

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

№ 1(48)
2020

Одеса
ОНУ
2020

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.urau.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

Завідувач редакцією Н. Г. Юргелайтіс
Редактори: Л. Б. Котлярова, І. В. Райко
Адреса редакції:
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2020

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: L. B. Kotlyarova, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 723-28-39,

e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

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

© Odesa National Mechnykov
University, 2020

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

| | |
|--|-----|
| І.В. Страшнова, Г.В. Ямборко, Н.Ю. Васильєва БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ ПІВДЕННОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ | 6 |
| М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук, В.О. Іваниця СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ, АМІНОКИСЛОТ ТА МОНОЦУКРИДІВ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>BACILLUS</i> , ВИДІЛЕНИХ З ДОННИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ | 20 |
| С.С. Декіна, І.І. Романовська, О.В. Севастьянов, Г.В. Мальцев АНАЛІЗ КОМПОНЕНТІВ ТАБЛЕТКОВИХ СУМІШЕЙ З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ЛІЗОЦИМОМ | 32 |
| О.Ю. Зінченко, Т.О. Філіпова, Л.Г. Клочко ОЦІНКА ПОТЕНЦІЙНОЇ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ N-БЕНЗИМІДАЗОЛ-СУЛЬФОАМІДУ НА МОДЕЛІ «ФАГ-БАКТЕРІЯ» | 48 |
| О.Г. Горшкова ОЦІНКА ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІЙ-ДЕСТРУКТОРІВ ВАЖКООКИСНЮВАЛЬНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК | 60 |
| Г.С. Лаврик, О.П. Корнійчук АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ ВІДНОСНО СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ З БІОПЛІВОК ХВОРИХ <i>ACNE VULGARIS</i> | 69 |
| І.В. Страшнова, І.О. Ковтун, Н.В. Коротасва ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ГУБОК ЧОРНОГО МОРЯ | 79 |
| ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ | 95 |
| АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2019 РОЦІ | 100 |

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

| | |
|--|-----|
| I.V. Strashnova, G.V. Yamborko, N.Yu. Vasylieva BIOLOGICAL ACTIVITY OF LACTOBACILLI FROM DIFFERENT ECOLOGICAL NICHES OF THE SOUTHERN REGION OF UKRAINE | 6 |
| M.D. Shtenikov, A.M. Ostapchuk, V.O. Ivanytsia COMPOSITION OF FATTY ACIDS, AMINO ACIDS AND MONOSACCHARIDES OF BACILLUS GENUS BACTERIA ISOLATED FROM THE BLACK SEA BOTTOM SEDIMENTS | 20 |
| S.S. Dekina, I.I. Romanovska, O.V. Sevastyanov, G.V. Maltsev ANALYSIS OF THE COMPONENTS OF TABLET MIXTURES WITH IMMOBILIZED LYSOZYME | 32 |
| O.Yu. Zinchenko, T.O. Philippova, L.G. Klochko EVALUATION OF POTENTIAL ANTIVIRAL ACTIVITY OF N-BENZIMIDAZOLE-SULFONAMIDE DERIVATIVES | 48 |
| O.G. Gorshkova ASSESSMENT OF PATHOGENIC PROPERTIES OF BACTERIA-DESTRUCTORS OF HEAVY-OXIDIZED ORGANIC COMPOUNDS | 60 |
| G.S. Lavryk, O.P. Korniychuk ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTOBACILLI AGAINST STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BIOFILMS FROM PATIENTS WITH ACNE VULGARIS | 69 |
| I.V. Strashnova, I.O. Kovtun, N.V. Korotaieva CHARACTERISTICS OF LACTIC ACID BACTERIA FROM THE BLACK SEASPONGES | 79 |
| INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS | 95 |
| ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL “MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” IN 2019 YEAR | 100 |

I.V. Strashnova, G.V. Yamborko, N.Yu. VasylievaOdesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: jamborkoann@ukr.net**BIOLOGICAL ACTIVITY OF LACTOBACILLI
FROM DIFFERENT ECOLOGICAL NICHES OF THE
SOUTHERN REGION OF UKRAINE**

***Aim** of the research was to study the antagonistic activity of lactobacilli isolated from different sources of the Southern region of Ukraine. **Methods.** The experiments used 13 strains of bacteria of the genus *Lactobacillus* isolated from different sources. The antagonistic activity of lactobacilli was determined by the well-diffusion method in the agar column using test cultures of pro- and eukaryotic microorganisms. Acid formation of the strains was evaluated by active and titrated acidity when cultured in milk. **Results.** All tested lactobacilli were active antagonists against gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* and *Proteus vulgaris*, as well against gram-positive *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus*. Lactobacilli showed less antagonistic activity against *Bacillus subtilis* and *Klebsiella pneumoniae*. Lactobacilli isolated from meat (*Lactobacillus* spp. M2 and M3) were the most active antagonists. The active and titrated acidity of lactobacilli varied for different strains. Strain *Lactobacillus* sp. 175 isolated from child feces showed the highest titrated acidity. Using statistical methods (cluster analysis) made it possible to form clusters with high reliability by the level of antagonistic activity of investigated lactobacilli. The environmental factors have a definite influence on the formation of the general activity of lactobacilli strains, but the manifestation of each of the individual features is rather specific and depends on the capabilities of the certain microorganism. **Conclusions.** In the study of a number of properties that determine the antagonistic activity, five strains (*Lactobacillus* spp. O1, B4, 175, M2 and M3) have been selected. They can be recommended for further researches for creation of probiotic preparation and functional foods.*

Key words: lactobacilli, antagonistic activity, acid-producing activity, clustering.

The total number of lactic acid bacteria in the biosphere is steadily increasing. They inhabit various natural substrates and can build symbiotic relationships in the digestive tract of worms, insects, fish, domestic and wild birds, mammals and humans. In recent years, there is a large number of scientific works devoted to the study of biological properties, taxonomy, classification and identification of lactic acid bacteria isolated from various ecological niches [13, 17, 18]. Today the search for new probiotic strains is still on going despite the widespread popularity of prophylactic and therapeutic probiotics [16]. The effectiveness of probiotic above all depends on the properties of the bacterial strains. The list of probiotic



microorganisms that can positively affect various aspects of the macroorganism's functional state is quite numerous. Among them representatives of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are the most studied [6, 14], as well as the certain strains of some *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* and *Saccharomyces* [12]. Since lactobacilli are one of the main microorganisms of the human body, study of their biological properties, and the antagonistic activity against pathogens and opportunistic pathogens, is one of the main criteria for their selection for the creation of probiotics.

Today at the modern market there is a large number of domestic and imported products based on lactobacilli for the correction of human microbiota. However, it is well known that use of microorganisms from specific ecological region for the maintenance of a normal level of metabolic processes and immunological reactivity of a macroorganism is required. Therefore, the selection of biologically active lactobacilli strains from ecological niches of the southern region of Ukraine is necessary for the creation of effective biological products and biological preparations of functional nutrition for the inhabitants of this ecological and geographical zone. The aim of our work was to study the antagonistic properties of *Lactobacillus* strains isolated from different sources.

Material and methods

Bacterial strains

Totally 13 strains of lactobacilli isolated from different sources were used in experiments: from auto-fermenting vegetables (*Lactobacillus sp.* B1, B3, B4, B5, B6, O1); from raw meat material (*Lactobacillus sp.* M1, M2, M3, M6); from feces of healthy children (*Lactobacillus sp.* 146, 275, 175).

Antagonistic activity

The antagonistic activity of lactobacilli was determined by the agar well diffusion method [4]. Yeast and bacteria strains were used as the test cultures: *Candida albicans* ONU 415, *C. utilis* ONU 413, *Escherichia coli* ONU 90, *Bacillus subtilis* ONU 24, *Pseudomonas aeruginosa* ONU 211, *Staphylococcus aureus* ONU 223, *Staphylococcus saprophyticus* ONU 537 M2, *Salmonella enteritidis* ONU 466, *Klebsiella pneumoniae* ONU 463 and *Proteus vulgaris* ONU 92. Test cultures were obtained from the Collection of microorganisms of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of Odesa I.I. Mechnykov National University.

Acid-producing activity

Acid production of the strains was evaluated as active and titratable acidity during cultivation in sterile skimmed milk [5]. The ability of the bacterial cultures to ferment milk and form a clot was studied. Acidity of milk was determined by the titrimetric method and expressed in Turner's degrees (°T).

Statistical analyses

The study was conducted in triplicates. Statistical analysis of the results were performed using Excel and free software environment R 3.4.0. Values were reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM). The Wilcoxon's test was used during the comparative analysis of the results. The degree of uniformity of indicators within the group was determined using the non-parametric Kruskal-Wallis test. Kruskal-Wallis test by rank is a non-parametric alternative to one-way ANOVA



test, which extends the two-samples Wilcoxon test in the situation where there are more than two groups. It's recommended when the assumptions of one-way ANOVA test are not met. The p-value < 0.05 was considered as statistically significant [7, 11].

Results and discussion

The perspective direction of microbiology and biotechnology is the search for new active strains among lactic acid bacteria for the production of probiotics and products of functional nutrition [1, 3, 6]. The antagonistic activity of lactobacilli is one of the main requirements for bacterial strains – candidates in probiotics. The study of this feature for 13 lactobacilli strains isolated from different sources showed that they were all antagonists against yeast and bacteria strains at different levels (Fig. 1).

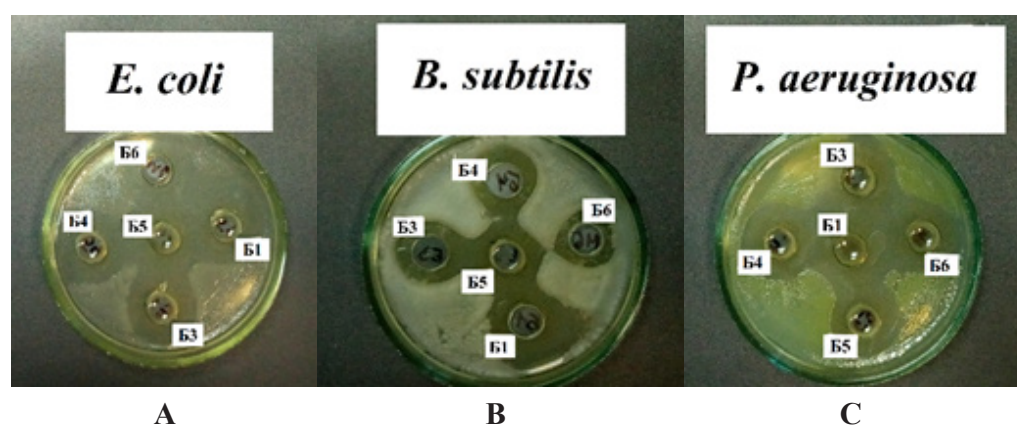


Fig. 1. The most sensitive test cultures to lactobacilli isolated from auto-fermenting vegetables: A – test-culture *E. coli* ONU 90; B – test-culture *B. subtilis* ONU 24; C – test-culture *P. aeruginosa* ONU 211

The major antagonistic activity of lactobacilli was observed against prokaryotic microorganisms. It was expressed in a greater number of strains-antagonists and in the sizes of growth inhibition zones of indicator strains (Fig. 1). *S. saprophyticus* ONU 537 M2 was most sensitive to metabolites of lactobacilli. Its growth was suppressed by all examined strains, and the diameter of growth inhibition zones was greater than 25 mm in almost all cases. Lactobacilli were found less active for the test-cultures *B. subtilis* and *K. pneumonia*. Only strains isolated from raw meat material (*Lactobacillus* sp. M1, M2, M3 and M6) showed antagonistic activity for *B. subtilis*. The greatest antagonistic activity was observed by strain *Lactobacillus* sp. M6; the diameter of growth inhibition zones of *B. subtilis* reached 23.0 ± 2.31 mm. *K. pneumoniae* ONU 463 was the most resistant to metabolites of lactobacilli. Its growth was suppressed by only 5 lactobacilli strains (isolated from different sources), and the diameter of growth inhibition zones did not exceed 25 mm. *Lactobacillus* sp. 175 was the most active antagonist for *K. pneumonia* (growth inhibition zones was 22.0 ± 1.21 mm).

Such relative resistance of *K. pneumoniae* and *B. subtilis* to lactobacilli antagonistic metabolites can be partly explained by the ability to form resistance factors such as the polysaccharide capsule (for *K. pneumoniae*) and endospores (for *B. subtilis*).

Data in literature on the impact of lactobacilli to *K. pneumoniae* and *B. subtilis* are quite controversial [3, 10].

The high resistance of eukaryotic microorganisms of the genus *Candida* to the metabolites of lactobacilli is known from the publications of many researchers of lactic acid bacteria [8, 9, 14].

The studies have found that the representatives of the genus *Candida* were resistant to the action of lactobacilli inhibitory substances (Table 1). The growth of *C. albicans* was suppressed by only 4 strains of *Lactobacillus*, three of which were isolated from raw meat materials. Growth of *C. utilis* was suppressed by 7 lactobacilli strains from auto-fermenting vegetables (*Lactobacillus spp.* B1, B5, O1), raw meat material (*Lactobacillus sp.* M2) and feces of children (*Lactobacillus spp.* 146, 275, 175). *Lactobacillus sp.* B4 was the most active against *C. albicans*, *Lactobacillus sp.* B1 against *C. utilis*, the diameters of growth inhibition zones were 25.0 ± 1.14 mm and 26.0 ± 1.13 , respectively.

In the literature there are data on the dependence of the manifestation of the antagonistic activity of lactobacilli on the source of isolation. Thus, in the work of Vasilyuk O.M. with co-authors (2014) it was found that *L. plantarum* strains isolated from fermented milk products are antagonistically more active against opportunistic pathogenic microorganisms than strains isolated from fermented vegetables. In this case, *L. plantarum* strains from fermented vegetables are the best antagonists of phytopathogens [3].

In the work of Mezaini A. et al. (2009) also have affirmative data on the effect of the source of isolation on the antagonistic activity of lactobacilli [15]. In other works, for example, Bissenova N.M. and others (2007) found no effect of the source of lactobacilli isolation on the manifestation of antagonistic activity; all strains were highly antagonistically active [2].

According to the results of the cluster analysis, it has been shown that the most sensitive to the action of the investigated lactobacilli strains was *S. saprophyticus* ONU 537 M2. The following indicator strains – *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. aureus* and *P. vulgaris* – share the same cluster with *S. saprophyticus* ONU 537 M2 (Fig. 2).

Indicator strains *B. subtilis*, *C. albicans*, *K. pneumonia* and *C. utilis* belong to a different cluster (Fig. 2) depending on the levels of resistance to the metabolites of lactobacilli. Indicators of probability are given at each internal node of the dendrogram and confirm the authenticity of the formed group. The results of the cluster analysis conducted to group the investigated lactobacilli by their total antagonistic activity are shown at the figure 3.

Obviously, all the examined strains were grouped in two clusters, and the second cluster has two subcluster. It should be noted that to the first cluster with high probability (values are indicated at each internal node) belong strains isolated from the raw meat material (*Lactobacillus spp.* M3, M6, M1, M2), which revealed to be the most active against *B. subtilis*, *K. pneumonia* and partially to *Candida sp.*



Table 1
Antagonistic activity of the investigated lactobacilli against yeast and opportunistic test-cultures

| Strains of the investigated lactobacilli | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. saprophyticus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. utilis</i> | <i>P. aeuruginisa</i> | <i>S. enteritidis</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. vulgaris</i> | <i>E. coli</i> |
|--|--------------------|------------------|-------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| 175 | 0.0±0.00 | 20.6±2.01 | 30.9±3.02 | 0.0±0.00 | 19.6±1.91 | 21.6±2.11 | 23.7±2.31 | 22.6±1.21 | 20.6±1.01 | 23.7±2.31 |
| 275 | 0.0±0.00 | 22.7±2.35 | 33.1±1.42 | 0.0±0.00 | 21.7±1.25 | 24.8±1.45 | 23.8±1.12 | 0.0±0.00 | 20.7±2.14 | 23.8±1.46 |
| 146 | 0.0±0.00 | 22.4±2.01 | 34.7±1.15 | 0.0±0.00 | 17.4±1.57 | 19.4±1.76 | 22.4±2.04 | 0.0±0.00 | 19.3±0.76 | 18.4±1.67 |
| O1 | 0.0±0.00 | 20.5±1.98 | 31.7±1.06 | 0.0±0.00 | 18.4±0.78 | 22.5±1.18 | 25.6±1.47 | 20.5±0.98 | 19.4±0.88 | 21.5±1.08 |
| B1 | 0.0±0.00 | 23.9±1.27 | 34.3±1.26 | 0.0±0.00 | 26.0±1.13 | 25.0±1.17 | 20.8±0.97 | 0.0±0.00 | 18.7±0.78 | 29.1±1.76 |
| B3 | 0.0±0.00 | 23.5±1.79 | 26.6±1.29 | 0.0±0.00 | 0.0±0.00 | 22.5±0.93 | 23.5±1.58 | 18.4±1.02 | 19.4±1.58 | 23.5±1.02 |
| B4 | 0.0±0.00 | 31.0±2.57 | 28.9±2.40 | 25.0±1.14 | 0.0±0.00 | 20.7±1.71 | 21.7±1.80 | 0.0±0.00 | 19.6±1.63 | 32.0±2.66 |
| B5 | 0.0±0.00 | 23.5±1.77 | 22.5±1.70 | 0.0±0.00 | 19.4±1.46 | 26.6±2.00 | 20.5±1.54 | 21.5±1.62 | 18.4±1.39 | 32.7±2.46 |
| B6 | 0.0±0.00 | 24.3±1.93 | 21.3±1.69 | 0.0±0.00 | 0.0±0.00 | 23.3±1.85 | 19.3±1.53 | 0.0±0.00 | 19.3±1.53 | 26.3±1.09 |
| M1 | 21.5±1.35 | 23.5±1.48 | 29.6±1.87 | 0.0±0.00 | 0.0±0.00 | 24.5±1.54 | 25.6±1.61 | 0.0±0.00 | 21.5±1.35 | 24.5±1.54 |
| M2 | 20.5±1.46 | 23.6±1.67 | 29.8±2.11 | 21.6±1.53 | 20.5±1.46 | 24.6±1.75 | 21.6±1.53 | 0.0±0.00 | 23.6±1.67 | 21.6±1.53 |
| M3 | 21.4±1.71 | 22.4±1.80 | 27.5±2.20 | 22.4±1.80 | 0.0±0.00 | 23.5±1.88 | 23.5±1.88 | 20.4±1.63 | 22.4±1.80 | 21.4±1.71 |
| M6 | 22.4±1.74 | 23.4±1.82 | 31.6±1.45 | 20.4±1.58 | 0.0±0.00 | 22.4±1.74 | 23.4±1.82 | 20.4±1.58 | 22.4±1.74 | 21.4±1.66 |

Notes: p ≤ 0.05.



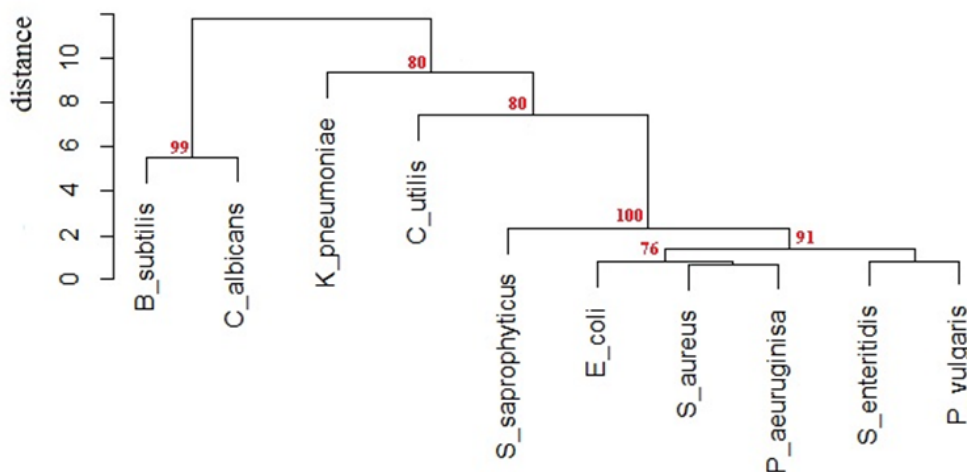


Fig. 2. Dendrogram of the clustering results of the indicator strains that resistance to the investigated lactobacilli. Note: clustering of data was performed using the function pvclust at nboot = 1000 (distance matrix – method "canberra", mode of "aggregation" – method "complete")

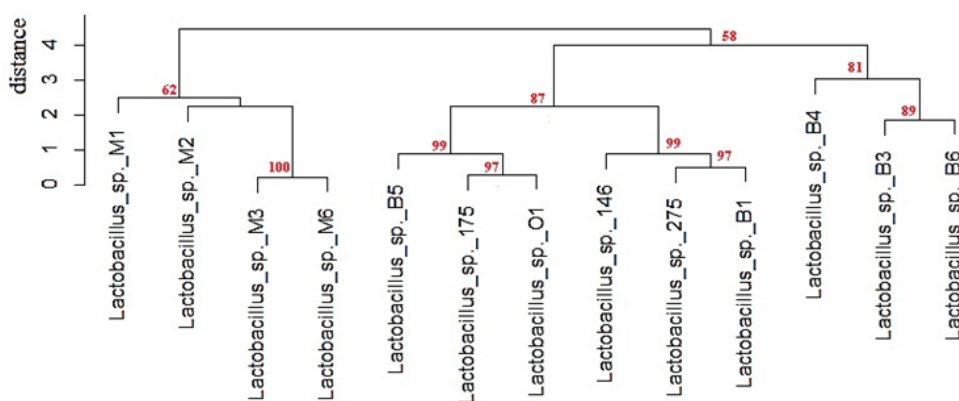


Fig. 3. Dendrogram of the clustering results on the levels of antagonistic activity of investigated lactobacilli. Note: clustering of data was performed using the function pvclust at nboot = 1000 (distance matrix – method "canberra", mode of "aggregation" – method "complete")

Similarly, the first subcluster of the second cluster includes lactobacilli isolated from auto-fermenting vegetables (*Lactobacillus spp.* B4, B3, B6). The second subcluster contains strains isolated from auto-fermenting vegetables (*Lactobacillus spp.* B5, B1, O1) and children feces (*Lactobacillus spp.* 146, 275, 175).

As was been shown the level of antagonistic activity depends on the strain and possibly depends on the strain's place isolation. So, result of ANOVA, carried out using Kruskal-Wallis test, corresponded to 28.8 at $p = 0.0042$, which indicates the heterogeneity of the studied parameter. However, at the same time, a similar analysis conducted on the basis strain's place isolation showed a much lower degree of heterogeneity of the studied parameter. In accordance with the results

obtained, the values of the criterion indicated an alternative hypothesis only for a sample formed from strains isolated from auto-fermenting vegetables (KW=11,26, p=0,043). The other two samples (“raw meat material” and “children feces”) that were formed on the basis of the grouping characteristic “place of isolation” were characterized by more homogeneity of the indicator of antagonistic activity in relation to yeast and opportunistic test-strains – KW= 6.59 (p=0.086) and KW =4.35 (p=0.113), respectively.

As was shown, when performing an equal analysis on the levels of antagonistic activity between samples, in general, the tested indicators are similar to each other in terms of the level of influence on yeast and conditionally pathogenic test strains (Table 2).

Table 2
Comparison of antagonistic activity of investigated samples of lactobacilli formed on the basis of the grouping characteristic “place of isolation” according to the Wilcoxon criteria

| Wilcoxon criteria | Auto-fermenting vegetables | Raw meat material | Children feces |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Auto-fermenting vegetables | W = 174, p = 1.0 | W = 99, p = 0.18 | W = 84, p = 0.75 |
| Raw meat material | W = 99, p = 0.18 | W = 80, p = 1.0 | W = 74, p = 0.094 |
| Children feces | W = 84, p = 0.75 | W = 74, p = 0.094 | W = 45, p = 1.0 |

The antagonistic activity of lactic acid bacteria is due, first of all, to the production of organic acids that have bactericidal action, and, in addition, reduce the pH of the environment, which is unfavorable to many types of microorganisms. The determination of activity of acid producing is an important characteristic of probiotic lactobacilli strains of the definition of active and titratable acidity of 72-hour lactobacilli cultures showed that these indices were diverged for different strains (Table 3).

The titratable acidity levels varied from 39.67 ± 1.31 °T to 168.33 ± 0.65 °T. The highest titratable acidity levels were marked for *Lactobacillus sp.* 175 and B1 (168.33 ± 0.65 and 166.33 ± 0.65 °T, respectively). The least acid-producing ability was demonstrated by *Lactobacillus spp.* 275, O1, M1 and M6. The clots forming these strains were dense and homogeneous; *Lactobacillus sp.* M4 formed a loose clot.

The ANOVA by Kruskal-Wallis has confirmed that the investigated lactobacilli strains were formed in two independent groups on the basis of their acid-producing activity (Fig. 4).

As shown on the data presented in Figure 4, the indicators of the level of active acidity of investigated lactobacilli were heterogeneous (KW=35.79, p-value = 0.000349). However, when we analyzed samples conducted on the basis strain's place isolation were shown that strains isolated from auto-fermenting vegetables (KW=8.31, p-value = 0.13) and children feces (KW=5.6, p-value = 0.061) practically do not differ among themselves in the level of active acidity and form homogeneous groups. The Wilcoxon criterion confirms the similarity of indexes in the level active acid-forming activity between these groups (W = 43.5, p-value = 0.13).



Table 3

Acid-producing ability of the investigated lactobacilli

| <i>Lactobacillus</i> strains | Active acidity, pH | Titratable acidity, °T |
|------------------------------|--------------------|------------------------|
| B3 | 4.55 | 146.00±1.13 |
| B4 | 4.68 | 154.67±1.31 |
| M3 | 4.68 | 157.67±1.31 |
| B6 | 4.69 | 151.67±1.31 |
| B5 | 4.70 | 158.00±1.13 |
| M2 | 4.70 | 148.33±0.65 |
| B1 | 4.73 | 166.33±0.65 |
| 175 | 4.76 | 168.33±0.65 |
| M6 | 6.01 | 48.7±1.13 |
| O1 | 6.02 | 39.67±1.31 |
| 275 | 6.02 | 54.33±0.65 |
| 146 | 6.04 | 43.00±1.13 |
| M1 | 6.04 | 42.33±0.65 |

Note: $p \leq 0.05$.

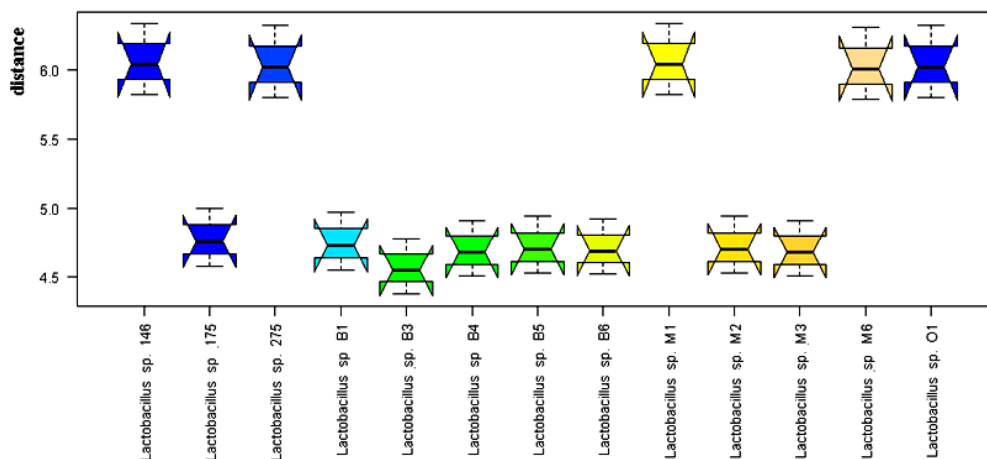


Fig. 4. Results of the one-factor dispersion analysis on the basis of the active acid-forming activity of the examined strains (Kruskal-Wallis chi-squared = 35.79, df = 12, p-value = 0.000349). Note: the boxplot lists the minimum values of active acidity, the value of the first quartile (Q1), the median, the value of the third quartile (Q3), the maximal values of the active acidity

Strains isolated from meat were more heterogeneous in active acid-forming activity regard (KW=8.53, p-value = 0.03).

During charting a binary dendrogram based on the parameters of antagonistic activity and the ability to active acid production, it was observed that *Lactobacillus spp.* M6, M1, B4, B1 and B5 formed a coupled lines between the vertices of both trees, which could serve as an indirect proof of the relationship between these indices for the listed strains (Fig. 5).



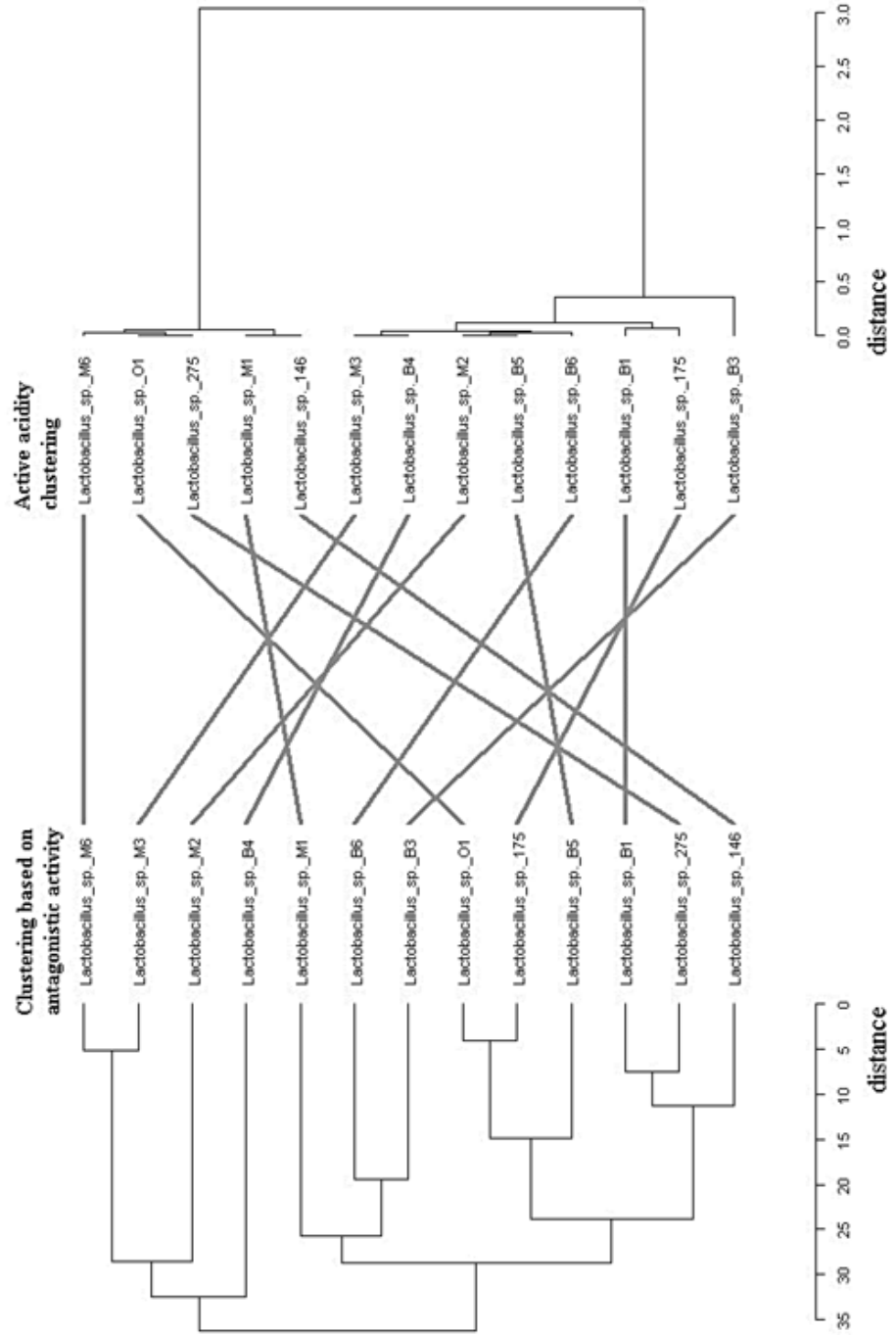


Fig. 5. Binary dendrogram illustrating the trees topology constructed on the basis of the results of clustering of the parameters of antagonistic activity and ability to active acid formation (distance matrix – "canberra", mode of aggregation – "complete")



Quite interesting is the fact that the connection between the level of antagonistic activity and the level of acid formation was found only for the strains isolated from raw meat materials and self-fermenting vegetables.

So, antagonistic properties of 13 lactobacilli isolated from different ecological niches have been investigated. Lactobacilli strains have been shown to inhibited the growth of pro- and eukaryotic microorganisms in different level. At the same time, the quantitative indicators of the synthesis of organic acids were different and depended on the certain strain. The levels of the studied abilities depended on the strain origin. During the cluster analysis of the set of investigated lactobacilli features has been revealed that the trend of grouping of the strains depending on their primary source of isolation. Thus, in the study of a number of properties that determine antagonistic activity, five lactobacilli (*Lactobacillus* spp. O1, B4, 175, M2 and M3) have been selected. They can be recommended for further researches for creation of probiotic preparation and functional foods.

І.В. Страшнова, Г.В. Ямборко, Н.Ю. Васильєва

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, 65082, Україна,
e-mail: jamborkoann@ukr.net

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ ПІВДЕННОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ

Реферат

Метою дослідження було вивчення антагоністичної активності лактобацил, виділених з різних джерел Південного регіону України. **Методи.** В експериментах використано 13 штамів бактерій роду *Lactobacillus*. Антагоністичну активність лактобацил визначали лунково-дифузійним методом в товщі агару, використовуючи тест-культури про-і еукаріотних мікроорганізмів. Кислотоутворення штамів оцінювали за активною та титрованою кислотністю при культивуванні в молоці. **Результати.** Усі досліджені лактобактерії були активними антагоністами грамнегативних (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* і *Proteus vulgaris*), а також грампозитивних (*Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus saprophyticus*) бактерій. Лактобактерії виявляли меншу антагоністичну активність щодо *Vacillus subtilis* та *Klebsiella pneumoniae*. Найбільш активними антагоністами були лактобактерії, виділені з м'яса (*Lactobacillus* spp. M2 і M3). Активна і титрована кислотність лактобацил варіювала для різних штамів. Штам *Lactobacillus* sp. 175, виділений з фекалій дітей, характеризувався найвищою титрованою кислотністю. Використання статистичних методів (кластерний аналіз) дозволило сформувати кластери з високою вірогідністю за рівнем антагоністичної активності досліджуваних лактобактерій. Фактори навколишнього середовища мають певний вплив на формування загальної активності штамів лактобактерій, але прояв кожної з окремих особливостей є досить специфічним і залежить від особливостей певного мікроорганізму. **Висновки.** При дослідженні низки властивостей, що визначають антагоністичну активність, було відібрано п'ять штамів лактобактерій



(*Lactobacillus* spp. O1, B4, 175, M2 та M3). Вони можуть бути рекомендовані для подальших досліджень для створення пробіотичного препарату та функціональних продуктів харчування.

Ключові слова: лактобактерії, антагоністична активність, кислототворна активність, кластеризація.

І.В. Страшнова, А.В. Ямборко, Н.Ю. Васильєва

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, 65082, Украина,
e-mail: jamborkoann@ukr.net

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ НИШ ЮЖНОГО РЕГИОНА УКРАИНЫ

Реферат

Целью исследования было изучение антагонистической активности лактобацилл, выделенных из различных источников Южного региона Украины. **Методы.** В экспериментах использовано 13 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. Антагонистическую активность лактобацилл определяли луночно-диффузным методом в толще агара, используя тест-культуры про- и эукариотических микроорганизмов. Кислообразование штаммов оценивали по изучению активной и титруемой кислотности при культивировании в молоке. **Результаты.** Все исследованные лактобактерии были активными антагонистами грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* и *Proteus vulgaris*), а также грамположительных (*Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus saprophyticus*) бактерий. Лактобактерии проявляли меньшую антагонистическую активность в отношении *Bacillus subtilis* и *Klebsiella pneumoniae*. Наиболее активными антагонистами были лактобактерии, выделенные из мяса (*Lactobacillus* spp. M2 и M3). Активная и титруемая кислотность лактобацилл варьировала для разных штаммов. Штамм *Lactobacillus* sp. 175, выделенный из фекалий детей, характеризовался наибольшей титруемой кислотностью. Использование статистических методов (кластерный анализ) позволило сформировать кластеры с высокой вероятностью по уровню антагонистической активности исследуемых лактобактерий. Факторы окружающей среды оказывают определенное влияние на формирование общей активности штаммов лактобактерий, но проявление каждой из отдельных особенностей является достаточно специфическим и зависит от особенностей определенного микроорганизма. **Выводы.** При исследовании ряда свойств, определяющих антагонистическую активность, были отобраны пять штаммов лактобактерий (*Lactobacillus* spp. O1, B4, 175, M2 и M3). Они могут быть рекомендованы для дальнейших исследований для создания пробиотического препарата и функциональных продуктов питания.

Ключевые слова: лактобактерии, антагонистическая активность, кислотообразующая активность, кластеризация.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Анисимова Е.А., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н. Антагонистическая активность лактобацилл, выделенных из природных эконисш // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 6. – С. 696–702.
2. Бисенова Н.М., Алмагамбетов К.Х., Кушугулова А.Р., Оралбаева С.С. и др. Характеристика антагонистических и кислотообразующих свойств *Lactobacillus casei* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 2. – С. 84–87.
3. Василюк О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т. 76, № 3. – С. 24–30.
4. Иркитова А.И., Качан Я.Р., Соколова Г.Г. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия Алтайского государственного университета. – 2012. – Т. 3, № 1. – С. 41–44.
5. Креть Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2000. – 386 с.
6. Полтавська О.А., Коваленко Н.К., Успенський І.Г. Скринінг штамів молочнокислих бактерій та біфідобактерій за пробіотичними властивостями // Мікробіологія і біотехнологія. – 2011. – 1 (13). – С. 6–16.
7. Сиделев С.И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию: Учебное пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2012. – 140 с.
8. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А. и др. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 2 (2). – С. 462–468.
9. Туякова А.К., Нагызбеккызы Э., Абитаева Г.К. и др. Изучение пробиотических свойств новых штаммов лактобактерий // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2013. – № 4. – С. 55–58.
10. Червинец Ю.В., Червинец В.М., Самоукина А.М., Михайлова Е.С. Антагонистическая активность пробиотических штаммов // Успехи современного естествознания. – 2009. – № 2. – С. 73–73.
11. Dalgaard P. Introductory Statistics with R. – Springer Science. – 2008. – 370 p.
12. Floch H.M., Walker W.A., Sanders M.E. Recommendations for Probiotic Use // Journal of Clinical Gastroenterology. – 2006. – 45 (3). – P. 168–171.
13. Garmasheva I.L., Vasyliuk O.M., Kovalenko N.K., Ostapchuk A.M., Oleshchenko L.T. Intraspecies cellular fatty acids heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented foods in Ukraine // Letters in Applied Microbiology. – 2015. – 61. – P. 283–292.
14. Georgieva R., Yocheva L., Tserovska L. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2015. – 29 (1). – P. 84–91.
15. Mezaini A., Chihib N.E., Bouras A.D., Nedjar-Arroume N., Hornez J.P.



Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product // *J. Environ. Public Health.* – 2009. – P. 678495–678496.

16. *Ohland C.L., Macnaughton W.K.* Probiotic bacteria and pontestinal epithelial barrier function // *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology.* – 2010. – 6 (298). – P. 807–819.

17. *Pidgorskyi V.S., Kovalenko N.K., Garmasheva I.L.* Taxonomic research, biological properties and biosynthetic activity of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from various natural ecological niches // *Mikrobiolohichniy Zhurnal.* – 2016. – 78 (6). – P. 8–18.

18. *Zheng J., Ruan L., Sun M., Ganzle M.A.* Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2015. – 81 (20). – P. 7233–7243.

References

1. Anisimova EA, Yarullina DR, Il'inskaya ON. Antagonistic activity of lactobacilli isolated from natural ecosystems. *Microbiology.* 2017; 86 (6): 696-702. (in Russian)

2. Bisenova NM, Almagambetov K. Kh, Kushugulova AR, Oralbayeva SS et al. Characterization of antagonistic and acid-forming properties of *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2007; 2: 84-87. (in Russian)

3. Vasilyuk OM, Kovalenko NK, Garmasheva IL. The antagonistic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional fermented products of Ukraine. *Microbiological Journal.* 2014; 76 (3): 24-30. (in Ukrainian)

4. Irkitova AI, Kachan YaR, Sokolova GG Comparative analysis of methods for determining the antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Izvestiya of the Altai State University.* 2012; 3 (1): 41-44. (in Russian)

5. Krus GN, Shalygina AM, Volokitina ZV. Methods for the study of milk and dairy products. M.: Kolos, 2000:386 (in Russian)

6. Poltavskaya OA, Kovalenko NK, Uspensky IG. Screening of strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria by probiotic properties. *Microbiology and Biotechnology.* 2011;1 (13): 6-16. (in Ukrainian)

7. Sidelev SI. *Mathematical Methods in Biology and Ecology: Introduction to Elementary Biometrics: Textbook.* Yaroslavl: Yaroslavl State Universitet. 2012:140. (in Russian)

8. Solovyeva IV, Tochilina AG, Novikova NA et al. Study of the biological properties of new strains of the genus *Lactobacillus*. *Bulletin of the Nizhny Novgorod University. N.I. Lobachevsky.* 2010; 2 (2): 462-468. (in Russian)

9. Tuyakova AK, Nagyzbekkyzy E, Abitaeva GK et al. Study of the probiotic properties of new strains of lactobacilli. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* 2013; 4: 55-58. (in Russian)

10. Chervynets YuV, Chervinets VM, Samoukina AM, Mikhailova ES. Antagonistic activity of probiotic strains. *Successes in Modern Natural History.* 2009; 2: 73-75. (in Russian)

11. Dalgaard P. *Introductory Statistics with R.* Springer Science, 2008: 370.



12. Floch HM, Walker WA, Sanders ME. Recommendations for Probiotic Use. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2006; 45 (3): 168-171.

13. Garmasheva IL, Vasyliuk OM, Kovalenko NK, Ostapchuk AM, Oleshchenko LT. Intraspecies cellular fatty acids heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented foods in Ukraine. *Letters in Applied Microbiology*. 2015;61: 283-292.

14. Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015; 29 (1): 84-91.

15. Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, Nedjar-Arroume N, Hornez JP. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. *J. Environ. Public Health*. 2009: 678495-678496.

16. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and pontestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010; 6 (298): 807-819.

17. Pidgorskyi VS, Kovalenko NK, Garmasheva IL. Taxonomic research, biological properties and biosynthetic activity of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from various natural ecological niches. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2016; 78 (6): 8-18.

18. Zheng J, Ruan L, Sun M, Ganzle MA. Genomic View of *Lactobacilli* and *Pediococci* Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015; 81 (20): 7233-7243.

Стаття надійшла до редакції 14.04.2020 р.



UDC 579.222.6

М.Д. Штеніков, А.М. Остапчук, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: shtenikovnik@gmail.com

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ, АМІНОКИСЛОТ ТА МОНОСАХАРИДІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *VACILLUS*, ВИДІЛЕНИХ З ДОННИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ

Метою роботи було визначити кількісний та якісний склад жирних кислот, амінокислот та моносахаридів антагоністично активних споротвірних бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря. **Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були антагоністично активні бактерії *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, *Bacillus subtilis* ONU 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95. Склад жирних кислот визначали на газовому хроматографі з полум'яно-йонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), моноцукридів – методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA), амінокислот – на рідинному хроматографі Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). **Результати.** Виявлено характерні для досліджених штамів жирні кислоти: для штаму *B. velezensis* ONU 553 – 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH, для *B. subtilis* ONU 559 – 19:0 iso, 19:0 anteiso, для *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH, *B. pumilus* 95 – 15:1 iso w5c та 12:0. Амінокислотні патерни досліджених штамів не демонструють значущу кореляцію з патерном біоти океану, а штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. pumilus* 95 характерні для біоти піщаних ґрунтів. Крім характерних для бактерій групи *B. subtilis* моносахаридів виявлена арабіноза, багатоамтоні спирти – L-ідітол та міоїнозитол, функції яких у клітинах бацил не відомі. **Висновки.** Показники HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій, а *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 – для помірних термофілів. Результати досліджень підтримують гіпотезу про неавтохтонність досліджуваних бактерій для глибоководних донних відкладень Чорного моря.

Ключові слова: *Bacillus*, Чорне море, донні відкладення, жирні кислоти, амінокислоти, моносахариди.

Представники роду *Bacillus* являють собою об'єкт активного дослідження з самого зародження мікробіології як науки [9]. Це пов'язано як з різноманітністю екологічних ніш, які вони займають (від різних форм паразитизму до коменсалізму та мутуалізму), специфічною будовою (здатність до утворення ендоспор) та здатністю до синтезу широкого спектру біологічно активних вторинних метаболітів у тому числі антибіотиків [10, 12]. До антимикробних



сполук належать нерибосомні пептиди родин сурфактинів, ітуринів, фенгіцинів та курстакінів, аміноглікозидні антибіотики (бутирозин, неотрегалозодіамін) тощо [16]. Біосинтетичний потенціал бацил морського походження поки лишається мало вивченим. Є всі підстави очікувати розширення наших знань про біосинтетичний потенціал бацил саме завдяки морським штамам. Так, у представників роду *Bacillus* морського походження було виявлено антибіотики пептидної природи ряду нових класів (маріхізини, гагеостатини, бацилітетрини) та незвичайно модифіковані сполуки раніше відомих класів (наприклад, глікозильований макролактин W) [8].

Інформація про первинні метаболіти, такі як амінокислотний та вуглеводний склад, в літературі представлена значно менше і для ряду груп взагалі відсутня, не зважаючи на важливість таких даних як з погляду цитофізіології, так і потенціалу штамів як пробіотиків, що актуально зокрема і для бацил [9]. Ці показники характеризують дуже важливі для клітинної фізіології молекули – білки та поліцукриди, що робить їх також одним з інструментів поліфазного таксономічного аналізу [13].

У попередніх дослідженнях з глибоководних донних відкладень Чорного моря було ізольовано більше 100 штамів споротвірних факультативно-анаеробних бактерій, визначено їх таксономічний склад та антагоністичну активність до широкого спектру тест штамів [1, 15].

Метою роботи було проаналізувати кількісний та якісний склад жирних кислот, амінокислот та вуглеводів антагоністично активних споротвірних бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були антагоністично активні бактерії *Bacillus subtilis* ONU 553, *Bacillus megaterium* *Bacillus megaterium* ONU 554, *Bacillus* 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95, відібрані з колекції споротвірних факультативно-анаеробних бактерій, ізольованих з глибоководних донних відкладень Чорного моря [1]. Бактерії підтримували на середовищі Nutrient agar (Himedia).

Для досліджень використовували добову культуру, яку двічі пересівали на щільному живильному середовищі Tryptic Soy Agar (TSA). Визначення жирнокислотних спектрів (далі – ЖК-спектрів) виконували методом газової хроматографії, за стандартною методикою [14] з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-йонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Розділення проводили на капілярній колонці 30м×0,25мм×0,25мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носіє водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв.

Для визначення загального складу моносахаридів до зразку бактеріальної біомаси об'ємом у дві бактеріологічні петлі додавали 2 мл 2М трифтороцтової кислоти [7]. Гідроліз проводили при 100 °С впродовж 6 год. Гідролізат упарювали, промивали водою для видалення кислоти. Для отримання альдонітрильних похідних моносахаридів до екстракту додавали дериватизу-



вальну суміш (гідроксиламін солянокислий у метанолі). Розчинений екстракт витримували впродовж 25 хв при 75 °С. Після ацетилювання до реакційної суміші додавали 1 мл дихлорметану. Дихлорметановий шар відбирали, висушували досуха та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 v/v).

Моносахариди визначали методом газо-рідинної хромато-мас-спектрометрії на системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA), колонка капілярна HP-5ms (30m×0,25mm×0,25mkm). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкову температуру 160 °С витримували впродовж 8 хв, піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 240 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв. Пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38–400 m/z). Швидкість потоку газу носія через колонку 1,2 мл/хв. Ідентифікацію проводили за часом утримання стандартів моносахаридів та з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувані проби. Як внутрішній стандарт використовували розчин сорбітолу.

Для визначення загальної кількості амінокислот дві бактеріологічні петлі бактеріальної біомаси вносили до віали, додавали 2 мл водного розчину 6N соляної кислоти та поміщали в термостат при 110 °С [6]. Гідроліз проводили впродовж 24 год. Після чого 0,5 мл відцентрифугованого екстракту/гідролізату упарювали на роторному випаровувачі, тричі промиваючи дистильованою водою для видалення соляної кислоти. Ресуспендували в 0,5 мл дистильованої води та фільтрували крізь мембранні фільтри з регенованої целюлози з порами 0,2 мкм. Отримання флуоресцентних похідних проводили в автоматичному програмованому режимі перед введенням проби в хроматографічну колонку з використанням ОРА (orthophthalaldehyde) та FMOC (9-fluorenylmethyl chloroformate). Ідентифікацію амінокислот проводили шляхом порівняння часу утримання з стандартною сумішшю амінокислот (Agilent 5061-3334). Кількісна оцінка рангової кореляції між рядами спадання вмісту для амінокислот була виконана з використанням тесту Кендела, реалізованого в бібліотеці ScyPy мови програмування Python [2, 17].

Результати та їх обговорення

Отримані дані свідчать про те, що спектри жирних кислот досліджених штамів в цілому демонструють риси, характерні для представників роду *Bacillus* та групи видів *Bacillus subtilis*, зокрема. До даної групи, окрім вищезазначеного, входять такі види, як *Bacillus megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. mojavensis* тощо [9, 10]. Багато штамів даної групи є продуцентами різноманітних біологічно активних речовин, зокрема антибіотиків та бактеріоцинів. До ознак першої групи належить характерне для представників роду *Bacillus* переважання розгалужених жирних кислот із довжиною вуглецевого ланцюга від 14 до 17 атомів (табл. 1). До властивостей ЖК-спектрів, характерних для групи *Bacillus subtilis* входить різке переважання насичених жирних кислот над ненасиченими, яке наближається до 100% в деяких випадках, значення індексу теплової адаптації (heat



adaptation index – далі HAI), близькі до одиниці та значення a15/i15 між 1,0 та 3,0 [3]. Ознаки останньої групи були у випадку досліджених штамів проявлені так само чітко, як це зазвичай характерно для групи *Bacillus subtilis*. Ця обставина стане нижче предметом обговорення. Підрахунок HAI виконували за формулою [3]:

$$\text{HAI} = \frac{(n14:0) + p(n16:0) + p(i14:0) + p(i15:0) + p(i16:0) + p(i17:0)}{p(a15:0) + p(a17:0) + p(n16:1) + p(i17:1 (n - 10)) + p(16:1 \omega 7c \text{ alcohol})}$$

де р є часткою певної жирної кислоти.

Значення sim-індексів, що вказують на подібність отриманого жирно-кислотного спектру для такого у типового штаму даного виду, визначеного за стандартною методикою, для штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. subtilis* 559, виявилися досить високими для видової ідентифікації, тобто більшими за 0,500. Відповідні значення для *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 такої ідентифікації виконати не дозволяють через низьке значення різниці між альтернативними індексами (штам 11) чи значення менше за 0,5 (штам 95) (табл. 1). Підкреслимо, що формально індекси цих штамів є задовільними для видової ідентифікації як такої згідно з керівництвом виробника, але різниця між їх значеннями та запропонованими альтернативними індексами не перевищує 0,1. Значення Sim-індексу штаму *B. pumilus* 95 може вказувати на нетиповість даного штаму для виду *Bacillus pumilus*.

Показники HAI та a15/i15, що є оцінкою термофільності даного штаму і були розроблені саме для представників роду *Bacillus*, були розраховані за формулами, запропонованими Diomandé et al. [3]. Їх значення інтерпретуються таким чином: якщо HAI штаму приймає значення близьке до одиниці, то штам мезофільний; якщо він більший чи менший, то, штам ідентифікується, відповідно, як термофільний та психрофільний. Аналогічно визначається коефіцієнт a15/i15: мезофільні штами мають значення між 1 та 3, термофільні та психрофільні – менші за 1 та більші за 3, відповідно.

Інтерпретуючи в такому ключі отримані дані, можна дійти висновку, що показники HAI та a15/i15 штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 характерні для мезофільних бактерій, а *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 демонструють набір ознак, характерних для помірних термофілів, тобто відносно високі значення HAI та низькі a15/i15 [3]. Температурні діапазони росту для досліджуваних штамів не визначалися, проте всі вони демонстрували задовільний ріст за інкубації при 30 °C.

Також можна відзначити унікальні для кожного зі штамів жирні кислоти – для штаму *B. velezensis* ONU 553 це 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH. Для штаму *B. pumilus* 554 таких жирних кислот не виявлено, для *B. subtilis* ONU 559 такими є 19:0 iso, 19:0 anteiso, для *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH і, відповідно, *B. pumilus* 95 – 15:1 isow5c та 12:0.

Порядок виявлених амінокислот по зниженню масової долі майже незмінний (табл. 2).



Таблиця 1

Спектри жирних кислот бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з Чорного моря

Table 1

Spectra of fatty acids of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from the Black Sea

| Жирна кислота | <i>Bacillus subtilis</i> ONU 553 | <i>Bacillus pumilus</i> ONU 554 | <i>Bacillus subtilis</i> ONU 559 | <i>Bacillus megaterium</i> 11 | <i>Bacillus pumilus</i> 95 |
|----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Sim-індекс | 0,812 | 0,655 | 0,846 | 0,516 | 0,484 |
| 15:0 anteiso | 37,16 | 42,69 | 36,5 | 34,66 | 36,29 |
| 15:0 iso | 25,47 | 42,89 | 22,75 | 45,8 | 41,16 |
| 17:0 iso | 10,16 | 2,09 | 13,79 | 5,17 | 5,18 |
| 17:0 anteiso | 8,6 | 4,81 | 12,95 | 6,16 | 7,41 |
| 16:00 | 3,81 | 0,9 | 2,19 | 1,38 | 1,27 |
| 16:0 iso | 2,97 | 1,59 | 2,89 | 2 | 2,08 |
| 17:1 iso w10c | 1,96 | 0,41 | 2,05 | 1,28 | 0,95 |
| 16:1 w11c | 1,63 | 0,33 | 0,88 | 0,52 | 0,36 |
| 17:1 iso w5c | 1,46 | 0,64 | 0 | 0 | 0,56 |
| 15:1 iso w5c | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,49 |
| 15:0 2OH | 0 | 0 | 0 | 0,05 | 0 |
| 14:0 iso | 1,22 | 0,7 | 0,8 | 0,69 | 0,64 |
| 14:00 | 0,91 | 0,49 | 0,3 | 0,39 | 0,45 |
| 16:1 w7c alcohol | 0,7 | 0,35 | 0,59 | 0,5 | 0,43 |
| 17:00 | 0,64 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13:0 anteiso | 0,36 | 0 | 0 | 0,04 | 0,45 |
| 14:0 anteiso | 0,27 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11:0 2OH | 0,24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15:1 w5c | 1,46 | 0,53 | 0,49 | 0 | 0 |
| 13:0 anteiso | 0 | 0,43 | 0,16 | 0 | 0 |
| 13:0 iso | 0 | 0,4 | 0,13 | 0,29 | 0,38 |
| 15:0 iso 3OH | 0 | 0,23 | 0 | 0,14 | 0,19 |
| 18:00 | 0 | 0 | 0,79 | 0 | 0,59 |
| 17:0 iso 3OH | 0 | 0 | 0,2 | 0,12 | 0,15 |
| 19:0 iso | 0 | 0 | 0,3 | 0 | 0 |
| 19:0 anteiso | 0 | 0 | 0,17 | 0 | 0 |
| 17:0 2OH | 0 | 0 | 0,14 | 0,08 | 0,12 |
| 12:00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,14 |
| 17:1 iso I/anteiso B | 0,99 | 0,52 | 1,91 | 0,73 | 0,72 |
| % C:15 | 0,63 | 0,86 | 0,59 | 0,80 | 0,77 |
| % насичених ЖК | 91,8 | 97,22 | 94,08 | 96,97 | 96,98 |
| a15/i15 | 1,46 | 0,995 | 1,60 | 0,76 | 0,88 |
| HA1 | 0,89 | 1,00 | 0,81 | 1,29 | 1,12 |
| SIM-індекс 1 | 0.812 | 0,655 | 0,846 | 0,516 | 0,484 |
| SIM-індекс 2 | - | 0,607 | - | 0,443 | 0,445 |



Таблиця 2

Амінокислотний склад бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з Чорного моря

Table 2

Amino acid composition of bacteria of the genus *Bacillus* isolated from the Black Sea

| <i>Bacillus velezensis</i> ONU 553 | % від загальної суми площ піків | <i>Bacillus pumilus</i> ONU 554 | % від загальної суми площ піків | <i>Bacillus subtilis</i> ONU 559 | % від загальної суми площ піків | <i>Bacillus megaterium</i> 11 | % від загальної суми площ піків | <i>Bacillus pumilus</i> 95 | % від загальної суми площ піків |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| L-Arg | 18,12 | Gly | 19,83 | L-Arg | 17,67 | Gly | 16,07 | Gly | 19,64 |
| Gly | 17,21 | L-Arg | 16,61 | Gly | 17,53 | L-Arg | 14,23 | L-Arg | 18,34 |
| L-Glu | 13,25 | L-Leu | 9,73 | L-Glu | 10,24 | L-Pro | 12,72 | L-Leu | 11,09 |
| L-Leu | 7,29 | L-Glu | 9,65 | L-Ala | 8,40 | L-Glu | 11,62 | L-Glu | 9,65 |
| L-Ala | 7,21 | L-Ala | 7,03 | L-Leu | 7,91 | L-Leu | 9,16 | L-Ala | 7,82 |
| L-Pro | 6,83 | L-Iso | 6,43 | L-His | 6,56 | L-Ala | 8,46 | L-Iso | 5,90 |
| L-Iso | 6,62 | L-His | 5,97 | L-Iso | 6,35 | L-Iso | 7,08 | L-Pro | 5,77 |
| L-Tyr | 4,88 | L-Tyr | 4,68 | L-Tyr | 4,89 | L-Tyr | 5,34 | L-Phe | 4,24 |
| L-His | 4,62 | L-Pro | 4,39 | L-Pro | 4,81 | L-Phe | 5,18 | L-Tyr | 4,04 |
| L-Phe | 3,94 | L-Phe | 4,09 | L-Phe | 3,92 | L-Val | 4,03 | L-His | 3,41 |
| L-Ser | 3,25 | L-Ser | 3,28 | L-Ser | 3,17 | L-Ser | 3,09 | L-Ser | 3,20 |
| L-Val | 3,12 | L-Val | 2,85 | L-Val | 2,86 | L-Asp | 3,02 | L-Val | 3,03 |
| L-Asp | 2,30 | L-Asp | 2,31 | L-Asp | 2,57 | L-His | - | L-Asp | 2,13 |
| L-Thr | 1,35 | L-Thr | 1,58 | L-Met | 1,71 | L-Thr | - | L-Thr | 1,75 |
| L-Met | - | L-Met | 1,57 | L-Thr | 1,42 | L-Met | - | L-Met | - |
| L-Lys | - | L-Lys | - | L-Lys | - | L-Lys | - | L-Lys | - |

В роботі Moura et al. [11] запропоновано цікавий метод аналізу амінокислотного складу для організмів різних біологічних ніш. Авторам вдалося виявити, що за розташування амінокислот за зниженням вмісту, організми різних біотопів демонструють певні сигнатури чи патерни чергування амінокислот у таких спектрах. Аналіз отриманих нами даних не виявив однозначної відповідності з жодним із запропонованих Moura патернів. Спостерігається певне наближення до інвертованого патерну, характерного для біоти піщаних ґрунтів (по зростанню кількості: аргінін-лізін-лейцин-аланін-аспарагін/аспартат), що може мати відношення до вихідного місця походження даних штамів. Також спостерігається, що компоненти патерну, характерного для організмів океану, групуються на початку відповідних переліків амінокислот, практично не відтворюючи досить цікавий саме в даному випадку мотив (по зростанню: аланін-триптофан-гліцин-глутамін/глутамат-лейцин).

Для об'єктивного порівняння порядків було використано тест рангової кореляції Кендела. Результати обрахування даного показника наведено у табл. 3.



Таблиця 3

Коефіцієнт рангової кореляції Кендела для наборів амінокислот дослідних штамів

Table 3

Kendall rank correlation coefficient values for the sets of amino acids of the studied strains

| Штам | А | | В | |
|------------------------------|--------|---------|--------|---------|
| | τ | p-value | τ | p-value |
| <i>B. velezensis</i> ONU 553 | 0,544 | 0,01 | 0,128 | 0,542 |
| <i>B. pumilus</i> ONU 554 | 0,544 | 0,01 | 0,032 | 0,879 |
| <i>B. subtilis</i> ONU 559 | 0,384 | 0,067 | 0,032 | 0,879 |
| <i>B. megaterium</i> 11 | 0,224 | 0,286 | -0,416 | 0,048 |
| <i>B. pumilus</i> 95 | 0,544 | 0,01 | 0,096 | 0,648 |

Примітка: Порівняння проведено за даними амінокислотного пулу: А – біоти піщаних ґрунтів [11], В – з даними біоти океану [11], τ – коефіцієнт кореляції Кендела. Значення τ вважається за значуще, якщо відповідне значення p-value менше за 0,05.

Note: comparison was conducted with the data of amino acid pool: А – of sandy soils biota [11], В – ocean biota data [11], τ – Kendall rank correlation coefficient. τ value considered meaningful, if corresponding p-value is less than 0.05.

Амінокислотні патерни штамів *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. pumilus* 95 демонструють значущу і пряму кореляцію з відповідним патерном біоти піщаних ґрунтів, в той час як їх кореляція з патерном океанічної біоти слабка і незначуща. Це можна інтерпретувати як свідчення на користь походження досліджуваних штамів з піщаних пляжів узбережжя Чорного моря.

Патерн штаму *B. megaterium* 11 демонструє обернену та значущу кореляцію з патерном біоти океану і не демонструє переконливої кореляції з патерном пісків. Такий результат важко піддається інтерпретації. Те ж стосується штаму *B. subtilis* ONU 559, патерн якого не корелює з жодним з запропонованих.

Вміст моносахаридів для досліджених бактерій носить в цілому очікуваний характер (табл. 4). Рибоза входить до складу РНК та у низки представників *Bacillus subtilis* до тейхоевих кислот, і цілком природно припустити її наявність у тій самій ролі у клітинних стінках штамів філогенетично близьких видів. Рамноза для бацил відома лише у складі ендоспор та її наявність у зразках усіх штамів, окрім *B. velezensis* ONU 553, може свідчити про початок процесу ендоспороутворення у бактерій. Цікавою в цьому контексті є відсутність рідкісного моносахариду хіновози, характерного для ендоспор *B. subtilis* та вегетативних форм деяких штамів цього виду [18]

Велика кількість глюкози зрозуміла з позицій її ролі в енергетичному обміні прокариот та зокрема фірмікут. Високий вміст галактози відомий для *Bacillus anthracis*, що відрізняє даний вид навіть з досить однорідної групи *B. cereus*. У невеликих кількостях, менших приблизно на два порядки за від-



повідні значення для глюкози, галактоза також давно відома як компонент клітин *Bacillus subtilis*, проте її точна локалізація та функція в клітині невідомі [18]. Арабіноза не відома як компонент клітин бацил та взагалі фірмікут. Серед прокариот вони відомі лише для актинобактерій як компоненти арабіногалактану [4, 5].

Таблиця 4

Склад маносахаридів бактерій роду *Bacillus*,
ізольованих з Чорного моря (% від загальної суми площ піків)

Table 4

Manosaccharide composition of bacteria of the genus *Bacillus*
isolated from the Black Sea (in % of the total peak area)

| Моноцукрид | <i>Bacillus subtilis</i> ONU 553 | <i>Bacillus pumilus</i> ONU 554 | <i>Bacillus subtilis</i> ONU 559 | <i>Bacillus megaterium</i> 11 | <i>Bacillus pumilus</i> 95 |
|-------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Арабіноза | 3,8210 | 4,8189 | 1,8306 | 1,2370 | 5,3184 |
| Галактоза | 2,6950 | 4,0278 | 5,7860 | 7,1885 | 3,9411 |
| Глюкоза | 53,7670 | 6,7654 | 37,0567 | 34,2136 | 8,4826 |
| Рамноза | 0 | 17,4851 | 1,7592 | 2,0270 | 12,3244 |
| Рибоза | 6,7820 | 0 | 1,1844 | 1,3568 | 3,3746 |
| L-ідітол | 5,7000 | 9,5021 | 8,2531 | 7,9936 | 12,6218 |
| Міоїнозитол | 0 | 3,6773 | 3,3938 | 2,2432 | 5,1889 |

У досліджених штамів виявлені також два багатоамтонних спирти – L-ідітол (у всіх штамів) та міоїнозитол (у всіх штамів, окрім *B. velezensis* ONU 553), у штаму *B. subtilis* ONU 559 – редукувальний дисахарид туранозу, у штамів *B. velezensis* ONU 553 та *B. pumilus* ONU 554 – глікозидсалірепін, а у штаму *B. megaterium* 11 – алкалоїд солазодин, однак ці результати потребують подальшого дослідження та аналізу.

Отже, можна зробити висновок, що за показниками HAI та a15/i15 штами *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 та *B. subtilis* ONU 559 можуть бути віднесені до мезофільних бактерій, а *B. megaterium* 11 та *B. pumilus* 95 – до помірних термофілів. Ці дані та характеристика амінокислотних спектрів досліджених штамів підтримують гіпотезу про алохтонність досліджуваних штамів для глибоководних донних відкладень Чорного моря.

Роботи з використанням хроматографічного обладнання були проведені в Центрі колективного користування унікальним науковим обладнанням при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, при технічному та методичному сприянні к.б.н. Хархоти Максима Андрійовича, за що висловлюємо йому щирю вдячність.



Н.Д. Штеніков, А.Н. Остапчук, В.О. Іваниця

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, АМИНОКИСЛОТ И МОНОСАХАРИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОСАДКОВ ЧОРНОГО МОРЯ

Реферат

Целью работы было определить количественный и качественный состав жирных кислот, аминокислот и углеводов антагонистически активных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*, изолированных из глубоководных донных осадков Черного моря. **Материалы и методы.** Объектом исследования были бактерии *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, *Bacillus subtilis* ONU 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95. Состав жирных кислот определяли на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), моносахаридов – методом газо-жидкостной хромато-мас-спектрометрии на Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA), аминокислот – на жидкостном хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). **Результаты.** Обнаружены характерные для исследованных штаммов жирные кислоты: для штамма *B. velezensis* ONU 553 – 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH, для *B. subtilis* ONU 559 – 19:0 iso, 19:0 anteiso, для *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH, *B. pumilus* 95 – 15:1 isow5c и 12:0. Аминокислотные паттерны исследованных штаммов не демонстрируют значимой корреляции с паттерном биоты океана, а у штаммов *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 и *B. pumilus* 95 характерны для биоты песчаных грунтов. Кроме характерных для бактерий группы *B. subtilis* углеводов обнаружена арабиноза, многоатомные спирты – L-идитол и миоинозитол, функции которых в клетках бацилл неизвестны. **Выводы.** Показатели HAI и a15/i15 штаммов *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 и *B. subtilis* ONU 559 характерны для умеренно мезофильных бактерий, а *B. megaterium* 11 и *B. pumilus* 95 – для умеренных термофилов. Результаты исследований поддерживают гипотезу о неавтотонности исследуемых бактерий для глубоководных донных осадков Черного моря.

Ключевые слова: *Bacillus*, Черное море, донные отложения, жирные кислоты, аминокислоты, моносахариды.



M.D. Shtenikov, A.M. Ostapchuk, V.O. Ivanytsia

Odesa National University after I. I. Mechnikov,
2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine

COMPOSITION OF FATTY ACIDS, AMINO ACIDS AND MONOSACCHARIDES OF BACILLUS GENUS BACTERIA ISOLATED FROM THE BLACK SEA BOTTOM SEDIMENTS

Summary

The aim of this work was to determine the quantitative and qualitative composition of fatty acids, amino acids and, carbohydrates of antagonistically active sporeforming *Bacillus* genus bacteria isolated from the deep-sea sediments of the Black Sea. **Materials and methods.** The object of the study was the antagonistically active bacteria of *Bacillus velezensis* ONU 553, *Bacillus pumilus* ONU 554, *Bacillus subtilis* ONU 559, *Bacillus megaterium* 11, *Bacillus pumilus* 95 strains. The fatty acid composition was determined by using a gas chromatograph with flame ionization detector Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), monosaccharides – by gas-liquid chromatography-mass spectrometry on Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA), amino acids – on liquid chromatograph Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). **Results.** There were found the characteristic fatty acids for the studied strains: for strain *B. velezensis* ONU 553 – 17:0, 14:0 anteiso, 11:0 2OH, for *B. subtilis* ONU 559 – 19:0 iso, 19:0 anteiso, for *B. megaterium* 11 – 15:0 2OH and, *B. pumilus* 95 – 15:1 iso w5c and 12:0. The amino acid patterns of the studied strains do not show any significant correlation with the ocean biota pattern and strains *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 and *B. pumilus* 95 show such characteristic for sandy soil biota. In addition to *B. subtilis* group bacteria-specific monosaccharides there were revealed arabinose, polyatomic alcohols – L-iditol and myoinositol, which functions are unknown in bacilli cells. **Conclusions.** It can be concluded that HAI and a15/i15 indices of *B. velezensis* ONU 553, *B. pumilus* ONU 554 and *B. subtilis* ONU 559 strains are characteristic of mesophilic bacteria and *B. megaterium* 11 and *B. pumilus* 95 are of moderate thermophiles. The results of the studies support the hypothesis that these bacteria are not autochthonous for the deep-sea bottom sediments of the Black Sea.

Key words: *Bacillus*, the Black Sea, bottom sediments, fatty acids, amino acids, monosaccharides.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М. Факультативно-анаэробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень чорного моря. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – V. 40, N 4. – P. 94–103.
2. Abdi H. Kendall rank correlation. In: Salkind NJ, editor. Encyclopedia of Measurement and Statistics. – Thousand Oaks (CA): Sage; 2007. P. 508–510.
3. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. // Front. Microbiol. – 2015. – 6. – P. 1–20.
4. Doyle R.J. (edit.) Glycomicrobiology. – Kluwer Academic Publishers New



York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 2002. 557 p.

5. Fox A., Stewart G.C., Waller L.N., Fox K.F., Harley W.M., Price R.L. Carbohydrates and glycoproteins of *Bacillus anthracis* and related bacilli: targets for biodetection. // Journal of Microbiological Methods. –2003. – V. 54, N 2. – P. 143–152.

6. Jámbor A., Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. // Journal of Chromatography A. – 2009. – V. 1216, N 34 – P. 6218–6223.

7. Guerrant G.O., Moss C.W. Determination of monosaccharides as aldono-nitrile, O-methyloxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography. // Analytical Chemistry. – 1984. – V. 56, N 4. – P. 633–638.

8. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. // J Nat Prod. – 2019. – V. 82, N 7. – P. 2038–2053.

9. Logan N. A., De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria NJ: Wiley, 2015.

10. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas J.D. Ecology of *Bacillaceae*. // Microbiology Spectrum. – 2015. – V. 3, N 1. – P. 1–24.

11. Moura A., Savageau M.A., Alves R. Relative Amino Acid Composition Signatures of Organisms and Environments. // PLoS One. – 2013. – V. 8, N 10. – P. 1–9.

12. Nicholson W. L. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2002. – V. 59, N 3. – P. 410–416.

13. Raina V., Nayak T., Ray L., Kumari K., Suar M.A Chapter 9. Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. // Microbial Diversity in the Genomic Era. – Academic Press, 2019. – P. 137–152.

14. Rainey F., Oren A. Methods in Microbiology. Volume 38. – Taxonomy of Prokaryotes. – Elsevier Ltd, 2011. – 474 p.

15. Shtenikov M.D., Ostapchuk A. M., Ivanytsia V.O. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments. // Microbiology & Biotechnology. – 2018. – V. 43, N 3. – P. 82–89.

16. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. // Mol Microbiol. – 2005. – V. 56, N 4. – P. 845–857.

17. Virtanen P., Gommers R., Oliphant T.E., Haberland M., Reddy T., Cournapeau D. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. // Nature methods. – 2020. – V. 17. – P. 261–272.

18. Wunschel D., Fox K.F., Black G.E., Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. // Syst. Appl. Microbiol. – 1995. – V. 17, N 4. – P. 625–635.

References

1. Ivanytsia VO, Shtenikov MD, Ostapchuk A. M. [Facultatively anaerobic sporeforming bacteria of deep sea sediments of the Black sea]. Microbiology & Biotechnology. 2017; 40(4): 94-103. [In Ukrainian].



2. Abdi H. Kendall rank correlation. In: Salkind NJ, editor. Encyclopedia of Measurement and Statistics. Thousand Oaks (CA): Sage. 2007:508-510.
3. Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière MH, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1-20.
4. Doyle RJ. (edit.) Glycomicrobiology. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 2002: 557 p.
5. Fox A, Stewart GC, Waller LN, Fox KF, Harley WM, Price RL. Carbohydrates and glycoproteins of *Bacillus anthracis* and related bacilli: targets for biodection. *Journal of Microbiological Methods.* 2003; 54(2): 143-152.
6. Jámbor A, Molnár-Perl I. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *Journal of Chromatography A.* 2009; 1216(34): 6218-6223.
7. Guerrant GO, Moss CW. Determination of monosaccharides as aldono-trile, O-methylxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography. *Analytical Chemistry.* 1984; 56(4): 633-638.
8. Kaspar F, Neubauer P, Gimpel M. Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *J Nat Prod.* 2019; 82(7): 2038-2053.
9. Logan NA, De Vos P. *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. NJ: Wiley, 2015: 1-164.
10. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. Ecology of Bacillaceae. *Microbiology Spectrum.* 2015; 3(1): 1-24.
11. Moura A, Savageau MA, Alves R. Relative Amino Acid Composition Signatures of Organisms and Environments. *PLoS One.* 2013; 8(10): 1-9.
12. Nicholson WL. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2002; 59(3): 410-416.
13. Raina V, Nayak T, Ray L, Kumari K, Suar M. Chapter 9. A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. *Microbial Diversity in the Genomic Era.* Academic Press, 2019: 137-152
14. Rainey F, Oren A. *Methods in Microbiology.* Volume 38. Taxonomy of Prokaryotes. Elsevier Ltd, 2011: 474.
15. Shtenikov MD, Ostapchuk AM, Ivanytsia VO. Antagonistic activity of endosporeforming bacteria of deep water the Black Sea sediments *Microbiology & Biotechnology.* 2018; 43(3): 82-89.
16. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.* 2005; 56(4): 845-857.
17. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D. et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature methods.* 2020; 17: 261-272.
18. Wunschel D, Fox KF, Black GE, Fox A. Discrimination among the *Bacillus cereus* group, in comparison to *B. subtilis*, by structural carbohydrate profiles and ribosomal RNA spacer region PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 1995; 17(4): 625-635.

Стаття надійшла до редакції 23.03.2020 р.



УДК 577.15 (088.8)

**С.С. Декіна¹, І.І. Романовська¹, О.В. Севастьянов¹,
Г.В. Мальцев²**

¹Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080,
тел. +38(048)7662044, e-mail: s.dekina@gmail.com

²ОДО «Інтерхім», Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080
тел. +38(048) 777 2950

АНАЛІЗ КОМПОНЕНТІВ ТАБЛЕТКОВИХ СУМІШЕЙ З ІММОБІЛІЗОВАНИМ ЛІЗОЦИМОМ

Мета. Дослідження впливу компонентів таблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом на визначення вмісту діючих речовин при створенні біологічно активної добавки. **Методи.** Гідролітичну активність лізоциму визначали спектрофотометрично, використовуючи як субстрат клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Хартрі, кверцетину – із застосуванням хлориду цирконію (IV), біглюконат хлоргексидину – за реакцією з α -нафтолом і хроматомас-спектрометрично. Таблеткові суміші з іммобілізованим лізоцимом отримували за технологією вологого гранулювання. **Результати.** З використанням методів спектрофотометрії кількісно визначені кверцетин і лізоцим у складі таблетованих сумішей. Показано, що хлоргексидину біглюконат визначається кількісно за відсутності інших компонентів, тоді як додавання інших складових ускладнюють його кількісний аналіз. Так, в присутності лізоциму визначається 80,22% аналіту, кверцетину – 90,52%, маніту – 89,82%, лактози – 30,87%, сахарози – 40,97%, полівінілпіролідону – 91,34%, цитрату кальцію – 52,99%. **Висновки.** Показано, що лізоцим і кверцетин кількісно визначаються в багатокомпонентних таблеткових сумішах з іммобілізованим ензимом. Виявлено, що лізоцим, кверцетин, маніт, полівінілпіролідон, сахароза і лактоза заважають кількісному визначенню хлоргексидину біглюконата методами спектрофотометрії і хроматомас-спектрометрії як в однофакторному, так і в багатофакторному експерименті.

Ключові слова: лізоцим, кверцетин, хлоргексидину біглюконат, методи визначення, таблеткові суміші.

Враховуючи зростаючу резистентність мікроорганізмів до антибіотиків, гідролітичний ензим лізоцим (КФ 3.2.1.17), який має антибактеріальну, протизапальну дію і є неспецифічним фактором імунітету, знаходить все більш широке застосування в медицині у різних лікарських формах: ранові покриття, капсули, гелі [6, 14].

Розробка таблетованої форми іммобілізованого лізоциму з застосуванням полімерних матриць для стабілізації ензиму; підсилення його протизапальної і антисептичної дії введенням природного поліфенолу – кверцетину і хлоргексидину біглюконату є актуальним напрямом досліджень в області фармацевтичної біотехнології. Кверцетин є одним з найбільш поширених флавоноїдів з високою терапевтичною активністю, унікальною протизапаль-



ною, капілярпропекторною, антиоксидантною дією [10]. Застосування біотехнологічних підходів іммобілізації лізоциму сприяє стабільності ензиму, пролонгованості дії, забезпечує мукоадгезивні властивості, що подовжують час контакту таблеток зі слизовою оболонкою порожнини рота.

В попередніх дослідженнях [7] були розроблені таблеткові суміші з іммобілізованим лізоцимом і кверцетином з використанням полімерних носіїв різного походження та структури. Аналіз біохімічних і фізико-хімічних властивостей іммобілізованого лізоциму показав переваги використання желатину, натрієвої солі карбоксиметилцелюлози, полівінілпіролідону як матриць. Іммобілізація сприяла розширенню рН-діапазону активності ферменту і підвищенню стабільності в кислому середовищі. Однак слід зазначити, що препарат має багатокомпонентний склад, і визначення всіх діючих речовин у присутності інших, в тому числі допоміжних компонентів, представляє непросте завдання.

Мета роботи – дослідження впливу компонентів таблеткових сумішей з лізоцимом на визначення вмісту діючих речовин при створенні біологічно активної добавки.

Матеріали і методи

У роботі використовували лізоцим білка курячого яйця (КФ 3.2.1.17) («Sigma-Aldrich», Німеччина, М.м. 14,4 кДа, 20000 од/мг), клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665 («Sigma-Aldrich», Німеччина), кверцетин («Sigma-Aldrich», Німеччина), хлоргексидину біглюконат (ООО «Фармація», Україна), желатин, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози (РВІ, Бельгія), полівінілпіролідон (Повідон К-17, Zhejiang, Китай). Виготовлення таблеткових сумішей з іммобілізованим лізоцимом методом вологого гранулювання проводили згідно [7].

Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом (субстрат – клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665) [14]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв. Вміст білка контролювали методом Лоурі-Хартрі [11]. Як контроль використовували грануляти без лізоциму. Кверцетин визначали згідно [1, 9]. Калібрувальну криву будували за кверцетином моногідратом.

Кількісний аналіз вмісту хлоргексидину біглюконату (ХГБГ) проводили спектрофотометрично згідно [12], а також хроматомас-спектрометричним методом у зразку грануляту D (табл. 1). Дослідження проводилося в комбінованій системі ВЕРХ-МС – рідинний хроматограф 1260 Infinity з діод-матричним детектором і детектором 6530 Accurate Mass Q-TOF (Agilent Technologies, США) в наступних умовах: колонка з неіржавіючої сталі розміром 100 мм × 4,6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром частинок 3,5 мкм; рухома фаза: ацетонітрил – метанол – амонійно-форміатний буферний розчин з рН = 4,0 (35:20:45 об/об); швидкість елюювання 0,50 см³/хв; температура колонки 35 °С; об'єм інжекції 0,01 см³; час проведення аналізу: для градувальних розчинів 5 хв; для досліджуваних розчинів 25 хв; детектування: за іонним струмом (спосіб іонізації – подвійний електро-спрей при атмосферному тиску; температура газоносія – 350 °С; енергія фрагментації – 200 В; тиск розпилювача – 45 psiq; напруга на капіляри – 4500 В);



спектрофотометричне (реєстрація сигналу при довжині хвилі 260 нм).

Для калібрувальної залежності в мірні колби (25,0 см³) вносили по 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 і 1,50 см³ 0,05% розчину хлоргексидину біглюконату, доводили водою до мітки і перемішували. Отримані розчини хроматографували в зазначених вище умовах, отримуючи результати по трьох паралельних інжекціях. Для аналізу таблетованої суміші наважку грануляту (58,8 мг) вносили в мірну колбу, місткістю 10,0 см³, додавали 6 см³ води і ставили в УЗ-баню на 2 хв. Потім доводили водою до мітки, перемішували і фільтрували через шприцевий мембранний фільтр ПТБЕ 0,45 мкм, відкидаючи перші 2 см³ фільтрату. Хроматографували в умовах, зазначених вище в 5 наважках масою 58,8 мг; 61,7 мг; 59,3 мг; 60,4 мг; 58,9 мг. Результати зазначені для наважки 58,8 мг.

Дані експериментів піддавали статистичному опрацюванню згідно [5]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень при кількості повторень n=5. Ймовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стюдента на рівні значущості не менше 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$).

Результати та обговорення

Розробляючи технологію отримання таблеткових сумішей, особливу увагу приділяли методам кількісного аналізу діючих компонентів. Слід зазначити, що чим більше компонентів у складі препарату, тим складніше їх кількісне визначення. Допоміжними компонентами були обрані речовини, що часто використовуються у фармацевтичній промисловості, а саме, лактоза, кальцію цитрату тригідрат (наповнювачі), маніт (дезінтегрант), ароматизатор «лимон» і сахароза (смакові добавки), карбоксиметилцелюлози натрієва сіль (NaКМЦ), полівінілпіролідон (ПВП) і желатин (зв'язуючі речовини і матриці для іммобілізації лізоциму).

Кількісний склад компонентів таблеткових сумішей, що аналізували представлено в табл. 1

Таблиця 1

Склад гранулятів з іммобілізованим лізоцимом

Table 1

The composition of granules with immobilized lysozyme

| Функція компонента | Найменування компонента | Вміст компонентів (мг) | | | | |
|--------------------|--------------------------|------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | | Гранулят А | Гранулят В | Гранулят С | Гранулят Д | Гранулят Е |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Діючі речовини | Лізоцим | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 10,0 | 15,0 |
| | Кверцетин | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 5,0 |
| | Хлоргексидину біглюконат | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 2,0 | 5,0 |
| Наповнювачі | Лактоза | 114,9 | 154,5 | 160,0 | 164,1 | - |
| | Кальцію цитрат тригідрат | - | - | - | - | 360,0 |
| Деинтегрант | Маніт | 17,9 | 17,9 | 17,9 | 17,9 | - |



Продовження таблиці

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Смакові добавки | Ароматизатор «Лимон» | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 1,2 |
| | Сахароза | - | - | - | - | 3,0 |
| Зв'язуючі речовини* | НаКМЦ | - | - | 4,5 | 0,4 | - |
| | Повідон К-17 | 50 | 10 | - | - | - |
| | Желатин | - | - | - | - | 210,0 |
| Всього | | 200,0 | 200,0 | 200,0 | 200,0 | 600,0 |

Примітка. *Для сумішей А, В застосовували повідон К-17 (5% водний розчин полівінілпіролідону); для сумішей С, D – 1,5%, 0,1% водні розчини NaКМЦ, відповідно, для суміші Е – 5% желатин.

Note. *For mixtures A, B povidone K-17 (5% aqueous solution of polyvinylpyrrolidone) was used; for mixtures C, D – 1.5%, 0.1% aqueous NaCMC solutions, respectively, for mixture E – 5% gelatin.

Кількісне визначення лізоциму полягало в аналізі білка і гідролітичної активності. Слід зазначити, що жодних труднощів при визначенні ензиму не виникало ні в одному з досліджуваних гранулятів. У всіх випадках досліджувані параметри виявлялися кількісно. Результати визначення лізоциму в гранулятах представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Визначення лізоциму в гранулятах

Table 2

Determination of lysozyme in granulates

| Гранулят* | Вміст білка, мг | | Гідролітична активність, од/мг ферменту | |
|-----------|-----------------|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | Внесено | Знайдено | Вихідна | У грануляті |
| A | 10 | 9,98±0,49 <i>P**<0,05</i> | 20000 | 19000±870 <i>P***<0,05</i> |
| B | 10 | 9,99±0,51 <i>P**<0,05</i> | 20000 | 19160±900 <i>P***<0,05</i> |
| C | 10 | 9,98±0,39 <i>P**<0,05</i> | 20000 | 19300±980 <i>P***<0,05</i> |
| D | 10 | 9,97±0,43 <i>P**<0,05</i> | 20000 | 19830±895 <i>***P<0,05</i> |
| E | 15 | 14,72±0,65 <i>P**<0,05</i> | 20000 | 19750±920 <i>P***<0,05</i> |

Примітка. *Відповідає грануляту у табл. 1; **ймовірність відмінностей з визначення білка в грануляті; ***ймовірність відмінностей з визначення гідролітичної активності лізоциму в грануляті.

Note. *Corresponds to the granulate number in Table 1; **the significance of differences of protein determination in granulate; ***the probability of differences on determination of hydrolytic activity of lysozyme in granulate.



З метою кількісного визначення кверцетину використовують комплекс фізико-хімічних методів: хроматографічні, спектрофотометричні, електрохімічні, електрофоретичні й інші методи аналізу [2–4, 13]. Високою специфічністю характеризується метод визначення кверцетину з хлорокисом цирконію [1, 9]. В таблиці 3 наведені результати аналізу вмісту кверцетину в гранулятах різного складу. У всіх випадках кверцетин визначається кількісно, як і лізоцим.

Таблиця 3

Визначення кверцетину в гранулятах

Table 3

Determination of quercetin in granules

| Гранулят | Вміст кверцетину, мг | |
|----------|----------------------|------------------------------|
| | Внесено | Знайдено |
| A | 2 | 1,93±0,09 <i>P*</i> <0,05 |
| B | 2 | 1,97±0,08 <i>P*</i> <0,05 |
| C | 2 | 1,96±0,11 <i>P*</i> <0,05 |
| D | 2 | 1,97±0,09 <i>P*</i> <0,05 |
| E | 5 | 4,70±0,15 <i>P*</i> <0,05 |

Примітка. *Ймовірність відмінностей з визначення кверцетину в грануляті
Note. * Probability of differences for the determination of quercetin in granules

Хлоргексидин – лікарський препарат, антисептик, в готових лікарських формах використовується у вигляді біглюконату (*Chlorhexidini bigluconas*). Для визначення хлоргексидина біглюконату користуються як титриметричними (неводне титрування), так і спектрофотометричними та хроматографічними методами. Оскільки спектрофотометрично за реакцією з α -нафтолом у таблеткових сумішах хлоргексидину біглюконат визначався тільки на 30,9%, досліджували вплив окремих компонентів на його визначення. В монофакторному експерименті методика аналізу хлоргексидину у гранулятах за роботою Kusaka Y. [12] також не дозволила його кількісно визначити (табл. 4).

Виходячи з даних, наведених в таблиці 4, хлоргексидину біглюконат кількісно визначається за відсутності інших компонентів з високим ступенем достовірності. Однак у складах гранулятів супутні компоненти достовірно впливають на його визначення. Так, в присутності лізоциму визначається 80,22% хлоргексидину біглюконату, кверцетину – 90,52%, маніту – 89,82%, лактози всього лише 30,87%, сахарози – 40,97%, полівінілпіролідону – 91,34%, цитрату Са – 52,99%.

Визначення хлоргексидину біглюконату хроматомас-спектрометричним методом проводили в зразку гранулята D (табл. 1). На рисунках 1 і 2 представлені електронний спектр поглинання і мас-спектр хлоргексидину біглюконату. В УФ-спектрі спостерігається два максимуми при 200 нм і 260 нм.



Таблиця 4

Визначення хлоргексидину в присутності компонентів таблетованих сумішей

Table 4

Determination of chlorhexidine in the presence of the components of tablets mixtures

| Сполука | Мольне співвідношення сполука / ХГБГ (внесено сполуки) | Визначений вміст ХГБГ, мкг (%) |
|--|---|---|
| ХГБГ за відсутності інших компонентів | – (200 мкг) | 195,05±3,74 мкг (100%) P* < 0,05 |
| Лізоцим | 3,22·10 ⁻⁴ /1 (1 мг) | 155,46±3,54 (80,22%) P** < 0,05 |
| Кверцетин | 2,96·10 ⁻² /1 (1,94 мкг) | 176,56±5,64 (90,52%) 0,02 < P** < 0,01 |
| Маніт | 45,09/1 (1,785 мг) | 175,19±4,01 (89,82%) 0,001 < P** < 0,002 |
| Лактоза·Н ₂ О | 217,99/1 (17,5 мг) | 60,22±1,81 (30,87%) P** < 0,001 |
| Ароматизатор | – (63 мкг) | 192,09± (98,48%) P** > 0,1 |
| Повідон К-17 (полівінілпіролідон) | 7,92·10 ⁻³ /1 (30 мкг) | 178,15 (91,34%) 0,05 < P** < 0,1 |
| Цитрат Сатетрагідрат, твердий | 110,14/1 (14 мг тетрагідрату) | 103,15±6,96 (52,99%) P** < 0,05 |
| Сахароза | 217,99/1 (2,0 мг) | 79,75 ± 6,69 (40,97%) P** < 0,05 |
| Желатин | – (5,0 мг) | 465,85±9,49 мкг (93,17%) P** < 0,05 |

Примітка: P* – ймовірність відмінностей з визначення ХГБГ за відсутності компоненту суміші, P** – ймовірність відмінностей між визначеннями ХГБГ в присутності компоненту суміші. Мольні відношення були згідно таких у таблеткових сумішах.

Note: P* – the probability of differences of CHDG definitions in the absence of a component of the mixture; P** – the probability of differences of CHDG definitions in the presence of a component of the mixture. The molar ratios were as in tablet formulations.

У мас-спектрі спостерігаються пік протонowanego молекулярного йона хлоргексидину (M^+H^+) = 505.2124 m/z, а також піки осколкових йонів.

Градувальний графік залежності площі піка хлоргексидину від концентрації наведено на рис. 3.

Хроматограми відповідних градувальних розчинів наведені на рис. 4.

При перших випробуваннях бралися наважки з розрахунку, що в препараті міститься внесена кількість аналізованої сполуки. Однак при цьому отримували значення площі піка хлоргексидину, що виходять за нижню точку градувального графіка. При наступних випробуваннях наважки брали з таким розрахунком, щоб значення площі піка хлоргексидину перебували в градувальному інтервалі. Хроматограма і мас-спектр хлоргексидину в уже згадуваному грануляті представлені на рис. 5, 6.

У таблиці 5 представлені результати визначення вмісту хлоргексидину біглоконату в грануляті складу № 4.



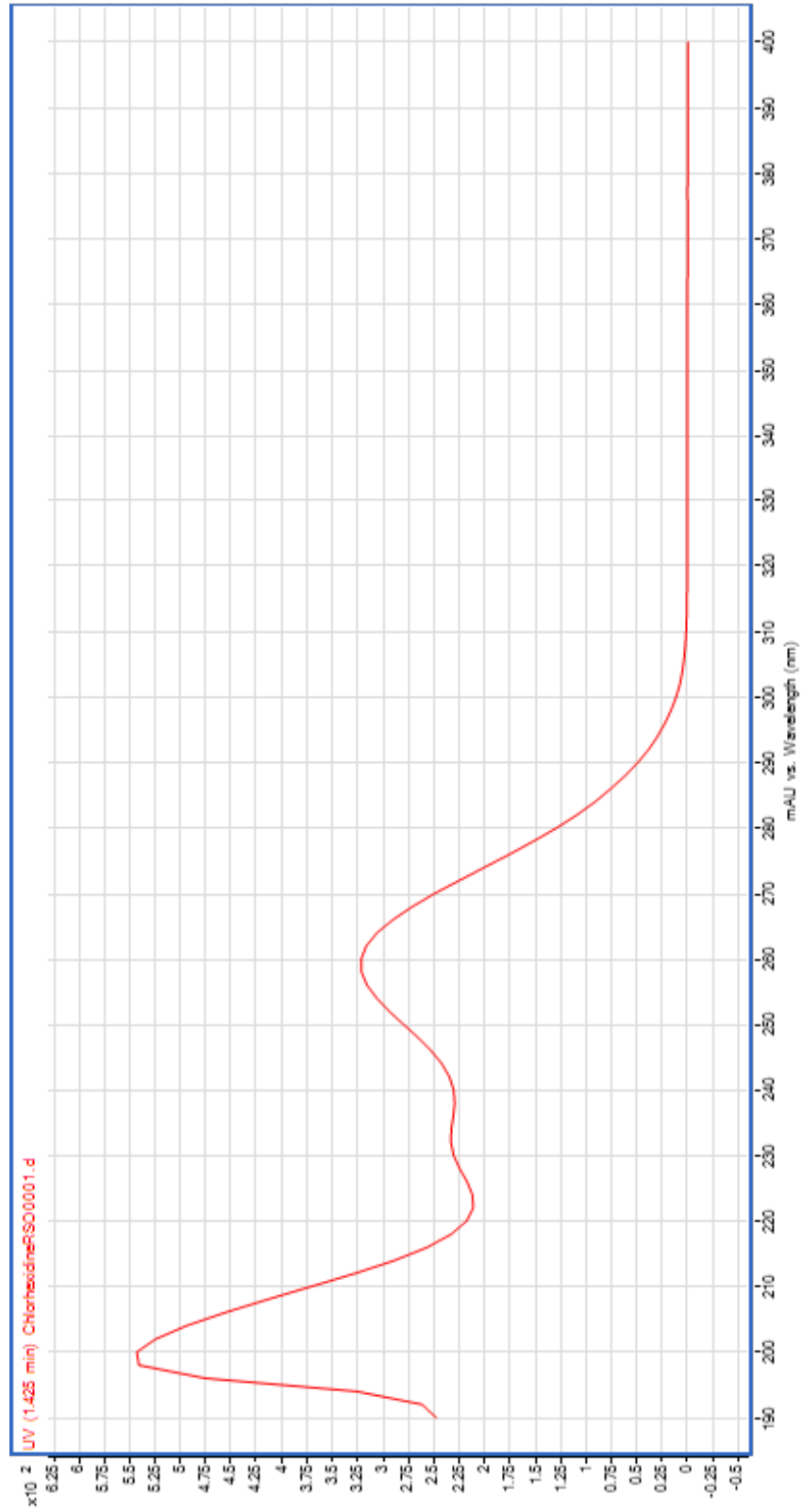


Рис. 1 УФ спектр хлоргексидину біглюконату
Fig. 1 UV spectrum of the peak chlorhexidine bigluconate



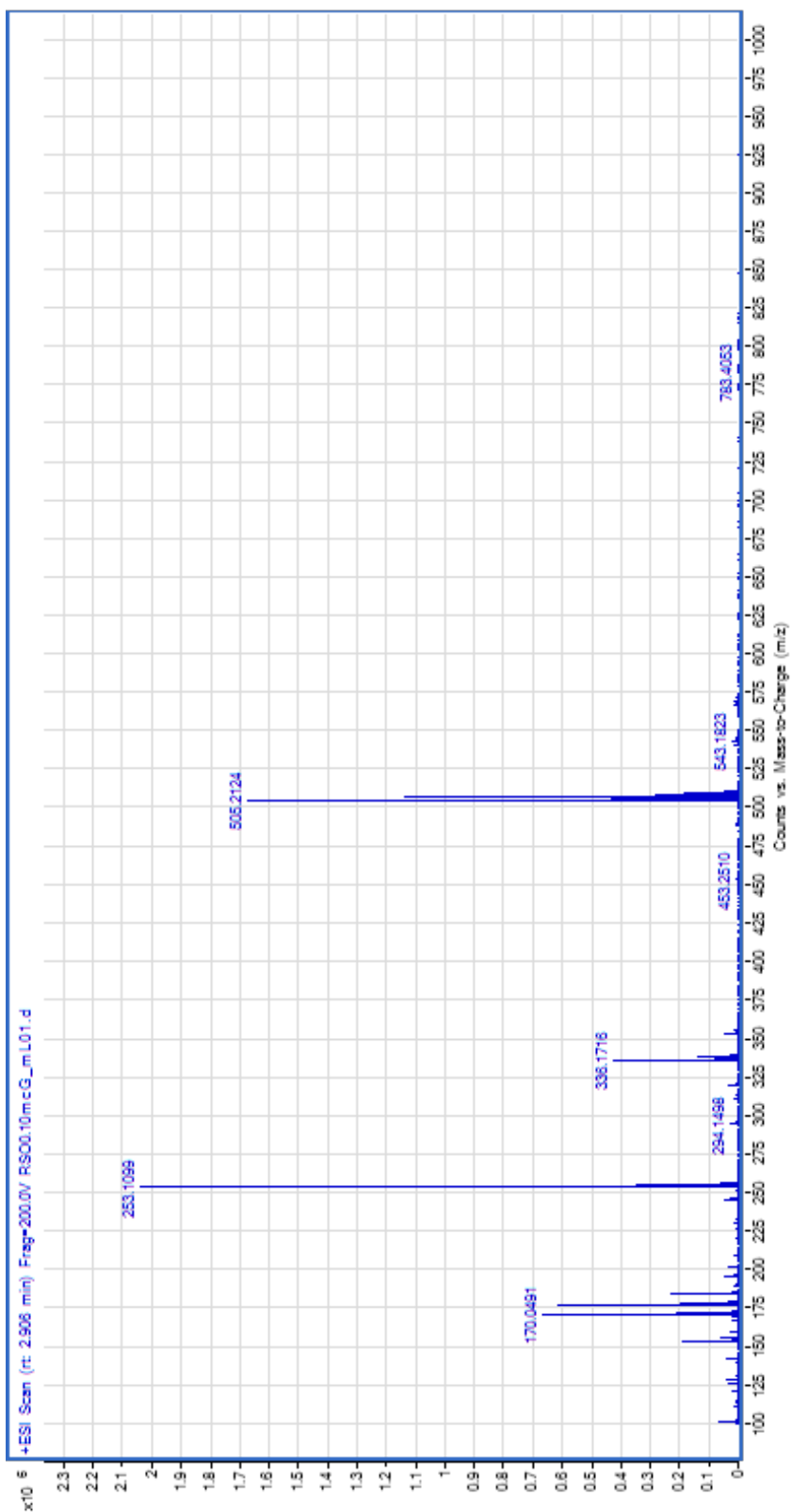


Рис. 2 Мас-спектр хлоргексидину
Fig. 2 Mass spectrum of chlorhexidine

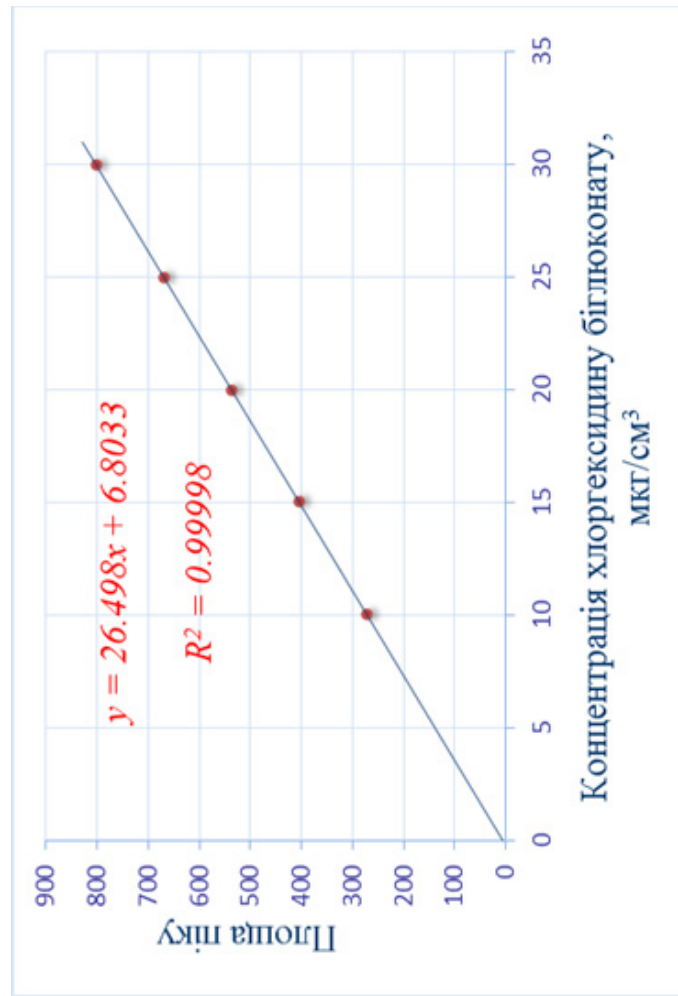
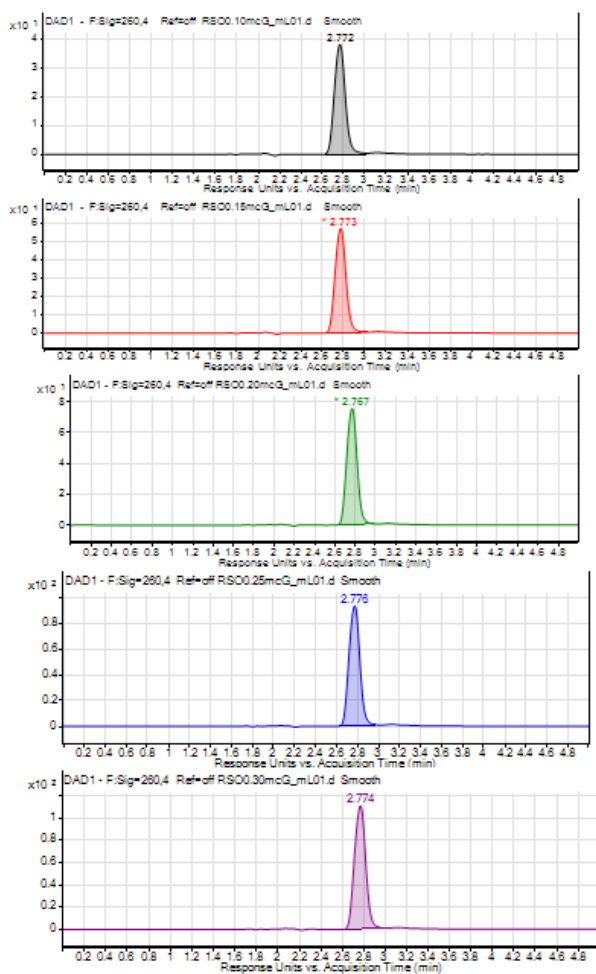


Рис. 3. Градууювальний графік залежності площі піка хлоргексидину від його концентрації при довжині хвилі 260 нм
Fig. 3. The calibration graph of the dependence of the peak area of chlhexidine at wavelength of 260 nm





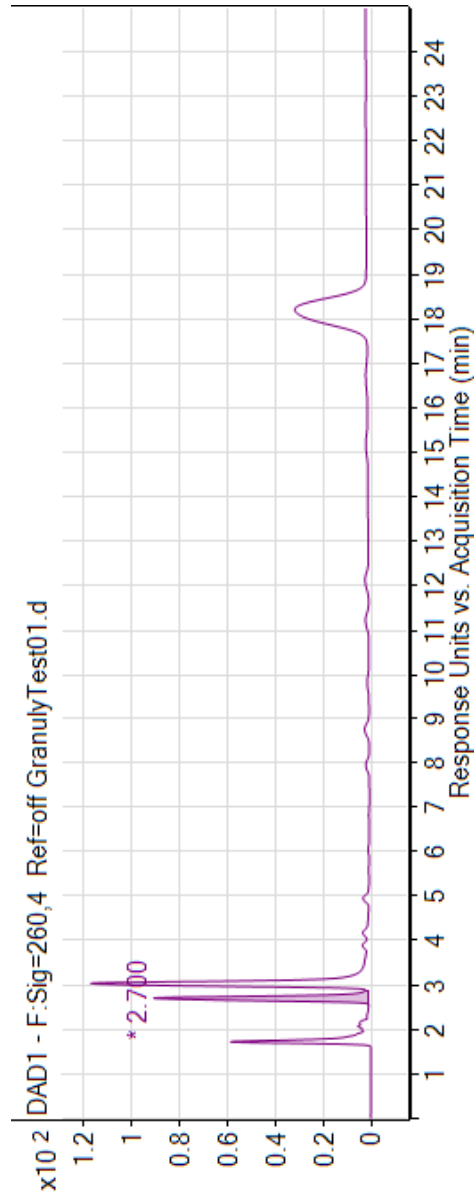
Integration Peak List

| Peak | Start | RT | End | Height | Area |
|------|-------|-------|-------|--------|--------|
| 1 | 2.636 | 2.772 | 3.014 | 38.17 | 272.89 |
| 2 | 2.633 | 2.773 | 3.027 | 57.27 | 404.94 |
| 3 | 2.633 | 2.767 | 2.973 | 75.25 | 534.78 |
| 4 | 2.631 | 2.776 | 2.964 | 93.15 | 667.17 |
| 5 | 2.625 | 2.774 | 2.975 | 100.72 | 804.20 |

Рис. 4. Хроматограми градувальних розчинів

Fig. 4. Chromatograms of calibration solutions





Integration Peak List

| Peak | Start | RT | End | Height | Area |
|------|-------|------|------|--------|--------|
| 1 | 2.55 | 2.70 | 2.89 | 89.90 | 605.10 |

Рис. 5. Хромотограма випробуваного розчину

Fig. 5. Chromatogram of the test solution



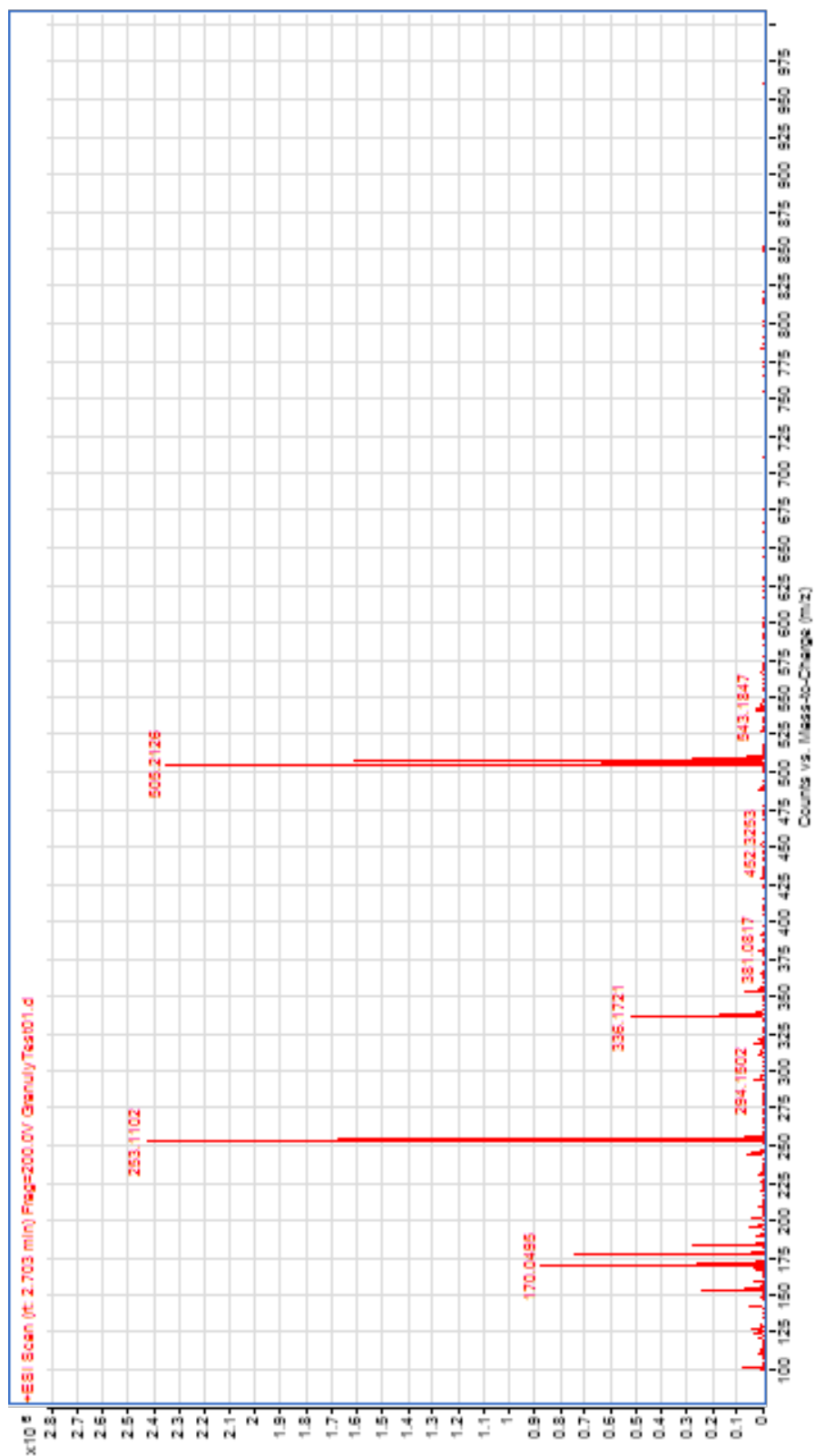


Рис. 6. Мас-спектр аналітичного піка з RT = 2.7 хв на хроматограмі випробуваного розчину

Fig. 6. Mass-spectrum of the analytical peak with RT = 2.7 min on the chromatogram of the test solution

Таблиця 5

Результати визначення вмісту хлоргексидину біглюконату в гранулі D

Table 5

The results of determining the content of chlorhexidine bigluconate in granulate D

| Маса наважки грануляту, мг | Площа піка | Вміст ХГБГ, мг на 1 г грануляту | Середнє значення вмісту ХГБГ, мг/1 г грануляту | Визначено ХГБГ від його вмісту в грануляті, % |
|----------------------------|------------|---------------------------------|--|---|
| 58,80 | 605,10 | 3,84 | 3,82±0,36 P<0,05 | 38,20 |
| | 600,79 | 3,81 | | |
| | 602,52 | 3,82 | | |

Примітка: P – ймовірність відмінностей з визначення вмісту ХГБГ в грануляті D при n=5.
Note: P – probability of differences to determine the content of CHDG in the granulate D at n=5

Специфічність даної методики аналізу доведено поділом хроматографічних зон і ідентифікацією зони аналізованого компонента за допомогою мас-спектра.

Отримані результати хроматомас-спектрометрії узгоджуються з результатами спектрофотометричного аналізу: хлоргексидину біглюконат визначається у грануляті D на 38,2 і 30,9%, відповідно, що може бути наслідком міжмолекулярних взаємодій компонентів. У зв'язку з цим на даному етапі досліджень кількісне визначення хлоргексидину біглюконату у таблетованій суміші є проблематичним.

Показано, що лізоцим і кверцетин кількісно визначаються в багатокомпонентних таблеткових сумішах з іммобілізованим ензимом. Виявлено, що лізоцим, кверцетин, маніт, полівінілпіролідон, сахароза і лактоза заважають кількісному визначенню хлоргексидина біглюконата методами спектрофотометрії і хроматомас-спектрометрії як в однофакторному, так і в багатофакторному експериментах.

С.С. Декина¹, И.И. Романовская¹, О.В. Севастьянов¹,
Г.В. Мальцев²

¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080,
тел. +38(048)766 20 44, e-mail: s.dekina@gmail.com

²ОДО «Интерхим», Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080
тел. +38 (048) 777 2950

АНАЛИЗ КОМПОНЕНТОВ ТАБЛЕТОЧНЫХ СМЕСЕЙ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ЛИЗОЦИМОМ

Реферат

Цель. Исследование влияния компонентов таблеточных смесей с иммобилизованным лизоцимом на определение содержания действующих веществ при создании биологически активной добавки. **Методы.** Гидролитическую



активность лизоцима определяли спектрофотометрически, используя в качестве субстрата клетки *Micrococcus lysodeikticus* 2665. Содержание белка определяли по методу Лоури в модификации Хартри, кверцетин – с применением хлорида циркония (IV), хлоргексидина биглюконат по реакции с α -нафтолом спектрофотометрически и хромато-масс-спектрометрически. Таблеточные смеси получали по технологии влажного гранулирования.

Результаты. С использованием методов спектрофотометрии количественно определены кверцетин и лизоцим в составе таблетированных смесей. Показано, что хлоргексидина биглюконат определяется количественно при отсутствии других компонентов, тогда как их добавление усложняют его количественный анализ. Так, в присутствии лизоцима определяется 80,22% аналита, кверцетин – 90,52%, маннита – 89,82%, лактозы – 30,87%, сахарозы – 40,97%, поливинилпирролидона – 91,34%, цитрата кальция – 52,99%.

Выводы. Показано, что лизоцим и кверцетин количественно определяются в многокомпонентных таблеточных смесях с иммобилизованным энзимом. Обнаружено, что лизоцим, кверцетин, манит, поливинилпирролидон, сахароза и лактоза мешают количественному определению хлоргексидина биглюконата методами спектрофотометрии и хромато-масс-спектрометрии как в однофакторном, так и в многофакторном эксперименте.

Ключевые слова: лизоцим, кверцетин, хлоргексидинабиглюконат, методы определения, таблеточные смеси.

**S.S. Dekina¹, I.I. Romanovska¹, O.V. Sevastyanov¹,
G.V. Maltsev²**

A.V. Bogatsky's Physico-chemical institute NAS of Ukraine,
86, Lustdorfskador., Odesa, Ukraine, 65080,
tel. (48) 765 94 31, e-mail: s.dekina@gmail.com

²«InterChem SLC», 86, Lustdorfska dor., Odesa, 65080
tel. +38 (048) 777 2950

ANALYSIS OF THE COMPONENTS OF TABLET MIXTURES WITH IMMOBILIZED LYSOZYME

Summary

Aim. Study of the effect of the tablet mixtures components with immobilized lysozyme on the determination of active substances for dietary supplement creation. **Methods.** Activity of egg white lysozyme was determined by the bacteriolytic method with *Micrococcus lysodeikticus* 2665 as substrate. Protein content was determined by the Lowry-Hartree method, quercetin using zirconium (IV) chloride, chlorhexidine digluconate by the reaction with α -naphthol and chromatography-mass-spectrometrically. Tablet mixtures were prepared using wet granulation technology. **Results.** Quercetin and lysozyme are quantified in the composition of tablet mixtures by the spectrophotometry methods. It was shown that chlorhexidine digluconate is determined quantitatively in the absence of other components, while their addition complicates its quantitative analysis. So, in the presence of lysozyme, 80.22% of analyte is determined, quercetin – 90.52%, mannitol – 89.82%, lactose – 30.87%, sucrose by 40.97%, polyvinylpyrrolidone – 91.34%, calcium citrate – 52.99%. **Conclusions.** The methods for the quantitative analysis of the active components of tablet mixtures: lysozyme, quercetin and chlorhexidine



digluconate are determined. It was found that lysozyme, quercetin, mannitol, polyvinylpyrrolidone, sucrose and lactose interfere with the quantitative determination of chlorhexidine digluconate by spectrophotometry and the chromatographic mass spectrometry methods in both one-factor and multivariate experiments.

Key words: lysozyme, quercetin, chlorhexidine digluconate, determination methods, tablet mixtures.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Георгиевский В. П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 144 с.
2. Дмитриенко С.Г., Кудринская В.А., Аняри В.В. Методы выделения, концентрирования и определения кверцетина // Журн. аналит. химии. – 2012. – Т. 67, № 4. – С. 340–353.
3. Карцова Л.А., Алексеева А.В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений // Журн. аналит. химии. – 2008. – Т. 63. – № 11. – С. 1126–1136.
4. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Книга по требованию, 2014. – 339 с.
5. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
6. Решетов И.В., Юданова Т.Н., Маторин О.В. Пленочное покрытие, содержащее хлоргексидин и лизоцим, для лечения ран // Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, № 7. – С. 41–43.
7. Романовська І.І., Декіна С.С., Севастьянов О.В., Рогожа Є.О. Таблеткові суміші, що містять іммобілізований лізоцим і кверцетин: отримання, властивості // Медична та клінічна хімія. – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 19–24.
8. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств: В 2 т./ Под ред. Перцев И.М. – Харьков: УкрФА, 1999. – Т. 1. – 461 с.
9. Grimaldi F.S., White C.E. Quercetin as colorimetric reagent for determination of zirconium // Analytical Chemistry. – 1953. – Т. 25, № 12. – С. 1886–1890.
10. Formica J.V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids // Food and chemical toxicology. – 1995. – Т. 33, № 12. – С. 1061–1080.
11. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Analytical Biochemistry – 1972. – V. 48, № 2. – P. 422–427.
12. Kusaka Y., Aoki M. Colorimetric determination of chlorhexidine // Yakuzaigaku. 1966. – Vol. 26, № 1. – P. 58.
13. Shikiba Y., Ogura H., Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids. // Journal of pharmaceutical sciences. – 1968. – Vol. 57, № 4. – P. 705–706.
14. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme // Biochimica et biophysica acta. – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.



References

1. Georgievsky VP, Komissarenko NF, Dmitruk SE. Biologically active substances of medicinal plants. Novosibirsk: Science, 1990. 144p. [in Russian].
2. Dmitrienko SG, Kudrinskaya VA, Apyari VV. Methods of isolation, concentration and determination of quercetin. Zh. analyte. chemistry. 2012; 67(4): 340-353. [in Russian].
3. Kartsova LA, Alekseeva AV. Chromatographic and electrophoretic methods for the determination of polyphenolic compounds. Zh. analyte. chemistry. 2008; 63(11): 1126-1136. [in Russian].
4. Korenman IM. Photometric analysis: Methods for determination of organic compounds M.: Book on Demand, 2014. 339 p. [in Russian].
5. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistical methods in biomedical research using Excel. K.: Morion, 2000. 320 p. [in Russian].
6. Reshetov IV, Yudanov TN, Matorin OV. A film coating containing chlorhexidine and lysozyme for the treatment of wounds. Chemical and Pharmaceutical Journal. 2004; 38(7): 41-43. [in Russian].
7. Romanov'ska II, Dekina SS, Sevast'yanov OV, Rohozha YO. Tablet mixtures containing immobilized lysozyme and quercetin: production, properties. Medychna ta klinichna khimiya. 2017; 19(2): 19-24. [in Ukrainian].
8. Pharmaceutical and biomedical aspects of drugs: 2 t. Ed. Pertsev IM. Kharkov: UkrFA, 1999. I.1. 461 p. [in Russian].
9. Grimaldi FS, White CE. Quercetin as colorimetric reagent for determination of zirconium. Analytical Chemistry. 1953; 25(12): 1886-1890.
10. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. Food and chemical toxicology. 1995; 33(12): 1061-1080.
11. Hartree EF. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry. 1972; 48(2): 422-427.
12. Kusaka Y, Aoki M. Colorimetric determination of chlorhexidine. Yakuzaigaku. 1966; 26(1): 58.
13. Shikiba Y, Ogura H, Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids. Journal of pharmaceutical sciences. 1968; 57(4): 705-706.
14. Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. Biochimica et biophysica acta. 1952; 8: 302-309.

Стаття надійшла до редакції 13.03.2020 р.



УДК 578.72

О.Ю. Зінченко, Т.О. Філіпова, Л.Г. Клочко

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: farmikr@ukr.net

ОЦІНКА ПОТЕНЦІЙНОЇ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ПОХІДНИХ N-БЕНЗІМІДАЗОЛ-СУЛЬФОНАМІДУ НА МОДЕЛІ «ФАГ-БАКТЕРІЯ»

Мета. Визначення потенційної противірусної активності похідних N-бензімідазол-сульфонамідів на моделі «фаг-бактерія». **Методи.** У роботі використано 5 похідних N-бензімідазол-сульфонамідів. Методом серійних розведень визначено їх антибактеріальні властивості щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Модифікованим методом Грація визначено вплив похідних на літичну активність комерційних фагів, специфічних щодо бактерій тест-штамів. **Результати.** У досліджених сполук виявлено здатність до пригнічення росту *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на 41–45% та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – до 35% у середовищі Luria-Bertani. N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамід та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонамід знижували літичну активність як стафілококового, так і псевдомонадного фагів. N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітро-бензенсульфонамід викликав збільшення кількості негативних колоній стафілококового та псевдомонадного фагів на 28,4 та 35,5% відповідно. **Висновок.** N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамід та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонамід володіють потенційною противірусною активністю щодо ДНК-вірусів. N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітро-бензенсульфонамід посилює продукцію фагових часток.

Ключові слова: противірусна активність, похідні N-бензімідазол-сульфонамідів, фаг, літична активність.

Етіотропна терапія вірусних інфекцій на сьогодні залишається одним з викликів сучасній медицині. За останні десятиріччя досягнуто значних успіхів у лікуванні ВІЛ-інфекції та герпесвірусних інфекцій. Однак для широкого кола захворювань, викликаних вірусами, доступною залишається переважно симптоматична терапія, що наочно продемонструвала пандемія, викликана SARS-CoV-2. Поширеним підходом до розробки противірусних засобів є ретаргетинг існуючих лікарських препаратів, який не завжди забезпечує ефективність та безпечність лікування. Отже, пошук нових антивірусних агентів не втрачає своєї актуальності.

Скринінг сполук щодо їх здатності пригнічувати активність вірусів є досить складною задачею, вимагає задіяння значних ресурсів та несе потенційну небезпеку для дослідника. У такій ситуації раціональним є винайдення



безпечних, швидких та недорогих моделей. Низкою авторів для первинного тестування нових речовин запропонована система «бактеріофаг-бактерія» [5, 6, 10, 12–15].

Сульфонаміди складають важливий клас лікарських засобів, які належать до кількох типів фармакологічних агентів, що володіють антибактеріальною, антикарбоангідразною, сечогінною, гіпоглікемічною, антитиреоїдною та протипухлинною активністю. У лікуванні інфекційних захворювань сульфонаміди традиційно застосовуються як антибактеріальні агенти. Тим не менш, було встановлено, що велика кількість структурно нових сульфаниламідних похідних демонструє суттєву противірусну активність *in vitro* та *in vivo*. Деякі клінічно застосовувані інгібітори ВІЛ-протеази (ампренавір) або сполуки, що знаходяться на стадії клінічних випробувань (тикранавір, ТМС-126, ТМС-114 та ін.) містять сульфаниламідні компоненти в своїх молекулах [8]. Також є дані про декілька нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази ВІЛ або інгібіторів інтегрази ВІЛ, що містять сульфаниламідні групи. Інший підхід до інгібування репродукції ретровірусів, включаючи ВІЛ, спрямований на викид йонів цинку з так званих вірусних цинкових пальців, що має наслідком гальмування реплікації вірусу без виникнення мутацій, які могли б призвести до фенотипової стійкості до лікарських засобів. Більшість сполук з антивірусною активністю, що мають цей механізм дії, містять у своїх молекулах первинні сульфаниламідні групи. Нарешті, деякі низькомолекулярні антагоністи хемокінів, що діють як інгібітори проникнення ВІЛ, також мають сульфаниламідні функціональні групи у своїй структурі [19]. Отже, розглядати сульфонаміди як сполуки з потенційною противірусною активністю є цілком обґрунтованим.

Метою даної роботи було визначення потенційної антивірусної активності похідних N-бензімідазол-сульфонаміду на моделі «фаг-бактерія».

Матеріали та методи дослідження

У роботі досліджували активність 5 сполук, похідних N-бензімідазол-сульфонаміду, будову яких наведено в табл. 1.

Сполуки синтезовані в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Їх чистоту оцінювали з використанням хроматографічних методів, ПМР-спектроскопії та мас-спектрометрії. Досліджені похідні представляли собою кристалічні субстанції білого кольору без запаху, нерозчинні у воді.

Протифагову дію досліджуваних сполук перевіряли на модельних системах *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 – полівалентний стафілококовий бактеріофаг та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – псевдомонадний бактеріофаг. Штами бактерій отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України.

В експериментах використовували комерційні препарати бактеріофагів – «Бактеріофаг стафілококовий» та «Бактеріофаг псевдомонас аеругіноза» (НПО «Мікроген», Росія).

Для того, щоб виключити пригнічення росту бактеріальних культур досліджуваними похідними попередньо оцінювали антибактеріальну актив-

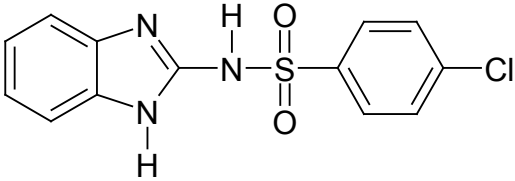
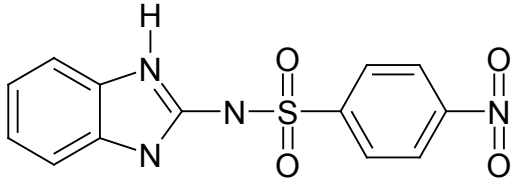
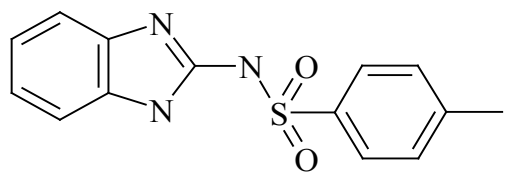
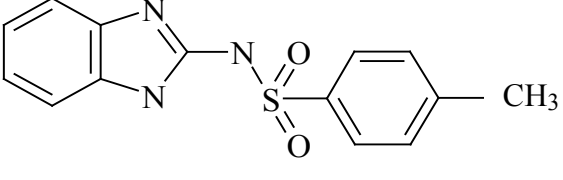
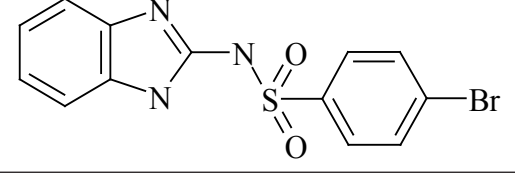


Таблиця 1

Будова досліджуваних похідних N-бензімідазол-сульфонамідів

Table 1

Molecule structure of N-benzimidazole-sulfonamide derivatives

| № | Будова молекули | Назва |
|-----|--|--|
| I |  | N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-хлоробензенсульфонамід |
| II |  | N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітро-бензенсульфонамід |
| III |  | N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамід |
| IV |  | N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-метилбензенсульфонамід |
| V |  | N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонамід |



ність останніх. З цією метою готували розчини сполук у диметилсульфоксиді концентрацією 4 мМ, розводили середовищем Luria-Bertani (LB) [17] до робочих концентрацій 0,4; 4; 40; та 80 мкМ. Аналіз літератури щодо скринінгу сульфонамідів показав, що у багатьох дослідженнях для визначення активності нових похідних використовуються десятикратні розведення [4, 9, 16], тому у наших дослідах використано саме такі концентрації. Розчини досліджуваних похідних стерилізували автоклавуванням при 1 атм. Добові культури бактерій на скошеному МПА змивали стерильним фізіологічним розчином, доводили щільність отриманої суспензії до 0,5 ОД за МакФарландом та використовували для інокуляції. У кожен лунку 24-лункового полістиролового планшета (Greiner bio-one Cellstar, Австрія) вносили 1 мл стерильного середовища LB, що містило досліджувані сполуки в робочих концентраціях і додавали 50 мкл інокуляту відповідної культури. Як контроль використовували середовище LB, інокульоване тест-культурою без досліджуваних сполук. Кожну концентрацію досліджували у трьох повторях. Планшети інкубували при 37 °С протягом 24 год та вимірювали оптичну щільність на планшетному спектрофотометрі «Quant» BioTek (США) при $\lambda=600$ нм.

Протифагову активність визначали модифікованим методом титрування бактеріофага за Грація (метод агарових шарів) [1]. Готували напіврідкий (0,7%) м'ясо-пептонний агар (МПА) та 1,5% МПА. Напіврідкий агар розливали у пробірки по 1 мл. Середовища стерилізували автоклавуванням при 1 атм.

У досліді використовували пластикові чашки Петрі діаметром 60 мм. У чашки заливали 1,5% МПА, підсушували. Готували розведення досліджуваних речовин у стерильному фізіологічному розчині (використовували концентрацію 40 мкМ в 1 мл, за якої не спостерігалось значного пригнічення росту тест-культури). До розчинів додавали 0,1 мл розведення препарату бактеріофага, що містило $1,6 \times 10^9$ бляшкоутворювальних одиниць (БУО) в 1 мл. Така концентрація фага була визначена як оптимальна при попередньому титруванні. Суміш інкубували годину в термостаті при температурі 37 °С.

Напіврідкий 0,7% МПА для поверхневого шару розплавляли на водяній лазні, охолоджували до 46 °С, додавали 0,1 мл добової бульйонної культури *S. aureus* або *P. aeruginosa* та 0,1 мл суспензії фагових часток, проінкубованих з похідними N-бензімідазол-сульфонамідів. Середовище ретельно перемішували та виливали на поверхню МПА в чашках Петрі, рівномірно розподіляючи його по поверхні агару. Після застигання поверхневого шару агару чашки перевертали і залишали у термостаті при 37 °С на 24 год. Кожну сполуку тестували в трьох повторях. Дослід супроводжували двома контролями: контроль активності бактеріофага – без додавання досліджуваних сполук, контроль росту бактеріальної культури – без додавання фага.

Антифагову активність (А) виражали у відсотках інактивації, які підраховували за формулою:

$$A = (1 - N_o/N_k) \times 100\%,$$

де N_o – кількість БУО у досліді, N_k – кількість БУО у контролі.

Статистичну значущість відмінностей визначали за непараметричним критерієм Мана-Уїтні, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значущості не менше 95% ($p \leq 0,05$).



Результати та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що ріст *S. aureus* ATCC 25923 пригнічувався усіма сполуками, однак повного пригнічення не спостерігали. При цьому для більшості досліджених похідних виявлено зворотну залежність доза-ефект (рис. 1). Найбільш виражений антибактеріальний ефект спостерігали за присутності N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-метилбензенсульфонаміду та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонаміду, що складав 13,9-45,4% та 27,5-41,9%, відповідно. Тим не менш, у максимальній концентрації сполука V спричиняла посилення росту.

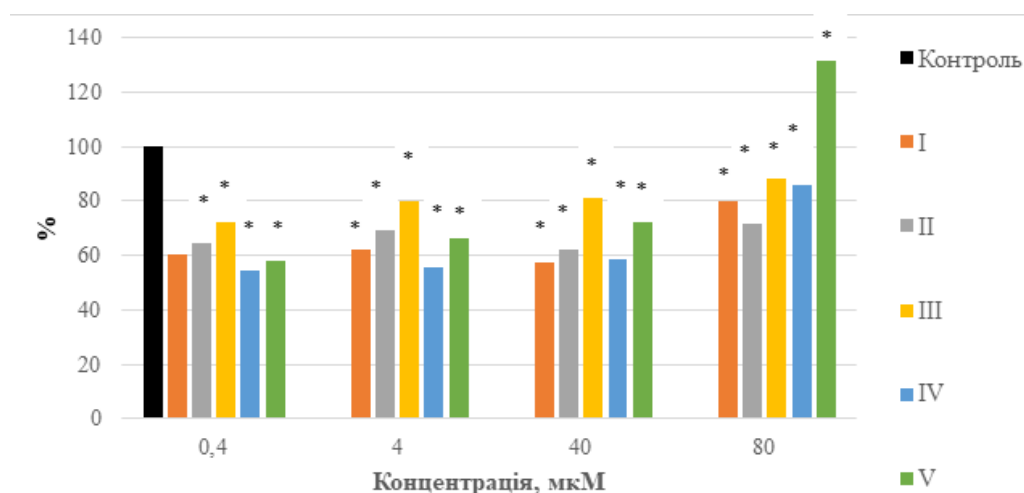


Рис. 1. Накопичення біомаси тест-штаму *S. aureus* ATCC 25923 за присутності похідних N-бензімідазол-сульфонаміду

Примітка: I – N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-хлоробензенсульфонамід, II – N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітро-бензенсульфонамід, III – N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамід, IV – N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-метилбензенсульфонамід, V – N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонамід, * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. Biomass accumulation by the test-strain *S. aureus* ATCC 25923 at the presence of N-benzimidazole-sulfonamide derivatives

Note: I – N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-chlorobenzenesulfonamide, II – N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-nitro-benzenesulfonamide, III – N-(1H-benzimidazole-2-yl)-benzenesulfonamide, IV – N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-methylbenzenesulfonamide, V – N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-bromo-benzenesulfonamide, * – differences are significant in comparison with control ($p < 0,05$)

Щодо *P. aeruginosa* ATCC 27853 інгібувальний ефект похідних N-бензімідазол-сульфонаміду також не завжди був дозозалежним (рис. 2). Так, N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-хлоробензенсульфонамід (сполука I) викликав пригнічення росту на 37,9% лише за концентрації 4 мкМ, при збільшенні концентрації спостерігалася стимуляція росту культури. Подібний ефект відзначено також для N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-метилбензенсульфонаміду (сполука IV) та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонаміду (сполука V). Стійке пригнічення росту культури, яке не перевищувало 35%, викликали N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітро-бензенсульфонамід (сполука II)



та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамід (сполука III) в усіх використаних концентраціях.

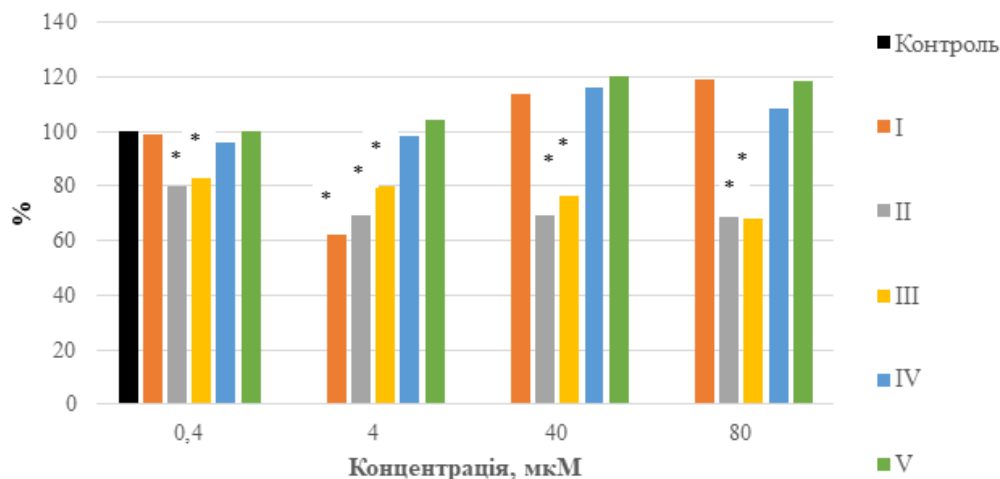


Рис. 2. Накопичення біомаси тест-штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 за присутності похідних N-бензімідазол-сульфонамідів
Примітка: див. Примітку до рис. 1

Fig. 2. Biomass accumulation by the test-strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 at the presence of N-benzimidazole-sulfonamide derivatives
Note: see Note to fig. 1

Для визначення впливу на літичну активність фагів досліджені сполуки використовували у концентрації 40 мкМ, за якої не спостерігали значного пригнічувального ефекту щодо бактерій тест-штамів. Пригнічувальну дію щодо стафілококового бактеріофага виявлено у N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонаміді (сполука III) (рис. 3). N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-метилбензенсульфонаміді (сполука IV) та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонаміді (сполука V), які викликали інактивацію 29,5, 21,1 та 31,7% фагових часток (рис. 3). Натомість, присутність сполуки II призводила до збільшення кількості негативних колоній на 28,4% у порівнянні з контролем.

Активність псевдомонадного бактеріофага також пригнічувалася N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамідом (сполука III) та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонамідом (сполука V) на 17,5 та 14,6% відповідно. Однак, на відміну від попереднього дослідження присутність N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-метилбензенсульфонаміді (сполука IV) стимулювала утворення негативних колоній на 21,0%. N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітробензенсульфонамід (сполука II) також стимулював утворення негативних колоній (на 35,5%).

Підвищення літичної активності бактеріофагів, вірогідно, є прикладом так званого синергізму фаг-антибіотик, описаного у 2007 році Comeau зі співавт. та детально розглянутого Gordillo Altamirano зі співавт. [11], які показали, що сублетальні концентрації антибіотиків можуть підвищувати продукування літичних фагів бактеріальними клітинами.

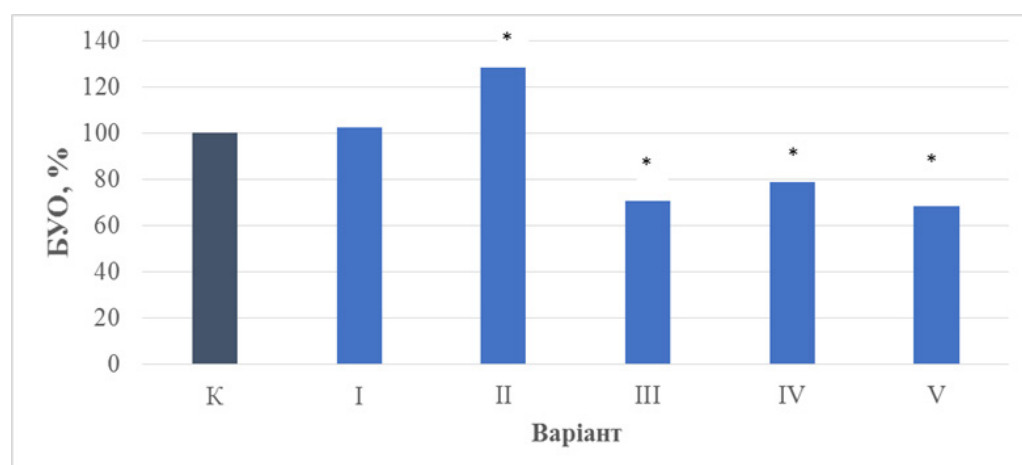


Рис. 3. Вплив досліджуваних сполук на літичну активність стафілококового бактеріофага

Примітка: див. Примітку до рис. 1

Fig. 3. The influence of studied compounds on the lytic activity of staphylococcal phage
Note: see Note to fig. 1

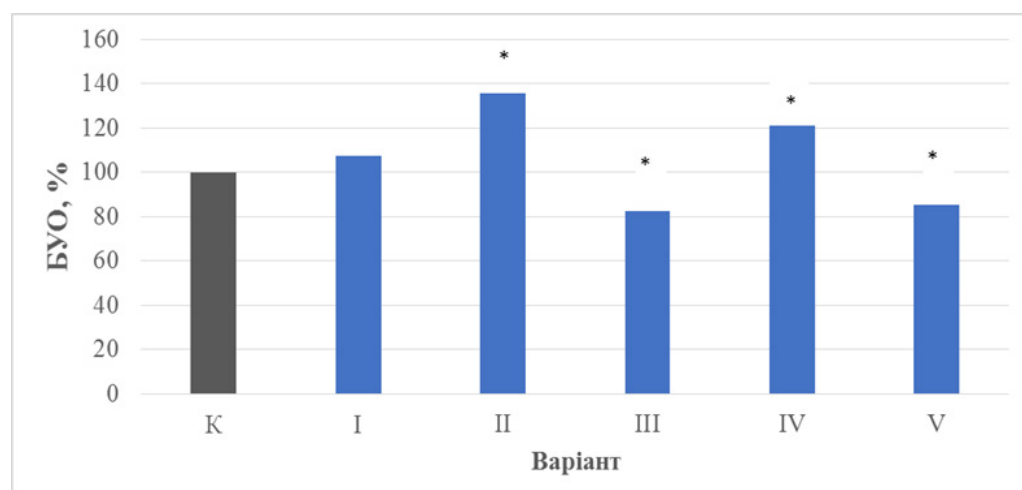


Рис. 4. Вплив досліджуваних сполук на активність псевдомонадного бактеріофага
Примітка: див. Примітку до рис. 1.

Fig. 4. The influence of studied compounds on the lytic activity of pseudomonad phage
Note: see Note to fig. 1.

Соск зі співавт. продемонстрували кореляцію між противірусною активністю екстрактів лікарських рослин щодо вірусу грипу на культурі клітин MDCK, герпесвірусів, папіломавірусів та на моделі фаг MS2-бактерія, довівши доцільність використання таких моделей для первинного скринінгу потенційних противірусних сполук [5]. Фаг MS2 належить до РНК-вмісних вірусів, у той час як відомі фаги *S. aureus* та *P. aeruginosa* належать до порядку *Caudovirales*, що є ДНК-вмісними фагами [2, 3, 7, 18]. Збудники



вірусних інфекцій людини мають переважно РНК-геном, тим не менш, ряд етіологічних агентів небезпечних захворювань, такі як герпесвіруси, папілома- та поліомавіруси, поксвіруси, мають ДНК-геном. Отже, використання запропонованої моделі може бути доцільним при визначенні активності нових молекул щодо цих збудників.

Таким чином, у досліджених сполук виявлено антибактеріальну активність як щодо *S. aureus* ATCC 25923, так і *P. aeruginosa* ATCC 27853. При цьому повного пригнічення росту не відбувалося.

N-(1H-бензімідазол-2-іл)-бензенсульфонамід та N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-бромо-бензенсульфонамід знижували літичну активність як стафілококового, так і псевдомонадного фагів і можуть розглядатися як потенційні противірусні агенти, активні щодо ДНК-вірусів.

N-(1H-бензімідазол-2-іл)-4-нітро-бензенсульфонамід викликав збільшення кількості негативних колоній стафілококового та псевдомонадного фагів на 28,4 та 35,5%, відповідно, що може свідчити про синергізм цих сполук з бактеріофагами.

О.Ю. Зинченко, Т.О. Филиппова, Л.Г. Клочко

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: farmikr@ukr.net

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ N-БЕНЗИМИДАЗОЛ-СУЛЬФОНАМИДА НА МОДЕЛИ «ФАГ-БАКТЕРИЯ»

Реферат

Цель. Определение потенциальной противовирусной активности производных N-бензиимидазол-сульфонамида на модели «фаг-бактерия». **Методы.** В работе использованы 5 производных N-бензиимидазол-сульфонамида. Методом серийных разведений определены их антибактериальные свойства в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Модифицированным методом Грация определено влияние производных на литическую активность коммерческих фагов, специфических по отношению к тест-штаммам. **Результаты.** У исследованных соединений выявлена способность к подавлению роста *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 на 41–45% и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – до 35% в среде Luria-Bertani. N-(1H-бензиимидазол-2-ил)-бензенсульфонамид и N-(1H-бензиимидазол-2-ил)-4-бромо-бензенсульфонамид снижали литическую активность как стафилококкового, так и псевдомонадного фагов. N-(1H-бензиимидазол-2-ил)-4-нітро-бензенсульфонамид вызывал увеличение количества негативных колоний стафилококкового и псевдомонадного фагов на 28,4 и 35,5% соответственно. **Вывод.** N-(1H-бензиимидазол-2-ил)-бензенсульфонамид и N-(1H-бензиимидазол-2-ил)-4-бромо-бензенсульфонамид обладают потенциальной противовирусной активностью в отношении ДНК-вирусов. N-(1H-бензиимидазол-2-ил)-4-нітро-бензенсульфонамид усиливает продукцию фаговых частиц.



Ключевые слова: противовирусная активность, производные N-бенз-имидазол-сульфонамида, фаг, литическая активность.

O.Yu. Zinchenko, T.O. Philippova, L.G. Klochko

Odesa I. I. Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine;
tel.: +38 068 259 33 08, e-mail: farmikr@ukr.net

EVALUATION OF POTENTIAL ANTIVIRAL ACTIVITY OF N-BENZIMIDAZOLE-SULFONAMIDE DERIVATIVES

Summary

Aim. Evaluation of the potential antiviral activity of N-benzimidazole-sulfonamide derivatives in the phage-sensitive bacterium model. **Methods.** 5 derivatives of N-benzimidazole-sulfonamide were used in the study. Antibacterial properties of studied compounds were evaluated by serial dilution method towards *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The influence of derivatives on the lytic activity of commercial phages specific towards test-strains was detected by modified Graziya method. **Results.** Studied compounds showed the ability to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by 41–45% and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – up to 35% in Luria-Bertani broth. N-(1H-benzimidazole-2-yl)-benzensulfonamide and N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-bromo-benzensulfonamide decreased the lytic activity of both staphylococcal and pseudomonal phages. N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-nitro-benzensulfonamide caused the increase of negative colonies number of staphylococcal and pseudomonal phage by 28.4 u 35.5 % respectively. **Conclusion.** N-(1H-benzimidazole-2-yl)-benzensulfonamide and N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-bromo-benzensulfonamide have potential antiviral activity against DNA viruses. N-(1H-benzimidazole-2-yl)-4-nitro-benzensulfonamide boosts the production of phage particles.

Key words: antiviral activity, N-benzimidazole-sulfonamide derivatives, phage, lytic activity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Черкес Ф. К., Богоявленская Л. Б., Бельская Н. А. Микробиология / Ф. К. Черкес, Л. Б. Богоявленская, Н. А. Бельская – М.: «Медицина», 1986. – 512 с.
2. Abatangelo V. Broad-range lytic bacteriophages that kill *Staphylococcus aureus* local field strains / V. Abatangelo, N. Peressutti Bacci, C.A. Boncompain, A.F. Amadio et al. // PloS One. – 2017. – Vol. 12(7). – P. e0181671.
3. Azam A.H. Peculiarities of *Staphylococcus aureus* phages and their possible application in phage therapy / A. H. Azam, Y. Tanji // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2019. – Vol. 4. – P. 11–22.
4. Becheker I. The Antibacterial and Cytotoxic Activities of Four New Sulfonamides Against Clinical Gram-Negative Bacteria / I. Becheker, H. Berredjerm, W. Boufas, B. Malika // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2016. – Vol. 39. – P. 125–133.



5. Cock I. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts / I. Cock, F. R. Kalt // *Pharmacognosy Res.* – 2010. – Vol. 2(4). – P. 221–228.

6. De Clercq E. Highlights in the discovery of antiviral drugs: A personal retrospective / E. De Clercq // *J Med Chem.* – 2010. – Vol. 53. – P. 1438–1452.

7. Deghorain M. The *Staphylococci* phages family: an overview / M. Deghorain, L. Van Melderen // *Viruses.* – 2012. – Vol. 4(12). – P. 3316–35.

8. Fangcheng H. Synthesis, Antiviral Activity, and Mechanisms of Purine Nucleoside Derivatives Containing a Sulfonamide Moiety / H. Fangcheng, S. Jing, W. Yanju, W. Shaobo, C. Jixiang, G. Xiuhai, S. Baoan, H. Deyu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2019. – Vol. 67 (31). – P. 8459–8467.

9. Genç Y. Antimicrobial activity of some sulfonamide derivatives on clinical isolates of *Staphylococcus aureus* / Y. Genç, R. Ozkanca, Y. Bekdemir // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2008. – Vol. 20. – P. 7–17.

10. Gerhardt A. Testing linen disinfection procedures in practice with phage-charged-bioindicators / A. Gerhardt, H. Mucha, D. Höfer // *International Journal of Health Care Quality Assurance.* – 2012. – Vol. 25, Iss. 6. – P. 519–531.

11. Gordillo Altamirano F.L. Phage Therapy in the Postantibiotic Era / F.L. Gordillo Altamirano, J.J.B. Gordillo Altamirano, J.J. Barr // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2019. – Vol. 32(2). – P. 1–25.

12. Jassim S.A.A. *In vitro* Evaluation of the Antiviral Activity of an Extract of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Pits on a *Pseudomonas* Phage // S.A.A. Jassim, M. A. Naji // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* – 2010. – Vol. 7(1). – P. 57–62.

13. Lenski R.E. Bacteria and phage: A model system for the study of the ecology and co-evolution of hosts and parasites / R.E. Lenski, B.R. Levin. – L: The Linnean Society of London, 1985. – P. 222–265.

14. Li T.-M. Application of phage-indicator model in evaluation of antiviral drugs *in vitro* / T.-M. Li, X.-C. Mou, L. Chen, X.-Y. Cao, Y. Sun, Z.-Y. Yang // *Proc. of IEEE International Symposium on IT in Medicine and Education.* – 2011. – P. 438–440.

15. Malalasekara L. A preliminary study on application of phage-indicator model in evaluation of antiviral drugs / L. Malalasekara, D. L. Jayaratne // *Sri Lanka Association for the Advancement of Science. Proceedings of the 71st Annual Sessions.* – 2015. – Part I. – P. 413/D.

16. Oliveira A. New Sulfonamides Derived from Carvacrol: Compounds with High Antibacterial Activity against Resistant *Staphylococcus aureus* Strains / A. Oliveira, L. Canzian Llanes, I. I. Brighente, R. Nunes et al. // *Journal of Biosciences and Medicines.* – 2016. – Vol. 04. – P. 105–114.

17. Sezonov G. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth / G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D'Ari // *J Bacteriol.* – 2007. – Vol. 189(23). – P. 8746–8749.

18. Shigehisa R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family *Podoviridae* genus N4-like viruses isolated in Japan / R. Shigehisa, J. Uchiyama, S.-I. Kato, I. Takemura-Uchiyama, K. Yamaguchi, R. Miyata, T. Ujihara, Y. Sakaguchi, N. Okamoto, H. Shimakura, M. Daibata, M. Sakaguchi, S. Matsuzaki // *Microbiol Immunol.* – 2016. – Vol. 60. – P. 64–67.



19. *Supuran C.T.* Antiviral sulfonamide derivatives / C. T. Supuran, A. Innocenti, A. Mastrolorenzo, A. Scozzafava // *Mini Rev Med Chem.* – 2004. – Vol. 4(2). – P. 189–200.

References

1. Cherkes FK, Bogoyavlenskaya LB, Belskaya NA. *Microbiologia.* Moscow: Medicina, 1986; 512. [In Russian].
2. Abatangelo V, Peressutti Bacci N, Boncompain CA, Amadio FA et al. Broad-range lytic bacteriophages that kill *Staphylococcus aureus* local field strains. *PloS One.* 2017; 12(7): e0181671.
3. Azam AH, Tanji Y. Peculiarities of *Staphylococcus aureus* phages and their possible application in phage therapy. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2019; 4: 11-22.
4. Becheker I, Berredjerm H, Boufas W, Malika B. The Antibacterial and Cytotoxic Activities of Four New Sulfonamides Against Clinical Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2016; 39: 125-133.
5. Cock I, Kalt FR. A modified MS2 bacteriophage plaque reduction assay for the rapid screening of antiviral plant extracts. *Pharmacognosy Res.* 2010; 2(4): 221-228.
6. De Clercq E. Highlights in the discovery of antiviral drugs: A personal retrospective. *J Med Chem.* 2010; 53: 1438-1452.
7. Deghorain M, Van Melderen L. The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses.* 2012; 4(12): 3316-35.
8. Fangcheng H, Jing S, Yanju W, Shaobo W et al. Synthesis, Antiviral Activity, and Mechanisms of Purine Nucleoside Derivatives Containing a Sulfonamide Moiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2019; 67 (31): 8459-8467.
9. Genç Y, Ozkanca R, Bekdemir Y. Antimicrobial activity of some sulfonamide derivatives on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2008; 20: 7-17.
10. Gerhardts A, Mucha H, Höfer D. Testing linen disinfection procedures in practice with phage-charged-bioindicators. *International Journal of Health Care Quality Assurance.* 2012; 25(6): 519-531.
11. Gordillo Altamirano FL, Gordillo Altamirano JJB, Barr JJ. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical Microbiology Reviews.* 2019; 32(2): 1-25.
12. Jassim SAA, Naji MA. *In vitro* Evaluation of the Antiviral Activity of an Extract of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Pits on a *Pseudomonas* Phage. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2010; 7(1): 57-62.
13. Lenski RE, Levin BR. Bacteria and phage: A model system for the study of the ecology and co-evolution of hosts and parasites. L: The Linnean Society of London, 1985: 222-265.
14. Li T.-M., Mou X-C, Chen L, Cao X-Y et al. Application of phage-indicator model in evaluation of antiviral drugs *in vitro*. *Proc. of IEEE International Symposium on IT in Medicine and Education.* 2011: P. 438-440.
15. Malalasekara L, Jayaratne DL. A preliminary study on application of phage-indicator model in evaluation of antiviral drugs. Sri Lanka Association for the Advancement of Science. *Proceedings of the 71st Annual Sessions.* 2015; Part I: 413/D.



16. Oliveira A, Canzian Llanes L, Brighente I, Nunes R et al. (2016). New Sulfonamides Derived from Carvacrol: Compounds with High Antibacterial Activity against Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Biosciences and Medicines*. 2016; 04: 105-114.

17. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*. 2007; 189(23); 8746-8749.

18. Shigehisa R, Uchiyama J, Kato S.-I, Takemura-Uchiyama I et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family *Podoviridae* genus N4-like viruses isolated in Japan. *Microbiol Immunol*. 2016; 60: 64-67.

19. Supuran CT, Innocenti A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. Antiviral sulfonamide derivatives. *Mini Rev Med Chem*. 2004; 4(2): 189-200.

Стаття надійшла до редакції 11.04.2020 р.



УДК 579.695

О.Г. Горшкова

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38(068) 278 02 05, e-mail: helen-good@ukr.net

ОЦІНКА ПАТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІЙ-ДЕСТРУКТОРІВ ВАЖКООКИСНЮВАЛЬНИХ ОРГАНІЧНИХ СПОЛУК

Мета. Оцінка потенційно патогенних властивостей бактерій-деструкторів органічних сполук на моделях культури клітин людини і тварин та на білих мишах. **Методи.** Оцінку патогенних властивостей за показниками інвазивності та цитотоксичності проводили *in vitro* на культурах клітин людини Her-2 та тварин L20B, а також *in vivo* на лабораторних білих мишах. **Результати.** Експериментально підтверджено, що протягом 96 годин спостережень бактерії-деструктори не викликали морфологічних змін і деструкцію моношару перещеплюваних культур клітин людини Her-2 і миші L20B. Бактерії не проникали в цитоплазму і не інфікували клітини, що свідчило про відсутність в них інвазивних і цитотоксичних властивостей. У лабораторних білих мишей клінічних ознак токсикозу та загибелі тварин не відмічалось. Протягом всього періоду спостереження всі тварини зберігали життєздатність, добре поїдали корм, змін з боку хутряного покриву не помічено. **Висновок.** Результати досліджень свідчать про те, що штами бактерій-деструкторів *Bacillus subtilis* ONU551, *Brevibacillus centrosporus* Ф14, *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas ceracia* ONU327 не володіють інвазивними та цитотоксичними властивостями у культурах клітин людини Her-2 і тварин L20B, а також вірулентністю для лабораторних білих мишей.

Ключові слова: бактерії-деструктори, патогенність, інвазивні та цитотоксичні властивості, культури клітин людини і тварин, лабораторні тварини.

Бурхливий розвиток промисловості призвів до забруднення біосфери різноманітними важкоокиснювальними органічними поліюгантами, що володіють токсичними, мутагенними, тератогенними та канцерогенними властивостями [1, 14]. Особливу небезпеку становлять важкоокиснювальні сполуки – вуглеводні нафти, фенол, поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ), синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР), зокрема біологічно «жорсткі» ароматичної природи – алкілбензолсульфонати, оксietiльовані алкіл феноли та інш. [10, 15].

У зв'язку з цим особливо важливе значення мають дослідження, присвячені розробці методів детоксикації органічних сполук. Одним з перспективних напрямків стало використання біохімічної діяльності мікроорганізмів, що дозволило розробити ефективні методи очистки стічних вод, морської



води, нафтозабрудненого ґрунту [3, 4, 12, 13]. Однак практичне застосування штамів бактерій-деструкторів можливе тільки за відсутності у них патогенних властивостей. Тому вивчення взаємодії бактерій-деструкторів з живими об'єктами у модельних системах, зокрема взаємовідносини між мікроорганізмами та макроорганізмами становить практичний інтерес.

У літературі є дані щодо використання клітинних культур для диференціації авірулентних штамів, визначення інвазивних та цитотоксичних властивостей бактерій, у тому числі потенційних біодеструкторів [2, 8, 11, 16, 17].

Метою роботи була оцінка потенційно патогенних властивостей бактерій-деструкторів важкоокиснювальних органічних сполук на моделях культур клітин людини і тварин та на білих мишах.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були 5 штамів бактерій-деструкторів важкоокиснювальних органічних сполук, відібраних для використання у біотехнологіях очистки стічних вод, морської води та ґрунту з колекції культур мікроорганізмів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова: деструктори фенолу – *Bacillus subtilis* ONU551 (Ф13) і *Brevibacillus centrosporus* Ф14, ізольовані зі фармацевтичних стічних вод; деструктори ПАР, фенолу та вуглеводнів нафти – *Pseudomonas fluorescens* ONU328 та штам *Pseudomonas maltophilia* ONU329, ізольований з морської води, та виділений з нафтозабрудненого ґрунту штам *Pseudomonas cepacia* ONU327; деструктор азотвмісних органічних барвників – *Pseudomonas aeruginosa* 2-9, ізольований з промислових стічних вод килимного комбінату [4, 15].

Бактерії зберігали на м'ясопептонному агарі в пробірках з гумовими корками, під шаром вазелінової олії.

Оцінку патогенних властивостей проводили на рівнях клітин та організмів: *in vitro* на культурах клітин людини Нер-2 та тварин L20В, а також *in vivo* на лабораторних білих мишах [4, 5, 6, 9].

Для вивчення цитотоксичних та інвазивних властивостей бактерій-деструкторів використовували перещеплювані культури клітин карциноми гортані людини Нер-2 та фібробластів мишей L20В. При культивуванні клітин застосовували середовище 199, що містило 10% сироватки великої рогатої худоби. Посівна доза складала $3-5 \times 10^4$ клітин у 1 мл ростового середовища. Культивували клітини за температури 37 °С протягом 72 год до утворення моношару клітин.

Інокуляцію культури клітин здійснювали суспензією 18-годинної культури бактерій, яку вирощували на м'ясопептонному агарі за температури 30 °С. Посівна доза складала 1×10^5 клітин бактерій у 1 мл ростового середовища 199.

Після інокуляції культур клітин бактеріями, через визначені інтервали часу (24, 48, 72, 96 год) здійснювали цитологічні дослідження нативних незабарвлених і постійних зафіксованих фіксатором Буена і забарвлених гематоксилін-еозином препаратів.

Патогенні властивості бактерій-деструкторів *in vitro* на культурі клітин оцінювали за 2-ма показниками:



– цитотоксичну дію через 24–96 год визначали візуально при мікроскопічному дослідженні постійних препаратів за морфологічними змінами окремих клітин і ступенем дегенерації моношару, яку враховували за кількістю нежиттєздатних клітин. Через 96 год знімали клітини з поверхні скла за допомогою скляного шпателя з гумовою насадкою, забарвлювали трепановим синім (у концентрації 0,01%), при цьому нежиттєздатні клітини забарвлювалися дифузно у синій колір, їх кількість виражали у відсотках (%). Критерієм цитотоксичності було збільшення кількості нежиттєздатних клітин у моношарі до 10% і більше у порівнянні з контролем;

– інвазивну активність оцінювали через 24–96 годин за кількістю інфікованих бактеріями клітин моношару у постійних забарвлених препаратах, виражали у відсотках (%). Критерій інвазивності – поява у моношарі клітин контамінованих мікроорганізмами [5].

Дослідження вірулентності бактерій-деструкторів здійснювали у гострих дослідах *in vivo* на моделі білих мишей. Використовували безпородних статевозрілих білих мишей вагою 18 ± 2 г. Тварини були адаптовані протягом 15 діб до умов утримання. Було сформовано 10 дослідних і одна контрольна група тварин по чотири особини одного віку в кожній. Суспензію добових культур бактерій концентрацією 4×10^9 і 40×10^9 КУО/мл готували на стерильному фізіологічному розчині. Досліджуваний матеріал вводили по 0,5 мл внутрішньочеревинно за допомогою ін'єкцій. Мишам контрольної групи вводили 0,5 мл фізіологічного розчину. Спостереження за зараженими тваринами вели протягом 14 діб. LD_{50} визначали за методом Ріда і Менча. Критерієм авірулентності слугувала відсутність інфекційної патології та загибелі мишей протягом 14 діб. Контролювали поведінкові реакції та фізіологічний стан мишей [6, 9].

Експериментальні дослідження на культурах клітин проводили у п'ятикратному повторі, на лабораторних тваринах – у чотирьохкратному повторі. Математичне опрацювання результатів досліджень здійснювали з використанням комп'ютерної програми MSExcel [7].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати дослідження патогенних властивостей бактерій-деструкторів органічних сполук *in vitro* та *in vivo* наведені у таблиці.

З наведених у таблиці даних видно, що протягом 96 год спостережень бактерії *B. subtilis* ONU 551, *B. centrosporus* Ф14, *P. ceracia* ONU 327, *P. fluorescens* ONU 328 та *P. maltophilia* ONU 329 не викликали морфологічних змін і деструкцію моношару перещеплюваних культур клітин людини Нер-2 і миші L20B, не проникали в цитоплазму і не інфікували клітини, тобто цитотоксичні та інвазивні властивості в них були відсутні.

Штам *P. aeruginosa* 2-9 вже в першу добу спостережень викликав виражений цитопатичний ефект у моношарі перещеплюваних культур клітин людини Нер-2 та тварин L20B, який проявлявся у округленні клітин, вакуолізації та грануляції цитоплазми, деформації, зморщуванні та пікнозі ядер. Реєструвалася повна дегенерація клітин моношару перещеплюваних культур клітин Нер-2 та L20B, що свідчило про цитотоксичну активність штаму *P. aeruginosa*



Таблиця

Результати оцінки патогенних властивостей бактерій-деструкторів органічних сполук *in vitro* та *in vivo*

Table

Results of evaluation of pathogenic properties of bacteria-destructors of organic compounds *in vitro* and *in vivo*

| Штам | Культура клітин (експозиція 96 год) | | | | Тварини* |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | людини Нер-2 | | миші L20В | | білі миші |
| | Цитотоксичні | Інвазивні | Цитотоксичні | Інвазивні | Вірулентні |
| | Деструкція моношару, % | Кількість інфікованих клітин, % | Деструкція моношару, % | Кількість інфікованих клітин, % | Кількість тварин, що загинули, % |
| <i>B. subtilis</i> ONU551 (Ф13) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. centrosporus</i> Ф14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. seracia</i> ONU327 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. fluorescens</i> ONU328 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. maltophilia</i> ONU329 | 5±1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>P. aeruginosa</i> 2-9 | 97±12 | 100 | 100 | 100 | 75±8 |

Примітка:* експозиція 14 діб

Note:* 14 daysexposure

2-9. Бактерії активно проникали до клітин, у цитоплазмі реєстрували їх скупчення біля ядра. Через 24 год експозиції майже половина клітин моношару була інфікована. Через 96 годин число інфікованих клітин сягало 100%, моношар був повністю зруйнований – кількість нежиттєздатних клітин сягала 97±12 – 100%, що свідчило про наявність у бактерій *P. aeruginosa* 2-9 цитотоксичних і інвазивних властивостей.

В експериментах на білих лабораторних мишах встановлено, що бактерії-деструктори важкоокиснювальних органічних сполук *B. subtilis* ONU 551, *B. centrosporus* Ф14, *P. fluorescens* ONU 328, *P. maltophilia* ONU 329 та *P. seracia* ONU 327 не володіють вірулентними властивостями. Протягом всього періоду спостереження після введення суспензії живих клітин бактерій внутрішньочеревинно всі тварини зберігали життєздатність, добре поїдали корм, змін з боку хутряного покриву не помічено. Миші були активними, фізіологічні відправлення у них не порушувалися, поведінкові реакції були звичайними. Клінічних ознак токсикозу не відмічено. Середні вірулентні дози не досягнули $LD_{50\text{в/ч}} > 2,0 \times 10^9$ кл/миш і перевищують рекомендовані порогові значення для IV-ого класу небезпеки штамів – “малонебезпечних, практично без алергенної та загальнотоксичної дії” [9].



Штам *P. aeruginosa* 2-9 – деструктор азотовмісних органічних барвників викликав загибель $75\pm 8\%$ мишей на 14 добу експозиції, що свідчить про його вірулентність.

В результаті експериментальних досліджень встановлено залежність між показниками патогенності бактерій-деструкторів органічних сполук на клітинному та організмовому рівнях – *in vitro* на культурах клітин людини Нер-2 та тварин L20В, та *in vivo* на лабораторних білих мишах.

Дані літератури свідчать про те, що для оцінки патогенних властивостей штамів бактерій-деструкторів, виробничих штамів, мікробних препаратів дослідники переважно використовують лабораторних тварин, що потребує економічних витрат на їх підтримання, харчування та інш. [6, 9, 17]. На підставі наших досліджень можемо рекомендувати використання методу культур клітин людини та тварин для первинного скринінгу патогенності бактерій-деструкторів ізольованих з різних джерел (стічних вод, ґрунту, водного середовища), а також колекційних штамів. Цей метод дозволяє у короткий термін (96 год) визначити цитотоксичність та інвазивність великої кількості штамів та відібрати серед них ті, що не володіють патогенними властивостями.

Таким чином, результати наших експериментальних досліджень свідчать про те, що штами бактерій-деструкторів органічних сполук *B. subtilis* ONU 551, *B. centrosporus* Ф14, *P. fluorescens* ONU 328, *P. maltophilia* ONU 329, *P. ceracia* ONU 327 не патогенні – не володіють інвазивними та цитотоксичними властивостями у культурі клітин людини Нер-2 і тварин L20В; та вірулентністю для ссавців – лабораторних білих мишей.

О.Г. Горшкова

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38(068) 278 02 05, e-mail: helen-good@ukr.net

ОЦЕНКА ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ ТЯЖЕЛООКИСЛЯЕМЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Реферат

Цель. Оценка потенциально патогенных свойств бактерий-деструкторов органических соединений на моделях культур клеток человека и животных и на белых мышах. **Методы.** Оценку патогенных свойств по показателям инвазивности и цитотоксичности проводили *in vitro* на культуре клеток человека Нер-2 и животных L20В, а также *in vivo* на лабораторных животных белых мышах. **Результаты.** Экспериментально подтверждено, что на протяжении 96 часов наблюдений бактерии-деструкторы не вызвали морфологических изменений и деструкцию монослоя перевиваемых культур клеток человека Нер-2 и мыши L20В. Бактерии не проникали в цитоплазму и не инфицировали клетки, что свидетельствовало об отсутствии у них инвазивных и цитотоксических свойств. У лабораторных белых мышей клинических признаков токсикоза и гибели животных не отмечалось. На протяжении всего периода наблюдений все животные сохра-



няли жизнеспособность, хорошо употребляли корм, изменений со стороны шерстяного покрова не отмечено. **Вывод.** Результаты исследований свидетельствуют о том, что штаммы бактерий-деструкторов *Bacillus subtilis* ONU 551, *Brevibacillus centrosporus* Ф14, *Pseudomonas fluorescens* ONU 328, *Pseudomonas maltophilia* ONU 329, *Pseudomonas cepacia* ONU 327 не обладают инвазивными и цитотоксическими свойствами в культуре клеток человека Hep-2 и животных L20B, а также вирулентностью для млекопитающих – лабораторных белых мышей.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, патогенность, инвазивные и цитотоксические свойства, культуры клеток человека и животных, лабораторные животные.

O.G. Gorshkova

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38(068) 278 02 05, e-mail: helen-good@ukr.net

ASSESSMENT OF PATHOGENIC PROPERTIES OF BACTERIA-DESTRUCTORS OF HEAVY- OXIDIZED ORGANIC COMPOUNDS

Summary

Aim. Assessment of potentially pathogenic properties of bacteria-destroyers of organic compounds on the model of cell cultures of human and animal and on white mice. **Methods.** Evaluation of pathogenic properties by indicators of invasiveness and cytotoxicity was carried out in vitro in a culture of human cells Hep-2 and animals L20B, as well as in vivo on laboratory animals of white mice. **Results.** Experimentally confirmed that for 96 hours observation bacteria-destroyers did not cause morphological changes and the destruction of the monolayer transplantable human cell cultures Hep-2 and mouse L20B. The bacteria did not penetrate the cytoplasm and did not infect the cells, which indicated of their lack of invasive and cytotoxic properties. In laboratory white mice, clinical signs of toxicosis and animal death were not observed. For the whole experimental period all animals stayed viable, no eating disorders were observed, no changes on the side of wool cover. **Conclusion.** The obtaining results showed that strains of bacteria-destroyers *Bacillus subtilis* ONU 551, *Brevibacillus centrosporus* Ф14, *Pseudomonas fluorescens* ONU 328 and *Pseudomonas maltophilia* ONU 329, *Pseudomonas cepacia* ONU 327 did not have invasive and cytotoxic properties in the cell culture Hep-2 and L20B; and was not pathogenic for mammals – laboratory white mouse.

Key words: bacteria-destroyers, pathogenicity, invasive and cytotoxic properties, human and animal cell cultures, laboratory animals.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Баландина А.Г., Хангильдин Р.И., Ибрагимов И.Г., Мартяшева В.А. Анализ воздействия предприятий нефтехимического комплекса на гидросферу и пути минимизации их негативного влияния // Башкирский химический журнал. – 2015. – Т. 22, № 1. – С. 115–126.
2. Дмитруха Н.Н. Культура клеток как *in vitro* модель в токсикологических исследованиях // MedixAnti-Aging. – 2013. – № 3. (33) – С. 50–55.
3. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляева Т.О., Пузирьова І.В., Лісютін Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4.. – С. 72–80.
4. Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Філіпова Т.О., Галкин Б.М., Іваниця Т.В., Горшкова О.Г., Чанішвілі Н. Оцінка цитотоксичних властивостей бактеріофага *Clostridium perfringens in vitro* на моделі перещеплюваної культури клітин людини НЕР-2 // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – С. 31–36.
5. Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Джахуди А.Г. Изучение патогенных свойств скользящих бактерий на модели культуры клеток мантии мидий // Микробиологический журнал. – 1992. – Т. 54. – № 5. – С. 17–21.
6. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С., Ширококов В.П. Практична мікробіологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – С. 100–111.
7. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морин, 2001. – 260 с.
8. Маркина О.В., Алексеева Л.П., Монахова Е.В. Культуры клеток в изучении биологической активности токсинов *Vibrio cholerae*, продуцируемых рекомбинантными штаммами *Escherichia coli* // Пробл. комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». – 2006. – № 19. – С. 91–93.
9. Наказ МОЗ України від 26 жовтня 2004 року N 521 «Про затвердження методичних вказівок "Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів"».
10. Павленко М.І., Сорока Я.М., Гвоздяк П.І., Кухар В.П. Біодеструкція поліциклічних ароматичних вуглеводнів // Катализ и нефтехимия. – 2007. – № 15. – С. 46–62.
11. Пименова Е. В. Разработка метода оценки цитотоксичности антигенов возбудителя мелиоидоза *in vitro* на модели перевиваемых клеточных культур: Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук 03.02.03 – микробиология. – Волгоград, 2016. – 115 с.
12. Серебренникова М.К. Биодegradация нефтяных углеводородов иммобилизованными родококками в колоночном биореакторе: Дисс. Канд. биол. наук. – Пермь, 2014. – 159 с.
13. Сопрунова О.Б., Утепешева А.А., Виет Тиен Нгуен Микроорганизмы – деструкторы ПАВ в водных средах// Вестник Астраханского государственного технического университета. Серия: Рыбное хозяйство. – 2013. – № 1. – С. 83–90.
14. Bergé A., Cladière M., Gasperi J., Coursimault A., Tassin B., Moiller-



on R. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols (Review) // *Envir. Sci. Pollut. Res.* – 2012. – Vol. 19, № 9. – P. 3798–3819.

15. *Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Galkin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa.* Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych. – Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1). – 2018. – 85 p.

16. *Harley V.S., Dance D.A.B., Drasar B.S.* Effects of *Burkholderia pseudomallei* and other *Burkholderia* species on eukaryotic cells in tissue culture// *Microbios.* – 1998. – Vol. 96. – P. 71–93.

17. *Tayabali A.F., Coleman G., Crosthwait J., Nguyen K.C., Zhang Y., Shwed P.* Composition and pathogenic potential of a microbial bioremediation product used for crude oil degradation. *PLOS ONE*|DOI:10.1371/journal.pone.0171911 February 8, 2017.

References

1. Balandina AG, Khangildin P.I., Ibragimov IG, Martiasheva VA Analysis of the impact of the petrochemical complex enterprises on the hydrosphere and ways to minimize their negative impact. *Bashkir chemical journal.* 2015; 22 (1): 115-126. [in Russian].

2. Dmitruha NN. Cell culture as an in vitro model in toxicological studies. *MedixAnti-Aging.* 2013; 3(33): 50-55. [in Russian].

3. Gudzenko TV, Voliuvach OV, Belyaeva TO, Puziriova IV, Lisutin GV, Gorshkova OG, Ivanytsya VO. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus. *Microbiology&Biotechnology.* 2013; 4 (24): 72-80. [in Ukrainian].

4. Ivanytsya VO, Gudzenko TV, Filipova TO, Galkin BM, Ivanytsya TV, Gorshkova OG, Changishvili N. Estimation of *Clostridium perfringens* bacteriophage cytotoxic properties in vitro on the human cells HEP-2 passaget culture model. *Microbiology&Biotechnology.* 2008; 2 (3):31-36.[in Ukrainian].

5. Ivanytsya VO, Gudzenko TV, Dzhanhudi AG. Study of pathogenic properties of gliding bacteria on a model of cell culture mussel mantle. *Microbiologicheskii zhurnal.* 1992; 54 (5); 17-21.[in Russian].

6. Klimnyuk SI, Sitnik IO, Tvorko MS, Shirobokov VP. *Practical Microbiology: A Handbook.* Ternopil: Ukrmedkniga, 2004: 100-111. [in Ukrainian].

7. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. *Statistical methods in medical and biological research using Excel.* K.: Morion, 2001: 260. [in Russian].

8. Markina OV, Alekseeva LP, Monakhova EV. Cell culture in the study of biological activity of *Vibrio cholerae* toxins produced by recombinant strains *Escherichia coli*. *Probl. Commission "Cholera and human pathogenic vibrions."* 2006; 19: 91-93. [in Russian].

9. Order of the Ministry of Health of Ukraine of October 26, 2004 N 521 "About the approval of methodical instructions"Medical and biological research of production strains of microorganisms and toxicological and hygienic evaluation of microbial preparations, determination of their safety and substantiation of hygienic standards and regulations". [in Ukrainian].



10. Pavlenko MI, Soroka JM, Hvozdiak PI, Kuhar VP. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Kataliz i neftehimija*. 2007; 15: 46-62. [in-Ukrainian].
11. Pimenova EV. Development of a method of evaluating cytotoxicity of antigens of melioidosis agent in vitro on the model of transplantable cell cultures: The dissertation for the degree of candidate of medical sciences: 03.02.03: microbiology: Volgograd, 2016: 115. [in Russian].
12. Serebrennikova MK. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by immobilized rhodococci in a column bioreactor: Diss. Cand. biol. sciences: Perm, 2014:159.[in Russian].
13. Soprunova OB, Utepesheva AA, Viet Tien Nguyen. Microorganisms - surfactant destructors in water media. *Journal of Astrakhan State Technical University. Series: Fisheries*. 2013; 1: 83-90. [in Russian].
14. Bergé A, Cladière M, Gasperi J, Coursimault A, Tassin B, Moilleron R. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols (Review). *Envir. Sci. Pollut. Res*. 2012; 19(9): 3798-3819. [in English].
15. Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Galkin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa. *Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych*. – Publisher: Globe Editisatra de markof International Book-Market Service Ltd., member of Omni Scriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1): 85. [in Polish]
17. Tayabali AF, Coleman G, Crosthwait J, Nguyen KC, Zhang Y, Shwed P. Composition and pathogenic potential of a microbial bioremediation product used for crude oil degradation. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0171911 February 8, 2017.

Стаття надійшла до редакції 17.04.2020 р.



Г.С. Лаврик, О.П. Корнійчук

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна,
e-mail: lavrykgal@gmail.com

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАЦИЛ ВІДНОСНО СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ З БІОПЛІВОК ХВОРИХ *ACNE VULGARIS*

Мета. Визначити ефективність антимікробної активності ізолятів лактобацил відносно біоплівкоутворювальних стафілококів *in vitro*. **Методи.** У дослідженні використано 15 штамів біоплівкоутворювальних стафілококів, які виділено з гнійних пустул хворих *acne vulgaris* та 7 штамів лактобацил. *L. fermentum* одержано з ротоглоткового слизу; *L. plantarum* – з випорожнень практично здорових осіб; пробіотичний штам *L. plantarum* 8P-A3 – з препарату «Лактобактерин» (Біофарма, Київ). Антимікробну активність бактеріальних культур лактобацил та відфільтрованих надосадових рідин лактобацил вивчали щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* за допомогою методу дифузії в агар через 12, 24, 48 год. **Результати.** Антагоністичну активність лактобацил визначали щодо 15 штамів *S. aureus*, у яких виявлено гени *icaA* та *icaD*. Для усіх штамів виду *L. plantarum* (12 год) встановлено високу антагоністичну активність та середню для *L. fermentum*. У 24-годинних досліджуваних культур лактобацил виявлена тенденція до зниження активності. Через 48 год спостерігається значне зменшення зон затримки росту стафілококів у порівнянні з результатами 12-ти годинних культур в середньому $7,9 \pm 0,2$ мм проти $12,5 \pm 0,7$ мм, відповідно. Фільтрування надосадової рідини лактобацил (12 год) призвело до різкого зменшення їхньої активності у 2,8 рази у порівнянні з показниками нативних культур лактобацил. **Висновки.** Антибактеріальна активність нативних бактеріальних культур лактобацил щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* через 12 год досягає максимуму. Встановлено мінімальні показники пригнічувальної дії відфільтрованої надосадової рідини лактобацил щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus*. Ізоляти *L. plantarum* виявляють вищу антагоністичну активність відносно стафілококів, ніж *L. fermentum*, і можуть бути запропоновані для розробки комбінованої терапії акне.

Ключові слова: антагонізм, *L. plantarum*, *L. fermentum*, біоплівка, *S. aureus*.

Бактеріальні клітини в складі біоплівки за своєю природою важко доступні для протимікробних препаратів у порівнянні із клітинами, що існують в планктонному стані, і, як відомо, їх важко зруйнувати після утворення біоплівкової структури. На даний час боротьба з плівкоутворювальними патогенами зосереджена на спробах перервати початкові стадії формування біоплівки, включаючи адгезію та її дозрівання [12].



Утворення біоплівки *Staphylococcus aureus* найчастіше пов'язано з наявністю поліцукридного міжклітинного адгезину PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), молекули якого відповідають за агрегацію клітин і плівкоутворення. Біосинтез PIA здійснюється за допомогою білків, кодованих ВСА оперона (*icaADBC*) [4].

В останні десятиліття через зростання швидкості появи резистентності серед патогенів схильних до утворення біоплівок [8], стало доцільним пошук альтернативних шляхів вирішення цих проблем [6].

Одним із способів підвищення ефективності протимікробної терапії захворювань, спричинених біоплівкоутворювальними стафілококами, є застосування еубіотичних препаратів, до складу яких входять лактобацили [14]. Серед лактобацил *Lactobacillus plantarum* є одним найбільш універсальних видів із визнаними пробіотичними властивостями [5].

Мета дослідження – визначити ефективність антимікробної активності ізолятів лактобацил відносно біоплівкоутворювальних стафілококів *in vitro*.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були 15 біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus*, ізольованих з гнійних пустул хворих *acne vulgaris*, та сім штамів лактобацил. Культури лактобацил ізольовано з пробіотичного препарату, випорожнень кишечника і слизу ротоглотки. Ізоляти *Lactobacillus fermentum* (n=3) одержано з ротоглоткового слизу, *L. plantarum* (n=3) – з випорожнень практично здорових осіб, пробіотичний штам *L. plantarum* 8P-A3 ізольовано з препарату «Лактобактерин» (Біофарма, Київ).

Виділення та ідентифікацію стафілококів проводили відповідно до чинних нормативно-методичних матеріалів [1]. Первинно здатність до плівкоутворення у виділених штамів було визначено за культуральними властивостями (підвищена в'язкість біомаси колонії). За даними наших попередніх досліджень у досліджуваних штамів *S. aureus* було виявлено гени *icaA* та *icaD* (публікація у друці).

Виділяли лактобацили на бульйоні та агарі de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) із додаванням 0,14% сорбінової кислоти та інкубували в анаеробних умовах за температури 37 °С впродовж 48 год.

Антибактеріальну активність досліджуваних штамів лактобацил вивчали щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* через 12, 24, 48 год за допомогою методу дифузії в агар, використовуючи нативні бактеріальні культури лактобацил (НБК) та їх відфільтровані надосадкові рідини лактобацил (ВНР). Молочнокислі бактерії інокулювали в MRS бульйоні за температури 37 °С в анаеробних умовах 12, 24, 48 год для встановлення стадії найвищої антагоністичної активності. 10 мкл культури (10^9 КУО/мл) індикаторних штамів стафілококів, вирощених в бульйоні Мюллера-Хінтона впродовж 24 год за температури 37 °С, наносили газоном на чашки з агаром Мюллера-Хінтона (HiMedia, India). У перфоровані лунки діаметром 5 мм на чашку вносили по 10 мкл бактеріальної культури лактобацил (через 12, 24, 48 год), надосадкові рідини лактобацил (12 год), які отримували центрифугуванням 15 хв при 4000 об/хв та відфільтруванням через мембранні фільтри ($d=0,45$ мкм).



Розраховували антагоністичну активність вимірюванням зон пригнічення росту, при цьому від отриманих результатів віднімали діаметр лунки. Зони пригнічення (мм): висока активність – 10–16 мм; середня 9–4 мм; низька <4 мм [18].

Варіаційно-статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакета для персональних комп'ютерів Microsoft Excel. Визначали такі основні статистичні показники, як середнє арифметичне значення (M), стандартну похибку (m). Достовірність змін встановлювали за t -критерієм Стюдента.

Результати та їх обговорення

Практично усі нативні культури лактобацил продемонстрували високі зони пригнічення стафілококів через 12 год, проте найбільшу зону пригнічення росту стафілокока зафіксовано за дії пробіотичного штаму *L. plantarum* 8P-A3 – 16,6±0,6 мм, середню активність проявив штаму *L. fermentum* 14 – 7,2±0,5 мм. Через 24 год спостерігається тенденція до зниження активності лактобацил ($p < 0,001$), через 48 год відстежується значне зменшення зон затримки росту стафілококів у порівнянні з результатами 12-ти годинних культур в середньому 7,9±0,2 мм проти 12,5±0,7 мм відповідно ($p < 0,001$) (рис. 1).

Потрібно відзначити, що антагоністична активність штамів *L. plantarum* (12 год) в середньому є значно вищою – 14,6±0,3 мм, ніж штамів *L. fermentum* – 9,1 ±0,3 мм ($p < 0,001$), такий тренд спостерігається і через 24, 48 год. Також серед усіх штамів лактобацил можна виділити пробіотичний штаму *L. plantarum* 8P-A3 та штаму *L. plantarum* 21, які зберегли високу антагоністичну активність через 48 год.

Щодо антибактеріальної дії відфільтрованої надосадової рідини лактобацил (12 год) виявлено різке зменшення їхньої активності у порівнянні з показниками нативних культур лактобацил (12 год) 12,6±1,0 мм проти 4,5±0,8 мм (рис. 1, 2 А, Б).

Порівнюючи антимікробну активність відфільтрованої надосадової рідини, встановлено середню активність штамів *L. plantarum* – 6,5±0,8 мм та низьку штамів *L. fermentum* – 1,9±0,8 мм ($p < 0,001$).

У раніше проведених дослідженнях, виділення стафілококів з гнійних пустул при акне показало, що стафілококи відіграють важливу роль у розвитку запального процесу на шкірі [3], що співпадає з результатами інших досліджень, які доводять, що популяційний рівень стафілококів зростає у процесі наростання клінічних проявів акне [2, 7].

Пробіотичні препарати, гальмуючи запалення, а також підтримуючи гідратацію шкіри і відновлення бар'єру мають першочергове завдання при лікуванні акне [11]. Тому нами було проведено дослідження з вивчення дії молочнокислих бактерій на біоплівкоутворювальні форми стафілококів.

Отримані результати продемонстрували значну відмінність у антагоністичній активності нативних культур лактобацил та відфільтрованої надосадової рідині відносно біоплівкоутворювальних стафілококів.

Досліджувані ізоляти нативних культур лактобацил через 12 год проявили високу активність, проте в динаміці росту їхня активність зменшувалася у порівнянні з 48-годинними культурами майже у 2 рази. Це підтверджує,



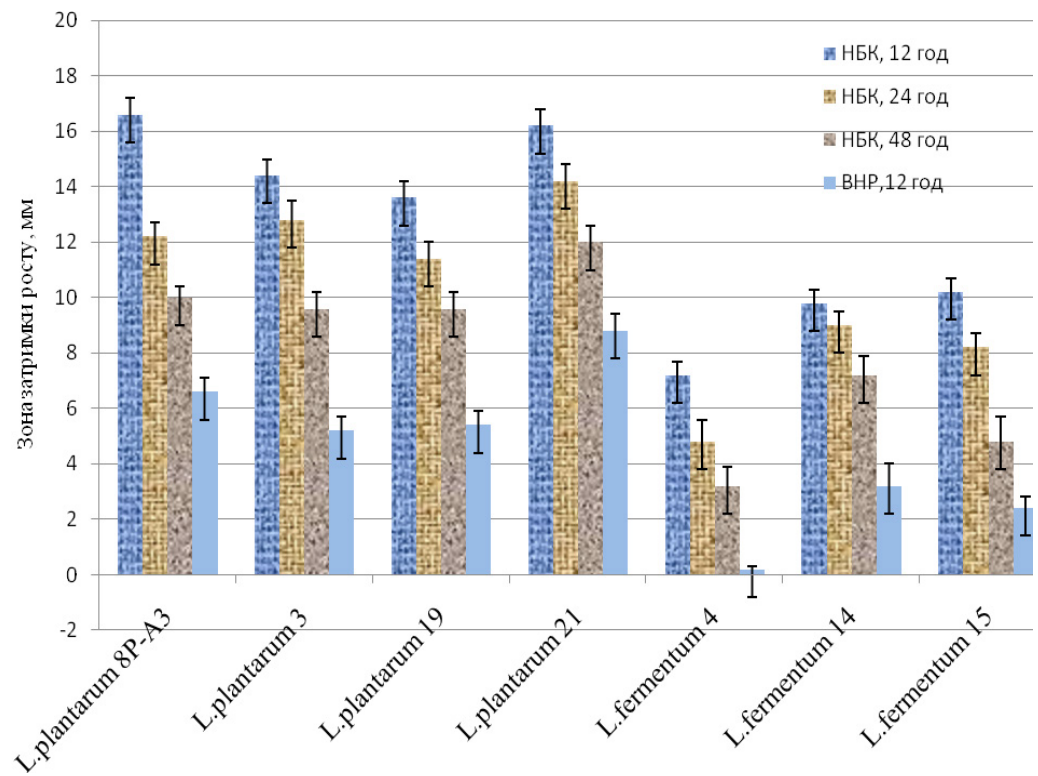


Рис. 1. Антимікробна активність нативних культур лактобацил та їх надосадових рідин відносно біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus* (n=15) через 12, 24, 48 год

Fig 1. Antimicrobial activity of native cultures of lactobacilli and their supernatant liquids against biofilm producing *S. aureus* strains (n=15) after 12, 24 and 48 hours

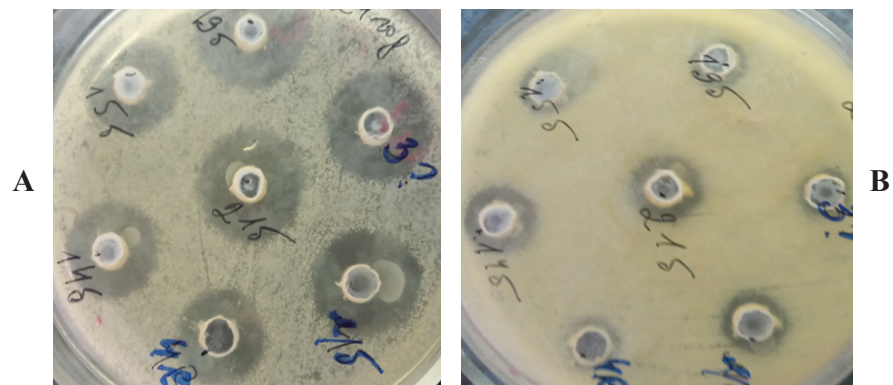


Рис. 2. Антагонізм досліджуваних штамів лактобацил і пробіотичного штаму відносно біоплівкоутворювального штаму *S. aureus* 3b.

A – антагоністична активність нативних бактеріальних культур лактобацил через 12 год.
B – антагоністична активність надосадових рідин відповідних штамів лактобацил через 12 год

Fig. 2. Antagonism of the studied strains of lactobacilli and a probiotic strain against biofilm producing *S. aureus* strain 3b.

A – antagonistic activity of native bacterial cultures of lactobacilli after 12 h.
B – antagonistic activity of the supernatant liquids of the similar lactobacilli strains after 12 h

що максимальний синтез антимікробних факторів відбувається впродовж активного росту бактерій.

У подібних дослідженнях синтез плантарицину VM-1 (*Lactobacillus plantarum* VM-1) починався швидко на ранній експоненціальній фазі і досягав максимуму на ранній стадії стаціонарної фази (16 годин). Таким чином, продукція плантарицину VM-1 пов'язана з фізіолого-біохімічною активністю, що було продемонстровано для всіх бактеріоцинів молочнокислих бактерій [9, 18].

Показники антагонізму відфільтрованої надосадової рідини лактобацил (через 12 год) були у 3 рази меншими за дані нативних культур. Результати антагоністичної активності нативних культур значно вищі через наявність живих клітин, які у фазах активного розмноження і росту продукують антимікробні метаболіти. Це може свідчити про те, що біоплівкоутворювальні стафілококи можуть бути індукторами біосинтезу бактеріоцинів.

Автори [15] виявили вищу антагоністичну активність нативних бактеріальних культур *L. plantarum*, ніж безклітинного супернатанта, щодо штамів *Listeria monocytogenes*.

За результатами аналізу антагоністичної активності штамів виду *L. fermentum* можна припустити, що характер їхньої антибактеріальної дії здебільшого пов'язаний не з бактеріоцинами, а синтезом інших антимікробних метаболітів.

Інші автори теж вказують на те, що бактеріоциногенні штами *L. fermentum* зустрічаються вкрай рідко. Вони були виділені з слини, вагіни жінок і зелених оливок [17].

Окрім того, багато дослідників підкреслюють, що здатність синтезувати антимікробні сполуки на кшталт бактеріоцинів, є специфічною для штаму [16].

Отже, досліджувані штами лактобацил, пристосовані до умов макроорганізму, активно культивуються і є досить ефективними антагоністами в умовах *in vitro*.

Зовнішнє застосування лактобацил підсилює ефект протимікробної хіміотерапії під час лікування патологічних процесів шкіри [11, 13], завдяки чому знижується медикаментозне навантаження на організм [10].

Таким чином, нативні бактеріальні культури лактобацил через 12 год виявляють високу антагоністичну активність щодо біоплівкоутворювальних штамів *S. aureus*. Показники пригнічувальної дії відфільтрованої надосадової рідини лактобацил є значно нижчими за відповідні показники нативних бактеріальних культур. Ізоляту *L. plantarum* виявляють вищу антагоністичну активність відносно стафілококів, ніж *L. fermentum*, тому можуть бути запропоновані для розробки комбінованої терапії акне.

Наші подальші дослідження будуть пов'язані із виявленням способів індукції бактеріоцинів досліджуваних штамів лактобацил та вивченням їхньої природи.



Г.С. Лаврик, Е.П. Корнийчук

Львовский национальный медицинский университет,
им. Данила Галицкого, ул. Пекарская, 69, Львов, Украина, 79010,
e-mail: lavrykgal@gmail.com

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ ОТНОСИТЕЛЬНО СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОПЛЕНОК БОЛЬНЫХ *ACNE VULGARIS*

Реферат

Цель. Определить эффективность антимикробной активности изолятов лактобацилл в отношении пленкообразующих стафилококков *in vitro*. **Методы.** В исследовании использовано 15 штаммов пленкообразующих стафилококков, выделенных из гнойных пустул больных *acne vulgaris* и 7 штаммов лактобацилл. *L. fermentum* получены из слизи ротоглотки; *L. plantarum* – из испражнений практически здоровых лиц; пробиотический штамм *L. plantarum* 8P-A3 – из препарата «Лактобактерин» (Биофарма, Киев). Изучали антимикробную активность бактериальных культур лактобацилл и отфильтрованных надосадочных жидкостей лактобацилл к пленкообразующим штаммам *S. aureus* с помощью метода диффузии в агар через 12, 24, 48 часов. **Результаты.** Определяли антагонистическую активность лактобацилл к 15 штаммам *S. aureus*, у которых обнаружены гены *icaA* и *icaD*. Для всех штаммов вида *L. plantarum* (12 ч) установлено высокую антагонистическую активность и среднюю для *L. fermentum*. У 24-часовых исследуемых культур лактобацилл выявлена тенденция к снижению их активности. Через 48 ч наблюдается значительное уменьшение зон задержки роста стафилококков в сравнении с результатами 12-ти часовых культур в среднем $7,9 \pm 0,2$ мм против $12,5 \pm 0,7$ мм, соответственно. Фильтрация надосадочной жидкости лактобацилл (12 ч) привело к резкому уменьшению их активности в 2,8 раза по сравнению с показателями нативных культур лактобацилл. **Выводы.** Антибактериальная активность нативных бактериальных культур лактобацилл к пленкообразующим штаммам *S. aureus* через 12 ч достигает максимума. Установлено, что показатели угнетающего действия отфильтрованной надосадочной жидкости лактобацилл к пленкообразующим штаммам *S. aureus* минимальные. Изоляты *L. plantarum* проявляют высокую антагонистическую активность в отношении стафилококков, чем *L. fermentum*, и могут быть предложены для разработки комбинированной терапии акне.

Ключевые слова: антагонизм, *L. plantarum*, *L. fermentum*, биоплёнка, *S. aureus*.



G.S. Lavryk, O.P. Korniychuk

Danylo Halytsky Lviv National Medical University,
69, Pekarska St., Lviv, 79010, Ukraine,
e-mail: lavrykgal@gmail.com

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LACTOBACILLI AGAINST STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BIOFILMS FROM PATIENTS WITH *ACNE VULGARIS*

Summary

Aim. Determine the effectiveness of the antimicrobial activity of *Lactobacillus* isolates against biofilm producing staphylococci in vitro. **Methods.** There were used 15 strains of biofilm producing staphylococci isolated from purulent pustules of patients with acne vulgaris and 7 strains of lactobacilli. *L. fermentum* ($n = 3$) were obtained from oropharyngeal mucus, *L. plantarum* ($n = 3$) from the feces of practically healthy individuals, probiotic strain *L. plantarum* 8P-A3 from the drug "Lactobacterin" (Biopharma, Kyiv). The antimicrobial activity of bacterial cultures of lactobacilli and filtered supernatant liquid of lactobacilli were studied using biofilm producing *S. aureus* strains by agar diffusion method after 12, 24 and 48 hours. **Results.** The antagonistic activity of lactobacilli was determined by 15 strains of *S. aureus* in which *icaA* and *icaD* genes were detected. For all strains of *L. plantarum* (12 h), high antagonistic activity was established and an average antagonistic activity for *L. fermentum* was established. In 24-h, in the studied lactobacilli cultures, there was observed a tendency of decreasing their activity. After 48 hours, a significant decrease in staphylococci growth inhibition zones was observed in comparison with the results of 12-hour cultures – on average 7.9 ± 0.2 mm versus 12.5 ± 0.7 mm, respectively. Filtration of the supernatant liquid of lactobacilli (12 h) led to a sharp decrease in their activity by 2.8 times compared with the rates of native cultures of lactobacilli. **Conclusions.** The antibacterial activity of native bacterial cultures of lactobacilli against biofilm producing *S. aureus* reaches a maximum level after 12 hours. The minimal inhibitory effects of the filtered supernatant liquid of lactobacilli against biofilm producing strains of *S. aureus* were established. Isolates of *L. plantarum* showed higher antagonistic activity against staphylococci than *L. fermentum*, and may be proposed as an option for the development of combination therapy of acne.

Key words: antagonism, *L. plantarum*, *L. fermentum*, biofilm, *S. aureus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бактеріологія і вірусологія: Нормативне виробничо-практичне видання. Частина 2. – К.: МНІАЦ мед. статистики, МВЦ «Медінформ», 2014. – 472 с.
2. Бурцева Г.Н., Сергеев А.Ю., Арзуманян В.Г., Сергеев Ю.Ю. Перифолликулярная микробиота кожи при акне. Часть I. Общие характеристики колонизации и резистентность к системным антибиотикам// Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2013. – №. 2. – С. 84–93.
3. Лаврик Г.С., Корнійчук О.П., Беседіна А.С., Воробець З.Д. Неокисний шлях метаболізму L-аргініну лімфоцитів периферичної крові у хворих



на *acne vulgaris* // Regulatory Mechanisms in Biosystems. – 2017. – 8, № 4. – P. 596–601.

4. Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2015. – 5. – P. 7.

5. da Silva Sabo S., Vitolo M., González J.M.D., de Souza Oliveira R. P. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria // Food Res. Int. – 2014. – № 64. – P. 527–536.

6. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces // Emerg. Infect. Dis. – 2002. – №8. – P. 881–890.

7. Dreno B., Martin R., Moyal D., Henley J. B., Khammari A., Seité S. Skin microbiome and *acne vulgaris*: *Staphylococcus*, a new actor in acne. // Experimental dermatology. – 2017. – 26, № 9. – C. 798–803.

8. Dryden M., Andrasevic A.T, Bassetti M., Bouza E., Chastre J., Bagueneid M. et al. Managing skin and soft-tissue infection and nosocomial pneumonia caused by MRSA: A 2014 follow-up survey // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2015. – 45. – P. 1–14.

9. Huang Y., Luo Y. B., Zhai Z. Y., Zhang H. X., Yang C. X., Tian H. T., Hao Y. L. Characterization and application of an anti *Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05–10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China // Food Control. – 2009. – 20. – P. 1030–1035.

10. Jung G.W., Tse J.E., Guiha I., Rao J. Prospective randomized open-label trial comparing the safety, efficacy and tolerability of an acne treatment regimen with and without a probiotic supplement in subjects with mild to moderate acne // J. Cutan. Med. Surg. – 2013. – 17, № 2. – P. 114–122.

11. Kober M.M., Bowe W.P. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging // International journal of women's dermatology. – 2015. – 1, № 2. – P. 85–89.

12. Mathur H., Field D., Rea M.C., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins // Biofilms Microbiomes. – 2018. – 4. – P. 1–13.

13. Muizzuddin N., Maher W., Sullivan M., Schnittger S., Mammone T. Physiologic effect of a probiotic on the skin // J. Cosmet. Sci. – 2012. – 63, № 6. – P. 385–395.

14. Nair N., Biswas R., Götz F., Biswas L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections // Infection and immunity. – 2014. – 82, № 6. – P. 2162–2169.

15. Oldak A., Zielińska D., Rzepkowska A., Kolożyn-Krajewska D. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: oscypek and korycinski cheese // BioMed Research international. – 2017.

16. Sip A., Więckowicz M., Olejnik-Schmidt A., Grajek W. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland // Food control. – 2012. – 26, № 1. – P. 117–124.

17. Wayah S. B., Philip K. Characterization, yield optimization, scale up and



biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. *Microbial cell factories*. – 2018. – 17, № 1. – P. 125.

18. Zhang H., Liu L., Hao Y., Zhong S., Liu H., Han T., Xie Y. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product // *Microbiol. Immunol.* – 2013. – 57. – P. 746–755.

References

1. Bakterioloģiia i virusoloģiia: Normatyvne vyrobnycho-praktychne vydannia. Chastyna 2. – K.: MNIATs med. statystyky, MVTs «Medinform», 2014.472 p. (In Ukrainian).

2. Burceva GN, Sergeev AY, Arzumanyan VG. et al. Perifollicular cutaneous microbiota in acne patients. Part I. Common patterns of colonization and resistance to systemic antimicrobials. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2013; 2: 84–87 (In Russian).

3. Lavryk GS, Korniychuk OP, Besedina AS, Vorobets ZD. The arginase pathway of L-arginine metabolism of peripheral blood lymphocytes in patients with *acne vulgaris*. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017;8 (4): 596–601 (In Ukrainian).

4. Arciola CR, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front. Cell Infect. Microbiol*. 2015; 5: 7.

5. da Silva Sabo S, Vitolo M, González JMD, de Souza Oliveira RP. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Res. Int*. 2014; 64: 527–536.

6. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis*. 2002; 8: 881-90.

7. Dreno B, Martin R, Moyal D, Henley JB, Khammari A, Seité S. Skin microbiome and *acne vulgaris*: *Staphylococcus*, a new actor in acne. *Exp. Dermatol*. 2017; 26: 798-803.

8. Dryden M, Andrasevic AT, Bassetti M, Bouza E, Chastre J. et al. Managing skin and soft-tissue infection and nosocomial pneumonia caused by MRSA: A 2014 follow-up survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2015; 45: 1–14.

9. Huang Y, Luo YB, Zhai ZY, Zhang HX, Yang CX, Tian HT, Hao YL. Characterization and application of an anti *Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05–10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control*. 2009; 20:1030–1035.

10. Jung GW, Tse JE, Guiha I, Rao J. Prospective randomized open-label trial comparing the safety, efficacy and tolerability of an acne treatment regimen with and without a probiotic supplement in subjects with mild to moderate acne. *J. Cutan. Med. Surg*. 2013; 17 (2): 114–122.

11. Kober MM, Bowe WP. The effect of probiotics on immune regulation, acne, and photoaging. *Int J Womens Dermatol*. 2015; 1: 85-89.

12. Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. *npj Biofilms Microbiomes*. 2018; 4: 1-13.



13. Muizzuddin N, Maher W, Sullivan M, Schnittger S, Mammone T. Physiologic effect of a probiotic on the skin. *J. Cosmet. Sci.* 2012; 63 (6): 385–395.
14. Nair N, Biswas R, Götz F, Biswas L. Impact of *Staphylococcus aureus* on pathogenesis in polymicrobial infections. *Infect. Immun.* 2014; 82:2162-2169.
15. Ołdak A, Zielińska D, Rzepkowska A, Kolożyn-Krajewska D. Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: oscypek and korycinski cheese. *BioMed research international.* 2017.
16. Sip A, Więckowicz M, Olejnik-Schmidt A, Grajek W. Anti-Listeria activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food control.* 2012; 26(1):117-124.
17. Wayah SB, Philip K. Characterization, yield optimization, scale up and biopreservative potential of fermencin SA715, a novel bacteriocin from *Lactobacillus fermentum* GA715 of goat milk origin. *Microbial cell factories.* 2018; 17 (1): 125.
18. Zhang H, Liu L, Hao Y, Zhong S, Liu H, Han T, Xie Y. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a traditionally fermented Chinese meat product. *Microbiol. Immunol.* 2013; 57:746-755.

Стаття надійшла до редакції 15.04.2020 р.



І.В. Страшнова, І.О. Ковтун, Н.В. Коротаєва

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ГУБОК ЧОРНОГО МОРЯ

Мета. Виділити молочнокислі бактерії з губок Чорного моря та дослідити їх основні біологічні властивості. **Методи.** Виділення штамів лактобацил та визначення їх чисельності у губках проводили, використовуючи середовища MRS і GYPB. Морфологію колоній та клітин, тінкторіальні властивості, каталазу та оксидазу активності, здатність до утворення індолу, сірководню, нітратредукції, окиснення/ферментації глюкози вивчали за загальноприйнятими методиками. Виділення метилових ефірів жирних кислот проводили відповідно до стандартного протоколу Sherlock Microbial Identification System. Ідентифікацію штамів за жирнокислотним складом проводили методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (база даних бібліотеки RTSBA 6 версія 6.2). Стійкість до морської солі визначали за інтенсивністю росту у MRS-бульйоні. Кислотоутворення визначали за активною і титрованою кислотністю у молоці. **Результати.** Кількість представників молочнокислих бактерій в досліджених чорноморських губках коливалася від $1,87 \times 10^5$ до $1,4 \times 10^9$ КУО/г залежно від губки. Серед жирних кислот бактерій, віднесених до видів *Lactobacillus vaccinoferus*, *L. parabuchneri* та *L. bifertentans*, переважали гексадеканова, нондеценна і 9-октадеценна кислоти. Оптимуми концентрації морської солі для росту досліджених штамів визначені у межах 2,5–5,0%. Через 24 год культивування титрована кислотність 74,5% штамів становила 26–46 °Т, а через 48 год 6,4% штамів демонстрували кислотність від 20 до 30 °Т, 78,6% – від 30 до 90 °Т, а 15,0% – більш, ніж 90 °Т. Більшість штамів закислювали середовище до рН 4,0–4,5. **Висновки.** При дослідженні молочнокислих бактерій чорноморських губок *Halictolona* sp. виявлено наявність в них представників роду *Lactobacillus*: *L. vaccinoferus*, *L. parabuchneri* і *L. bifertentans* та вивчено основні біологічні характеристики виділених бактерій.

Ключові слова: *Lactobacillus*, біологічні властивості, губки Чорного моря.

Молочнокислі бактерії (МКБ) дуже поширені в природі і, незважаючи на складні харчові потреби, особливості метаболізму, труднощі в їх адаптації і культивуванні в лабораторних умовах, виділити їх можна з багатьох природних джерел, зокрема як з хребетних, так і безхребетних тварин в різних еколого-географічних нішах. Однак, як їхня кількість, так і видовий склад, варіюють у дуже широких межах. Вони визначаються видом і віком тварини, місцем його мешкання, сезоном року і особливо характером харчування [9, 10].



На початку 21 століття увага багатьох дослідників прикута до морських молочнокислих бактерій [9]. Дослідження морського середовища на наявність молочнокислих бактерій обмежуються, в основному, промисловими об'єктами (рибою, креветками) або мікробіотою з води в небагатьох водних акваторіях [13]. Також в літературі майже відсутні систематизовані дані про знаходження молочнокислих бактерій у водних організмів з Чорного моря, що вказує на дуже низький рівень вивчення цих мікроорганізмів з водного середовища. Окрім цього повною мірою не досліджено біотехнологічний потенціал цих бактерій для розвитку марікультури та їх роль в раціональному використанні морських природних ресурсів, що робить актуальним вивчення МКБ Одеського узбережжя Чорного моря.

Метою роботи було виділити молочнокислі бактерії з губок Чорного моря та дослідити їх основні біологічні властивості.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження були морські губки *Haliclona* sp., зібрані за допомогою легковолодазних методів в Одеській затоці Чорного моря восени 2017 р. Мікробіологічні дослідження губок проводились не пізніше 2-х годин після збору.

Для визначення чисельності МКБ кожену губку подрібнювали на фрагменти розмірами приблизно 0,5 см, по 10 г яких поміщали у колби об'ємом 250 см³ і вносили 50 см³ стерильної дистильованої води. Дослідні проби перемішували в шейкері (фірми New Brunswick; при 250 RPM) при 25 °С протягом 3 год. Після цього робили серію 10-ти кратних послідовних розведень до такого ступеню, щоб можна було визначити передбачувану кількість мікроорганізмів в 1 г досліджуваної проби [4]. На поверхню чашок Петрі з живильними середовищами: стандартним середовищем MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) [8] і спеціальним для морських молочнокислих бактерій середовищем GYPB (Glucose Yeast Polypeptone Beef) [13] висівали по 0,1 см³ відповідних розведень. Посіви інкубували при 25, 37 °С протягом 24–48 год. Після чого проводили кількісний облік [4].

Для виявлення видового різноманіття подрібнені губки поміщали у пробірки з середовищами накопичення: MRS- і GYPB-бульйони [8, 13] та культивували при 25 та 37 °С протягом 48–72 годин. Виділення проводили, використовуючи MRS- і GYPB-агари.

Після отримання чистих культур вивчали основні біологічні властивості: морфологію колоній на MRS- і GYPB-агарах, характер росту в MRS- і GYPB-бульйонах, морфологію клітин та їх розташування в препаратах, тінкторіальні властивості, каталазну та оксидазну активності, здатність до утворення індолу, сірководню, нітратредукції, окиснення/ферментації глюкози [4, 11].

Профілі жирних кислот досліджували за [5]. Для аналізу жирнокислотного складу кожен штаб виділених бактерій культивували на середовищі MRS (Merck, Німеччина) при 37 °С протягом 48 год. Метиллові ефіри жирних кислот виділяли відповідно до стандартного протоколу Sherlock Microbial Identification System [14, 15]. Для цього в реакційну віалу поміщали 50 мг біо-



маси та додавали концентрований розчин NaOH. Суспензію змішували, поміщали на водяну баню і витримували 5 хв при 95–100 °С. Після чого змішування повторювали і витримували 25 хв на водяній бані при 95–100 °С для повного руйнування бактеріальних клітин та омилення ліпідів. До охолодженої суспензії додавали розчин підкисленого метанолу та витримували 10 хв на водяній бані при 80 °С для отримання метилових ефірів жирних кислот, які в подальшому екстрагували гексаном. Отриманий екстракт нейтралізували 0,3 М розчином NaOH та аналізували методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-йонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Колонка капілярна 25мм×0,2мм×0,33мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носії водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв [7]. Кількість кожної жирної кислоти було виражено у вигляді відсотка від загальної кількості клітинних жирних кислот, які присутні в концентрації більше ніж на 0,2%. Для ідентифікації досліджуваних штамів за їх жирнокислотним профілем використали програмне забезпечення MIDI Sherlock 4.5 та бібліотеку жирнокислотних профілів мікроорганізмів RSTBA 6 версії 6.2 [14, 15].

Для встановлення солестійкості штамів лактобацил готували живильне середовище MRS-бульйон з різним вмістом морської солі: 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% та 15%. Посівна доза – 5% добової бульйонної культури кожного штаму до об'єму середовища. Інтенсивність росту оцінювали через 48 год за 5-ти бальною шкалою, де 5 балів – виражений ріст в усьому об'ємі середовища, значне помутніння середовища; 4 бали – ріст в усьому об'ємі середовища, помутніння спостерігається у 2/3 частині середовища; 3 бали – середня інтенсивність росту з помутнінням у 1/3 частині середовища; 2 бали – інтенсивність росту низька, осад на дні пробірки; 1 бал – ріст майже відсутній, незначний осад; 0 балів – росту немає [8].

Кислотоутворення штамів оцінювали за активною і титрованою кислотністю при культивуванні в стерильному знежиреному молоці через 24–48 год. Для цього добові культури досліджуваних штамів засівали в стерильне молоко з розрахунку 3–5% посівного матеріалу до об'єму молока, поміщали в термостат та інкубували 24–48 год при температурі 37 °С. Під час обліку результатів враховували здатність культури сквашувати молоко та утворювати згусток [3].

Експерименти здійснювали в трьох повторях. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми Microsoft Office Excel 2003 [6].

Результати дослідження та їх обговорення

При проведенні досліджень на наявність МКБ у губках *Haliclona* sp., зібраних в Одеській затоці Чорного моря, ізолювано 63 штами бактерій, які за морфологічними, тінкторіальними, культуральними і фізіолого-біохімічними характеристиками були віднесені до роду *Lactobacillus*.

Усі виділені штами на MRS- і GYPB-агарах утворювали слизові, білі або напівпрозорі сферичні колонії. Встановлено, що усі виділені штами пред-



ставлені грампозитивними бактеріями. Клітини виділених штамів мали різну морфологію. Вони були від дуже коротких, що нагадували кокобацили до довгих, розташовувались поодинокі, попарно або утворювали ланцюги, клітини не утворювали спори, цисти і капсули (рис. 1).

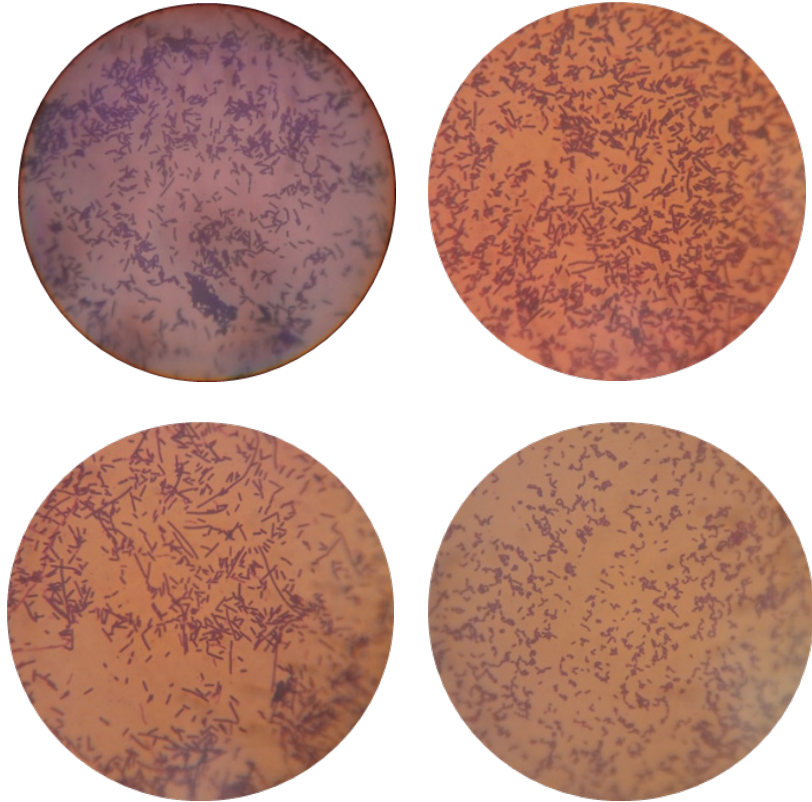


Рис. 1. Морфологія бактерій *Lactobacillus*, виділених з губок (×1000)

Fig.1. Morphology of *Lactobacillus* isolated from sponges (×1000)

Із літературних джерел відомо, що МКБ роду *Lactobacillus* характеризуються значним морфологічним поліморфізмом [1, 11]. Окрім того, довжина клітин у різних культур одних і тих самих видів бактерій залежить певною мірою від віку культури, складу середовища, способу інкубації. Тенденція до утворення ланцюжків змінюється у залежності від фази росту і рН середовища [11]. Суттєво на форму клітин впливають й інші фактори. Так, наприклад, при недостатчі вітаміну В₁₂, при опроміненні γ-променями, впливі магнітних полів, антибіотиків, лізоциму, рибонуклеази, відбувається гальмування поділу, що сприяє утворенню довгих, ниткоподібних клітин [1, 2]. Видовження клітин і фрагментація спостерігається на середовищах з високою кислотністю (рН 3,7), при значному вмісті хлориду натрію (до 6%), при температурі, що значно відрізняється від оптимальної, інколи, при високому вмісті етилового спирту [1].

Визначення характеру росту у середовищах MRS- і GYPB-бульйонах показало, що у процесі культивування лактобацили росли в усьому об'ємі середовища, з плином часу культури утворювали значне помутніння і осад.

Усі досліджені штами були каталазо- і цитохромоксидазонегативними; не відновлювали нітрати; споживали глюкозу в аеробних і анаеробних умовах; не утворювали індол і сірководень.

Таким чином, на підставі вивчення основних біологічних властивостей виділені культури віднесли до роду *Lactobacillus* [11].

Штами лактобацил виявлені в 10 із 17 досліджених губок *Haliclonas*. Їх кількість варіювала від $1,87 \times 10^5$ до $1,4 \times 10^9$ КУО/г залежно від губки (рис. 2).

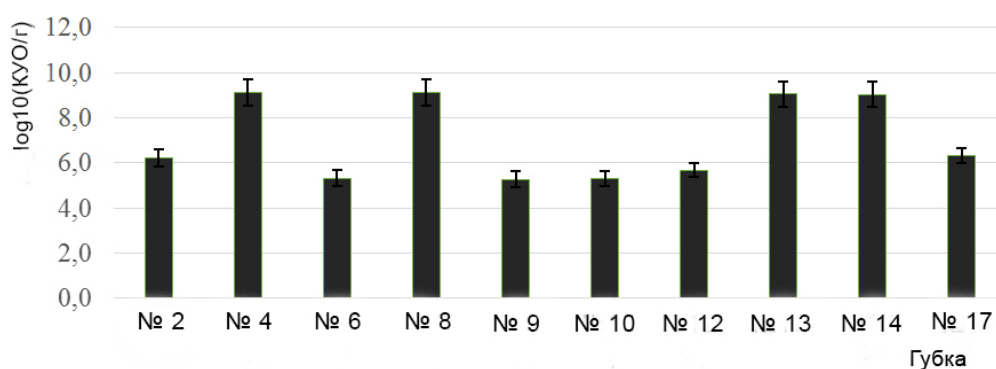


Рис. 2. Чисельність бактерій роду *Lactobacillus* в чорноморських губках

Fig. 2. The quantity of bacteria of the genus *Lactobacillus* in the Black Sea sponges

Максимальну кількість молочнокислих бактерій було ізольовано з губки № 4 – $1,4 \times 10^9$ КУО/г. Значна кількість лактобацил ($1,33 \times 10^9$ КУО/г; 17×10^9 КУО/г та $1,05 \times 10^9$ КУО/г) виявлена в губках № 8, 13 та 14, відповідно, а мінімальна – в губці № 9 – $1,87 \times 10^5$ КУО/г. Практично такою ж була кількість МКБ в губках № 6 і 10 – $2,13 \times 10^5$ КУО/г (рис. 2).

Для видової ідентифікації проведено аналіз жирнокислотного складу за допомогою газового хроматографу з використанням програмного забезпечення MIDI Sherlock 4.5 та бібліотеки жирнокислотних профілів мікроорганізмів RSTBA 6 версії 6.2 [14, 15], згідно чого виділені штами були віднесені до 3 видів: *Lactobacillus vaccinostercus*, *L. parabuchneri* та *L. bifermentans*. В залежності від губки кількість і відсоткове співвідношення видів лактобацил було різним (рис. 3).

У найменшій кількості із губок були виділені штами виду *L. vaccinostercus* (лише 5 штамів із 63 ізольованих, що склало 7,9%) (рис. 4).

У більшій кількості виділені представники видів *L. bifermentans* (36,5% штамів від усіх ізольованих) і *L. parabuchneri* (55,6% штамів).

З даних літератури відомо, що *Lactobacillus* sp. у логарифмічній та стаціонарній фазах містять основні жирні кислоти такі, як тетрадеканова, гексадекановата октадеканова кислоти [18]. Hilmi H. T. A. And al. (2007) встановили,

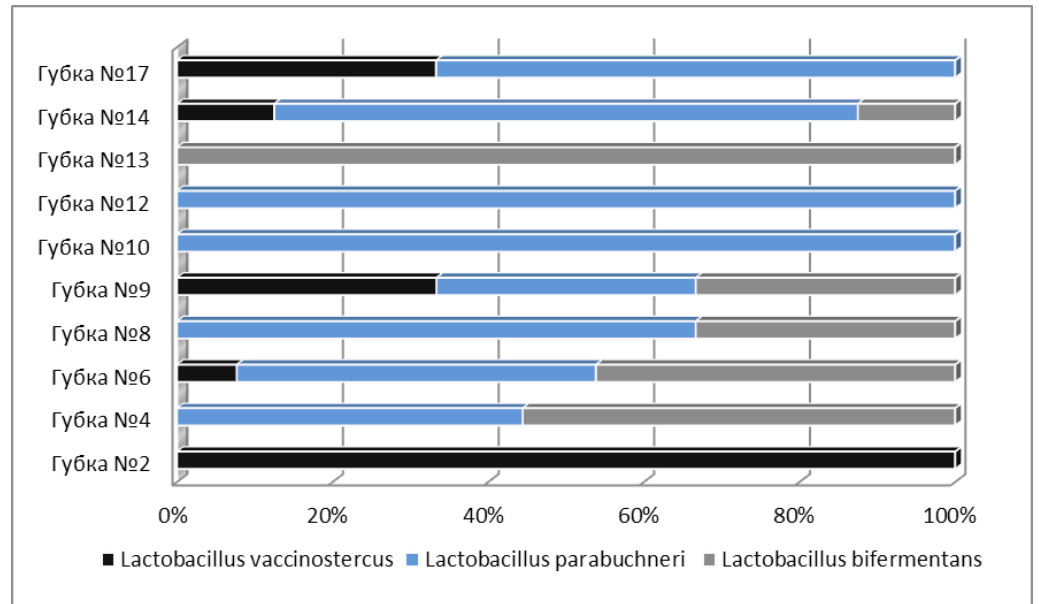


Рис. 3. Вміст представників різних видів роду *Lactobacillus* в чорноморських губках

Fig. 3. Content of representatives of different species of the genus *Lactobacillus* in the Black Sea sponges

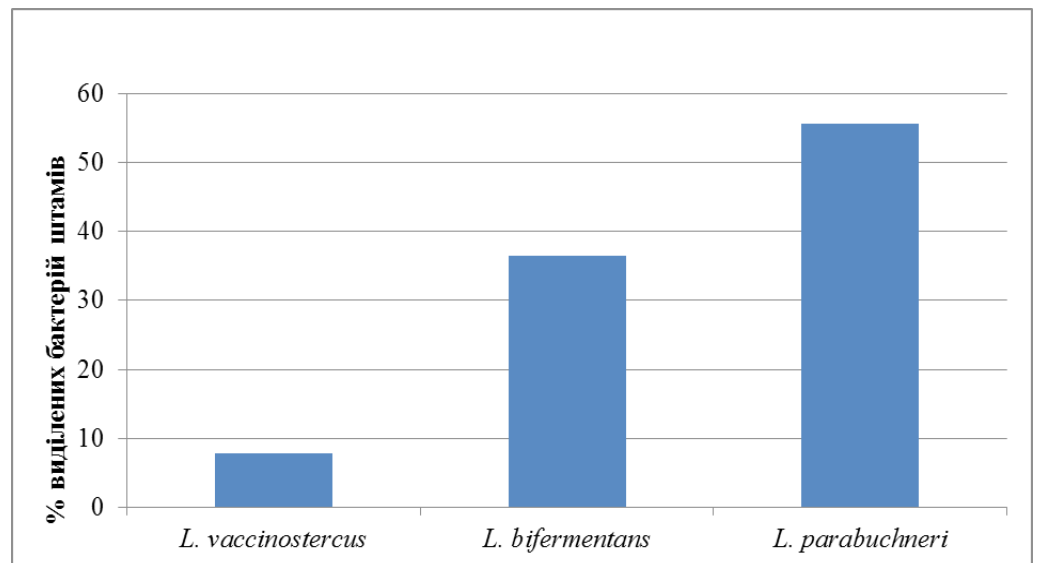


Рис. 4. Видова належність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із чорноморських губок

Fig. 4. Species belonging to bacteria of the genus *Lactobacillus* isolated from Black Sea sponges



що у ізолятів *L. reuteri* переважали ізомери 18:2; 18:1; 16:0 та 3-гідроксидекаанової кислоти [12].

В жирнокислотних профілях досліджених бактерій виявлено ізомери жирних кислот із довжиною вуглецевого ланцюга від 12 до 20 атомів вуглецю. Переважали ізомери гексадеканової й октадеканової кислот.

У профілях виділених МКБ встановлено в основному 10 жирних кислот, але відсоткове співвідношення цих кислот визначалося видовою приналежністю штамів (табл. 1–3).

Для виду *L. bifermentans* характерним було переважання нондеценаної (37,36%) і гексадеканової (26,03%) кислоти у жирнокислотному профілі. У табл. 1 наведено склад жирних кислот штаму *L. bifermentans* 19, а на рис. 5 хроматограму спектру ефірів жирних кислот бактерій цього штаму.

Для виду *L. vaccinostercus* нондеценанова кислота також превалювала, але на другому місці за поширеністю була октадеценанова кислота, а не гексадеканова, як у випадку *L. bifermentans*. Склад жирних кислот бактерій штаму *L. vaccinostercus* 22 наведено у табл. 2; хроматограму спектру ефірів жирних кислот бактерій цього штаму – на рис. 6.

Характерною особливістю бактерій виду *L. parabuchneri* є переважаюча кількість гексадеканової кислоти (36,15%). У табл. 3 і на рис. 7 наведено дані для бактерій штаму *L. parabuchneri* 39, відсоток гексадеканової кислоти у якого склав 36,15%, нондеценаної – 19,96%, октадеценаної – 16,27%.

Індекси подібності ізолятів коливались для *L. vaccinostercus* від 0,598 до 0,313, для *L. parabuchneri* від 0,756 до 0,382, а для *L. bifermentans* від 0,738 до 0,407, що вважається прийнятним показником подібності до штамів представлених в бібліотеці. Загалом, відмінності у складі жирних кислот були невеликими, що закономірно для бактерій штамів одного роду.

Отже, у результаті проведених досліджень із чорноморських губок виділені МКБ роду *Lactobacillus*: *Lactobacillus vaccinostercus*, *L. parabuchneri* та *L. bifermentans*.

У публікаціях іноземних фахівців з дослідження мікробіоти губок Червоного, Середземного, Японського морів описуються мікроорганізми, що належать більш ніж до 25 порядків. Деякі з них є представниками нових родів і видів, асоційовані саме з даними гідробіонтами [19, 20]. Але дотепер існує вкрай мало даних щодо МКБ, які населяють губки. У 2003 р. Ishikawa et al. виділили з губок Японського моря МКБ, віднесені до нового виду *Marinilactibacillus psychrotolerans* [13], а у 2005 р. Toffin L. et al. – *M. piezotolerans* [17].

Оскільки досліджувані бактерії було виділено з Чорного моря, для якого характерна сезонна зміна концентрації солі у воді і в середньому становить приблизно 14–15%, визначали здатність лактобацил до росту при концентраціях морської солі від 2,5 до 15,0%. Встановлено, що виділені штами при зазначених концентраціях солі мали різну інтенсивність росту. Бактерії усіх штамів добре росли при 2,5% і 5,0%, утворюючи значну кількість біомаси. При збільшенні концентрації солі спостерігали як зменшення кількості штамів, що росли, так і зниження інтенсивності їх росту.

Таблиця 1

Склад жирних кислот бактерій штаму *L. bif fermentans* 19 (%)

Table 1

Fatty acid composition of bacterial strain *L. bif fermentans* 19 (%)

| Назва жирної кислоти | Відсоток |
|--|----------|
| 19:1 w7c/19:1 w6c/ нондеценава кислота | 37,36 |
| 16:0/ гексадеканава кислота | 26,03 |
| 18:1 w9c/ 9-октадеценава кислота | 17,95 |
| 18:1 w7c/ вакценава кислота | 8,83 |
| 16:1 w7c/16:1 w6c/ гексадеценава кислота | 3,36 |
| 14:0/ тетрадеканава кислота | 2,89 |
| 18:0/ октадеканава кислота | 1,68 |
| 19:0 ізо/ 18-метил нондеканава кислота | 0,67 |
| 17:0 2ОН/ 2-гідрокси-гептадеканава кислота | 0,66 |
| 12:0/ додеканава кислота | 0,58 |

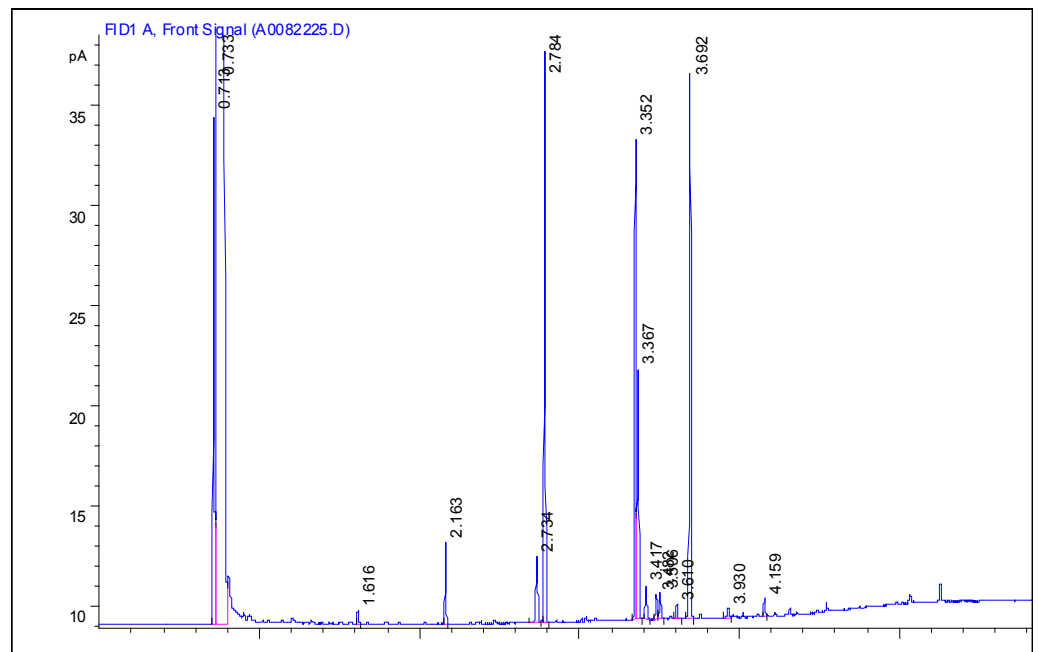


Рис. 5. Хроматограма спектру ефірів жирних кислот бактерій штаму *L. bif fermentans* 19

Fig. 5. Chromatogram of the spectrum of esters of fatty acids of bacterial strain *L. bif fermentans* 19



Таблиця 2

Склад жирних кислот бактерій штаму *L. vaccinostercus* 22 (%)

Table 2

Fatty acid composition of bacterial strain *L. vaccinostercus* 22 (%)

| Назва жирної кислоти | Відсоток |
|--|----------|
| 19:1 w7c/19:1 w6c/ нондецена кислота | 32,80 |
| 18:1 w9c/ 9-октадецена кислота | 26,03 |
| 16:0/ гексадеканова кислота | 24,22 |
| 18:1 w7c/ вакцена кислота | 4,54 |
| 14:0/ тетрадеканова кислота | 4,28 |
| 16:1 w7c/16:1 w6c/ гексадецена кислота | 3,35 |
| 18:0/ октадеканова кислота | 1,68 |
| 12:0/ додеканова кислота | 0,97 |
| 17:0 2ОН/ 2-гідрокси-гептадеканова кислота | 0,74 |
| 19:0 ізо/ 18-метил нондеканова кислота | 0,53 |

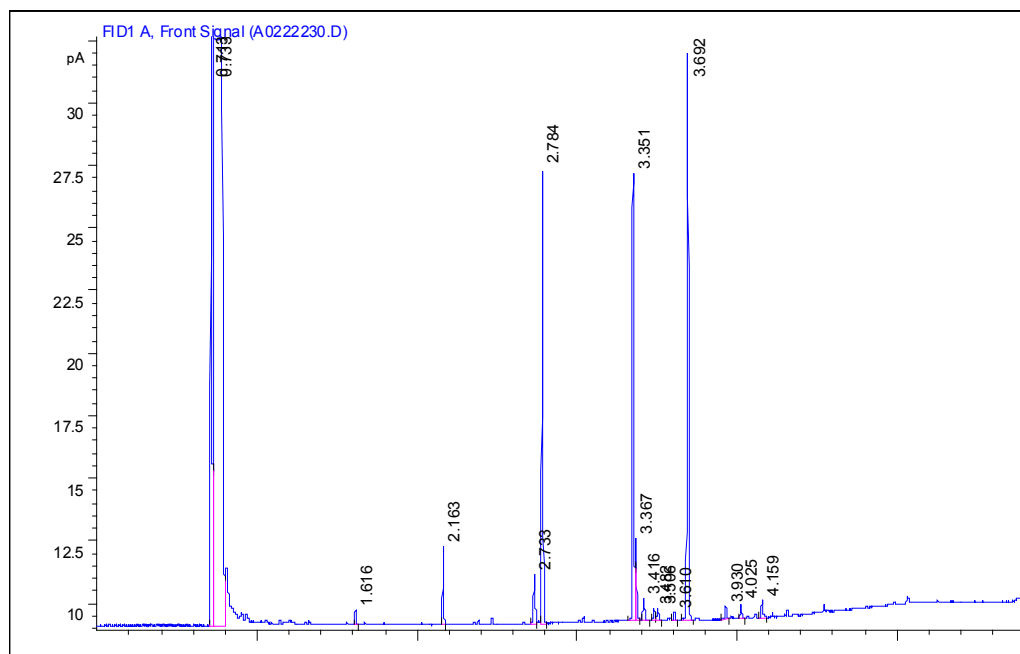


Рис. 6. Хроматограма спектру ефірів жирних кислот бактерій штаму *L. vaccinostercus* 22

Fig. 6. Chromatogram of the spectrum of esters of fatty acids of bacterial strain *L. vaccinostercus* 22

Таблиця 3

Склад жирних кислот бактерій штаму *L. parabuchneri* 39 (%)

Table 3

Fatty acid composition of bacterial strain of *L. parabuchneri* 39 (%)

| Назва жирної кислоти | Відсоток |
|--|----------|
| 16:0/ гексадеканова кислота | 36,15 |
| 19:1 w7c/19:1 w6c/ нондеценева кислота | 19,96 |
| 18:1 w9c/ 9-октадеценева кислота | 16,27 |
| 18:1 w7c/ вакценева кислота | 15,12 |
| 16:1 w7c/16:1 w6c/ гексадеценева кислота | 4,27 |
| 14:0/ тетрадеканова кислота | 3,68 |
| 18:0/ октадеканова кислота | 2,42 |
| 12:0/ додеканова кислота | 0,78 |
| 17:0 2OH/ 2-гідрокси-гептадеканова кислота | 0,71 |
| 19:0 ізо/ 18-метил нондеканова кислота | 0,64 |

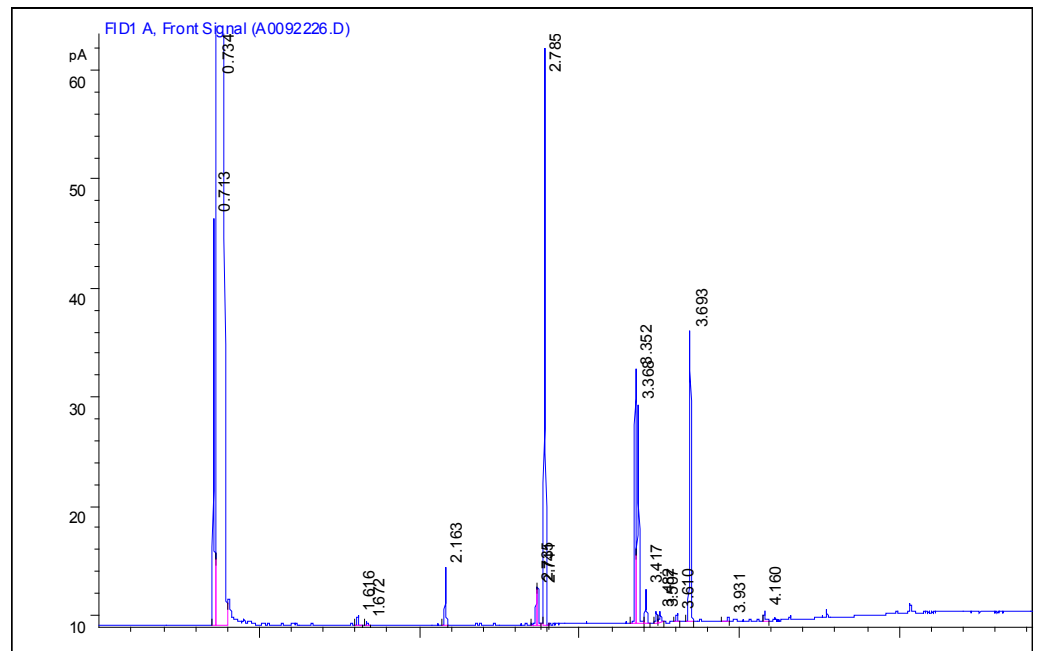


Рис. 7. Хроматограма спектру ефірів жирних кислот бактерій штаму *L. parabuchneri* 39

Fig.7. Chromatogram of the spectrum of esters of fatty acids of bacterial strain *L. parabuchneri* 39



Через 48 год 96,2% бактерій росли дуже інтенсивно на середовищі з вмістом солі 2,5%. Інтенсивний ріст, але на середовищі із 5,0% солі, показали також 53,8% лактобацил (рис. 8).

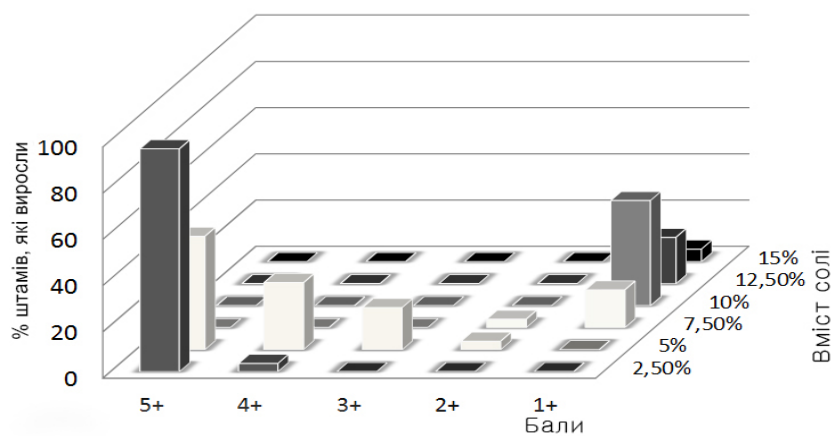


Рис. 8. Ріст лактобацил за різних концентрацій морської солі

Fig. 8. Growth of lactobacilli at different concentrations of sea salt

При більш високих концентраціях солі у середовищі переважна більшість бактерій не росла, а інтенсивність тих, що вирости, оцінена на «2» бали (3,9% штамів) і «1» бал (15,4% штамів). У середовищі з вмістом солі 10,0% незначний ріст відмічено для 40,4% бактерій, а 59,6% лактобацил взагалі не росли. При збільшенні концентрації солі у середовищі до 12,5% лише 28,8% штамів росли, але інтенсивність їх росту була низькою.

Більшість виділених із губок молочнокислих бактерій проявили стійкість до морської солі у концентраціях 2,5 і 5,0%, що співпадає з даними з інших досліджень по солестійкості штамів *Lactobacillus*, ізольованих з інших джерел, зокрема автоферментованих овочів, м'ясної сировини тощо [7].

Для визначення активності кислотоутворення використовували стерильне знежирене молоко. Результати, отримані через 24 год, показали, що лише 74,5% бактерій ферментували молоко (титрована кислотність визначена у межах 26–46 °Т). Молоко при цьому стало густіше, з'явився характерний кисломолочний запах. Бактерії інших штамів не сквасили молоко – згусток був відсутній, колір та консистенція молока не змінилася. Визначення активної кислотності показало, що через 24 год показник рН дорівнював 5,5–6,5 (для більшості штамів). Деякі бактерії закислювали молоко до рН 4,0–4,5.

Через 48 год рН більшості зразків досягав 4,0–4,5 та лише деякі штами не показали високої здатності до кислотоутворення (рН зразків дорівнював 5,0–5,5). Титрована кислотність для більшості штамів (78,6%) визначена у межах від 30 до 90 °Т, для 15,0% – більш, ніж 90 °Т і лише 6,4% характеризувалися незначною титрованою кислотністю (від 20 до 30 °Т).

Як відомо з літературних джерел, активність кислотоутворення у представників роду *Lactobacillus* варіює у широких межах і залежить від виду,

штаму, джерела виділення, складу живильних середовищ, умов культивування [1, 2]. У проведених дослідженнях показники титрованої кислотності бактерій більшості штамів не перевищували 90 °Т.

Таким чином, проведені дослідження показали, що молочнокисла мікробіота чорноморських губок представлена 3 видами: *L. vaccinofermentus*, *L. parabuchneri* та *L. bifementans*, кількість і відсоткове співвідношення яких варіювали у широких межах і визначалися, перш за все господарем. Визначення жирнокислотного профілю бактерій виділених штамів МКБ показало переважання ізомерів гексадеканової, нондеценаної і 9-октадеценаної кислот. Переважна більшість штамів активно росли при 2,5–5,0% вмісті солі у середовищі культивування та були здатними ферментувати молоко через 48 год, активність кислотоутворення при цьому визначена у межах 30–90 °Т.

Отримані результати є передумовою проведення подальших досліджень біотехнологічних властивостей штамів з метою їх застосування у марикультурі.

I.V. Strashnova, I.O. Kovtun, N.V. Korotaieva

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

CHARACTERISTICS OF LACTIC ACID BACTERIA FROM THE BLACK SEASPONGES

Summary

The **aim** of the work was to isolate the lactic acid bacteria from the Black Sea sponges and to investigate some of their biological properties. **Methods.** Isolation of lactobacilli strains and determination of their abundance in sponges was performed using MRS and GYPB media. Colony and cell morphology, tinctorial properties, catalase and oxidase activity, ability to form indole, hydrogen sulfide, nitrate reduction, glucose oxidation/fermentation were studied using standard methods. Fatty acid methyl esters was carried out according to the standard Sherlock Microbial Identification System protocol. The identification of strains by fatty acid composition was performed by gas chromatography using an automatic MIDI Sherlock microorganism identification system (RTSBA 6 library version 6.2). Sea salt resistance was determined by the growth rate in MRS broth. The acid production was determined by the active and titrated acidity in milk. **Results.** The number of representatives of lactic acid bacteria in the tested Black Sea sponges ranged from 1.87×10^5 to 1.4×10^9 CFU/g depending on the sponge. Among the fatty acids of bacteria belonging to the species *Lactobacillus vaccinofermentus*, *L. parabuchneri* and *L. bifementans*, hexadecanoic, nondecenoic and 9-octadecenoic acids prevailed. The optimal concentration of sea salt for the growth of the studied strains was determined in the range of 2.5–5.0%. After 24 h of cultivation, the titrated acidity of 74.5% of the strains was 26–46 °T, and after 48 h, 6.4% of the strains showed acidity from 20 to 30 °T, 78.6% – from 30 to 90 °T, and 15.0% – more than 90 °T. The acidification of the medium by most strains occurred at pH 4.0–4.5. **Conclusions.** In the study of the lactic acid bacteria of the Black Sea sponges *Haliclona* sp. the presence of representatives of the genus *Lactobacillus*:



L. vaccinostercus, *L. parabuchneri*, and *L. bifementans* were determined and the basic biological characteristics of the isolated bacteria were investigated.

Key words: *Lactobacillus*, biological properties, Black Sea sponges.

И.В. Страшнова, И.О. Ковтун, Н.В. Коротаяева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ГУБОК ЧЕРНОГО МОРЯ

Реферат

Целью работы было выделить молочнокислые бактерии из губок Черного моря и исследовать их основные биологические свойства. **Методы.** Выделение штаммов лактобацилл и определения их численности в губках проводили, используя среды MRS и GYPB. Морфологию колоний и клеток, тинкториальные свойства, каталазную и оксидазную активности, способность к образованию индола, сероводорода, к нитратредукции, к окислению/ферментации глюкозы изучали по общепринятым методикам. Выделение метиловых эфиров жирных кислот проводили в соответствии со стандартным протоколом Sherlock Microbial Identification System. Идентификацию штаммов по жирнокислотному составу проводили методом газовой хроматографии с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (база данных библиотеки RTSBA 6 версия 6.2). Устойчивость к морской соли определяли по интенсивности роста в MRS-бульоне. Кислообразование определяли по активной и титруемой кислотности в молоке. **Результаты.** Количество представителей молочнокислых бактерий в исследованных черноморских губках колебалось от $1,87 \times 10^5$ до $1,4 \times 10^9$ КОЕ/г в зависимости от губки. Среди жирных кислот бактерий, отнесенных к видам *Lactobacillus vaccinostercus*, *L. parabuchneri* и *L. bifementans*, преобладали гексадекановая, нондеценная и 9-октадеценная кислоты. Оптимумы концентрации морской соли для роста исследованных штаммов определены в пределах 2,5–5,0%. Через 24 ч культивирования титруемая кислотность 74,5% штаммов составляла 26–46 °T, а через 48 ч 6,4% штаммов демонстрировали кислотность от 20 до 30 °T, 78,6% – от 30 до 90 °T, а 15,0% – более 90 °T. Большинство штаммов окисляли среду до pH 4,0–4,5. **Выводы.** При исследовании молочнокислых бактерий черноморских губок *Haliclona* sp. выявлено наличие в них представителей рода *Lactobacillus*: *L. vaccinostercus*, *L. parabuchneri* и *L. bifementans*, изучены основные биологические характеристики выделенных бактерий.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, биологические свойства, губки Черного моря.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Боллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50–58.
2. Киселев Д.А., Корнеева О.С., Мотина Е.А., Шуваев П.В. Регулирование и контроль процессов биосинтеза молочнокислых бактерий // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 4 (часть 2) – С. 391–395.
3. Крусъ Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2000. – 386 с.
4. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
5. Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика і ідентифікація штаму *Vacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 6–13.
doi: 10.18524/2307-4663.2015.1(29).48011.
6. Сиделев С.И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию: Учебное пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2012. – 140 с.
7. Страшнова І.В., Ямборко Г.В., Васильєва Н.Ю. Стійкість штамів лактобацилл, виділених з різних джерел, до деяких чинників травного тракту // Журнал мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 2 (46). – С. 38–50.
doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).173176](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).173176) -
8. Фабіянська І.В. Розробка технології препаратів лактобацилл і їх використання для виготовлення сировокопчених ковбас: Автореф. дис... канд. техн. наук. Одеса, 2008. – 21 с.
9. Alonso S., Carmen Castro M., Berdasco M., de la Banda I.G., Moreno-Ventas X., de Rojas A. H. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture // Probiotics Antimicrob Proteins. – 2018.
doi: 10.1007/s12602-018-9439-2.
10. Angelakis E., Bachar D., Yasir M., Musso D., Djossou F., Melenotte C., Robert C., Davoust B., Gaborit B., Azhar E.I., Bibi F., Dutour A., Raoult D. Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins // New Microbes and New Infections. – 2019. – Vol. 27. – P. 40–47.
11. de Vos P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes / Ed. P. de Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K.-H. Schleifer, W. Whitman - 2nd ed. – New York: Springer, 2009. – V. 3. – P. 1–1450.
12. Hilmi H.T.A., Surakka A., Apajalahti J., Saris P.E.J. Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-Week-Old broiler chickens // Applied and environmental microbiology. – 2007. – V. 73, No. 24. – P. 7867–7873.
13. Ishikawa M., Nakajima K., Yanagi M., Yamamoto Y., Yamasato K. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – V. 53. – P. 711–720.
14. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September 2012 Newark.



15. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). – Technical Note 101. – Newark, DE: MIDI; 2006.

16. Tabla R., Gómez A., Rebollo J.E., Roa I. Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese // J. Dairy Res. – 2015. – No. 82 (2). – P. 215–221.

17. Toffin L., Zink K., Kato C., Pignet P., Bidault A., ge Bienvenu N. et al. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deepsub-seafloor sediment of the Nankai Trough // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – 55. – C. 345–351. doi: 10.1099/ij.s.0.63236-0.

18. Veerkamp J.H. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains // Journal of bacteriology. – 1971. – 108 (2). – P. 861–867.

19. Versluis D., Rodriguez de Evgrafov M., Sommer M.O., Sipkema D., Smidt H., van Passel M.W. Sponge microbiota are a reservoir of functional antibiotic resistance genes // Front Microbiol. – 2016. – 17 (7). – P. 1848. doi: 10.3389/fmicb.2016.01848.

20. Versluis D., McPherson K., van Passel M.W.J., Smidt H., Sipkema D. Recovery of previously uncultured bacterial genera from three Mediterranean sponges // Mar Biotechnol. – 2017. – Vol. 19 (5). – P. 454–468.

References

1. Glushanova NA. Biological properties of lactobacillus. Bulletin sibirskoy medicine. 2003; (4): 50-58.

2. Kiselev DA, Korneeva OS, Motina EA, Shuvaev PV. Lactic acid bacteria biosynthesis regulation and control. Fundamental research. 2012; (4/2): 391-395.

3. Krus' GN, Shaligina AM, Volokitina ZV. Research methods for milk and dairy products. Moskva, Kolos, 2000: 386.

4. Netrusov AI, Egorova MA, Zaharchuk LM, Kolotilova NN et al. Workshop on Microbiology: a textbook for students of higher educational institutions. Moskva, Akademiya, 2005: 608.

5. Ostapchuk AM. Molecular-biological characteristics and identification of *Bacillus* sp. ONU14 strain with entomopathogenic activity. Microbiology and Biotechnology. 2015; 1: 6-13. doi: 10.18524/2307-4663.2015.1(29).48011.

6. Sidelev S.I. Mathematical Methods in Biology and Ecology: Introduction to Elementary Biometry: A Training Manual. Yaroslavl, YarGU, 2012: 140

7. Strashnova IV, Yamborko GV, Vasylieva NYu. The resistance of strains of lactobacilli isolated from different sources to some factors of the digestive tract. Microbiology and Biotechnology. 2019; (2(46)): 38-50. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).173176](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).173176)

8. Fabiyanska I.V. Creation of lactobacilli preparations technology and their using for the production of fermented sausages. PhD thesis, Odesa National Academy of Food Technologies, 2008: 21.

9. Alonso S, Carmen Castro M, Berdasco M, de la Banda IG, Moreno-Ventas X, de Rojas AH. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aqua-



- culture. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018. doi: 10.1007/s12602-018-9439-2.
10. Angelakis E., Bachar D., Yasir M., Musso D., Djossou F., Melenotte C., Robert C., Davoust B., Gaborit B., Azhar E.I., Bibi F., Dutour A., Raoult D. Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins. *New Microbes and New Infections*. 2019; (27): 40-47.
 11. de Vos P. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes* / Ed. P de Vos, G Garrity, D Jones, N Krieg, W Ludwig, F Rainey, K-H Schleifer, W Whitma. 2nd ed. New York, Springer, 2009; (3): 1-1450.
 12. Hilmi HTA, Surakka A, Apajalahti J, Saris PEJ. Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-Week-Old broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*. 2007; (73(24)): 7867-7873.
 13. Ishikawa M, Nakajima K, Yanagi M, Yamamoto Y, Yamasato K *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003; (53): 711-720.
 14. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September 2012 Newark.
 15. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical Note 101. Newark, DE: MIDI; 2006.
 16. Tabla R, Gómez A, Rebollo JE, Roa I. Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese. *J. Dairy Res.* 2015; (82(2)): 215-221.
 17. Toffin L, Zink K, Kato C, Pignet P, Bidault A, ge Bienvenu N et al. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deepsub-seafloor sediment of the Nankai Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005; (55): 345-351. doi: 10.1099/ijs.0.63236-0.
 18. Veerkamp JH Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Journal of bacteriology*. 1971; (108(2)): 861-867.
 19. Versluis D, Rodriguez de Evgrafov M, Sommer MO, Sipkema D, Smidt H, van Passel MW Sponge microbiota are a reservoir of functional antibiotic resistance genes. *Front Microbiol.* 2016; (17(7)): 18-48. doi: 10.3389/fmicb.2016.01848.
 20. Versluis D, McPherson K, van Passel MWJ, Smidt H, Sipkema D. Recovery of previously uncultured bacterial genera from three Mediterranean sponges. *Mar Biotechnol.* 2017; (19(5)): 454-468.

Стаття надійшла до редакції 12.04.2020 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, діагностичними, 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 аббревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

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 мкмолях 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 ммоль/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.

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 амилазной 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, Djournanski 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.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛГІЯ»
У 2019 РОЦІ**

| Автори | № вип. | № стор. |
|--|--------|---------|
| <i>Абдуліна Д.Р., Коптева Ж.П., Коптева Г.Є., Вортман М.Я.</i> Вплив полімерних і гумотехнічних матеріалів на вуглеводеньокиснювальні бактерії | 2 | 51 |
| <i>Авксентьєва О.О.</i> Дослідження впливу екстракту <i>Aloe vera</i> на морфогенетичні реакції за мікроклонального розмноження декоративних сукулентів | 3 | 34 |
| <i>Аврамович І. див. Теслюк Н.І.</i> | 3 | 92 |
| <i>Акуленко І.В., Корбуш М.Ю., Стецька В.О., Сергійчук Т.М., Толстанова Г.М., Степанова Н.М.</i> Вплив антибіотикотерапії на загальну кількість оксалатдеградувальної мікробіоти у кишковому тракті щурів | 2 | 27 |
| <i>Барштейн В.Ю. див. Круподьорова Т.А.</i> | 2 | 65 |
| <i>Басюл О.В. див. Ліманська Н.В.</i> | 1 | 16 |
| <i>Беляєва Т.О. див. Гудзенко Т.В.</i> | 1 | 36 |
| <i>Беляєва Т.О. див. Гудзенко Т.В.</i> | 3 | 78 |
| <i>Беляєва Т.О. див. Гудзенко Т.В.</i> | 2 | 16 |
| <i>Блайда І.А., Васильєва Т.В., Слюсаренко Л.І., Васильєва Н.Ю.</i> Стійкість до важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, що виділені з техногенної сировини | 1 | 24 |
| <i>Васильєв М.А. див. Васильєва Н.Ю.</i> | 3 | 58 |
| <i>Васильєва Н.Ю. див. Блайда І.А.</i> | 1 | 24 |
| <i>Васильєва Н.Ю. див. Страшнова І.В.</i> | 2 | 38 |
| <i>Васильєва Н.Ю., Слюсаренко Л.І., Васильєва Т.В.</i> Акумуляція $Cu(II)$ морськими нейтрофільними тіоновими бактеріями | 1 | 56 |
| <i>Васильєва Н.Ю., Страшнова І.В., Васильєв М.А., Метеліцина І.П.</i> Стійкість бактерій роду <i>Lactobacillus</i> , ізольованих з чорноморських губок, до антибіотиків і важких металів | 3 | 58 |
| <i>Васильєва Т.В. див. Блайда І.А.</i> | 1 | 24 |
| <i>Васильєва Т.В. див. Васильєва Н.Ю.</i> | 1 | 56 |
| <i>Водзінський С.В. див. Галкін М.Б.</i> | 3 | 47 |
| <i>Волювач О.В. див. Гудзенко Т.В.</i> | 1 | 36 |
| <i>Волювач О.В. див. Гудзенко Т.В.</i> | 3 | 78 |
| <i>Волювач О.В. див. Гудзенко Т.В.</i> | 2 | 16 |



| | | |
|---|---|----|
| Вортман М.Я. див. Абдуліна Д.Р. | 2 | 51 |
| Галкін Б.М. див. Галкін М.Б. | 3 | 47 |
| Галкін М.Б. див. Гудзенко Т.В. | 2 | 16 |
| Галкін М.Б., Водзінський С.В., Джура М.С., Стрезєва Л.М., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Формування біоплівки штамми <i>Salmonella enteritidis</i> за присутності синтетичних аналогів 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону | 3 | 47 |
| Голота Ю.В. див. Стецька В.О. | 2 | 6 |
| Гончар С.Ю. див. Стецька В.О. | 2 | 6 |
| Гора Н.В., Серга С.В., Майстренко О.М., Козерецька І.А. Динаміка частот генотипів <i>Wolbachia</i> в природній популяції <i>Drosophila melanogaster</i> з Умані при впливі кліматичних факторів | 1 | 6 |
| Гордовська Н.В. див. Коломієць Л.А. | 3 | 6 |
| Горшкова О.Г. див. Гудзенко Т.В. | 1 | 36 |
| Горшкова О.Г. див. Гудзенко Т.В. | 2 | 16 |
| Горшкова О.Г. див. Гудзенко Т.В. | 3 | 78 |
| Гудзенко Т.В. див. Чабан М.М. | 1 | 48 |
| Гудзенко Т.В., Іваниця В.О., Конуп І.П., Горшкова О.Г., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Чабан М.М. Очищення води від фенолу бактеріями роду <i>Pseudomonas</i> , іммобілізованими на природних і синтетичних носіях | 3 | 78 |
| Гудзенко Т.В., Конуп І.П., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Чабан М.М. Вилучення фенолу з води бактеріями <i>Bacillus subtilis</i> ONU551, адгезованими на носіях різної природи | 1 | 36 |
| Гудзенко Т.В., Конуп І.П., Волювач О.В., Чабан М.М., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Галкін М.Б. Ефективність очистки води від фенолу при формуванні полівидової біоплівки на природних і синтетичних носіях у біофільтрі | 2 | 16 |
| Джура М.С. див. Галкін М.Б. | 3 | 47 |
| Довбинчук Т.В. див. Стецька В.О. | 2 | 6 |
| Жумінська Г.І. див. Жунько І.Д. | 2 | 76 |
| Жунько І.Д., Жумінська Г.І. Скринінг продуцентів сидерофорів серед штамів <i>Rantoea agglomerans</i> | 2 | 76 |
| Заєць В.М. див. Коломієць Л.А. | 3 | 6 |
| Зінченко О.Ю., Шматкова Н.В., Міресь С.Л., Лисова К.М. Вплив нікотиноїлгідразонів та комплексів германію та стануму на їх основі на ріст фітопатогенних грибів | 3 | 19 |

| | | |
|---|---|----|
| Іваниця В.О. див. Гудзенко Т.В. | 3 | 78 |
| Іваниця В.О. див. Ліманська Н.В. | 1 | 16 |
| Козерецька І.А. див. Гора Н.В. | 1 | 6 |
| Коломієць Л.А., Ложко Д.М., Засць В.М., Чуніхін О.Ю., Гордовська Н.В., Корнелюк О.І. Вплив декстрану 70 на агрегацію протипухлинного цитокіна ЕМАР II | 3 | 6 |
| Конуп І.П. див. Гудзенко Т.В. | 1 | 36 |
| Конуп І.П. див. Гудзенко Т.В. | 2 | 16 |
| Конуп І.П. див. Гудзенко Т.В. | 3 | 78 |
| Коптева Г.Є. див. Абдуліна Д.Р. | 2 | 51 |
| Коптева Ж.П. див. Абдуліна Д.Р. | 2 | 51 |
| Корбуш М.Ю. див. Акуленко І.В. | 2 | 27 |
| Корбуш М.Ю. див. Стецька В.О. | 2 | 6 |
| Корнелюк О.І. див. Коломієць Л.А. | 3 | 6 |
| Круподьорова Т.А., Барштейн В.Ю. Антагоністична активність макроміцетів проти <i>Mucor</i> sp. IFBG 139 | 2 | 65 |
| Лисова К.М. див. Зінченко О.Ю. | 3 | 19 |
| Ліманська Н.В., Басюл О.В., Суворова Т.В., Степанюк Г.В., Іваниця В.О. Здатність <i>Lactobacillus plantarum</i> ОНУ 12 до виживання в умовах ґрунту | 1 | 16 |
| Ложко Д.М. див. Коломієць Л.А. | 3 | 6 |
| Майстренко О.М. див. Гора Н.В. | 1 | 6 |
| Метеліцина І.П. див. Васильєва Н.Ю. | 3 | 58 |
| Мірось С.Л. див. Зінченко О.Ю. | 3 | 19 |
| Серга С.В. див. Гора Н.В. | 1 | 6 |
| Сергійчук Т.М. див. Акуленко І.В. | 2 | 27 |
| Сергійчук Т.М. див. Стецька В.О. | 2 | 6 |
| Слюсаренко Л.І. див. Блайда І.А. | 1 | 24 |
| Слюсаренко Л.І. див. Васильєва Н.Ю. | 1 | 56 |
| Степанова Н.М. див. Акуленко І.В. | 2 | 27 |
| Степанюк Г.В. див. Ліманська Н.В. | 1 | 16 |
| Стецька В.О. див. Акуленко І.В. | 2 | 27 |
| Стецька В.О., Голота Ю.В., Гончар С.Ю., Корбуш М.Ю., Довбинчук Т.В., Сергійчук Т.М., Толстановна Г.М. Порівняння довготривалого ефекту двох моделей дисбіозу у щурів лінії Wistar | 2 | 6 |
| Страшнова І.В. див. Васильєва Н.Ю. | 3 | 58 |
| Страшнова І.В., Ямборко Г.В., Васильєва Н.Ю. Стійкість штамів лактобацил, виділених з різних джерел, до деяких агресивних чинників травного тракту | 2 | 38 |
| Стрезєва Л.М. див. Галкін М.Б. | 3 | 47 |
| Суворова Т.В. див. Ліманська Н.В. | 1 | 16 |



| | | |
|--|---|----|
| Теслюк Н.І., Аврамович І. Удосконалення методів адаптації мікроклонів <i>Paulownia tomentosa</i> до умов <i>in vivo</i> з використанням бактерій <i>Bacillus megaterium</i> ONU 500 | 3 | 92 |
| Толстанова Г.М. див. Акуленко І.В. | 2 | 27 |
| Толстанова Г.М. див. Стецька В.О. | 2 | 6 |
| Філіпова Т.О. див. Галкін М.Б. | 3 | 47 |
| Чабан М.М. див. Гудзенко Т.В. | 1 | 36 |
| Чабан М.М. див. Гудзенко Т.В. | 2 | 16 |
| Чабан М.М. див. Гудзенко Т.В. | 3 | 78 |
| Чабан М.М., Гудзенко Т.В. Виявлення анамокс бактерій у стічних водах фармацевтичного виробництва | 1 | 48 |
| Чуніхін О.Ю. див. Коломісць Л.А. | 3 | 6 |
| Шматкова Н.В. див. Зінченко О.Ю. | 3 | 19 |
| Ямборко Г.В. див. Страшнова І.В. | 2 | 38 |

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 10.04.2020 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 8,45. Тираж 100 пр.
Зам. № 2077.

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