

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

№ 1 (33)
2016

Одеса
ОНУ
2016

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

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Затверджено до друку Вченою радою

Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Протокол № 3 від 24.03.2015 р.

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

Реферативна база 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.onu.edu.ua), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index.
Research Bib

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://journal_mbt.onu.edu.ua

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

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University.
Minutes No 3, 24.03.2015

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

**Bibliographic Database "Ukrainika scientific", Index Copernicus Journals
Master List, Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky,
Ulrich's periodicals, Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua),
Ukrainian Scientific journals (usj.org.ua), Institutional Repository at Odesa
I.I. Mechnykov National University, Google Scholar, Base-search, Citefactor,
Advanced, Sciences Index. Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua),
Reseach Bib**

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: //journal_mbt.onu.edu.ua](http://journal_mbt.onu.edu.ua)

З М І С Т

О Г Л Я Д О В І П Р А Ц І

Л.В. Капрельяни, Н.С. Трегуб СЕЛЕНЗБАГАЧЕНІ ПРОБІОТИЧНІ ПРОДУКТИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ.....	6
--	---

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

А.С. Семенець, М.Б. Галкін, Т.О. Філіпова УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>AERUGINOSA</i> З РІЗНИМ РІВНЕМ БІОСИНТЕЗУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ	19
--	----

С.Л. Голембіовська, Л.В. Поліщук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх ЛІМІТУЮЧІ КАРОТИНОГЕНЕЗ УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ МУТАНТІВ <i>STREPTOMICETES GLOBISPORUS</i> 1912.....	29
--	----

І.І. Маринова, В.Ю. Іваніца, Н.В. Ліманська ЧИСЕЛЬНІСТЬ ЕНДОФІТНОЇ МІКРОБІОТИ ПАГОНІВ ВИНОГРАДУ ...	40
---	----

В.О. Гончаров, Л.С. Котлік, Н.П. Ісакова, Ю.М. Виходцева, Ю.О. Баранов РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ТА ГЕНОТИПОВА СТРУКТУРА РОТАВІРУСІВ В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ	47
---	----

Н.А. Ткаченко ЗАКВАШУВАЛЬНІ КОМПОЗИЦІЇ БАКТЕРІЙ ДЛЯ ТЕХНОЛОГІЙ КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ ДИТЯЧОГО ХАРЧУВАННЯ.....	55
--	----

Т.В. Булигіна, Л.Д. Варбанець, Л.А. Пасічник, Н.В. Житкевич РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ДО АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІЙ <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>	68
---	----

Н.Ю. Васильєва, О.Г. Горшкова ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ <i>PSEUDOMONAS MALTOPHILIA</i> ONU329 – СОРБЕНТА ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ДЕСТРУКТОРА ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ.....	76
--	----

А.П. Петросьяни ВИДІЛЕННЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ З <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i> ЛМ-6, ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП КАТАЛІТИЧНОГО ЦЕНТРУ ФЕРМЕНТУ	89
--	----

АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2015 РОЦІ	96
--	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	101
---	-----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

L.V. Kaprelyants, N.S. Tregub

SELENIUM ENRICHED PROBIOTIC PRODUCTS WITH FUNCTIONAL PROPERTIES	6
---	---

EXPERIMENTAL WORKS

A.S. Semenets, M.B. Galkin, T.O. Filipova

BIOFILM FORMATION BY <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> STRAINS WITH DIFFERENT LEVELS OF CYCLIC DI-GUANOSINE MONOPHOSPHATE BIOSYNTHESIS	19
--	----

S.L. Golembiovska, L.V. Polishchuk, A.U. Kotsyuk, B.P. Matselykh

THE FACTORS OF CULTIVATION LIMITING CAROTENOGENESIS OF MUTANTS <i>STREPTOMICES GLOBISPORUS</i> 1912	29
---	----

I.I. Marynova, V.Yu. Ivanitsa, N.V. Limanska

AMOUNT OF ENDOPHYTIC MICROBIOTA IN GRAPEVINE SHOOTS	40
---	----

V.A. Goncharov, L.S. Kotlik, N.P. Isakova, Y.N. Vykhodceva, Y.O. Baranov

SPREADING AND GENOTYPIC STRUCTURE OF ROTAVIRUSES IN THE ODESA REGION	47
--	----

N.A. Tkachenko

STARTER CULTURES COMPOSITIONS FOR DAIRY BABY FOOD PRODUCTION TECHNOLOGIES	55
---	----

T.V. Bulyhina, L.D. Varbanets, L. A. Pasichnyk, N. V. Zhitkevych

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF <i>PANTOEA AGGLOMERANS</i>	68
---	----

N.Yu. Vasylieva, O.G. Gorshkova

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF <i>PSEUDOMONAS MALTOPHILIA</i> ONU329 STRAIN – SORBENT OF HEAVY METALS IONS AND DESTRUCTOR OF OIL HYDROCARBONS	76
---	----

A.P. Petrosyants

ISOLATION OF AN α -GALACTOSIDASE FROM <i>BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i> JIM-6 AND IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL GROUPS OF THE CATALYTIC CENTER OF ENZYME	89
--	----

ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL “MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” IN 2015 YEAR	96
--	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	101
------------------------------------	-----

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

УДК: 613.292-027.242:[579.864+579.873.1]:546.23-021.632

Л.В. Капрельянц, Н.С. Трегуб

Одесская национальная академия пищевых технологий,
ул. Канатная, 112, Одесса, 09976, Украина, тел. :+38 (095) 082 11 68,
e-mail: natashenka.tregub@mail.ru

СЕЛЕНОБОГАЩЕННЫЕ ПРОБИОТИЧЕСКИЕ ПРОДУКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В обзоре рассмотрены данные касающиеся роли пробиотиков в повышении неспецифической резистентности организма человека. Описана их способность к аккумуляции и биотрансформации селена. Описаны механизмы влияния селена на организм человека и пути его биотрансформации из неорганических форм в органические с помощью микроорганизмов. Охарактеризована роль пробиотиков и селена в нормализации процесса функционирования систем организма.

Ключевые слова: селен, функциональные продукты, пробиотики, лактобактерии, бифидобактерии.

В последние годы широкое распространение получила концепция функциональных продуктов питания, которая включает разработку теоретических основ, производство, реализацию и потребление новых функциональных продуктов [2].

Под понятием «продукты функционального назначения» подразумевают специальные пищевые продукты, предназначенные для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, обладающие научно обоснованными и подтвержденными свойствами, снижающие риск развития заболеваний, связанных с питанием, предотвращающие дефицит или восполняющие имеющийся в организме человека дефицит питательных веществ, сохраняющие и улучшающие здоровье за счет наличия в их составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов [16, 19, 24].

Продукты функционального назначения могут быть получены путем увеличения или уменьшения соотношения отдельных компонентов пищи: белков, аминокислот, липидов, витаминов, пищевых волокон, микро- и макроэлементов [30, 36]. Понятие «продукты функционального назначения» используется с 1991 года после законодательного принятия требований к производству пищевых продуктов со специфическим лечебным действием (FOSHU - Food of Specific Health Use). На рынке Украины можно выделить следующие группы функциональных продуктов: зерновые завтраки, молочные продукты,

© Л.В. Капрельянц, Н.С. Трегуб, 2016



маргарини і безалкогольні напої, спеціальні харчові продукти. Значительный удельный вес (65–70%) приходится на долю молочных продуктов. К ним относят низколактозные и безлактозные продукты, ацидофильные смеси, пробиотические продукты, БАД, безбелковые продукты, обогащенные нутриентами.

Одним из перспективных направлений исследований является разработка новых функциональных продуктов питания составляющими компонентами которых служили бы селенсодержащие пробиотики. Литературные данные свидетельствуют о способности пробиотиков к биотрансформации селена, при введении его источников в питательную среду. Известно, что обогащение микроорганизмов селеном не влияет на качество их пробиотических свойств. Селенообогащенные пробиотические микроорганизмы благодаря известным свойствам пробиотиков в дополнении с антиоксидантными, антимуtagenными, антиканцерогенными свойствами селена, инкорпорированного в них, дополнительно стимулируют иммунную систему человека, при потреблении продуктов питания, которые их содержат. При этом синтезированные микроорганизмами органические формы селена обладают большей биологической доступностью для человека, по сравнению с его неорганическими формами [32].

Обнаруженный И.И. Мечниковым еще в начале 20-го века положительный эффект от приема простокваши с живыми лактобактериями, состоящий в улучшении здоровья потребителей в процессе модификации кишечной микробиоты, был обозначен как пробиозис (probiosis). Феномен пробиозиса определяется как «ассоциация двух организмов, которая стимулирует жизненные процессы каждого из них», а «живая микробная кормовая добавка, которая оказывает полезное действие на организм хозяина путем улучшения его кишечного микробного баланса», получила название пробиотика [21].

Влияние пробиотиков на организм является сложным и многоплановым. Для того, чтобы быть отнесенными к пробиотикам микроорганизмы должны: быть фено- и генетически классифицируемыми, не обладать патогенностью, быть кислотоустойчивыми и сохранять жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт человека, обладать способностью к адгезии к кишечному эпителию, обладать способностью к колонизации кишечника, быть безопасными [1].

Наиболее известные микроорганизмы обладающие пробиотическими свойствами представлены в таблице 1.

Одними из наиболее часто используемых при производстве функциональных ферментативных продуктов питания являются пробиотические штаммы лакто- и бифидобактерий. При попадании в желудочно-кишечный тракт пробиотики адгезируются на стенках эпителиоцитов, колонизируя их. Процесс адгезии к эпителию вызывает укрепление цитоскелета клеток кишечного эпителия (путем усиления экспрессии протомиозина ТМ-5, синтез актина и окклюзина), снижение проницаемости (путем повышения фосфорилирования белка межклеточных соединений), повышение синтеза муцина (путем стимуляции гена MUC-3), стимуляцию синтеза и активацию рецептора эпителиального



фактора роста (EGF), увеличение синтеза полиаминов [9]. Микроорганизмы осуществляют синтез витаминов, антибиотиков, бактерицидных веществ (короткоцепочечных жирных кислот, молочной кислоты, перекиси водорода). Конкуренция за питательные вещества и факторы роста, снижение pH (за счет образования молочной кислоты) обеспечивает предотвращение адгезии и инвазии слизистой патогенными микроорганизмами [5, 6, 10, 23, 40]. При этом кислая среда способствует улучшению всасывания жиров, витаминов, железа и кальция [14, 26]. Таким образом, микроорганизмы повышают неспецифическую резистентность организма хозяина.

Таблица 1

Микроорганизмы обладающие пробиотической активностью

Table 1

Microorganisms having probiotic activity

Род	Вид
Lactobacillus	L. acidophilus
	L. rhamnosus
	L. plantarum
	L. reuteri
	L. fermentum
	L. lactis
	L. casei
	L. bulgaricus
Bifidobacterium	B. longum
	B. bifidum
	B. breve
	B. adolescentis
	B. animalis
Streptococcus	S. thermophilus
Enterococcus	E. faecium
Saccharomyces	S. boulardi

Литературные данные свидетельствуют, что совместное применение лакто- и бифидобактерий увеличивает их способность к адгезии. Это подтверждает наличие бактериального синергизма и делает предпочтительным создание продуктов функционального питания включающих симбионтные штаммы пробиотиков.



Известно, что пробиотические микроорганизмы способны накапливать и биотрансформировать селен при внесении его в среду культивирования. Добавление селена улучшает их окислительно-восстановительный потенциал, за счет образования органических форм селена [6].

На территориях Одесской, Кировоградской, Винницкой, Полтавской, Хмельницкой, Черниговской, Житомирской областей отмечено низкий уровень содержания селена в почве. Это явление затрудняет ассимиляцию селена растениями. Таким образом микроэлемент в недостаточном количестве поступает в организм человека по пищевой цепи. Поэтому актуальной задачей направленной на восполнение потребности организма в микроэлементе является создание альтернативных его источников, а именно селенобогатенных пробиотиков.

Селен – физиологически важный микроэлемент, незаменимый в питании человека, способен входить в состав органических и неорганических соединений. К неорганическим относят селениты и селенаты, а к органическим – аминокислоты (селеноцистеин и селенметионин), в которых селен замещает серу [33, 39]. Селен может включаться в состав ферментов, белков, способен депонироваться в органах [3, 29, 32].

Содержание селена в цельной крови в норме составляет 1,14–1,9 мкмоль/л. Минимальная суточная потребность равна 70–90 мкг (для женщин и мужчин, соответственно) [41]. Поступление селена в организм ниже нормы приводит к возникновению селенодефицитных состояний, что является факторами риска различных патологий среди которых можно выделить: заболевания кожи, волос, ногтей; психические и физические отклонения здоровья в детском и подростковом возрасте; возникновение ишемической болезни сердца, гипертонической болезни, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, неврозозов и других «болезней цивилизации»; рост мужского и женского бесплодия [4, 11, 28].

Селен относится к микроэлементам, для которых интервал между минимальной суточной потребностью и предельно допустимой концентрацией сравнительно узок и во многом зависит от того, в какой форме селен поступает в организм.

Для селена приоритетным путем поступления являются алиментарный – 90% – с едой и 10% – с водой.

Основными формами селена которые могут поступать в организм являются:

- селен органический натуральный. Поступает в организм с продуктами растительного и животного происхождения, которые естественным путем накапливают микроэлемент;
- селен органический искусственный. В этом случае селен соединен искусственно с белками. Примером служит препарат Селен-актив;
- селен органический полученный путем культивирования микроорганизмов на среде обогащенной неорганическими формами селена;
- селен минеральный (представлен неорганическими формами – селенитами и селенатами) [37].



В последние годы важным направлением исследований является разработка новых методов преодоления селенодифицита у населения многих стран мира, в частности Украины, России, Беларуси, Китая, Швеции. В Китае, в частности, искусственно вносят неорганические формы селена в почву, что приводит к его аккумуляции растениями. Это обеспечивает поступление микроэлемента в организм человека по пищевой цепи [11]. Другим путем преодоления селенодифицита является обогащение микроэлементом непосредственно продуктов питания. Примером служит производство селенообогащенного чая, поваренной соли, воды, яиц и мяса, грибов, проростков злаков, детского питания, кисломолочных напитков.

Из вышеизложенного следует, что проблема поиска новых пищевых источников органических форм селена и оценка их биологического действия является весьма актуальной. Перспективен биотехнологический путь получения пищевых источников этого микроэлемента в частности использование в качестве «объектов для биотехнологического встраивания» бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*:

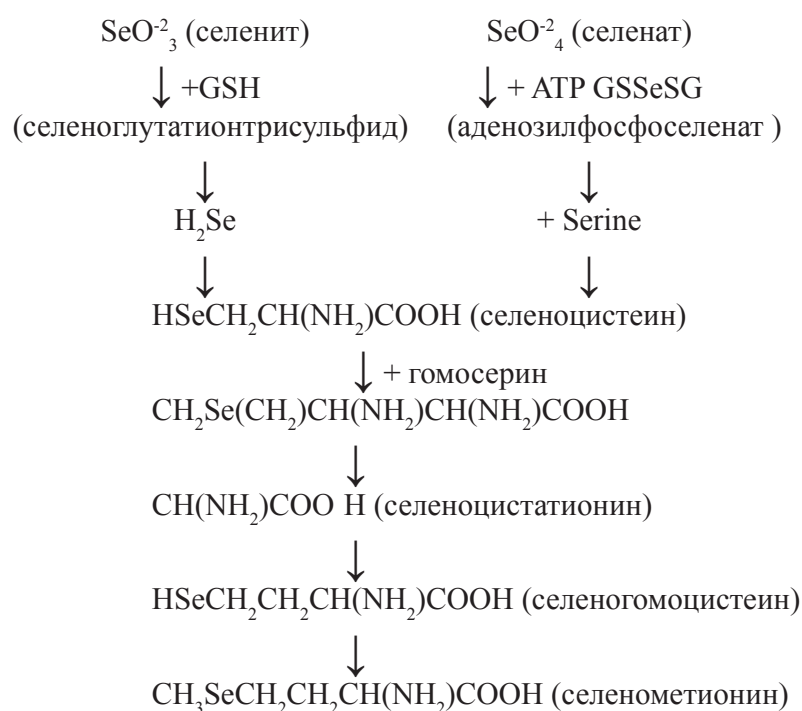


Рис. 1. Обобщенная схема биосинтеза селенометионина в микробных клетках [42]

Fig. 1. Generalized scheme of selenomethionine biosynthesis in microbial sells [42]

Микроорганизмы способны превращать неорганические формы селена в органические – селенметионин (Se-Met) и селеноцистеин (Se-Cys) [7, 8]. Согласно современным представлениям селен поступает в клетку с участием тех



же транспортных систем, что и сера, и включается в обмен серы, заменяя ее в метионине и цистеине [17]. Неорганические селенит- и селенат-ионы при поступлении в клетку подвергаются быстрому восстановлению до селеноводорода и его алкильных производных [27, 35]. Эти соединения гидрофобны и могут входить в состав липофильной внутриклеточной фракции биомассы. Строго определенные количества селена через промежуточную стадию селенофосфата включаются в селенсодержащие аминокислоты, а затем в специфические селенопротеины [7, 34].

Применительно к остатку селеноцистеина механизм такого включения детально исследован. Установлено, что он определяется наличием в составе мРНК триплета UGA в сочетании со специфическим нетранслируемым петлевым фрагментом Se-CYS. В процессе включения остатка селеноцистеина в белок участвует специфическая сериновая UGA-тРНК длиной 95 нуклеотидов и 4 фактора трансляции Sel-A, B, C и D. У прокариот этот нуклеотидный участок расположен в непосредственной близости от триплета UGA, в отличие от эукариот, где они разделены по крайней мере 1200 остатками нуклеотидов. Предполагают также, что как у прокариот, так и у эукариот процесс включения Se в белковую цепь осуществляется в момент непосредственной близости этих двух участков, когда вследствие конформационного перехода происходит перекодирование кодона UGA и вместо остановки синтеза белка полипептидная цепочка достраивается на остаток Se [13].

После биотрансформации в микробной клетке около 32% селена находится в мембранах, 22% входит в состав клеточной стенки, 52% – находится в составе аминокислот и растворимых белков протоплазмы (из них 72% содержится во фракции белков и аминокислот, 1% связан с липидами и 27% селена находится в неорганической форме) [31].

Литературные данные свидетельствуют о том, что биологически синтезированные формы селена характеризуются большей биологической доступностью и стабильностью, что позволяет их потреблять в дозах превышающих среднесуточную. Биологический синтез органических форм селена требует мало энергии и экономических затрат. К тому же этот метод является экологически безопасным и исключает возможность образования вредных побочных продуктов [38].

При попадании в желудочно-кишечный тракт пробиотики повышают неспецифическую резистентность организма хозяина. Они устойчивы к действию желудочной кислоты и желчи, потому употребление их в профилактических целях является эффективным. К тому же селенобогатые пробиотики являются источником микроэлемента. После попадания в организм биотрансформированный селен, а именно органические его формы включаются в состав белков вместо метионина либо же распадаются до селеноводорода (H_2Se). Последний путь обеспечивает реализацию биологической активности селена. Селен включается в состав белков, ферментов. Наиболее известными являются глутатионпероксидазы, тиоредоксинредуктазы, тиреоиддейодиназы, селенопротеины P, W, T, M [22]. Биохимическая роль селензависимых белков



определяется их участием в протекании окислительно-восстановительных реакций, причем основная роль отводится именно селеноцистеину [20, 25].

Основными функциями селена, попавшего в организм является: стимуляция иммунной системы (за счет образования антител, белых кровяных телец, макрофагов, участия в образовании эритроцитов), антиоксидантные свойства (предупреждение старения организма, активизация производства витамина Е), снижение риска возникновения сердечнососудистых заболеваний, играет роль противоопухолевого фактора, стимуляция обменных процессов организма, стимуляция репродуктивной функции (защита сперматозоидов и улучшение их подвижности), нормализация работы нервной и эндокринной системы, вхождение в состав ферментов, гормонов улучшение структуры волос и ногтей [12, 15, 18, 42]. Поэтому нормированное поступление селена в организм является важным фактором поддержки его функций.

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о двойном положительном влиянии пробиотиков и селена на процесс функционирования всех систем организма, поэтому актуальной является разработка селенобогатых функциональных продуктов питания.

Л.В. Капрельянц, Н.С. Трегуб

Одеська національна академія харчових технологій,
вул. Канатна, 112, Одеса, 09976, Україна, тел. :+38 (095) 082 11 68,
e-mail: natashenka.tregub@mail.ru

СЕЛЕНЗБАГАЧЕНІ ПРОБІОТИЧНІ ПРОДУКТИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Реферат

В огляді розглянуто літературні дані, що стосуються ролі пробіотиків в підвищенні неспецифічної резистентності організму людини. Описана їх здатність до акумуляції і біотрансформації селену. Описані механізми впливу селену на організм людини і шляхи його біотрансформації із неорганічних форм в органічні за допомогою мікроорганізмів. Охарактеризована роль пробіотиків і селена в процесі нормалізації функціонування систем організму.

Ключові слова: селен, функціональні продукти, пробіотики, лактобактерії, біфідобактерії.

L.V. Kaprelyants, N.S. Tregub

Odessa National Academy of Food Technologies,
112, Kanatna st., Odessa, 09976, Ukraine, tel.: +38 (095) 082 11 68,
e-mail: natashenka.tregub@mail.ru

SELENIUM ENRICHED PROBIOTIC PRODUCTS WITH FUNCTIONAL PROPERTIES

Summary

The review deals with the literature data on the role of probiotics in increasing non-specific resistance of the human body. It has been described their ability of accumulation



and biotransformation selenium. The mechanisms of action of selenium in the human's body and the ways of its biotransformation from inorganic forms to organic forms by microorganisms were elucidated. The role of probiotics and selenium in the process of normalization of the functioning of body systems were described.

Key words: selenium, functional foods, probiotics, lactobacilli, bifidobacteria.

Список использованной литературы

1. Глушанова Н.А. Лактобациллы в исследовании и коррекции резидентной микрофлоры человека. – Новокузнецк, 1999. – 23 с.
2. Капрельяню Л.В., Йоргачова О.Г. Функціональні продукти. – Одеса, 2003. – С. 229–237.
3. Трегуб Н.С., Капрельяню Л.В. Кінетичні параметри накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* на середовищах із селеном. // Збірник Наукові праці ОНАХТ. – Одеса, 2014. – С. 112–115.
4. Трегуб Н.С., Капрельяню Л.В. Зміна показників кінетичних параметрів накопичення біомаси *Lactobacillus acidophilus* та *Bifidobacterium bifidum* при культивуванні на селеновмісних середовищах. // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. – Львів, 2015. – С. 28–34.
5. Кочемасова З.Н. Санитарная микробиология и вирусология. – М.: Медицина, 1987. – С. 64–117.
6. Amaretti A., di Nunzio M., Pompei A., Raimondi S., Rossi M., Bondoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 97. – P. 809–817.
7. Andreoni V., Luisch M. M., Cavalca L., Erba D., Ciappellano S. Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. // Annals of Microbiology. – 2000. – Vol. 50. – P. 77–88.
8. Augilar F., Charrandiere U.R., Dusemund B., Galtier P. L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes to food supplements. // J. European Food Safety Authority. – 2009. – Vol. 12. – P. 1–39.
9. Chukeatirote E. Potential use of probiotics. // J. Sci. Technol. – 2003. – 25 Vol. 2. – P. 275–282.
10. Claerson M., Kerr C. Diversity of Bifidobacteria within the Infant Gut Microbiota. // J. Pone Sci. – 2012. – Vol. 4. – P. 45–56.
11. Eazenyi P., Sztrik. A., Babka B., Prokisch J. Elemental, Nano-Sized (100-500 nm) Selenium Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. // J. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. – 2011. – Vol. 1. – P. 56–64.
12. Fairweather-Tait S.J., Bao Y., Broadley M.R., Collings R., Ford D. Selenium in human health and disease. Antioxid Redox Signal. // J. Food & Health Innovation Service. – 2011. – Vol. 5. – P. 337–383.
13. Galano E., Mangiapane E., Bianga J., Palmese A., Szpunar J. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. // Molecular & Cellular Proteomics. – 2006. – Vol. 12. – P. 2196–2204.



14. Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. Comparison of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. // J. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. – 2008. – Vol. 2. – P. 5–20.
15. Guo Y., Pan D., Li H., Sun Y., Zeng X., Yan B. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 13. – P. 84–89.
16. Hadadji M., Bensoltane A. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. // J. African Journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 6. – P. 34–39.
17. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. // Annual Review of Nutrition. – 2008. – Vol. 2. – P. 157–177.
18. Hossein Yazdi M., Shahverdi A. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses *in vivo* and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. // J. Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 3. – P. 21–33.
19. Lampis S., Zonaro E., Bertolini C., Burler C., Vallini G. Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* Se-ITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. // J. Microbial Cell Factories. – 2014. – Vol. 2. – P. 22–37.
20. Lu J., Berndt C., Holmgren A. Methabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. // Biochim Biophys Acta. – 2009. – Vol. 12. – P. 1513–1519.
21. Mikulasova M., Dusinsky R. Probiotic supplementation: What nurse practitioners need to know to recommend safe and effective formulations. // J. Biomed Res. Int. – 2013. – Vol. 4. – P. 78–94.
22. Monsen E.R. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, Vitamin E, selenium, and carotenoids. // Journal of the American Dietetic Association. – 2000. – Vol. 10. – P. 637–640.
23. O'Sullivan D.J. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. // J. Ag. Food Chem. – 2001. – Vol. 4. – P. 157–160.
24. Palomo M., Gutierrez A. M., Perez-Conde M. C., Camara C., Madrid Y. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. // Food Chemistry. – 2014. – Vol. 16. – P. 371–379.
25. Pan C., Zhao Y., Liao S., Chen F., Qin S., Wu X. Effect of selenium-enriched probiotics on laying performance, egg quality, egg selenium content, and egg glutathione peroxidase activity. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2011. – Vol. 5. – P. 11424–11431.
26. Picard C., Fioramont J., Francois A. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. // J. Alim. Pharm & Therapeutics. – 2005. – Vol. 1. – P. 112–127.



27. Pieniz S., Andrezza R., Pereira J. Q., Camargo F.A. Production of Selenium-enriched biomass by *Enterococcus durans*. // *Biological Trace Element Research*. – 2013. – Vol. 15. – P. 447–454.
28. Rayman M.P. The importance of selenium to human health. // *Lancet*. – 2000. – Vol. 3. – P. 233–241.
29. Reilly C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. // *Trends in Food Science & Technology*. – 2008. – Vol. 9. – P. 114–118.
30. Robinson T., Neant F. Probiotics. Prebiotics and the Gut Microbiota. // *J. ILSI Europe*. – 2013. – Vol. 11. – P. 56–88.
31. Rother M. Selenium metabolism in prokaryotes. // *J. Ag. Food Chem.* – 2012. – Vol. 4. – P. 457–470.
32. Sasidharan S., Balakrishnaraja R. Comparison Studies on the Synthesis of Selenium Nanoparticles by Various Microorganisms. // *J. Int. J. Pure App. Biosis*. – 2014. – Vol. 2. – P. 112–117.
33. Sneddon A. Selenium nutrition and its impact on health. // *J. Food & Health Innovation Service*. – 2012. – Vol. 12. – P. 104–108.
34. Stolz J.F., Basu P., Santini J.M. Arsenic and selenium in microbial metabolism. // *Annual Review of Microbiology*. – 2006. – Vol. 6. – P. 107–130.
35. Stolz J.F., Oremland R.S. Bacterial respiration of arsenic and selenium. // *FEMS Microbiology Reviews*. – 1999. – Vol. 23. – P. 615–627.
36. Tabasco R., Paarup T., Janer C., Requen T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. // *J. International Dairy Journal*. – 2007. – Vol. 17. – P. 1107–1114.
37. Thomson C.D., Robinson M.F. Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1980. – Vol. 33. – P. 303–323.
38. Xia S.K., Chen L., Liang J.Q. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 5. – P. 55.
39. Yazdi M.N., Mahdavi M., Kheradmand E. The preventive oral supplementation of a selenium nanoparticle-enriched probiotic increases the immune response and lifespan of 4T1 breast cancer bearing mice. // *Arzneimittelforschung*. – 2012. – Vol. 62. – P. 525–531.
40. Yin Y., Wang O.X., Xing J., Fan Y.R., Wu Z. Antitumor efficacy of *Bifidobacterium longum* carrying endostatin gene enriched with selenium and the distribution of selenium. // *African Journal of Microbiology Research*. – 2011. – Vol. 5. – P. 5615–5621.
41. Zhang J., Wang X., Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemoprevention agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice. // *Toxicol Sci*. – 2008. – Vol. 101. – P. 22–31.
42. Zang Y., Turanov A.A., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. In silico identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait. // *BMC Genomics*. – 2009. – Vol. 9. – P. 251.



References

1. Glushanova NA. Laktobatsillyi v issledovanii i korrektsii rezidentnoy mikrofloryi cheloveka. Novokuznetsk, 1999. 23.
2. Kaprelyants LV, Yorgachova OG. Funktsionalni produkti. Odesa, 2003:229—237.
3. Tregub NS, Kaprelyants LV. Kinetichni parametri nakopichennya biomasi *Lactobacillus acidophilus* na seredovischah Iz selenom. ZbIrnik NaukovI pratsI ONAHT. 2014;(12):112-115.
4. Tregub NS, Kaprelyants LV. ZmIna pokaznikIv klnetichnih parametrIv nakopichennya biomasi *Lactobacillus acidophilus* ta *Bifidobacterium bifidum* pri kultivuvanni na selenovmIsnih seredovischah. Naukoviy vIsnik LvIvskogo natsIonalnogo unIversitetu veterinarnoYi meditsini ta bIotekhnologIy ImenI S.Z. Gzhitskogo. 2015;(9):28—34.
5. Kochemasova ZN. Sanitarnaya mikrobiologiya i virusologiya. M.: Meditsina, 1987:64-117.
6. Amaretti A, di Nunzio M, Pompei A, Raimondi S, Rossi M, Bondoni A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;(97):809–817.
7. Andreoni V, Luisch MM, Cavalca L, Erba D, Ciappellano S. Selenite tolerance and accumulation in the *Lactobacillus* species. *Annals of Microbiology*. 2000;(50):77–88.
8. Augilar F, Charrandiere UR, Dusemund B, Galtier P. L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes to food supplements. *J. European Food Safety Authority*. 2009;(12):1–39.
9. Chuksatirote E. Potential use of probiotics. *J. Sci. Technol*. 2003;(2):275–282.
10. Claerson M, Kerr C. Diversity of *Bifidobacteria* within the Infant Gut Microbiota. *J. Pone Sci*. 2012;(4):45–56.
11. Eazyeni P, Sztrik A, Babka B, Prokisch J. Elemental, Nano-Sized (100-500 nm) Selenium Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria. *J. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2011;(1):56–64.
12. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D. Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox Signal. J. Food & Health Innovation Service*. 2011;(5):337–383.
13. Galano E, Mangiapane E, Bianga J, Palmese A, Szpunar J. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006;(12):2196–2204.
14. Goderska K, Nowak J, Czarnecki Z. Comparison of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplemented with selected saccharides including prebiotics. *J. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 2008;(2):5–20.
15. Guo Y, Pan D, Li H, Sun Y, Zeng X, Yan B. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Food Chemistry*. 2013;(13):84–89.



16. Hadadji M, Bensoltane A. Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. *J. African Journal of Biotechnology*. 2006;(6):34–39.
17. Hesketh J. Nutrigenomics and selenium: gene expression patterns, physiological targets, and genetics. *Annual Review of Nutrition*. 2008;(2):157–177.
18. Hossein Yazdi M, Shahverdi A. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. *J. Pharmaceutical Sciences*. 2013;(3):21–33.
19. Lampis S, Zonaro E, Bertolini C, Burler C, Vallini G. Delayed formation of zero-valent selenium nanoparticles by *Bacillus mycoides* Se-ITE01 as a consequence of selenite reduction under aerobic conditions. *J. Microbial Cell Factories*. 2014;(2):22–37.
20. Lu J, Berndt C, Holmgren A. Methabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. *Biochim Biophys Acta*. 2009;(12):1513–1519.
21. Mikulasova M, Dusinsky R. Probiotic supplementation: What nurse practitioners need to know to recommend safe and effective formulations. *J. Biomed Res. Int.* 2013;(4):78–94.
22. Monsen ER. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, Vitamin E, selenium, and carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*. 2000;(10):637–640.
23. O'Sullivan DJ. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J. Ag. Food Chem.* 2001;(4):157–160.
24. Palomo M, Gutierrez AM, Perez-Conde MC, Camara C, Madrid Y. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. *Food Chemistry*. 2014;(16):371–379.
25. Pan C, Zhao Y, Liao S, Chen F, Qin S, Wu X. Effect of selenium-enriched probiotics on laying performance, egg quality, egg selenium content, and egg glutathione peroxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;(5):11424–11431.
26. Picard C, Fioramont J, Francois A. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *J. Alim. Pharm & Therapeutics*. 2005;(1):112–127.
27. Pieniz S, Andreazza R, Pereira JQ, Camargo FA. Production of Selenium-enriched biomass by *Enterococcus durans*. *Biological Trace Element Research*. 2013;(15):447–454.
28. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000;(3):233–241.
29. Reilly C. Selenium: a new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science & Technology*. 2008;(9):114–118.
30. Robinson T, Neant F. Probiotics. Prebiotics and the Gut Microbiota. *J. ILSI Europe*. 2013;(11):56–88.



31. Rother M. Selenium metabolism in procariotes. *J. Ag. Food Chem.* 2012;(4):457–470.
32. Sasidharan S, Balakrishnaraja R. Comparison Studies on the Synthesis of Selenium Nanoparticles by Various Microorganisms. *J. Int. J. Pure App. Biosis.* 2014;(2):112–117.
33. Sneddon A. Selenium nutrition and its impact on health. *J. Food & Health Innovation Service.* 2012;(12):104–108.
34. Stolz JF, Basu P, Santini JM. Arsenic and selenium in microbial metabolism. *Annual Review of Microbiology.* 2006;(6):107–130.
35. Stolz JF, Oremland RS. Bacterial respiration of arsenic and selenium. *FEMS Microbiology Reviews.* 1999;(23):615–627.
36. Tabasco R, Paarup T, Janer C, Requen T. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *J. International Dairy Journal.* 2007;(17):1107–1114.
37. Thomson CD, Robinson MF. Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1980;(33):303–323.
38. Xia SK, Chen L, Liang JQ. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2007;(5):55.
39. Yazdi MN, Mahdavi M, Kheradmand E. The preventive oral supplementation of a selenium nanoparticle-enriched probiotic increases the immune response and lifespan of 4T1 breast cancer bearing mice. *Arzneimittelforschung.* 2012;(62):525–531.
40. Yin Y, Wang OX, Xing J, Fan YR, Wu Z. Antitumor efficacy of *Bifidobacterium longum* carrying endostatin gene enriched with selenium and the distribution of selenium. *African Journal of Microbiology Research.* 2011;(5):5615–5621.
41. Zhang J, Wang X, Xu T. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemoprevention agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with Se-methylselenocysteine in mice. *Toxicol Sci.* 2008;(101):22–31.
42. Zang Y, Turanov AA, Hatfield DL, Gladyshev VN. In silico identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait. *BMC Genomics.* 2009;(9):251.

Стаття надійшла до редакції 28.11.2015 р.



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

UDC 579.222:579.841.1

A.S. Semenets, M.B. Galkin, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine, phone: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

BIOFILM FORMATION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS WITH DIFFERENT LEVELS OF CYCLIC DI-GUANOSINE MONOPHOSPHATE BIOSYNTHESIS

Aim: Swarming motility and biofilm formation abilities determination in *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, with low c-di-GMP level. **Materials and methods.** *P. aeruginosa* PA01 and *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 were used as a test-organisms. Bacteria were cultivated in 24-wells Nuclon plates in LB medium at 37 °C for 30–60 min for adhesion determination and for 24 hours for biofilm formation. Determination of planktonic cells amount were carried out spectrophotometrically, biofilm formation – by CV-test, and polysaccharide determination – by alcian blue and congo red staining. Swarming motility, hydrophobicity, and z-potential were carried out by common methods. **Results.** It was shown that *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 form biofilm with impaired structure and in 3.7 times less intensive than *P. aeruginosa* PA01. Even on early stages of the biofilm formation mutant strain shows low adhesion ability compare to wild type. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 planktonic cells amount was higher than in wild type strain at all stages of biofilm formation. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 swarming motility zones diameter was 62 ± 5 mm and it was in 1.4 times higher than at *P. aeruginosa* PA01 – 43 ± 3 mm. Swarming motility zones morphology were different. It was shown that cells of each strains change its hydrophobicity from logarithmic to stationary phase, but direction of changes was opposite. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 cells hydrophobicity increase at stationary phase. *P. aeruginosa* PA01 cells hydrophobicity were higher in logarithmic phase. Cells of each strains have the same z-potential. **Conclusions.** On the frame of low c-di-GMP amount *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 have low adhesion and biofilm formation abilities. Planktonic cells amount and swarming motility intensity are conversely high.

Key words: cyclic-di-GMP, *Pseudomonas aeruginosa*, adhesion, biofilm, swarming motility.

Bis-(3-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) is in the spotlight of the scientists as the result of last achievement of microbial genomics and great interests in microbial communities [10, 12, 13]. Cytoplasmic c-di-GMP is a bacterial secondary messenger, that regulates numerous of physiological processes: cell-to-cell communication, biofilm formation, motility, virulence, etc. [1, 2, 4].



Depends on concentration of this regulator bacteria shifts its life-form from motile to sessile (biofilm formation) [12]. It is found that c-di-GMP affects all stages of the biofilm formation process in *Pseudomonas aeruginosa* from the beginning of adhesion to **biofilm decay**. **This compound regulates biosynthesis of matrix components**, quorum sensing signal molecules, biosurfactants. [8, 11]. That fact, that many processes change direction in bacterial cells depends on c-di-GMP led to hypo- and hyperproduction strains construction. Their use allows to deepening knowledge in the role of this compound in many bacterial cells processes and the possibility to use this molecule as an instrument for biofilm formation control.

The aim of this work was studying the features of *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 swarming motility and biofilm formation in fact that this strain is characterized with low level of c-di-CMP in its cells.

Materials and methods

In this work two strains of *P. aeruginosa* were used. *P. aeruginosa* PA01 – the wild type strain was obtained from the collection of Odessa Mechnikov National University microbiology, virology and biotechnology department. PA01 pJN2133 with low level of c-di-GMP was kindly provided by Dr. Olena Rzhepishevskaya from University of Umea, Sweden. Strains were cultivated on LB medium (g/l, pepton – 15.0; yeast extract – 10.0; NaCl – 5.0) at 37 °C.

Number of **adherent cells**, **biofilm mass**, **planktonic cells** and **matrix exopolysaccharides** content were carried out in 24-wells polysteroll Nuclon plates cultivation conditions. Planktonic cells amount was examined spectrophotometrically on wave length 540 nm. Amount of adherent cells was examined after 30 and 60 min of incubation, biofilm mass – after 24 hours of incubation. After washing well content was fixed with 96% ethanol for 10 min and were stained with 1% crystal violet solution. After 15 minutes of incubation each wells were washed and dried. Wells content was lysed by 1.5 lytic solution with 0.1 M NaOH and 1% sodium dodecylsulfate and OD₅₉₂ of each samples were measured [3].

Biofilm matrix exopolysaccharides content were studied by staining with congo red (Pel) and alcian blue (alginate). After dissolution in lytic solution OD₄₉₀ and OD₆₀₈ were measured respectively [10].

All spectrophotometrically measurement was carried out with SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary).

For biofilm morphology discovery 24×24 mm cover glasses was incubated in 35 mm sterile plastic Petri dishes with 2 ml of LB-medium and *P. aeruginosa* cells (10³ CFU/ml). Plates were incubated for 24 hours at 37 °C. After incubation glasses were fixed with 96% ethanol for 10 min and were stained with 1% crystal violet solution. After drying glasses were analyzed with Primo Star PC, Carl Zeiss microscope and photographed with Olympus DCM (3.0 M pixels) camera.

Swarming motility was studied by the next way. Briefly 2 µl of overnight culture were transferred on the centre of Petri dishes with 0,6% agar medium contain



meat-peptone bullion – 8.0 g/l, glucose – 50.0 g/l, agar-agar – 6.0 g/l. Dishes were incubated for 24 hours at 37 °C. Swarming motility intensity was analyzed by cells spread zones diameter measurement.

Cells surface hydrophobicity was analyzed by MATH-test [14]. Cells from overnight culture were harvested by centrifugation and resuspended in PBS buffer. OD₆₀₀ were adjusted to ~ 0.5. 1 ml of hexadecane was added to 3 ml of cells suspension and mixtures were vortexed vigorously for 1 min. After separation of layers OD₆₀₀ of aqueous phase were measured. Hydrophobicity (%) was calculated by formula: $[(A_0 - A)/A_0] \times 100$, where A₀ – optical density of initial suspension, A – optical density of suspension after hexadecane treatment.

Zeta-potential and cell diameter were measured with Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments.

All experiments were carried out in 3 independent studies with 3–6 repeat.

Statistical analysis was performed by using standard methods of variation analysis. Average values (\bar{X}) and their standard error ($S_{\bar{X}}$) were calculated. Reliability of differences was determined by Student's criterion at significance level of not less than 95% ($p \leq 0.05$). All mathematics calculations were performed by using the computer program Excel.

Results and discussion

Biofilm formation process begins with cells attachment to solid surface. Adhesion level is depending on same properties, not only on cell-surface but from abiotic surface as well. Cell properties that affect adhesion are hydrophobicity, z-potential, motility, and exopolysaccharides and biosurfactants secretion. Substrate properties include hydrophobicity, z-potential, and surface architecture [7, 12]. In this study we focused our attention on comparison of these properties in two *P. aeruginosa* strains – PA01 (wild type), and PA01 pJN2133 with low level of c-di-GMP biosynthesis. According to literature data it is known that in *P. aeruginosa* PA01 intracellular content of this messenger equals to 3.5 fmol/mg proteins, and in *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 there is an undetectable amount of this compound [9].

Previously, we have shown that the first microcolonies of *P. aeruginosa* PA01 appeared 45 minutes after the start of incubation [6]. Therefore the determination of planktonic and attached cells were carried out after 30 and 60 minutes of incubation (fig. 1). Optical density of inoculums was 0.047 for *P. aeruginosa* PA01 and 0.051 for *P. aeruginosa* PA01 pJN2133.

Obtained results show that from the beginning of cultivation *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 shows the lowest than wild type strain ability of attachment to solid surface. After 30 min of incubation attached cells amount of *P. aeruginosa* PA01 was in 1.5 higher. In next 30 min of incubation attached cells amount increased in both cases, but it was on 25% lower in case of *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 compare the *P. aeruginosa* PA01. After 60 min of incubation there is a tendency of higher increasing of planktonic cells amount in *P. aeruginosa* PA01.



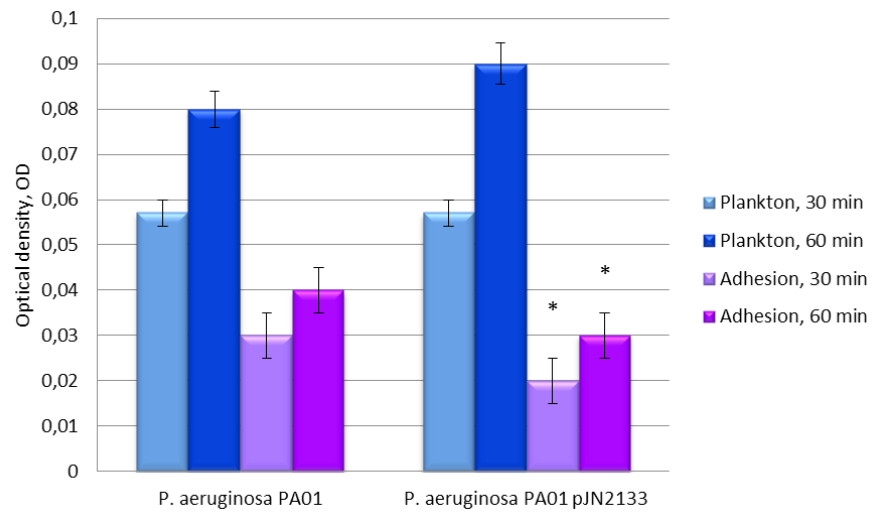


Fig. 1. Attached and free cells amount of *P. aeruginosa* test strains at the first hours of incubation

Note: * – significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01

Examination of daily biofilms show that there were significant differences in general form and structure (fig. 2). *P. aeruginosa* PA01 biofilm consists of multicellular 3D-structures. At the same time, *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 biofilm was flat and “monolayer” (fig. 2A). The difference from two strains also was noticeable on microcolony level (fig. 2B). *P. aeruginosa* PA01 microcolonies were good formed that consists of matrix enclosed cells. In addition, there are secondary microcolonies formation that enhance biofilm mass. In *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 only the small structural units were detected.

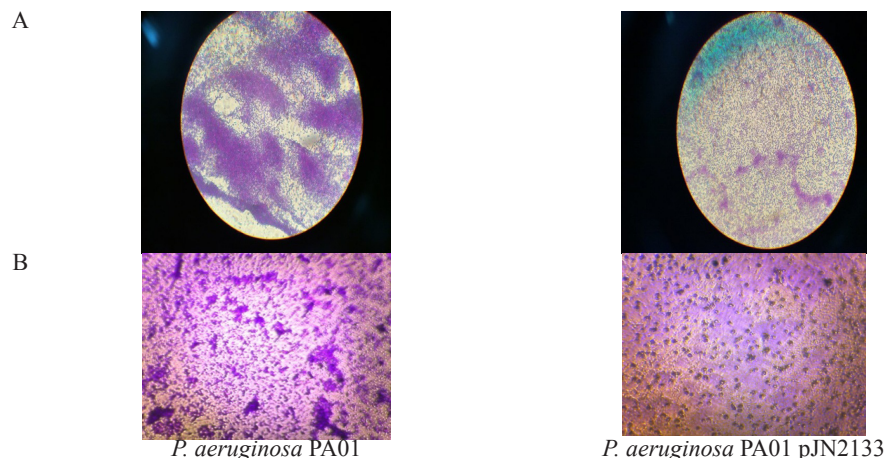


Fig. 2. Images of biofilms, forming by wild and mutant strains of *P. aeruginosa* (Magnification: A – $\times 200$; B – $\times 400$; crystal violet staining)

Quantity examination of the biofilm formation shows (fig. 3) that *P. aeruginosa* PA01 biofilm has in 3.7 times higher mass than in *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. ($p < 0.001$).

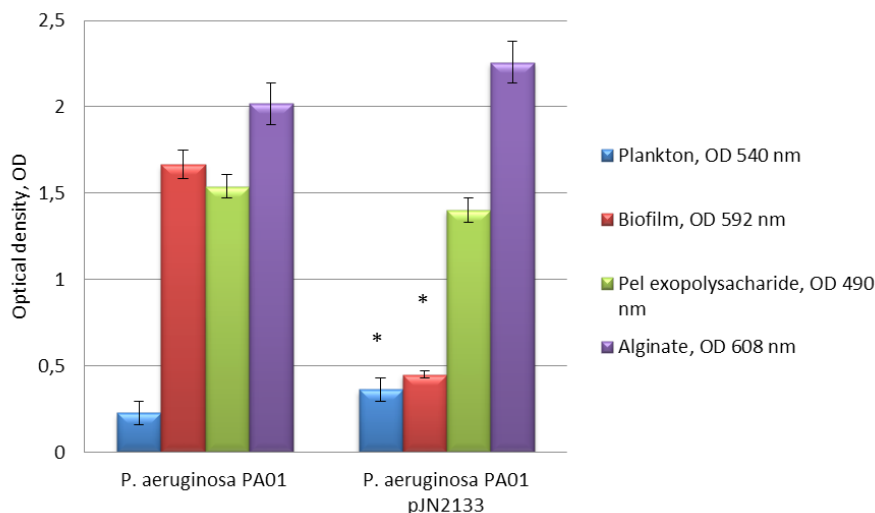


Fig. 3. Biofilm mass and exopolysaccharides amount

Note: * – significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01

However, planktonic cells amount was in 1.6 times higher in the case of *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Pel and alginate exopolysaccharides amount was similar in all strains biofilm matrix.

Cell size and physical-chemical properties of the cells surface study show that examined strains **have a difference in hydrophobicity. More over, strains hydrophobicity changed during the cultivation (table.)**

Table

Cell size and physical-chemical properties of *P. aeruginosa* strains cells surface

Strain	Cell hydrophobicity, %		Cell size, nm	z-potential, - mV
	3 h	24 h		
<i>P. aeruginosa</i> PA01	42.8 ± 2.3	14.2 ± 1.7	666.4 ± 46.4	23.4 ± 1.2
<i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133	8.3 ± 0.4*	43.1 ± 1.9*	920.8 ± 53.1*	23.6 ± 1.3

Note: * – significant difference compared with *P. aeruginosa* PA01

In logarithmic phase of growth, after 3 h of incubation cell hydrophobicity of *P. aeruginosa* PA01 was higher in 5.2 times then in *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Transition to **stationary phase accompanied with opposite changes of hydrophobicity**: 3 fold decreasing in wild type and 5 fold increasing in mutant type strain. Cell diameter in *P. aeruginosa* PA01 overnight culture was in 1.4 times lower than in *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Z-potential of the cells was the same.



An important indicator that affects the interaction of **bacterial cells with different surfaces** and biofilm formation ability is motility, especially swarming. It was shown that *P. aeruginosa* PA01 and *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 are distinguish in the swarming motility process characteristics (fig. 4). *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 swarming motility zones diameter was 62 ± 5 mm and it was in 1.4 times higher than at *P. aeruginosa* PA01 – 43 ± 3 mm.

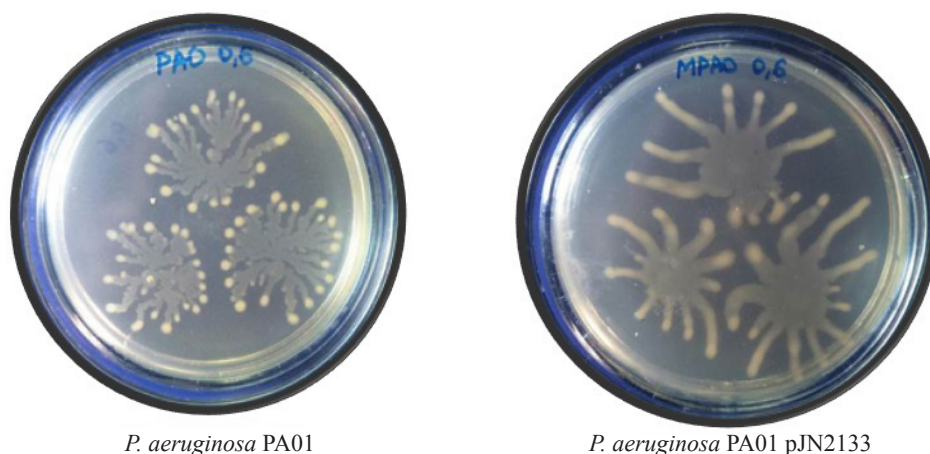


Fig. 4. Swarming motility of *P. aeruginosa* PA01 and *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 cells

P. aeruginosa PA01 swarming zones have not clearly formed central “core” (fig. 4). Branching paths of the cells migration begun from inoculation point is thin in gentle by sight. In the end of each “rays” there is a white thick colony. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 swarming zones looks more rough with 1.5–2.0 cm in diameter centre and thick nonbranching «rays» 2.5 cm in length. Cells in a part of these spread zones more or less evenly along their length and do not form dense colonies. Based on this results, we can conclude that *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 cells are more motile than *P. aeruginosa* PA01 cells. Increasing of the motility could be explained by overproduction and secretion of high rhamnolipids amount, because biosurfactants play the main role in swarming motility implementation. If this hypotheses will be confirmed in the next studies, *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 could be used as a good rhamnolipids producent.

More over, decreasing in biofilm formation ability on the background of c-di-GMP decreasing make this system an attractive target for novel antimicrobial drugs.

А.С. Семенець, М.Б. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ ukr.net

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* З РІЗНИМ РІВНЕМ БІОСИНТЕЗУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ

Реферат

Мета роботи: встановлення особливостей утворення біоплівки та переміщення шляхом роїння клітин штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, що характеризується низьким рівнем синтезу цикло-ди-ГМФ. **Матеріали та методи.** Як тест-мікроорганізми використовували штами *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Культивування проводили в 24-лункових плоскодонних пласкетах Nucleon у середовищі LB при 37 °C впродовж 30–60 хв при визначенні адгезії клітин і впродовж 24 годин при дослідженні утворення біоплівки. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, кількість прикріплених клітин і масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим, вміст полісахаридів у матриці – за методом забарвлення конго червоним або алціановим синім. Роїння, гідрофобність клітин та дзета потенціал оцінювали за загальноприйнятими методами. **Результати.** Встановлено, що *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 у порівнянні з *P. aeruginosa* PA01 утворює біоплівку з порушеною структурою, маса якої знижена у 3,7 рази. Вже на ранньому етапі формування біоплівки мутантний штам поступається батьківському за кількістю адгезованих клітин. У той же час, на всіх етапах утворення біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 кількість планктонних клітин достовірно перевищує рівень, характерний для штаму дикого типу. Діаметр зони розповсюдження клітин *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 шляхом роїння становив 62 ± 5 мм і в 1,4 рази перевищував показник *P. aeruginosa* PA01 – 43 ± 3 мм. Морфологія зон роїння досліджуваних штамів суттєво різниться за рядом ознак. Показано, що клітини обох штамів при переході з логарифмічної до стаціонарної фази росту змінюють гідрофобність, але спрямованість змін носить протилежний характер: підвищення у разі мутантного штаму, і зниження у разі штаму дикого типу. Клітини обох штамів мають однаковий дзета потенціал. **Висновки.** На тлі низького вмісту у цитоплазмі цикло-ди-ГМФ гальмується адгезія клітин до твердої поверхні і утворення повноцінної біоплівки, що сприяє планктонному способу існування *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Одержані результати дозволяють припустити, що ці явища обумовлені низькою гідрофобністю клітин мутантного штаму та їх високою здатністю до переміщення по поверхні шляхом роїння.

Ключові слова: цикло-ди-ГМФ, *Pseudomonas aeruginosa*, адгезія, біоплівка, роїння.



А.С. Семенец, Н.Б. Галкин, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел. : +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova @ ukr.net

ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМ УРОВНЕМ БИОСИНТЕЗА ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Реферат

Цель работы: выявление особенностей образования биопленки и передвижения путем роения клеток штамма *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, характеризующегося низким уровнем синтеза цикло-ди-ГМФ. **Материалы и методы.** Как тест-микроорганизмы использовали штаммы *P. aeruginosa* PA01 и *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Культивирование проводили в 24-луночных плоскодонных планшетах Nucleon в среде LB при 37 °C в течение 30–60 мин при определении адгезии клеток и в течение 24 часов при исследовании образования биопленки. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, количество прикрепленных клеток и массу биопленки – по методу окраски кристаллическим фиолетовым, содержание полисахаридов в матриксе – по методу окраски конго красным или алциановым синим. Роение, гидрофобность клеток и дзета потенциал оценивали по общепринятым методам. **Результаты.** Установлено, что *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 по сравнению с *P. aeruginosa* PA01 образует биопленку с нарушенной структурой, масса которой снижена в 3,7 раза. Уже на раннем этапе формирования биопленки мутантный штамм уступает родительскому по количеству адгезированными клеток. В то же время, на всех этапах образования биопленки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 количество планктонных клеток достоверно превышает уровень, характерный для штамма дикого типа. Диаметр зоны распространения клеток *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 путем роения составил 62 ± 5 мм и в 1,4 раза превышал показатель *P. aeruginosa* PA01 – 43 ± 3 мм. Морфология зон роения исследуемых штаммов существенно отличается по ряду признаков. Показано, что клетки обоих штаммов при переходе от логарифмической к стационарной фазе роста меняют гидрофобность, но направленность изменений носит противоположный характер: повышение в случае мутантного штамма, и снижение в случае штамма дикого типа. Клетки обоих штаммов имеют одинаковый дзета потенциал. **Выводы.** На фоне низкого содержания в цитоплазме цикло-ди-ГМФ тормозится адгезия клеток к твердой поверхности и образование полноценной биопленки, что способствует планктонным способа существования *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Полученные результаты позволяют предположить, что эти явления обусловлены низкой гидрофобностью клеток мутантного штамма и их высокой способностью к перемещению по поверхности путем роения.

Ключевые слова: цикло-ди-ГМФ, *Pseudomonas*, адгезия, биопленка, роение.



References

1. Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M.R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // *Mol. Microbiol.* – 2010. – V. 75. – P. 827–842.
2. Caiazza N.C., Merritt J.H., Brothers K.M., O'Toole G.A. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 // *J. Bacteriol.* – 2007. – V. 189. – P. 3603–3612.
3. Christensen G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // *J. clin. microbiol.* – 1985. – V. 22. – № 6. – P. 996–1006.
4. Cotter P.A., Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – V. 10. – P. 17–23.
5. Friedman L., Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms // *Mol. Microbiol.* – 2004. – V. 51. – P. 675–690.
6. Galkin M. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm formation dynamic in presence of the meso-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrine bismuth complex // *Visnyk of L'viv University. Biological series.* – 2016. – V. 71. – P. 206–214.
7. Habimana O., Semizo A.J.C., Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes // *Journal of Membrane Science.* – 2014. – V. 454. – P. 82–96.
8. Hickman J.W., Tifrea D.F., Harwood C.S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels // *PNAS.* – 2005. – V. 102. – P. 14422–14427.
9. Jones J.C., Newsom D., Kelly B. et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS Pathog.* – 2014. – V. 10(3): e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
10. Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production // *Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 65. – P. 1474–1484.
11. Parsek M.R., Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // *Trends in Microbiol.* – 2005. – V. 13. – P. 27–33.
12. Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2013. – V. 77, № 1. – P. 1–52.
13. Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system // *Mol. Microbiol.* – 2005. – V. 53. – P. 629–639.
14. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1980. – V. 9. – P. 29–34.

References

1. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to rein-



- force the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2010;75:827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
2. Caiazza NC, Merritt JH, Brothers KM, O'Toole GA. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* 2007;189:3603–3612. doi:10.1128/JB.01685-06.
 3. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. clin. microbiol.* 1985;22(6):996–1006.
 4. Cotter PA, Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007;10:17–23. doi:10.1016/j.mib.2006.12.006
 5. Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 2004; 51: 675–690. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x
 6. Galkin M. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm formation dynamic in presence of the *meso*-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrine bismuth complex. *Visnyk of L'viv University. Biological series.* 2016;71:206-214.
 7. Habimana O, Semiro AJC, Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes. *Journal of Membrane Science.* 2014;454:82–96. doi:10.1016/j.memsci.2013.11.043
 8. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *PNAS.*2005;102:14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102
 9. Jones JC, Newsom D, Kelly B, et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS Pathog.* 2014;10(3):e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
 10. Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa YA. Cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 2007;65:1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
 11. Parsek MR, Greenberg EP. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiol.* 2005;13:27-33. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.007
 12. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2013;77(1):1–52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
 13. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system. *Mol. Microbiol.* 2005; 53:629-639. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x
 14. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 1980; 9:29–34. doi: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x

Стаття надійшла до редакції 02.03.2016 р.



УДК 579.049

С.Л. Голембіовська, Л.В. Поліщук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх

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

ЛІМІТУЮЧІ КАРОТИНОГЕНЕЗ УМОВИ КУЛЬТИВУВАННЯ МУТАНТІВ *STREPTOMICES* *GLOBISPORUS* 1912

Мета. Встановити компоненти синтетичного середовища та умови культивування, які блокують ознаку біосинтезу каротиноїдів у мутантних штамах *Streptomyces globisporus* 1912 Нр7 і Нр7С. **Методи.** Приготування агаризованих синтетичних середовищ з попередньо математично прорахованим співвідношенням С:N. Вплив солей на ознаку біосинтезу каротиноїдів визначали за допомогою методу лунок, перенесення поверхневого міцелію на досліджувані середовища здійснювали методом репліки. Ознаку біосинтезу каротиноїдів на досліджуваних середовищах проводили візуально. **Результати.** Проаналізовано вплив несприятливих для каротиногенезу чинників культивування для штаму *S. globisporus* 4Lcp отриманих раніше. На їх основі визначали чинники, які блокують біосинтез каротиноїдів у мутантних штамах *S. globisporus* 1912 Нр7 та *S. globisporus* 1912 Нр7С. Визначено, що 0,007% $FeSO_4$ лімітує утворення каротиноїдів досліджуваними штамами на оптимальних середовищах Ваксмана та Красильникова СРІ. Показано, що вміст джерел вуглецю по відношенню до джерел азоту є меншим за 24:1 та рН нижчим за 7 без застосування $CaCO_3$, який запобігає закисленню в процесі культивування, блокує утворення каротиноїдів. З'ясовано, що процес каротиногенезу досліджуваними штамами потребує стрес-чинників, таких як $MgSO_4$. **Висновки.** Визначено лімітуючі каротиногенез чинники культивування для мутантних штамах *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С: 0,007% $FeSO_4$, співвідношення С:N нижче за 24:1 та рівень рН нижче за 7, за відсутності $CaCO_3$ та стимулювальних каротиногенез солей, зокрема $MgSO_4$.

Ключові слова: стрептоміцети, каротиногенез, лімітуючі чинники.

Каротиноїди – внутрішньоклітинні природні пігменти. Вони утворюються шляхом поєднання C_5 -ізопреноїдів у молекули з C_{30} , C_{35} , C_{40} , C_{45} , C_{50} – вуглецевим скелетом, що містять спряжені подвійні зв'язки (СПЗ), кількість яких впливає на спектр поглинання енергії світла. Каротиноїди, які мають від 7-ми СПЗ поглинають кванти світла у видимій ділянці і людське око сприймає їх різні відтінки від світложовтого до темночервоного забарвлення [3, 7].

Каротиноїди виконують захисні функції для організмів, які постійно перебувають в агресивних умовах навколишнього середовища. Біосинтез каротиноїдів у нефотосинтезувальних мікроорганізмів, якими є стрептоміцети, носить регулятивний характер. В більшості стрептоміцетів гени біосинтезу каротиноїдів (*crt*-кластера) знаходяться в критичному стані, а їх активація

© С.Л. Голембіовська, Л.В. Поліщук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх, 2016



відбувається у відповідь на стресові чинники, такі як освітлення $\lambda = 450\text{-}550$ нм, підвищення температури, внесення окисників, кислот, солей, зміною рН середовища [8, 10].

З 1998 року у відділі Генетики мікроорганізмів ІМВ імені Д.К. Заболотного НАНУ існує колекція мутантів штаму *Streptomyces globisporus* 1912, які синтезують каротиноїди лікопін і бета-каротин. Вони відносяться до C_{40} -каротиноїдів, містять 11 спряжених подвійних зв'язків, є кольоровими і їх накопичення фіксують візуально. Після проведення сиквенс-аналізу геному одного з каротинсинтезувальних мутантів [9] став зрозумілий конститутивний характер біосинтезу каротиноїдів у мутантів *S. globisporus* 1912. Тим не менш, актуальною є проблема дисоціації популяції з утворенням варіантів низькоактивних (жовті, кремові) та неактивних (білих) за різних умов культивування (рідкі, агаризовані середовища) або тривалості зберігання. При розсіві білих колоній на повноцінні агаризовані середовища спостерігається накопичення в їх популяції каротинсинтезувальних варіантів, що свідчить про вірогідну регуляцію процесів біосинтезу каротиноїдів умовами культивування. Тому метою роботи було дослідити компоненти синтетичних середовищ і умови культивування мутантних штамів *S. globisporus* 1912 та визначити фактори, що лімітують біосинтез каротиноїдів у продуцентів каротиноїдів *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С.

Матеріали і методи

Характеристики досліджуваних штамів наведені в таблиці 1.

Склад середовищ культивування, які використовували в роботі представлено в таблиці 2.

Гомогенізовану суспензію культур отримували змивом міцелію 7–10 добових культур зі скошеної поверхні агаризованого кукурудзяно-соевого середовища [1] стерильною дистильованою водою, ресуспендуванням та фільтруванням через стерильний ватний фільтр.

Таблиця 1

Характеристики використаних в роботі каротинсинтезувальних мутантів *S. globisporus* 1912

Table 1

Features of mutants *S. globisporus* 1912 used in the work

Штам	Колір колоній	Каротиноїд	Походження
<i>S. globisporus</i> 4 Lcp	Рожевий	Лікопін	4Crt спонтанно [2]
<i>S. globisporus</i> 1912 Нр7	Темно-рожевий	Лікопін	4 Lcp H ₂ O ₂ [1]
<i>S. globisporus</i> 1912 Нр7С	Оранжевий	Лікопін , β -каротин	Нр7 спонтанно



Розсів проводили в розведенні в розрахунку 50–100 колоній на чашку Петрі. Для застосування методу репліки міцелій штамів *S. globisporus* 4 Lcp, Hp7 та Hp7C за допомогою петлі секторами наносили на поверхню агаризованого повноцінного середовища в чашках Петрі і вирощували протягом 4–5 діб. Далі на підставку-реплікатор надівали стерильний фільтрувальний папір та фіксували його. На зовнішній поверхні всіх чашок Петрі робили позначку маркером. В стерильних умовах відкриту чашку з вирощеними культурами з невеликою силою притискали до паперу реплікатора, так щоб залишити на ньому частину поверхневого міцелію. Після цього з поверхні реплікатора робили відбиток на досліджувані агаризовані середовища, при цьому позначку маркера для всіх чашок залишали в одному положенні.

Таблиця 2

Склад середовищ, які підлягали порівняльному аналізу [2]

Table 2

Compound of the medium for comparative analysis [2]

Середовище	Склад середовища, %						
	C	N	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	NaCl	FeSO ₄	Інше
Красильникова СРІ	Глюкоза 2,0	NaNO ₃ 0,2	0,05	0,05	0,05	0,001	CaCO ₃ 0,3
Чапека з глюкозою	Глюкоза 2,0	NaNO ₃ 0,2	0,1	0,05	0,05	0,005	
Глюкозо-амонійне	Глюкоза 1,0	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,4	0,2	0,1	0,5	0,002	CaCl ₂ x 5H ₂ O 0,04
Ваксмана	Гліцерин 3,0	NaNO ₃ 0,2	0,05	0,05	0,05	0,001	
Гліцерин-амонійне	Гліцерин 1,0	NH ₄ Cl 0,1	0,1	0,05	0,05		CaCO ₃ 0,1

Вплив FeSO₄ на блокування біосинтезу каротиноїдів проводили на оптимальних середовищах Ваксмана та Красильникова СРІ. За допомогою пробійника (d=10мм) в товщі середовища з щільно засіяним мутантами газонем робили лунки, в які вносили по 0,1 мл FeSO₄ в концентраціях від 0,1 до 0,5% з кроком 0,1%. Розраховували кількість солі в 0,1 мл за різних концентрацій. Через 7–10 діб лінійкою вимірювали величину зон відсутності росту продуцентів, блокування каротиноїдів та пригнічення їх синтезу. Математично виходили об'єм середовища навколо лунок, поширення солі в агарі навколо лунок (геометрична прогресія) та вірогідну концентрацію солі (з похибкою 5%), яка лімітує ріст досліджуваних мутантів. Після чого середовища Ваксмана та Красильникова СРІ готували з внесенням 0,005 до 0,009% з кроком 0,001% FeSO₄, які засівали методом репліки.

Для середовищ з гліцерином і амонієм C:N 24:1 методом лунок визначали потребу в солях K₂HPO₄, NaCl, MgSO₄ та CaCO₃. Готували 4-ри розчини: №1



містив по 1% суміші всіх солей, №2 не містив CaCO_3 , №3 – MgSO_4 , №4 – MgSO_4 та CaCO_3 . В агарі чашок Петрі робили лунки, куди вносили по 0,1 мл вищенаведених розчинів.

Вплив еквімолярних співвідношень вуглецю до азоту на біосинтез каротиноїдів досліджували із внесенням гліцерину та глюкози з 0,08% сульфатом амонію, інші солі (г/л): K_2HPO_4 – 0,5, NaCl – 0,5, MgSO_4 – 0,5, CaCO_3 – 0,5. Досліджуваними співвідношеннями С:N були 12:1, 24:1, 36:1, 48:1 та 60:1. Масову частку атомів азоту або вуглецю в молекулах, що їх містять визначали за формулою:

$$W = n \times A_r / M [5],$$

де W — масова частка елемента; A_r — відносна атомна маса елемента в таблиці Менделєєва; n — кількість атомів елемента у формулі; M_r — відносна молекулярна маса речовини, в якій міститься елемент.

Вплив початкового рН на синтез каротиноїдів досліджували за співвідношення С:N 24:1. Джерелами вуглецю були: сахароза, фруктоза, етанол, глюкоза, інозит, сорбіт та арабіноза, які вносили в концентрації 1%, етанолу – 0,5%, джерелами азоту – 0,1% нітрат натрію та 0,08% сульфату амонію. Для випадку внесення етанолу додавали 0,07% нітрату натрію або 0,05% сульфату амонію. Використовували солі (г/л): K_2HPO_4 – 1,0 та NaCl – 1,0. Досліджуваними значеннями рН були 6,0, 7,0 та 8,0, які доводили перед стерилізацією до необхідного значення NaOH або HCl . Пересівання досліджуваних штамів на середовища здійснювали за допомогою методу репліки. Ознаку біосинтезу каротиноїдів лікопіну та бета-каротину аналізували візуально після вирощування впродовж 7–10 діб в термостаті за t 28 °С.

Результати досліджень та їх обговорення

На початку дослідження проаналізовано вплив середовищ культивування на інтенсивність каротиногенезу у мутантного штаму *S. globisporus* 4 Lcp [2] та вибрані необхідні для дослідження впливу у напрямку визначення лімітуючих каротиногенез чинників культивування (табл. 3).

Найбільшу увагу привертала середовища Красильникова СРІ та Чапека, які схожі за компонентним складом, але відрізняються продуктивністю. Для Чапека було застосовано пояснення закислення середовища в процесі культивування до 4,8, аналогічно глюкозо-амонійному – 5,5 за відсутності CaCO_3 . У даному дослідженні зосередили увагу на причинах закислення. Одна з них – FeSO_4 в середовищі Чапека, що здійснює вплив на окисно-відновлювальний потенціал та сприяє накопиченню H^+ -йонів в середовищі [5]. Оптимальні для каротиногенезу середовища в прописі мають цю речовину у п'ять разів меншій кількості, ніж в Чапека. Для підтвердження впливу FeSO_4 на блокування біосинтезу пігментів на оптимальних середовищах Красильникова СРІ та Ваксмана її вносили у вищій, ніж в прописі кількості. Внесення 0,2–0,5% FeSO_4 по 0,1 мл в лунку пригнічувало ріст досліджуваних штамів навколо лунки з середньою зоною затримки росту $d=13\pm 2,0$ мм.



Таблиця 3

Накопичення біомаси та синтез лікопіну штамом *S. globisporus* 4Lcp при глибинному культивуванні на синтетичних середовищах [2]

Table 3

Accumulation of biomass and lycopene biosynthesis of strain *S. globisporus* 4Lcp in liquid synthetic medium [2]

Середовище	C:N	рН		Суха біомаса, г/л середовища	Лікопін мг/г СБМ
		до	після		
		вирощування			
Красильникова СРІ	24:1	7,5	6,5	2,0 ± 0,1	1,30 ± 0,01
Чапека з глюкозою	24:1	7,4	4,8	2,0 ± 0,2	0,50 ± 0,02
Глюкозо-амонійне	12:1	7,4	5,5	2,0 ± 0,2	0,50 ± 0,02
Гліцерин-амонійне	24:1	7,3	7,0	1,5 ± 0,1	Сліди
Ваксмана	36:1	7,0	7,2	3,0 ± 0,2	1,30 ± 0,05

Далі на агарі фіксували білі зони росту культур, величина діаметрів яких була пропорційною концентраціям внесеної солі. Навколо лунки, куди вносили 0,1 мл 0,1% FeSO₄ газон досліджуваних штамів був білим, а зони пригнічення росту не фіксували. Математично прорахували, що кількість солі, яка не сприятиме росту культур становитиме 0,01%. Подальші приготування вищеназваних середовищ містили 0,005–0,009% концентрації FeSO₄. При їх порівняльному реплікаційному аналізі визначено, що внесення 0,007% FeSO₄ блокувало біосинтез пігментів без впливу на ріст штамів *S. globisporus* 1912Hr7 та Hr7C. Потрібно зауважити, що така кількість FeSO₄ близька до концентрації в прописі Чапека – 0,005%, що доповнює пояснення низького синтезу каротиноїдів для цього середовища.

Рівень низького біосинтезу лікопіну у штаму *S. globisporus* 4 Lcp на глюкозо- та гліцерин-амонійних середовищах пояснювали блокуванням лікопіногенезу солями амонію. Крім цього, глюкозо-амонійне середовище містить співвідношення атомів вуглецю до азоту 12:1, а визначене раніше оптимальне для продуктивності *S. globisporus* 4 Lcp складає 48:1 [2]. Відомо, що вміст великої кількості вуглецевих молекул на тлі браку джерел азоту активує процес біосинтезу каротиноїдів у нефотосинтезувальних мікроорганізмів [4, 7]. Не сприятливість лікопіногенезу гліцерин-амонійного за C:N 24:1, за відсутності FeSO₄ і нейтральному рН робило необхідним ретельніше його дослідити.

Гомогенізовані суспензії мутантних штамів *S. globisporus* 1912-Hr7 та Hr7C в розведеннях висівали на агаризовані глюкозо- (12:1) і гліцерин- (24:1)



амонійні середовища порівняно з оптимальними та спорідненими за джерелом вуглецю нітратними Красильникова СРІ (24:1) і Ваксмана (36:1).

На чашках з окремими колоніями спостерігалася велика різниця в забарвленні колоній на середовищах з амонієм порівняно з нітратними, що підтверджувало попередню гіпотезу блокування солями амонію каротиногенезу у штаму *S. globisporus* 4 Lcp. Колонії варіантів на середовищах Ваксмана та гліцерин-амонійному були більшими, з краще розвиненим поверхневим міцелієм, вірогідно через вищий вміст гліцерину в прописі середовища Ваксмана (рис. 1).

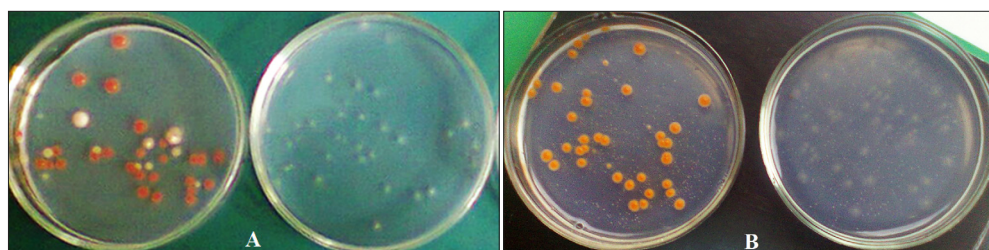


Рис. 1. Колонії мутантних штамів *S. globisporus* 1912Hp7 (А) та Hp7C (В) на середовищі Ваксмана (зліва) та гліцерин-амонійному (справа)

Fig. 1. Mutant strains colonies *S. globisporus* 1912Hp7 (A) and Hp7C (B) on Waksman (left) and glycerol-ammonium (right) medium

У зв'язку з цим, вирішили дослідити вплив співвідношення С:N 12:1, 24:1, 36:1, 48:1 та 60:1 для гліцерину і глюкози до азоту – сульфат амонію на синтез каротиноїдів у мутантних штамів *S. globisporus* 1912 Hp7 та Hp7C. В результаті на середовищах з варіантами С:N 12:1 та 24:1 колонії мутантів були неактивними за синтезом каротиноїдів (білі). При додатковому внесенні молекул вуглецю 36:1, 48:1 та 60:1 поверхневий міцелій колоній мутантного штаму *S. globisporus* 1912 Hp7 був світло рожевим, а Hp7C – світло оранжевим. Амоній відомий як донор протонів водню [5], тому потрібно було дослідити ознаку біосинтезу каротиноїдів за початкового рівня рН 6, 7 та 8, що є важливим показником для утворення каротиноїдів у мукових грибів [6]. Визначено, що в умовах рН 7 поверхневий міцелій мутантів *S. globisporus* 1912 Hp7 та Hp7C набував світлих відтінків рожевого та оранжевого кольорів, відповідно. Тоді як, при розсіві окремими колоніями культури в таких самих умовах були білими (попередній дослід з визначенням С:N). Отже, спостерігалася підсилення синтезу каротиноїдів за сумісного вирощування, що є наближеним до умов глибинного культивування, на протигагу самостійному росту колоніями. Досліджено, що рівень рН 6 не сприяв розвитку поверхневого міцелію мутантів, а субстратний був безпігментним. За початкового рівня рН 8 замість газону виростили поодинокі каротинсинтезувальні колонії. Тому, одним з лімітуючих каротиногенез чинників на гліцерин-амонійному середовищі є недостатня кількість ОН⁻-іонів. Також, для цього середовища з рН 7 була досліджена потреба в солях MgSO₄



та CaCO_3 . Навколо лунки, куди вносили 0,1 мл розчину №1 – всі солі K_2HPO_4 , NaCl , MgSO_4 та CaCO_3 по 1%, синтез каротиноїдів досліджуваними мутантами був інтенсивнішим, ніж в цілому на газоні гліцерин-амонійного середовища. Відсутність MgSO_4 та CaCO_3 , як разом, так і поодиноці не впливала на ріст штамів, але не сприяла накопиченню ними каротиноїдів. Сіль MgSO_4 може виступати як стресстимуловальний чинник або ко-фактор процесів біосинтезу каротиноїдів, а CaCO_3 запобігає зниженню рівня рН. Відсутність обох солей віднесено до лімітуючих каротиногенез чинників у штамів *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С, вміст яких для продуктивності гліцерин-амонійного середовища має бути у вищій, ніж в прописі кількості. Завдяки візуальній оцінці утворення поверхневого міцелію навколо лунок та попередньо визначеним кількостям K_2HPO_4 та NaCl [2] в подальшому їх додавали по 1,0 г/л для обох варіантів.

Було вирішено дослідити вплив початкового рівня рН 6, 7 та 8 при відсутності солей MgSO_4 , CaCO_3 та С:N 24:1 на біосинтез каротиноїдів у *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С. Джерелами вуглецю були: 1) сахароза, фруктоза та етанол як несприятливі [2]; 2) глюкоза, шестиатомні спирти інозит і сорбіт для порівняння; 3) п'ятиатомний цукор арабіноза для визначення утилізації пентоз. Як джерело азоту використовували амоній сульфат і нітрат натрію. В результаті спостерігали відсутність синтезу каротиноїдів у лікопінсинтезувального штаму *S. globisporus* 1912 Нр7 за рН 6 для всіх джерел вуглецю, крім арабінози, в поєднанні з обома застосованими джерелами азоту. Штам *S. globisporus* 1912 Нр7С, що накопичує каротиноїди лікопін та бета-каротин не утворював каротиноїди за рН 6 з внесенням цукрів у поєднанні з солями амонію, а спиртів з обома джерелами азоту. Гіпотеза блокування солями амонію каротиногенезу за рН 7 [2] знайшла підтвердження тільки при внесенні цукрів в середовище культивування лікопінсинтезувального мутанта *S. globisporus* 1912 Нр7. В інших варіантах за рівня рН 7 поверхневий міцелій досліджуваних штамів набував світлих відтінків відповідного для кожного мутанта кольорів, крім внесення арабінози та інозиту з обома джерелами азоту. В останніх поверхневий міцелій досліджуваних мутантів набував інтенсивніших відтінків кольорів властивих продуцентам. Натомість, накопиченню каротиноїдів сприяв рівень рН 8, хоча при цьому у більшості виростили поодинокі інтенсивно пігментовані колонії, а на середовищах з етанолом та сорбітом в поєднанні з нітратом ріст мутантів взагалі був відсутній. Вірогідно, надлишок гідрокси-йонів підсилювався окисником нітратом натрію, що не сприяло росту культур, тоді як відновлювальні властивості амонійної солі за рН 8 виявилися сприятливими. В цілому для всіх застосованих варіантів джерел вуглецю при рН 8 сульфат амонію був кращим субстратом для синтезу пігментів мутантними штамами *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С.

Дослідженнями встановлено продуктивні варіанти накопичення пігментів при внесенні інозиту в поєднанні з обома джерелами азоту за рН 7 та арабінози за всіх досліджуваних рН. Цей факт свідчить про наявність обох відомих на сьогодні шляхів біосинтезу C_{40} -каротиноїдів у мікроорганізмів: мевалонатного та метилеритритолфосфатного (МЕР-шлях) [3]. Крім того, можливість утво-



рювати мутантними штамами каротиноїди при застосуванні вищеназваних субстратів без внесення $MgSO_4$ свідчить, що він не може бути ко-фактором процесів біосинтезу каротиноїдів, але носить стресстимулювальний характер.

Отже, утворення каротиноїдів мутантними штамами *S. globisporus* 1912 Нр7 та Нр7С лімітує низку чинників: 0,007% $FeSO_4$, співвідношення джерел вуглецю по відношенню до азоту нижче за 24:1, рН нижче за 7, крім внесення арабінози, за відсутності $CaCO_3$ та стрес-чинників, зокрема $MgSO_4$.

УДК 579.049

С.Л. Голембиовская, Л.В. Полищук, А.Ю. Коцюк, Б.П. Мацелюх

Институт микробиологии и вирусологии НАНУ, ул. Заболотного, 154,
Киев, МСП, ДО3680, Украина, e-mail: golembiowska@ukr.net

ЛИМИТИРУЮЩИЕ КАРОТИНОГЕНЕЗ УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МУТАНТОВ *STREPTOMICES GLOBISPORUS* 1912

Реферат

Цель. Установить компоненты синтетической среды и условия культивирования лимитирующие каротиногенез мутантных штаммов *Streptomyces globisporus* 1912 Нр7 и Нр7С. **Методы.** Приготовление агаризованных синтетических сред с предварительно математически просчитанным соотношением С:N. Влияние солей на признак биосинтеза каротиноидов проводили с помощью метода лунок, перенесение воздушного мицелия осуществляли методом реплики. Признак биосинтеза каротиноидов на исследованных средах проводили визуально.

Результаты. Проведен анализ неблагоприятных каротиногенезу факторов для штамма *S. globisporus* 4Лср. На их основе определены факторы, которые блокируют биосинтез каротиноидов у мутантных штаммов *S. globisporus* 1912 Нр7 и *S. globisporus* 1912 Нр7С. Показано, что 0,007% $FeSO_4$ блокирует образование каротиноидов исследованными штаммами на оптимальных средах Ваксмана та Красильникова СРІ. Установлено, что содержание источников углерода по отношению к источникам азота ниже 24:1 и рН ниже 7 без применения $CaCO_3$, который предотвращает закисление в процессе культивирования блокирует образование каротиноидов. Определено, что процесс биосинтеза каротиноидов исследуемыми штаммами требует стресс-факторов, таких как $MgSO_4$. **Выводы.** Установлено лимитирующие каротиногенез мутантных штаммов *S. globisporus* 1912 Нр7 и Нр7С факторы культивирования: 0,007% $FeSO_4$, соотношение С:N ниже 24:1, уровень рН ниже 7, при отсутствии $CaCO_3$ и стимулирующих каротиногенез солей, в частности $MgSO_4$.

Ключевые слова: стрептомицеты, каротиногенез, блокирование.



UDK 579.049

S.L. Golembiovska, L.V. Polishchuk, A.Yu. Kotsyuk, B.P. Matselykh

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine,
154, Zabolotny st., Kyiv,
e-mail: golembiovska@ukr.net

THE FACTORS OF CULTIVATION LIMITING CAROTENOGENESIS OF MUTANTS *STREPTOMICES GLOBISPORUS* 1912

Summary

Aim. To set the limiting carotenogenic components of the synthetic medium and conditions of cultivation for mutant strains *Streptomyces globisporus* 1912 Hp7 and Hp7C.

Methods. The synthetic agar media has been prepared with the pre-mathematically calculated ratio C:N. Influence of salts on the process of carotenoids biosynthesis has been determined by the method of holes, the aerial mycelium has been carried by the copies method. The sign of the carotenoids biosynthesis has been visual investigated.

Results. The analysis of the unfavorable factors for carotenogenesis have been conducted for strain *S. globisporus* 4Lcp. On their basis the factors has been determined, which block carotenoids biosynthesis in mutant strains *S. globisporus* 1912 Hp7 and *S. globisporus* 1912 Hp7C. It is shown that 0,007% FeSO_4 has inhibited the formation of carotenoids of tested strains on optimal medium Waxman and Krasyl'nikov CPI. It was shown that the content of carbon sources to nitrogen sources below 24:1 and pH below 7 without the use of CaCO_3 , that prevents acidification during cultivation has suppressed the carotenoids formation. Stimulation effect of stress factors, particularly MgSO_4 on tested strains carotenogenesis has been established. **Conclusions.** There were installed the limiting carotenogenic cultivation factors for mutant strains *S. globisporus* 1912 and Hp7 Hp7C: 0.007% FeSO_4 , the ratio of C:N below 24:1, pH below 7, in the absence of CaCO_3 and stimulating carotenogenesis salts, in particular MgSO_4 .

Key words: *Streptomyces*, carotenogenic, limiting factors.

Список використаної літератури

1. Голембівська С.Л., Лавренчук В.Я., Мацелюх Б.П. Багатоступенева селекція високопродуктивних по лікопіну мутантів // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – 2012. – Т. 4 – С. 334–338.
2. Голембівська С.Л., Тимошенко С.Г., Мацелюх Б.П. // Вплив джерел вуглецю і азоту на біосинтез лікопіну *Streptomyces globisporus* 4Lcp 1912 // Мікробіол. журн. – 2010. – т. 72, № 6. – С. 46–51.
3. Еришов Ю.В. Метилэритритолфосфатный (немевалонатный путь) синтеза изопреноидов. // Успехи биол. химии – 2005. – Т. 45. – С. 307–312.
4. Санникова В.М., Погуляка Ф.П., Санников В.Д., Тюна Г.Г. Разработка питательной среды для выращивания гриба – продуцента каротина // Биотехнология. – 1989. – Т. 5, № 1. – С. 58–60.
5. Посібник з хімії для вступників до вузів / Под ред. Хомченко Г.П., Демиденко Н.В. – К: АСК, 2003. – 480 с.



6. *Феофилова Е.П.* Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 30. – С. 181–196.

7. *Daisuke U., Tobias, A.V., Arnold F.H.* General Carotenoid Biosynthetic Pathways // MMBR. – 2005. – V. 69. – P. 51–78.

8. *Lee H.S., Ohnishi Y., Horinouchi S.* A sigmaB-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus* // J Mol. Microbiol Biotechnol. – 2001. – V. 3, № 1. – P. 95–101.

9. *Matselykh B.P., Polishchuk L.V., Lukyanchuk V.V., Golembiovskaya S.L., Lavrenchuk V.Y.* Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the producer *Streptomyces globisporus* 1912 // Biotechnologia Acta – 2014. – V. 7, № 6 – P. 69–74.

10. *Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K.* Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, № 5. – P. 1825–1832.

References

1. Golembiovskaya SL, Lavrenyuk VYa, Matseliukh BP. Multi Selection of High Performance in Lycopene Mutants. Achievements and Problems of Genetics, Breeding and Biotechnology. 2012; 4: 334-38.

2. Golembiovskaya SL, Tymoshenko SG, Matselyukh BP. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Biosynthesis of Lycopene By *Streptomyces Globisporus* 4Lcp. Mikrobiol Z. 2010; 72.6: 46-51.

3. Ershov YuV. Methylerythritol Phosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. USP BIOL KHIM. 2005; 45: 307-57.

4. **Sannikova VM, Pohulyaka FP, Sannikov VI, Tyupa GG.** Research of a Nutrient Medium for Cultivation of the Fungus – Producer of Carotene. Biotechnology. 1989; 5(1): 58-60.

5. Khomchenko GP, Demidenko NV. Manual in Chemistry for Entering Universities. Kiev: ASC; 2003. 480p.

6. Feofilova EP. Carotenoids of Fungi: Biological Function and Practical Use. Applied Biochemistry and Microbiology. 2004; 30: 181-96.

7. Umeno D, Tobias AV, Arnold FH. Diversifying Carotenoid Biosynthetic Pathways by Directed Evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2005; 69(1): 51-78.

8. Horinouchi S, Lee HS, Ohnishi Y. A SigmaB-like Factor Responsible for Carotenoid Biosynthesis in *Streptomyces Griseus*. J Mol. Microbiol Biotechnol. 2001; 3(1): 95-101.



9. Matselyukh BP. Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the produser *Streptomeces globisporus* 1912. *Biotechnologia Acta Biotechnol. Acta*. 2014; 7(6): 69-74.

10. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-Induced Carotenogenesis in *Streptomyces Coelicolor* A3(2): Identification of an Extracytoplasmic Function Sigma Factor That Directs Photodependent Transcription of the Carotenoid Biosynthesis Gene Cluster. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187 (5): 1825-832.

Стаття надійшла до редакції 29.02.2016 р.



УДК 579.6:632.3

I.I. Marynova, V.Yu. Ivanitsa, N.V. Limanska

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, tel.: +38(048) 68 79 64,
e-mail: limanska@gmail.com

AMOUNT OF ENDOPHYTIC MICROBIOTA IN GRAPEVINE SHOOTS

The **aim** of the investigation was to evaluate the amount of grapevine endophytic microbiota using different nutritional media. **Materials and methods.** Endophytic microbiota from wooden shoots of grapevine *Vitis vinifera* L. cv Arkadia was isolated on the eight nutritional media with different compositions. **Results.** The highest amounts of bacteria were isolated on YEM, YMA and TY nutritional media. The distinctive features of YMA and YEM media was the presence of mannitol, and of TY – the increased concentration of yeast extract. **Conclusion.** Amount of microbiota representatives from grapevine shoots reached from $(6.4 \pm 0.3) \times 10^4$ to $(2.0 \pm 0.4) \times 10^7$ CFU/cm³ depending on the nutritional medium and decreased from October to December at least in one range.

Key words: endophytic microbiota, grapevine, nutritional media.

Grapevine endophytic microbiota includes bacteria inhabiting internal plant tissues – more commonly xylem vessels, where bacteria can freely move and firmly attach [10]. The normal microbiota of plants are usually represented by saprophytic bacteria. If pathogens penetrate into a plant, the survived in xylem harmful bacteria (*Xylella fastidiosa*, *Clavibacter xyli*, *Pseudomonas syzygii*, *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter* etc.) can cause a disease [7].

Endophytic microbiota may also be a source of antagonistic strains for the control of infectious plant diseases [8].

The **aim** of investigation was to evaluate the amount of grapevine endophytic microbiota using different nutritional media.

Materials and methods

The wooden shoots of grapevine *Vitis vinifera* L. were collected from the cv Arkadia plants. Microorganisms in grapevine were detected by the method of J. Lehoczky [10]. Wooden shoots of grapevine were selected from the lateral trunk branches in October-December. The shoots were cut close to the branching. The shoots were washed with detergent under running water, thoroughly rinsed, flambéed and then fragments from the proximal ends of the shoots with 0.6–0.7 cm length and 10 cm in diameter were cut to 0.5 cm discs. The disks were placed in sterile boxes and poured with sterile saline to completely cover the cut material. The disks were shaken for one hour at room temperature and later placed at 4 °C. After 24 hr of exposition, 100 µl of the obtained suspensions were plated on nutrient media and incubated for



2 days at 28 °C. The amount of bacteria was calculated as the number of colony forming units per cm³ volume of the tested grapevine shoot fragments (CFU/cm³). Mean values of seven repeats of each variants with 95% confidential interval were calculating using “Microsoft Excel”.

To isolate the wide range of endophytic grapevine microbiota and to estimate the amount of bacteria in grapevine shoots, eight nutritional media of different compositions were used (Table 1).

Table 1

Composition of the nutritional media for endophytic grapevine microbiota

Medium	Medium composition, g/l
PSA	300 g of potatoes (extract), Ca(NO ₃) ₂ ·x4H ₂ O - 0,5 g, Na ₂ HPO ₄ ·x12H ₂ O – 2 g, sucrose - 20 g, agar-agar – 15 g [9]
YEM	Mannitol – 10 g, yeast extract - 0,4 g, K ₂ HPO ₄ - 0,5 g, MgSO ₄ – 0,2 g, agar-agar – 15 g [14]
PYGA	Peptone – 3 g, yeast extract – 5 g, glycerine – 10 ml, agar-agar – 20 g [7]
YMA	Yeast extract – 1 g, mannitol – 10 g, K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O - 0,65 g, MgSO ₄ x 12H ₂ O – 0,2 g, NaCl – 0,12 g, agar-agar – 15 g [6; 8]
LB	Peptone – 10 g, yeast extract – 5 g, NaCl - 10 g, agar-agar – 15 g [5]
TY	Tryptone – 5 g, yeast extract - 3 g, CaCl ₂ ·x6H ₂ O - 1,3 g, agar-agar – 15 g [12]
YPGA	Yeast extract - 5 g, glucose - 10 g, peptone – 5 g, agar-agar - 15 g [11; 13]
PA	Potato extract (200 g in 1 liter of tap water), agar-agar - 1,5 g [2]

Results and discussion

The results of isolation of microorganisms from 27 grapevines have shown that the amount of wooden shoot microbiota in different plants varied significantly during the investigation period. On the media with the best compositions for endophytic grapevine microbiota from $(6.4 \pm 0.3) \times 10^4$ to $(2.0 \pm 0.4) \times 10^7$ CFU/cm³ were revealed (Table 2).

Table 2

Mean amount of endophytic microbiota in different months of investigations (CFU/m³)

Month	Nutritional media							
	PSA	YPGA	YEM	YMA	PA	LB	TY	PYGA
October	(1,1±0,2) x 10 ⁷	(1,3±0,5) x 10 ⁷	(2,0±0,4) x 10 ⁷	(1,1±0,2) x 10 ⁷	(8,8±0,6) x 10 ⁶	(1,4±0,3) x 10 ⁷	(1,0±0,7) x 10 ⁷	(1,1±0,3) x 10 ⁷
November	(1,6±0,3) x 10 ⁶	(2,7±0,6) x 10 ⁶	(3,5±0,5) x 10 ⁶	(1,2±0,3) x 10 ⁶	(4,2±0,7) x 10 ⁶	(6,4±0,5) x 10 ⁵	(8,7±0,4) x 10 ⁶	(2,5±0,3) x 10 ⁵
December	(6,9±0,5) x 10 ⁵	(1,1±0,3) x 10 ⁵	(6,4±0,3) x 10 ⁴	(4,5±0,4) x 10 ⁶	(9,2±0,5) x 10 ⁵	(3,8±0,2) x 10 ⁴	(9,7±0,6) x 10 ⁴	(1,5±0,2) x 10 ⁵



As it can be seen from Figure 1, the amount of grapevine endophytic bacteria in the majority of cases (66.6%) reached up to 10^6 and 10^7 CFU/cm³.

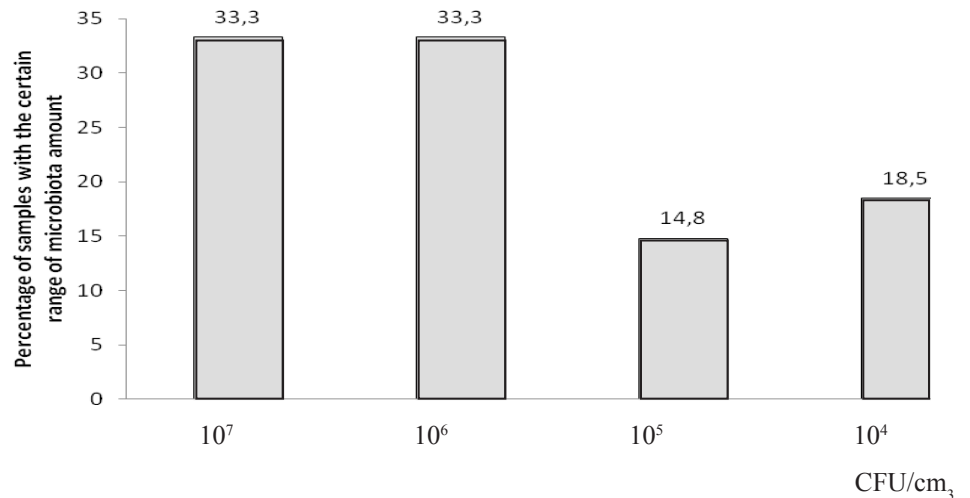


Fig. 1. Percentage of the certain ranges of microbiota amount in October–December.

The obtained results coincide with the data of the previous investigators which have shown that grapevine vessels contained from 10^2 to 10^5 /ml of microorganisms depending on the detection method [4].

Comparison of the mean quantities of bacteria (Figure 2) in all 27 tested grapevine plants by the isolation on each of eight media allowed us to reveal the highest number of bacteria on the media YEM (7.7 ± 0.4) $\times 10^6$ CFU / cm³), YMA (5.7 ± 0.8) $\times 10^6$ CFU/cm³) and TY (5.6 ± 1.1) $\times 10^6$ CFU/cm³).

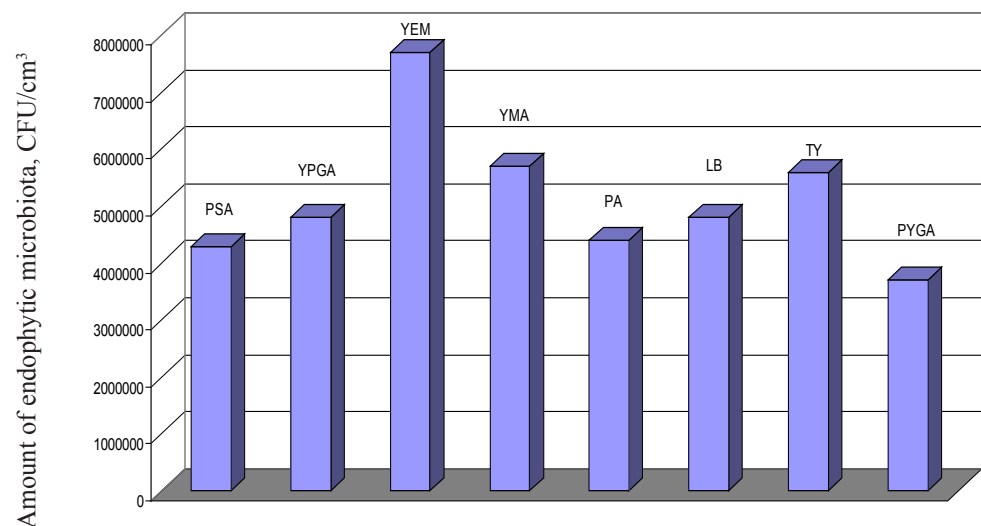


Fig. 2. Mean amount of endophytic microbiota as determined by the isolation on different nutritional media in October–December (CFU/cm³)

YEM («yeast-mannitol medium») [14] and YMA («yeast-mannitol agar») contain yeast extract and mannitol (carbon source), but differ by the composition of salts. TY («tryptone yeast») medium besides of yeast extract [12] contains also trypton as an available source of amino acids for microorganisms, and CaCl_2 . In case of YEM and YMA media showing the best results, we may suppose that the high level of bacterial growth could be explained by the presence of mannitol in their compositions. In case of TY medium a high level of growth could be explained by the high quantity of yeast extract. The results coincide with the data of our previous studies that also showed better growth of endophytic grapevine bacteria on YMA and YEM media [1].

The results of investigations carried out for three months in the end of grapevine vegetation period – in the beginning of the dormancy period (October, November, December) have showed that the mean amount of bacteria grown on nutritional media clearly decreased every month.

In December, the number of bacteria grown on nutritional media decreased in two - three ranges comparing with October (Table 2). Thus, the mean number of endophytic microbiota on YEM decreased from $(2.0 \pm 0.4) \times 10^7$ CFU/cm³ in October to $(6.4 \pm 0.3) \times 10^4$ CFU/cm³ in December.

With YMA medium it was possible to detect the maximum number of bacteria in December, which was a range higher than the results of isolation on other media $(4.5 \pm 0.4) \times 10^6$ /cm³. Thus, YMA medium can be recommended for the isolation of endophytic grapevine microbiota in winter period.

Our results coincide with the data of Bauer et al. (1994) who described the population amounts of some representatives of endophytic grapevine microbiota with peaks in May and October and the subsequent decrease in November - December.

During our investigations it was found out that in October the number of endophytic bacteria reached approximately 10^6 and 10^7 CFU/cm³. From October to December the amount of endophytic microbiota on the majority of media decreased in 2–3 ranges.

The obtained results have shown that the highest amount of endophytic bacteria could be isolated on YEM medium. With YEM medium it would be possible to detect the number of bacteria in shoots during all seasons and to establish the role of microorganisms in grapevine plants.

УДК 579.6:632.3

І.І. Маринова, В.Ю. Іваніца, Н.В. Ліманська

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

ЧИСЕЛЬНІСТЬ ЕНДОФІТНОЇ МІКРОБІОТИ ПАГОНІВ ВИНОГРАДУ

Реферат

*Метою роботи було визначення чисельності ендоефітної мікробіоти рослин винограду за висівах на середовища різного складу. **Матеріали і методи.***



Ендофітну мікробіоту винограду виділяли на вісім середовищ різного складу. Для досліджень відбирали здерев'янілу лозу винограду *Vitis vinifera L.* сорту Аркадія. **Результати.** Найбільшу кількість бактерій можна було виділити висівами на середовища УМА, УЕМ та ТУ, відмінною особливістю перших двох яких була наявність манітолу, а середовища ТУ – підвищеної кількості дріжджового екстракту. **Висновок.** Чисельність представників мікробіоти судин пагонів винограду становила від $(6,4 \pm 0,3) \times 10^4$ до $(2,0 \pm 0,4) \times 10^7$ КУО/см³ в залежності від середовища культивування і у період з жовтня місяця по грудень зменшувалася щонайменше на один порядок.

Ключові слова: ендофітна мікробіота, виноград, живильні середовища.

И.И. Маринова, В.Ю. Иваница, Н.В. Лиманская

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса 65082; e-mail: limanska@gmail.com

ЧИСЛЕННОСТЬ ЭНДОФИТНОЙ МИКРОБИОТЫ ПОБЕГОВ ВИНОГРАДА

Реферат

Целью работы было выявление численности эндофитной микробиоты винограда при высевах на среды разного состава. **Материалы и методы.** Эндофитную микробиоту винограда выделяли на восемь сред разного состава. Для исследования отбирали одревесневшую лозу винограда *Vitis vinifera L.* сорта Аркадия. **Результаты.** Наибольшее количество бактерий можно было выделить посевами на среды УМА, УЕМ и ТУ, отличительной особенностью первых двух из которых было наличие маннитола, а среды ТУ – повышенного количества дрожжевого экстракта. **Вывод.** Численность представителей микробиоты сосудов побегов винограда составляла от $(6,4 \pm 0,3) \times 10^4$ до $(2,0 \pm 0,4) \times 10^7$ КОЕ/см³ в зависимости от среды культивирования и в период с октября месяца по декабрь уменьшалась по меньшей мере на один порядок.

Ключевые слова: эндофитная микробиота, виноград, питательные среды.

Список використаної літератури

1. Лиманская Н.В., Е Шуай, Узун Я.Н., Венгер А.Н. Оптимизация питательной среды для культивирования представителей эндофитной микробиоты винограда // Тезисы V Межд. конф. «Научные исследования – теория и эксперимент 2009» (18–20 мая, 2009, Полтава, Украина). – С. 58–59.
2. *Методические рекомендации по диагностике бактериального рака винограда.* – М.: Изд-во ВАСХНИИЛ, 1981. – 30 с.
3. Bauer C., Schulz T.F., Lorenz D., Eichhorn K.W., Plapp R. Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period // *Vitis.* – 1994. – № 33. – P. 25–29.
4. Bell C.R., Dickie G.A., Harvey W.L.G., Chan J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine // *Can. J. Microbiol.* – 1995. – Vol. 41. – P. 46–53.



5. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // Journal of bacteriology. – 1951. – Vol. 62, № 3. – P. 293–300.
6. Bishop A.L., Burr T.J., Mittak V.L., Katz B.H. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilisation for indexing grapevine propagation material // Phytopathology. – 1989. – Vol. 79. – P. 995–998.
7. Cubero J., Martínez M.C., Llop P., López M.M. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours // Journal of Applied Microbiology. – 1999. – Vol. 86, № 4. – P. 591–602.
8. Kawaguchi A., Inoue K. New antagonistic strains of non-pathogenic *Agrobacterium vitis* to control grapevine crown gall // Journal of Phytopathology. – 2012. – Vol. 160. – P. 509–518.
9. Kawaguchi A., Inoue K., Nasu H. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* VAR03-1 // Journal of General Plant Pathology. – 2007. – Vol. 73. – P. 133–138.
10. Lehoczy J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines // Vitis. – 1971. – Vol. 10. – P. 215–221.
11. Lelliot R.A., Stead D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants // Methods in plant pathology. – 1987. – Vol. 2. – 216 pp.
12. McClure N., Ahmadi A.-R., Clare B.G. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease // Applied and environmental microbiology. – 1998. – Vol. 64. – P. 3977–3982.
13. Pionnat S, Keller H, Hélicher D, Bettachini A, Dessaux Y, Nesme X, Poncet C. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // Applied and environmental microbiology. – 1999. – Vol. 65, № 9. – P. 4197–4206.
14. Wang K. *Agrobacterium* protocols. – Vol. 1. – 2006, Humana Press: Totowa, New Jersey. – P. 3–15.

References

1. Limanska N.V., Shuai Ye, Uzun Ya.M., Venger A.M. Optimization of the nutritional medium for cultivation of endophytic grape microbiota representatives. In: Proceedings of the V Intern. conference “Scientific investigations - theory and experiment 2009”, Poltava, Ukraine. 2009:58-59.
2. Methodical recommendations for diagnostics of crown gall of grape. Russia: VASCHNIIL, 1981. 30 p.
3. Bauer C, Schulz TF, Lorenz D, Eichhorn KW, Plapp R. Population dynamics of *Agrobacterium vitis* in two grapevine varieties during the vegetation period. Vitis. 1994; (33): 25–29.
4. Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG., Chan JWYF. Endophytic bacteria in grapevine. Can. J. Microbiol. 1995; (41):46-53.
5. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of bacteriology. 1951; (62):293–300.



6. Bishop AL, Burr TJ, Mittak VL, Katz BH. A monoclonal antibody specific to *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 and its utilisation for indexing grapevine propagation material. *Phytopathology*. 1989; (79): 995–998.
7. Cubero J, Martínez MC, Llop P, López MM. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours. *Journal of Applied Microbiology*. 1999; (86): 591–602.
8. Kawaguchi A, Inoue K. New antagonistic strains of non-pathogenic *Agrobacterium vitis* to control grapevine crown gall. *Journal of Phytopathology*. 2012; (160): 509–518.
9. Kawaguchi A, Inoue K, Nasu H. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* VAR03-1. *Journal of General Plant Pathology*. 2007; (73): 133–138.
10. Lehoczky J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. *Vitis*. 1971; (10): 215–221.
11. Lelliot RA, Stead DE. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in plant pathology*. 1987; (2): 150-153.
12. McClure N, Ahmadi A-R, Clare BG. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease. *Applied and environmental microbiology*. 1998; (64): 3977–3982.
13. Pionnat S, Keller H, Héricher D, Bettachini A, Dessaux Y, Nesme X, Poncet C. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries. *Applied and environmental microbiology*. 1999; (65): 4197–4206.
14. Wang K. *Agrobacterium* protocols. Humana Press: Totowa, New Jersey, 2006; (Vol.1):3–15.

Стаття надійшла до редакції 17.02.2016 р.



УДК 614.3:578.823.91

**В.О. Гончаров, Л.С. Котлік, Н.П. Ісакова, Ю.М. Виходцева,
Ю.О. Баранов**

¹ДУ «Одеський обласний лабораторний центр ДСЕС України»,
пл. Старосінна, 33, 65007, Одеса, Україна
тел.: (048) 725 22 10, тел./факс: (048) 722 29 63, e-mail: polio-odessa@ukr.net

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ТА ГЕНОТИПОВА СТРУКТУРА РОТАВІРУСІВ В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ

*Метою дослідження було встановлення розповсюдження та різноманітності генотипової структури ротавірусів у дітей віком до 5 років, циркуляції ротавірусів та інших вірусів збудників кишкових інфекцій у водогінній воді і в зовнішньому середовищі (стічна вода) в Одеській області у 2010-2015 рр. **Методи.** Визначення антигену ротавіруса проводили методом імуноферментного аналізу, а виявлення нуклеїнової кислоти ротавірусів, астровірусів, каліцівірусів, ентеровірусів, аденовірусів методом полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). **Результати.** За досліджений період відсоток виділення ротавірусів від хворих на гострі кишкові інфекції дітей становив 41,8%. Найбільша частка позитивних проб виявлена серед дітей у віці 2–5 років – 52%. За одержаними даними захворюваність ротавірусної інфекції реєструвалася впродовж року. Відзначалася деяка особливість в циркуляції вірусів. Зареєстровані нехарактерні для інфекції два літніх піка захворюваності в липні і серпні (2012–2015рр.). Переважального поширення набули генотипи ротавірусів G4P(8), G1P(8), G3P(8) і G2P(4). При обстеженні фекалій та проб стічної води встановлено, що ротавірус, серед інших збудників кишкових інфекцій, виділявся в значній кількості (37,2%). **Висновки.** Таким чином, встановлено, що серед збудників гострих гастроентеритів у хворих дітей та в стічній воді домінують ротавіруси генотипів G4P(8), G1P(8), G3P(8), G2P(4). Захворюваність на ротавірусну інфекцію виявляється впродовж року з нехарактерними двома піками у липні та серпні.*

Ключові слова: ротавірусна інфекція, генотипова структура, збудники гострого гастроентериту.

Дослідження останніх років показали, що значна частина гострих кишкових інфекцій, переважно у дітей, етіологічно пов'язана з вірусами, частка яких в структурі захворюваності впродовж останніх років неухильно зростає і на даний час складає до 60% [7]. У структурі гострих кишкових захворювань ротавірусна інфекція займає одне з провідних місць [6].

Основний механізм передачі – фекально-оральний. Також описані водні, харчові та внутрішньолікарняні спалахи ротавірусної хвороби [4]. Особливу епідемічну небезпеку становлять особи без клінічних проявів хвороби і носії, оскільки рівень здорового вірусоносійства серед людей досить високий (до 10%) [1].

© В.О. Гончаров, Л.С. Котлік, Н.П. Ісакова, Ю.М. Виходцева, Ю.О. Баранов, 2016



Епідеміологічно значущою є діагностика захворюваності ротавірусної інфекції. Починаючи з 2006 року на базі Одеської Національної лабораторії з діагностики ротавірусної інфекції України (ЦВЛ з діагностикою СНІДу та інших ОНВІ, ДУ «Одеський обласний лабораторний центр Держсанепідслужби України») по програмі Всесвітньої Організації Охорони здоров'я проводиться обстеження хворих дітей віком до 5 років, госпіталізованих з діагнозом гостра кишкова інфекція.

Ротавіруси дуже стійкі в зовнішньому середовищі і можуть бути присутніми у великій кількості в природних водоймах і стічних водах. Встановлено, що традиційні схеми водоочищення недостатньо ефективні до цих вірусів [2].

Метою дослідження було встановлення розповсюдження та різноманітності генотипової структури ротавірусів у дітей віком від 0 до 5 років, циркуляції ротавірусів та інших кишкових вірусів у водогінній воді і в зовнішньому середовищі (стічна вода) в Одеській області у 2010–2015 рр.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження були 11108 проб фекалій, відібраних від хворих дітей, 4962 проби водогінної води та 1987 проб стічної води у 2010–2015 рр.

Перед початком проведення досліджень проби проходили попередню обробку. Підготовка фекалій полягала в отриманні освітленого екстракту 10–20% фекальної суспензії з використанням фосфатно-сольового буфера. Концентрація вірусів у водогінній воді і з об'єктів зовнішнього середовища (стічна вода) здійснювалася методом адсорбції за допомогою гідрогелю метилкремніевої кислоти (ГМКК) [1].

Антиген ротавірусу визначали методом імуноферментного аналізу (ІФА) (Oxoid Ltd, Великобританія). Визначення нуклеїнової кислоти ротавірусів, астровірусів, каліцівірусів, ентеровірусів, аденовірусів здійснювали методом полімеразно-ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР).

Генотипування позитивних в ПЛР-аналізі проб проводили методом ЗТ-ПЛР.

Результати досліджень та їх обговорення

За 2010–2015 рр. відсоток виділення ротавірусів від хворих на гострі гастроентерити дітей становив 41,8%. Найвищий відсоток позитивних випадків зареєстрований в 2011р. (48,7%) і 2014 р. (47,9%), найнижчий – у 2012 р. (37,8%) і 2013 р. (35,5%). Результати епідеміологічного нагляду за ротавірусною інфекцією серед обстежених дітей віком до п'яти років з діагнозом гостра кишкова інфекція, за 2010–2015 рр. в Одеській області представлені в таблиці 1.

Підтверджені випадки ротавірусної інфекції по віковим групам розподілилися таким чином: найбільше виявлено серед дітей у віці 2–5 років – 52%, 1–2 років – 29%, 6–11 місяців – 16% і найменше 0–5 місяців – 2,3%.

Відомо, що для ротавірусної інфекції характерна зимова сезонність з осінніми та весняними піками [5]. Однак, в Одеській області захворюваність на ротавірусну інфекцію реєструвалася впродовж року.



Таблиця 1

Частота виділення ротавірусів від хворих на гостру кишкову інфекцію дітей віком до п'яти років у 2010–2015 рр. в Одеській області

Table 1

The frequency of virus isolation from the patients with acute intestinal infection in children under five years in 2010–2015 in the Odesa region

Рік	Кількість протестованих зразків фекалій	Позитивні на ротавіруси	
		Кількість	%
2010	765	357	46,6
2011	1396	680	48,7
2012	2065	782	37,8
2013	2450	871	35,5
2014	2434	1167	47,9
2015	1998	787	39,4
Всього:	11108	4644	41,8

Також відзначено деякі особливості в циркуляції вірусів. Так, в 2012 році зареєстровані нехарактерні для інфекції два літніх піка захворюваності в липні і серпні. У 2013 р., 2014 р. і 2015 роки також спостерігалось зростання захворюваності в міжсезоння – липень, серпень та вересень. Сезонне поширення ротавірусної інфекції по Одеській області в 2010–2015 рр. представлено на рис. 1.

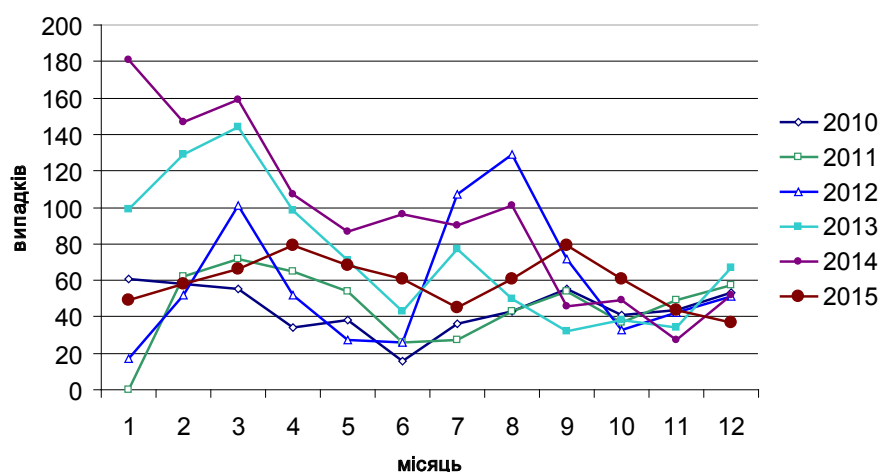


Рис. 1. Сезонне поширення ротавірусної інфекції в Одеській області в 2010–2015 рр.

Fig. 1. Seasonal distribution of rotavirus infection in Odesa region in 2010–2015



За період 2010–2014 роки було генотиповано 439 зразків, в яких виявлені ротавіруси групи А. Переважного поширення набув генотип ротавірусів G4P(8) – 47,8%. На другому місці за частотою зустрічальності генотип G1P(8) – 19,6%. Третє і четверте місце зайняли генотипи G3P(8) – 14,8% і G2P(4) – 13,8%. Генотип ротавірусів G9P(8) і рідкісні генотипи по частоті склали по 1,8%. Крім того, в 2011 р виділені суміші – G3(P4 + P8), в 2012 р. – G1 + G3(P8), в 2013 р. G2(н/т), в 2014 р. – G1 + G4(P8), G1 + G2(P4 + P8), G2 + G4(P4 + P8), G2(P4 + P8). Частота зустрічальності G/P генотипів ротавірусів в 2010–2014 рр. по Одеській області представлена на рис. 2.

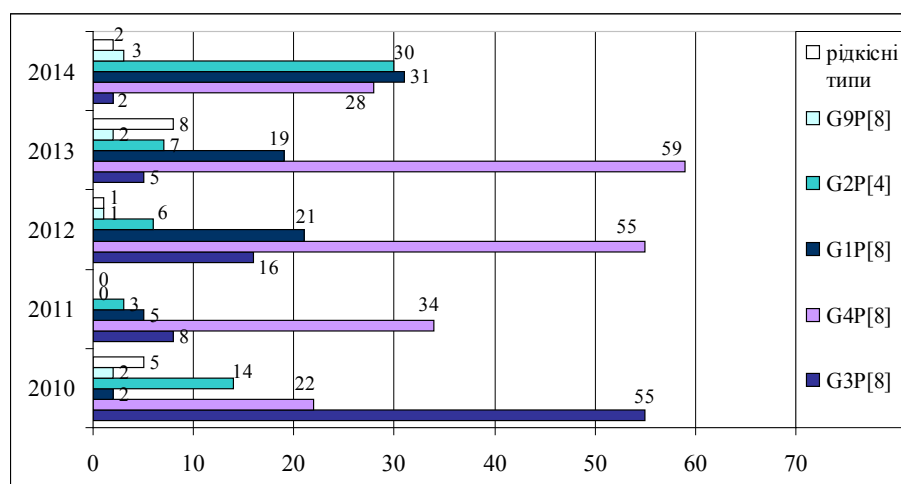


Рис. 2. Частота зустрічальності G/P генотипів ротавірусів в 2010–2014 рр. у Одеській області

Fig. 2. The frequency of G/P genotypes of rotaviruses in 2010–2014 in the Odessa region

Дослідженнями клінічного матеріалу від хворих дітей методом полімеразної ланцюгової реакції для виявлення ротавірусів та інших кишкових вірусів виявлено, що переважальну частку від загального числа обстежених проб склали ротавіруси – 62%. Меншу частину складають інші збудники гострих гастроентеритів: *Adenovirus* (15%), *Calicivirus* (10%), *Astrovirus* (7%) і *Enterovirus* (6%). Структура виділення кишкових вірусів від хворих дітей представлена на рис. 3.

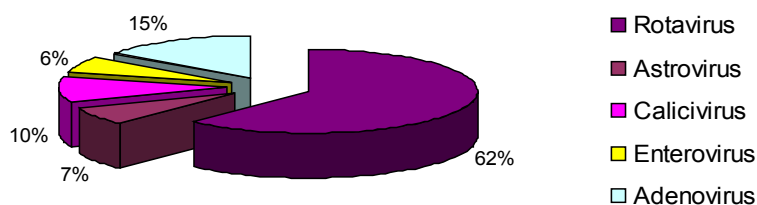


Рис. 3. Структура виділення кишкових вірусів від хворих дітей

Fig. 3. The structure of the selection of enteric viruses from sick children

За результатами досліджень проб водогінної води на наявність антигену ротавірусу найбільша частка позитивних результатів зареєстрована в 2010 р. – 3,1%, а найменша в 2012 р. – 0,1%. При дослідженні проб води на інші віруси позитивних результатів не виявлено. Виявлення збудника ротавірусної інфекції у водогінній воді пов'язано з тим, що в області відзначалося погіршення санітарно-технічного стану водогінних споруд, інженерних мереж, а також через низьку оперативність усунення аварійних ситуацій на мережах водогону.

У пробах зовнішнього середовища (стічна вода) найбільший відсоток позитивних проб припадає на *Rotavirus* (37,2%). Крім того, значну частину займають *Enterovirus* (23,7%) і *Adenovirus* (19,4%). *Calicivirus* (11,8%) і *Astrovirus* (7,6%) мають нижчий відсоток виділення. Структура виділення вірусів у зовнішньому середовищі (стічна вода) представлена на рис. 4.

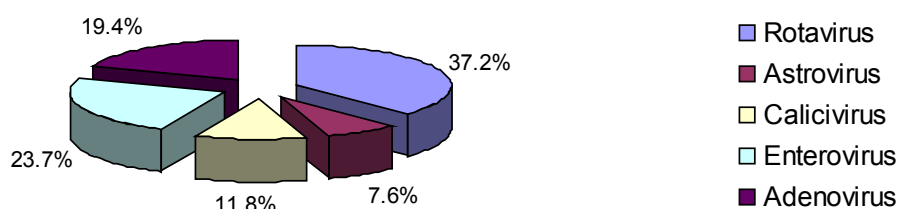


Рис. 4. Структура виділення вірусів у зовнішньому середовищі (стічна вода)

Fig. 4. The structure of the selection of viruses in the environment (waste water)

В результаті проведених досліджень встановлено, що досить висока захворюваність серед дітей з гострим гастроентеритом викликана ротавірусом. За досліджений період відсоток виділення ротавірусів від хворих дітей становив 41,8%. Максимальна кількість випадків ротавірусної інфекції – 48,7%, зареєстрована в 2011 р., а мінімальна в 2013 р. – 35,5%.

Аналізуючи зростання захворюваності серед різних вікових груп, встановлено, що переважна більшість випадків спостерігалася серед дітей 2–5 років – 52%. Низький показник захворюваності – 2,3% зареєстрований у дітей до року 0–5 міс.

В Одеській області реєструється нехарактерна сезонність ротавірусної інфекції. Особливістю є підйом захворюваності в міжсезоння в липні (2013 р.), серпні (2014 р.) і вересні (2015 р.). У 2012 р. зареєстровані нехарактерні для інфекції два літніх піка захворюваності в липні і серпні.

При вивченні генетичної різноманітності ротавірусів в Одеській області встановлена циркуляція переважальних генотипів (G4P(8), G1P(8), G3P(8), G2P(4)). Меншою мірою зустрічається ротавірус генотипу G9P(8) і рідкісні генотипи. Крім того, виявлені суміші генотипів. Таким чином, моніторинг генотипування дозволяє визначити спектр переважальних генотипів, своєчасно відстежити їх зміну, прогнозувати епідеміологічну ситуацію.

Аналізуючи структуру виділення вірусів від хворих дітей, можна сказати, що серед кишкових інфекцій вірусної етіології ротавіруси займають провідне місце – 62%. Інші збудники гострих гастроентеритів розподілилися в такій послідовності: *Adenovirus* (15%), *Calicivirus* (10%), *Astrovirus* (7%) і *Enterovirus* (6%) .

Слід зазначити, що в структурі виділення вірусів з об'єктів зовнішнього середовища (стічна вода) ротавірус виявляли частіше у пробах стічної води – 37,2%. Незначна кількість ротавірусів була виділена із зразків водопровідної води (максимальний в 2010 р. – 3,1%, мінімальний в 2012 р. – 0,1%).

За результатами проведеного дослідження була показана значна роль ротавірусів у структурі захворюваності дітей віком до 5 років на гострі гастроентерити, а також широке розповсюдження збудника в навколишньому середовищі, що висвітлює проблему забруднення природних вод Одеської області ротавірусами, а разом з цим існування великої загрози виникнення спалахів. Набуває більшої актуальності своєчасне виявлення збудника та проведення протиепідемічних заходів.

Таким чином, встановлено, що серед збудників гострих ентеритів серед хворих дітей та в стічній воді домінують ротавіруси генотипів G4P(8), G1P(8), G3P(8), G2P(4). Захворюваність на ротавірусні інфекції виявляється впродовж року з нехарактерними двома піками у липні та серпні.

В.А. Гончаров, Л.С. Котлік, Н.П. Ісакова, Ю.Н. Выходцева, Ю.О. Баранов

ГУ «Одесский областной лабораторный центр ГЭСС Украины»,
пл. Старосенная, 33, Одесса, 65007, Украина,
тел.: (048) 725 22 10, тел./факс: (048) 722 29 63, e-mail: polio-odessa@ukr.net

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ГЕНОТИПНАЯ СТРУКТУРА РОТАВИРУСОВ В ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ

Целью исследования было установление распространения и разнообразия генотипической структуры ротавирусов у детей в возрасте до 5 лет, циркулирующих ротавирусов и других вирусных возбудителей кишечных инфекций в водопроводной воде и во внешней среде (сточная вода) в Одесской области в 2010-2015 гг. **Методы.** Определение антигена ротавируса проводили методом иммуноферментного анализа, а определение нуклеиновой кислоты ротавирусов, астровирусов, калицивирусов, энтеровирусов, аденовирусов методом полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). **Результаты.** За исследуемый период процент выделения ротавирусов от больных детей на острые кишечные инфекции составил 41,8%. Наибольшее количество позитивных проб среди детей в возрасте 2-5 лет - 52%. На основании полученных данных заболеваемость ротавирусом регистрируется круглый год. Отмечается особенность в циркуляции вирусом. Зарегистрированы нехарактерные для инфекции два летних пика заболеваемости в июле и августе (2012-2015гг.). Преобладающая распространенность среди генотипов ротавирусов G4P(8), G1P(8), G3P(8) и G2P(4). При обследовании фекалий и проб сточной воды установлено, что ротавирусы, среди



других возбудителей кишечных инфекций, выделялись в значительном количестве (37,2%). **Выводы.** Таким образом, установлено, что среди возбудителей острых гастроэнтеритов у больных детей и в сточной воде доминируют генотипы G4P(8), G1P(8), G3P(8) и G2P(4). Заболеваемость на ротавирусные инфекции регистрируется круглый год с нехарактерными двумя пиками в июле и августе.

Ключевые слова: ротавирусная инфекция, генотипическая структура, возбудители острого гастроэнтерита.

V.O. Goncharov, L.S. Kotlik, N.P. Isakova, Y.M. Vykhodtseva, Yu.O. Baranov

SE "Odesa Regional Laboratory Centre of Ukraine SES"

Virology Laboratory, Department of Biological factors.

Centralized immuno-virological laboratoriya with AIDS diagnosis and other dangerous viral infections,

33, Starosenna square, Odesa, 65007, Ukraine;

tel. (048) 725-22-10, tel./fax (048) 722-29-63, e-mail: polio-odessa@ukr.net

SPREADING AND GENOTYPIC STRUCTURE OF ROTAVIRUSES IN THE ODESA REGION

Aim. The study was to determine the distribution and genotypic diversity of rotaviruses in children under the age of 5 years, the circulation of rotavirus and other viral pathogens of intestinal infections in tap water and in the environment (waste water) in the Odesa region in 2010-2015. **Methods.** Determination of rotavirus antigen was determined by enzyme immunoassay, and the determination of nucleic acid of rotaviruses, astroviruses, caliciviruses, enteroviruses, adenoviruses by polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR). **Results.** During the study period, the percentage of allocation of rotavirus sick children at acute intestinal infection was 41.8%. The greatest number of positive samples among children aged 2–5 years – 52%. Based on these data the incidence of rotavirus is recorded all year round. There is a peculiarity in virus circulation. There were registered two uncharacteristic summer peaks of infection in July and August (2012–2015). The prevailing was propagation among genotypes of rotavirus G4P(8), G1P(8), G3P(8) and G2P(4). The examination of faeces and waste water samples revealed that rotaviruses, among other activators of faeces and waste water samples revealed that rotaviruses, among other activators of intestinal infections, were found out in a significant number (37.2%). **Conclusions.** Thus, it was found that among the pathogens of acute enteritis at infected children and in the waste water there were dominated genotypes G4P(8), G1P(8), G3P(8) and G2P(4). The incidence of rotavirus infection is registered in the year-round with indistinctive two peaks in July and August.

Key words: rotavirus infection, genotypic diversity, pathogens acute gastroenterocolitis.

Список використаної літератури

1. Ротавірусна інфекція. Навчально-методичний посібник / За ред. І.В. Дзюблик – К.: Олпринт, 2004. – 116 с.
2. Abad F.X., Pintó R.M., Bosch A. Flow cytometry detection of infectious rotaviruses in environmental and clinical samples // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – 64. – P. 2392–2396.



3. *Carol J.B., Evan J.A., Penelope H.D., David O.M., David B.N.* Multiple Serotypes and the Argument for Rotavirus Vaccination. - National Foundation for Infectious Diseases (NFID): Roundtable Discussion, 2007, available at: www.nfid.org/idinfo/rotavirus/rotavirus-paper.pdf
4. *Centers for Disease Control and Prevention.* Rotavirus. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases / Eds: J. Hamborsky, A. Kroger, S. Wolfe.* 13th ed. - Washington: Public Health Foundation, 2015, available at: www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html
5. *Kang G.* Seasonality of Rotavirus Diarrhea: A Call for Interdisciplinary Approach // *Epidemiology.* – 2008. – **19**, № 6. – P. S49
6. *Parashar U.D., Bresee J.S., Gentsch J.R., Glass R.I.* Rotavirus // *Emerg. Infect. Dis.* – 1998. – **4**, № 4. – P. 561–570.
7. *Parashar U.D., Gibson C.J., Bresse J.S., Glass R.I.* Rotavirus and severe childhood diarrhea // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. – **12**, № 2. – P. 304–306.
8. *Parashar U.D., Hummelman E.D., Bresse J.S., Miller M.A., Glass R.I.* Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children // *Emerg. Infect. Dis.* – 2003. – **9**, № 5. – P. 565–572.

References

1. Dziublyk IV. Rotavirus infection. Educational-methodical manual. Kyiv: Allprint, 2004. 116 p.
2. Abad FX, Pintó RM, Bosch A. Flow cytometry detection of infectious rotaviruses in environmental and clinical samples. **Applied and Environmental Microbiology.** 1998;(64):2392–2396.
3. Carol JB, Evan JA, Penelope HD, David OM., David BN. Multiple Serotypes and the Argument for Rotavirus Vaccination. National Foundation for Infectious Diseases (NFID): Roundtable Discussion, 2007, available at: www.nfid.org/idinfo/rotavirus/rotavirus-paper.pdf
4. Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.* Eds: Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S. 13th ed. Washington: Public Health Foundation, 2015, available at: www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html
5. Kang G. Seasonality of Rotavirus Diarrhea: A Call for Interdisciplinary Approach. *Epidemiology.* 19(6):S49, November 2008.
6. Parashar UD, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus. *Emerg. Infect. Dis.* 1998;4(4):561–570.
7. Parashar UD, Gibson CJ, Bresse JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(2):304–306.
8. Parashar UD, Hummelman ED, Bresse JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(5):565–572.

Стаття надійшла до редакції 15.02.2016 р.



УДК 637.146:[579.864+579.873.13]:613.22

Н.А. Ткаченко

Одеська національна академія харчових технологій,
вул. Канатна, 112, Одеса, Україна, 65039,
тел.: +38 (048) 712 40 45, e-mail: nataliya.n-2013@yandex.ua

ЗАКВАШУВАЛЬНІ КОМПОЗИЦІЇ БАКТЕРІЙ ДЛЯ ТЕХНОЛОГІЙ КИСЛОМОЛОЧНИХ ПРОДУКТІВ ДИТЯЧОГО ХАРЧУВАННЯ

Мета. Створення заквашувальних композицій із культур біфідо- й лактобактерій для розробки технологій ферментованих молочних продуктів дитячого харчування з підвищеними пробіотичними, в т.ч. антагоністичними властивостями.

Методи. Культивування заквашувальних культур біфідо- та лактобактерій здійснювали в стерилізованому молоці, збагаченому фруктозою. Кислотність визначали титриметричним та потенціометричним методами, вологоутримувальну здатність згустку – метод центрифугування, умовну в'язкість ферментованих продуктів – за тривалістю витікання згустку із піпетки, кількість життєздатних клітин лактобактерій – посівом у стерилізоване молоко, кількість клітин біфідобактерій – посівом у тіогліколеве середовище, антагоністичну активність культур лакто- й біфідобактерій – за луночно-дифузійним методом, протеолітичну активність – за сумою трьох вільних амінокислот в перерахунку на тирозин.

Результати. Визначено технологічні, пробіотичні, в т.ч. антагоністичні, й протеолітичні властивості лакто- й біфідобактерій прямого внесення, представлених на ринку України. На основі проведених досліджень рекомендовано для технологій ферментованих молочних продуктів дитячого харчування використовувати монокультури *Lactobacillus acidophilus* La-5 та *Bifidobacterium animalis* Bb-12 та змішані культури *L. lactis* ssp. *lactis* + *L. lactis* ssp. *cremoris* + *L. lactis* ssp. *diacetylactis* + *L. mesenteroides* (ЗК). За встановленого співвідношення між ЗК : *L. acidophilus* La-5 : *B. animalis* Bb-12 у складі заквашувальних композицій 1,0 : 0,1 : 1,0 (вихідна концентрація культур при інокуляції – 1×10^6 , 1×10^5 та 1×10^6 КУО/см³, відповідно) отримано кисломолочний продукт з нормованими фізико-хімічними показниками, високими пробіотичними та гіпоалергенними властивостями.

Висновки. Розроблено композиції заквашувальних культур із використанням лакто- та біфідобактерій прямого внесення, які забезпечують отримання ферментованих молочних продуктів дитячого харчування (напоїв та білкових продуктів) з підвищеними пробіотичними та гіпоалергенними властивостями.

Ключові слова: дитяче харчування, ферментація молока, біфідобактерії, лактобактерії.

Технології виробництва кисломолочних продуктів дитячого харчування, неадаптованих за хімічним складом до жіночого молока, в т.ч. кефіру, йогурту, сиру кисломолочного й виробів з нього, впроваджені сьогодні на молокопере-



робних підприємствах, не гарантують отримання продукції, яка не викликає у малюків алергічні реакції. Для зниження алергенного впливу на організм дітей необхідно зменшувати кількість алергенних фракцій білків, зокрема α_{s1} -казеїну та β -лактоглобуліну, у молоці коров'ячому, яке є сировиною для дитячих продуктів [4]. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми може бути використання у складі заквашувальних композицій для біотехнологій кисломолочних дитячих продуктів культур лактобактерій, які виробляють активні екзогенні протеази, що дозволяє максимально зменшити у ферментованих дитячих молочних продуктах кількість алергенних фракцій білків, забезпечити гіпоалергенний вплив цих продуктів на дитячий організм та підвищити засвоюваність білків при споживанні [6, 7].

Кисломолочні продукти для дитячого харчування повинні мати невисокий рівень кислотності, тому основу заквашувальних композицій більшості з них складають змішані культури (ЗК) мезофільних молочнокислих лактококків [4]. Комплексні наукові дослідження протеолітичних і технологічних властивостей ЗК у складі бактеріальних концентратів прямого внесення (БК *DVS*) провідних фірм-виробників заквасок («Alce Mofin Group», Італія, «Chr. Hansen», Данія, «Good Food», Італія) [7] дозволили рекомендувати для технологій кисломолочних продуктів дитячого харчування використовувати БК *DVS* фірми «Chr. Hansen» (Данія): заморожені – *F DVS C-301* або *F DVS C-303*, і отримані ліофільним сушінням – *FD DVS CH N-11* або *FD DVS CH N-19*. Усі рекомендовані БК *DVS* містять змішані культури *L. lactis ssp. lactis* + *L. lactis ssp. cremoris* + *L. lactis ssp. diacetylactis* + *L. mesenteroides* з підвищеними протеолітичними властивостями, причому протеолітичні властивості ЗК у складі заморожених БК *DVS* у 2,43–3,52 рази вищі від таких у ліофільно висушених БК *DVS* (за результатами попередніх досліджень [7]).

Для забезпечення високих пробіотичних і антагоністичних властивостей дитячих кисломолочних продуктів до складу заквашувальних композицій слід вводити штами біфідобактерій і лактобацил з доведеними пробіотичними властивостями та, зокрема, високими антагоністичними характеристиками відносно патогенних та умовно-патогенних бактерій. Збагачення кисломолочних дитячих продуктів активними штамами пробіотиків та їх метаболітами також сприятиме подовженню терміну зберігання продуктів, особливо, якщо використовувати як заквашувальні культури БК *DVS* [2, 4, 6, 7].

Попередніми дослідженнями [7] доведено, що для використання у технологіях дитячих кисломолочних продуктів з високими пробіотичними властивостями і невисоким рівнем кислотності доцільно використовувати у заквашувальних композиціях монокультури (МК) *Lactobacillus acidophilus La-5* у складі БК *DVS* фірми «Chr. Hansen» (Данія) – *FD DVS La-5* і *F DVS La-5*. Наявність пробіотичних властивостей та, зокрема, антагоністичної активності по відношенню до патогенних та умовно-патогенних бактерій у МК *L. acidophilus La-5* доведена попередніми дослідженнями [2]. Крім того, дані культури характеризуються досить високою здатністю до протеолізу білків молока [7].



Мета представленої роботи – створення заквашувальних композицій із пробіотичних культур штамів роду *Bifidobacterium*, монокультури *L. acidophilus* La-5 і ЗК для технологій кисломолочних продуктів дитячого харчування з підвищеними пробіотичними, в т.ч. антагоністичними властивостями.

Матеріали і методи

На першому етапі досліджень здійснювали вибір пробіотичних культур біфідобактерій прямого внесення, перелік яких наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Характеристика концентратів біфідобактерій

Table 1

The characteristic of bifidobacteria bacterial concentrates

Назва	Виробник	Склад	Вид
LYOBAC BIFI	«alce Mofin Group» (Італія)	ЗК <i>B. bifidum</i> BB 03 + <i>B. longum</i> BL 03 + <i>B. breve</i> BR 03	ліофільно висушені культури
LYOBAC 3BIFIDI		ЗК <i>B. bifidum</i> BB 03 + <i>B. longum</i> BL 03 + <i>B. adolescentis</i> BA 03	
FD DVS Bb-12	«Chr. Hansen» (Данія)	МК <i>B. animalis</i> Bb-12	
F DVS Bb-12		МК <i>B. animalis</i> Bb-12	

З метою вибору бактеріальних концентратів *Bifidobacterium* прямого внесення для виробництва дитячих кисломолочних продуктів було проаналізовано їх функціонально-технологічні, протеолітичні й антагоністичні властивості.

Культивування біфідобактерій здійснювали в молоці жирністю 1%, збагаченому фруктозою як біфідогенним фактором (масова частка фруктози – 0,1 % [2, 10]), стерилізованому за температури (120±1) °С протягом 20 хв. Вихідна концентрація біфідобактерій у молоці складала 1×10⁶ КУО/см³. Ферментацію молока біфідобактеріями здійснювали за температури (37±1) °С до досягнення ізоелектричної точки білків молока (рН 4,6). Отримані згустки охолоджували до температури (20±1) °С і визначали в них показники якості.

Для визначення кислотності використовували титриметричний та потенціометричний методи, вологоутримувальну здатність (ВУЗ) згустку визначали методом центрифугування [3], умовну в'язкість – за тривалістю витікання згустку із піпетки ємністю 100 см³ з вихідним отвором 5 мм [3]. Визначення кількості життєздатних клітин біфідобактерій здійснювали посівом у тіогліколове середовище [1], антагоністичну активність біфідобактерій – за луночно-дифузійним методом [6], протеолітичну активність – за сумою трьох вільних амінокислот в перерахунку на тирозин [6].



Для обґрунтування складу заквашувальних композицій із ЗК з підвищеними протеолітичними властивостями, МК *L. acidophilus La-5* і МК *B. animalis Bb-12* було складено вісім композицій (табл. 2), в яких вихідну концентрацію лактобацил (як найсильніших кислотоутворювачів із всіх використаних культур) при інокуляції варіювали в межах $1 \times 10^5 \dots 1 \times 10^6$ КУО/см³.

Таблиця 2

Заквашувальні композиції, складені із БК *DVS* лакто- та біфідобактерій

Table 2

Starter compositions composed of bacterial concentrates *DVS* of lacto- and bifidobacteria

№ з/п	Заквашувальна композиція	Вихідна концентрація бактерій, КУО/см ³		
		ЗК	МК <i>L. acidophilus La-5</i>	МК <i>B. animalis Bb-12</i>
1	<i>F DVS C-301 + F DVS La-5 + F DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^5	1×10^6
2	<i>F DVS C-303 + F DVS La-5 + F DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^5	1×10^6
3	<i>F DVS C-301 + F DVS La-5 + F DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^6	1×10^6
4	<i>F DVS C-303 + F DVS La-5 + F DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^6	1×10^6
5	<i>FD DVS CH N-11 + FD DVS La-5 + FD DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^5	1×10^6
6	<i>FD DVS CH N-19 + FD DVS La-5 + FD DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^5	1×10^6
7	<i>FD DVS CH N-11 + FD DVS La-5 + FD DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^6	1×10^6
8	<i>FD DVS CH N-19 + FD DVS La-5 + FD DVS Bb-12</i>	1×10^6	1×10^6	1×10^6

Культивування бактерій заквашувальних композицій здійснювали аналогічно культивуванню біфідобактерій. У ферментованих згустках, крім зазначених вище показників якості, визначали кількість життєздатних клітин лактобактерій посівом у стерилізоване молоко.

Результати досліджень та їх обговорення

За результатами оцінки функціонально-технологічних та пробіотичних властивостей БК *DVS* біфідобактерій (табл. 3) рекомендовано у технологіях дитячих кисломолочних продуктів використовувати БК *FD DVS Bb-12* і *F DVS Bb-12*.



Таблиця 3

Функціонально-технологічні та пробіотичні властивості біфідобактерій

Table 3

Functional-technical and probiotic properties of bifidobacteria

Бактеріальний концентрат <i>Bifidobacterium</i>	Тривалість сквашування молока, год.	Титрована кислотність згустку, °Т	Умовна в'язкість, сек.	ВУЗ згустку, %	Кількість біфідобактерій, $\times 10^8$ КУО/см ³
LYOVAC BIFI	7,0 ± 0,5	81,0 ± 1,0	52,0 ± 3,0	82,0 ± 1,0	4,8 ± 0,5
LYOVAC 3BIFIDI	8,0 ± 0,5	73,0 ± 1,5	63,0 ± 2,0	83,0 ± 1,0	5,3 ± 0,2
FD DVS Bb-12	12,0 ± 1,0	50,5 ± 0,5	34,5 ± 1,5	80,0 ± 1,0	4,5 ± 0,5
F DVS Bb-12	10,0 ± 1,0	49,0 ± 3,0	33,0 ± 1,0	78,0 ± 1,0	3,0 ± 0,1

Примітка: n=5, p≤0,05.

Note: n=5, p≤0.05.

При ферментації молока монокультури *B. animalis Bb-12* утворюють згустки з невисоким рівнем кислотності, в'язкості, ВУЗ і високою концентрацією життєздатних клітин бактерій. Бактеріальні концентрати *LYOVAC BIFI* й *LYOVAC 3BIFIDI* також ферментують молоко з утворенням згустків з високою концентрацією життєздатних клітин бактерій, але титрована кислотність цих згустків досить висока, що може спричинити стрімкий ріст кислотності продуктів у процесі зберігання, що не допустимо у продуктах дитячого харчування. Вищу концентрацію життєздатних клітин МК *B. animalis Bb-12* містить згусток, отриманий ферментацією молока з використанням БК, отриманого ліофільним сушінням (табл. 3). Це пояснюється тим, що ліофільно висушені біфідобактерії на 2 години довше ферментують молоко в порівнянні з замороженими клітинами, тому за цей час накопичується більша кількість життєздатних бактерій. Наявність пробіотичних властивостей у *B. animalis Bb-12* доведена попередніми дослідженнями [2].

З метою оцінки антагоністичних і протеолітичних властивостей обраних БК біфідобактерій, було визначено їх антагоністичні властивості щодо патогенних і умовно-патогенних бактерій (*S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli*, *B. subtilis*), а також досліджено здатність до протеолізу білків молока (табл. 4).

З точки зору антагоністичної активності МК *B. animalis Bb-12* можна оцінити як перспективні для практичного використання у складі заквашувальних композицій для дитячих молочних продуктів; найвищу антагоністичну активність ці бактерії проявляють по відношенню до бактерій роду *Salmonella* (табл. 4).



**Антагоністична й протеолітична активність *B. animalis Bb-12*
у складі бактеріальних концентратів *DVS***

Table 4

**Antagonistic and proteolytic activity of *B. animalis Bb-12*
in the composition of bacterial concentrates *DVS***

БК <i>DVS</i> <i>Bifidobacterium</i>	Розмір зони пригнічення росту, мм				Вміст тирозину в згустку, мг/100 г
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	
FD <i>DVS</i> Bb-12	11,5±1,0	19,5±1,0	12,5±0,6	14,5±0,7	0,010±0,001
F <i>DVS</i> Bb-12	11,0±1,0	18,5±1,0	12,3±0,4	14,0±0,5	0,009±0,002

Примітка: n=5, p≤0,05.

Note: n=5, p≤0.05.

Протеолітична активність МК *B. animalis Bb-12* – невисока (табл. 4), що обумовлено незначною кількістю активних протеолітичних ферментів, які продукують ці культури в процесі життєдіяльності. Однак, за літературними даними [2, 6, 10], протеолітична активність біфідобактерій може підвищуватися при спільному культивуванні їх з лактобактеріями з високими протеолітичними властивостями.

Функціонально-технологічні властивості складених заквашувальних композицій для виробництва дитячих кисломолочних продуктів наведені в табл. 5.

Встановлено, що ферментація молока заквашувальними композиціями 1-4, складеними із заморожених БК, триває на 0,5 год менше в порівнянні з ферментацією композиціями 5-8, складеними із ліофільно висушених БК (табл. 5). Це пояснюється значно коротшою *lag*-фазою при ферментації молока замороженими концентратами бактерій [2]. Використання для ферментації молока заквашувальних композицій зі співвідношенням МК *B. animalis Bb-12*: МК *L. acidophilus La-5* : ЗК – 1,0 : 1,0 : 1,0 сприяє прискоренню процесу на 0,5 год в порівнянні з ферментацією молока композиціями зі співвідношенням культур 1,0 : 0,1 : 1,0, що зумовлено вищою вихідною концентрацією ацидофільних бактерій, які є сильними кислотоутворювачами. Але при ферментації молока композиціями 3, 4, 7 і 8 отримуємо згустки, які мають значно вищий рівень титрованої кислотності (на 13,0–14,5 °Т), що негативно позначається на кислотності цільового продукту і може викликати швидке її наростання в процесі зберігання. Умовна в'язкість та ВУЗ всіх згустків (табл. 5) знаходяться в межах норми для кисломолочних напоїв та білкових продуктів.



Таблиця 5

**Функціонально-технологічні властивості заквашувальних композицій,
складених із БК DVS лакто- та біфідобактерій**

Table 5

**Functional-technical properties of starter compositions composed of bacterial
concentrates DVS of lacto- and bifidobacteria**

Заквашувальна композиція №	Тривалість сквашування молока, год	Титрована кислотність згустку, °Т	Умовна в'язкість, сек	ВУЗ згустку, %
1	6,25 ± 0,25	59,0 ± 3,0	50,5 ± 1,5	62,0 ± 1,0
2	6,25 ± 0,25	60,0 ± 2,5	49,0 ± 2,0	61,5 ± 1,5
3	5,75 ± 0,25	72,5 ± 1,5	67,5 ± 2,5	70,0 ± 2,0
4	5,75 ± 0,25	74,0 ± 1,0	63,0 ± 2,0	73,0 ± 3,0
5	6,50 ± 0,25	63,0 ± 2,0	63,0 ± 3,0	66,0 ± 1,0
6	6,50 ± 0,25	65,5 ± 1,5	58,0 ± 2,0	64,5 ± 1,5
7	6,00 ± 0,25	77,5 ± 2,5	73,5 ± 1,5	78,0 ± 2,0
8	6,00 ± 0,25	79,0 ± 2,0	71,0 ± 1,0	75,0 ± 3,0

Примітка: n=5, p≤0,05.

Note: n=5, p≤0.05.

Оцінюючи пробіотичні властивості ферментованих згустків за сумарною кількістю пробіотичних культур *B. animalis* Bb-12 і *L. acidophilus* La-5 (табл. 6), слід відзначити, що найвищу сумарну концентрацію життєздатних клітин $(1,95-4,60) \times 10^9$ КУО/см³ мають зразки, ферментовані композиціями 5 і 6, незначно поступають їм за сумарним вмістом бактерій – $(1,73-3,35) \times 10^9$ КУО/см³ – зразки, ферментовані композиціями 1 і 2. Зразки, отримані ферментацією молока заквашувальними композиціями 3, 4, 7 і 8 містять нижчу сумарну концентрацію бактерій – $(6,0-11,1) \times 10^8$ КУО/см³, причому слід відзначити, що у цих зразках як пробіотичні культури переважають ацидофільні бактерії, тоді як у зразках 1, 2, 5 і 6 – біфідобактерії, які є переважальними в кишечнику малюків. Вища концентрація біфідобактерій в зразках 1, 2, 5 і 6 пояснюється нижчою вихідною концентрацією МК *L. acidophilus* La-5, які є сильними кислотоутворювачами і в зразках 3, 4, 7 і 8 пригнічують ріст біфідобактерій.



**Кількість життєздатних клітин лакто- та біфідобактерій у згустках,
отриманих ферментацією молока складеними композиціями**

Table 6

**The number of viable cells of lacto- and bifidobacteria in clots obtained by
fermentation of milk using composed compositions**

Заквашувальна композиція №	Кількість життєздатних клітин, КУО/см ³ ,		
	МК <i>B. animalis Bb-12</i> , X·10 ⁻⁹	МК <i>L. acidophilus La-5</i> , X·10 ⁻⁸	ЗК, X·10 ⁻⁹
1	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,6	19,0 ± 6,0
2	2,7 ± 0,4	1,9 ± 0,6	19,0 ± 6,0
3	0,1 ± 0,1	6,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0
4	0,2 ± 0,1	6,0 ± 1,0	5,0 ± 1,0
5	2,3 ± 0,6	3,2 ± 1,8	25,0 ± 12,0
6	3,5 ± 0,7	3,2 ± 1,8	25,0 ± 12,0
7	0,2 ± 0,1	7,0 ± 1,0	6,0 ± 1,0
8	0,3 ± 0,1	7,0 ± 1,0	6,0 ± 1,0

Примітка: n=5, p≤0,05.

Note: n=5, p≤0.05.

Максимальну кількість життєздатних клітин ЗК з підвищеними протеолітичними властивостями містять зразки 5 і 6 та зразки 1 і 2 (табл. 6) – (2,5–4,0)×10¹⁰ та (1,3–2,5)×10¹⁰ КУО/см³, що, напевне, також пояснюється нижчою вихідною концентрацією лактобацил у цих зразках при заквашуванні молока та симбіозом МК *B. animalis Bb-12* та ЗК, доведеним у попередніх дослідженнях [2]. Така висока концентрація ЗК у цих зразках, напевне, зумовлена вищим вмістом в них біфідобактерій, адже, за результатами попередніх досліджень [2], МК *B. animalis Bb-12* та ЗК утворюють при спільному культивуванні у співвідношенні 1,0 : 1,0 симбіотичну композицію і стимулюють ріст один одного.

Результати визначення антагоністичної та протеолітичної активності заквашувальних композицій, складених із БК *DVS* лакто- та біфідобактерій (табл. 7), також свідчать про доцільність застосування у технології дитячих кисломолочних продуктів заквашувальних композицій з МК *B. animalis Bb-12*, МК *L. acidophilus La-5* та ЗК у співвідношенні 1,0 : 0,1 : 1,0 при вихідній концентрації культур у молоці 1×10⁶, 1×10⁵ і 1×10⁶ КУО/см³ відповідно, оскільки композиції 1, 2, 5 і 6 ферментують молоко з утворенням згустків з високими протеолітичними й антагоністичними властивостями.



Таблиця 7

Антагоністична та протеолітична активність заквашувальних композицій,
складених із БК *DVS* лакто- й біфідобактерій

Table 7

Antagonistic and proteolytic activity of starter compositions composed of
bacterial concentrates *DVS* of lacto- and bifidobacteria

Заквашувальна композиція №	Розмір зони пригнічення росту, мм, для тест-культури				Вміст тирозину в згустку, мг/100 г
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	
1	31,5 ± 1,0	39,0 ± 1,0	29,5 ± 0,3	41,5 ± 0,8	0,782 ± 0,017
2	33,5 ± 0,5	40,5 ± 1,0	31,0 ± 0,5	45,5 ± 1,5	0,796 ± 0,013
3	34,0 ± 1,0	35,5 ± 1,5	25,5 ± 1,5	37,0 ± 0,5	0,612 ± 0,024
4	34,5 ± 1,5	37,0 ± 1,0	27,0 ± 1,0	39,5 ± 1,2	0,616 ± 0,011
5	34,5 ± 1,0	41,0 ± 1,0	31,5 ± 0,8	45,5 ± 1,1	0,346 ± 0,010
6	35,0 ± 1,5	42,0 ± 1,0	33,0 ± 1,0	47,0 ± 1,0	0,231 ± 0,007
7	34,0 ± 0,4	37,0 ± 0,7	26,5 ± 0,5	37,5 ± 1,3	0,283 ± 0,020
8	33,8 ± 0,2	38,2 ± 0,2	28,0 ± 1,5	40,5 ± 1,1	0,197 ± 0,013

Примітка: n=5, p≤0,05.

Note: n=5, p≤0.05.

Спільне використання у складі заквашувальних композицій лактококів, лактобацил та біфідобактерій призводить до синергізму їх протеолітичних властивостей, що забезпечує отримання дитячих кисломолочних продуктів з високим ступенем гідролізу білків, в т.ч. алергенних фракцій (це припущення доведено результатами дослідження фракційного складу білків паст білкових для дитячого харчування, вироблених з використанням розроблених заквашувальних композицій [9], а також медико-біологічними дослідженнями білків паст білкових для дитячого харчування [8]). Найвищі протеолітичні властивості мають зразки 1 і 2, основу заквашувальних композицій в яких складають БК *DVS* зі ЗК, отриманих заморожуванням, які мають найвищі протеолітичні властивості [7]. Отже, можна припустити, що дитячі кисломолочні продукти, вироблені з використанням заквашувальних композицій 1 і 2 матимуть нижчий вміст алергенних фракцій білків (це припущення також доведено дослідженнями фракційного складу білків у пастах білкових для дитячого харчування [9]). До того ж, вартість БК *DVS*, отриманих заморожуванням, на 270–300 грн. нижча, ніж вартість БК *DVS*, отриманих ліофільним сушінням.



Але відмовлятися від використання в технологіях дитячих кисломолочних продуктів заквашувальних композицій із БК *DVS*, отриманих ліофільним сушінням, не доцільно, оскільки ці композиції забезпечують отримання згустків з вищою кількістю життєздатних пробіотичних біфідобактерій (табл. 6), які мають високу антагоністичну активність по відношенню до патогенних і умовно-патогенних бактерій, що, напевне, зумовлено більшою тривалістю ферментації молока (табл. 5). До того ж, для зберігання ліофільно висушених БК *DVS* на підприємстві необхідно мати холодильну камеру з температурою (-18) - (-20) °С, тоді як для зберігання заморожених БК *DVS* необхідна холодильна камера з температурою (-45) - (-50) °С.

Для розробки технологій кисломолочних продуктів дитячого харчування доцільно рекомендувати такі заквашувальні композиції: змішані культури *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. diacetylactis*, *L. mesenteroides* + МК *Lbc. acidophilus La-5* + МК *B. animalis Bb-12* у співвідношенні 1,0 : 0,1 : 1,0 у складі бактеріальних концентратів *F DVS C-301* (або *F DVS C-303*), *F DVS La-5* і *F DVS Bb-12* відповідно (вихідна концентрація бактерій при інокуляції – 1×10^6 , 1×10^5 і 1×10^6 КУО/см³ відповідно) та змішані культури *L. lactis ssp. lactis*, *L. lactis ssp. cremoris*, *L. lactis ssp. diacetylactis*, *L. mesenteroides* + МК *L. acidophilus La-5* + МК *B. animalis Bb-12* у співвідношенні 1,0 : 0,1 : 1,0 у складі бактеріальних концентратів *FD DVS CH N II* (або *FD DVS CH N 19*), *FD DVS La-5* і *FD DVS Bb-12* відповідно (вихідна концентрація бактерій при інокуляції – 1×10^6 , 1×10^5 і 1×10^6 КУО/см³ відповідно).

Н.А. Ткаченко

Одесская национальная академия пищевых технологий,
ул. Канатная, 112, Одесса, Украина, 65039;
тел.: +38 (048) 712 40 45, e-mail: nataliya.n-2013@yandex.ua

ЗАКВАСОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИИ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ТЕХНОЛОГИЙ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ ДЕТСКОГО ПИТАНИЯ

Реферат

Цель. Создание заквасочных композиций из культур бифидо- и лактобактерий для разработки технологий ферментированных молочных продуктов детского питания с повышенными пробиотическими, в т.ч. антагонистическими свойствами. **Методы.** Культивирование заквасочных культур бифидо- и лактобактерий осуществляли в стерилизованное молоко, обогащенное фруктозой. Кислотность определяли титриметрическим и потенциометрическим методами, влагоудерживающую способность сгустка – методом центрифугирования, условную вязкость ферментированных продуктов – по продолжительности истечения сгустка из пипетки, количество жизнеспособных клеток лактобактерий – посевом в стерилизованное молоко, количество клеток бифидобактерий – посевом в тиогликолевую среду, антагонистическую активность культур



лакто- и бифидобактерий – по луночно-диффузионному методу, протеолитическую активность – по сумме трех свободных аминокислот в пересчете на тирозин. **Результаты.** Определены технологические, пробиотические, в т.ч. антагонистические, и протеолитические свойства лакто- и бифидобактерий прямого внесения, представленных на рынке Украины. На основе проведенных исследований рекомендовано для технологий ферментированных молочных продуктов детского питания использовать монокультуры *Lactobacillus acidophilus* La-5 и *Bifidobacterium animalis* Bb-12 и смешанные культуры *L. lactis* ssp. *lactis* + *L. lactis* ssp. *cremoris* + *L. lactis* ssp. *diacetylactis* + *L. mesenteroides* (СК). При установленном соотношении между СК : *L. acidophilus* La-5 : *B. animalis* Bb-12 в составе заквасочных композиций 1,0:0,1:1,0 (исходная концентрация культур при инокуляции – 1×10^6 , 1×10^5 и 1×10^6 КОЕ/см³ соответственно) получен кисломолочный продукт с нормативными физико-химическими показателями, высокими пробиотическими и гипоаллергенными свойствами. **Выводы.** Разработаны композиции заквасочных культур с использованием лакто- и бифидобактерий прямого внесения, которые обеспечивают получение ферментированных молочных продуктов детского питания (напитков и белковых продуктов) с повышенными пробиотическими и гипоаллергенными свойствами.

Ключевые слова: детское питание, ферментация молока, бифидобактерии, лактобактерии.

N.A. Tkachenko

Odesa National Academy of Food Technologies,
112, Kanatna Str, Odesa, 65039, Ukraine,
тел.: +38 (048) 712 40 45, e-mail: nataliya.n-2013@yandex.ua

STARTER CULTURES COMPOSITIONS FOR DAIRY BABY FOOD PRODUCTION TECHNOLOGIES

Summary

Aim. Creating the fermenting compositions of bifidus bacteria and lactobacilli cultures to develop innovative technologies for fermented milk baby foods with high probiotic and antagonist properties. **Methods.** The cultivation of bifidobacteria and lactobacilli starter cultures took place in sterilized milk environment enriched with fructose. To determine acidity the titration and potentiometric techniques were used; to assess the clot's water retention capacity the centrifugation method was used; to determine the fermented products viscosity – the assessment of the clot's discharge delay was applied when leaving the pipette; to estimate the number of viable lactobacilli cells the sterilized milk inoculation technique was applied, for determining the bifidus bacteria viable cells number – the thioglycolic medium inoculation technique, and to assess the bifidus bacteria and lactobacilli cultures antagonistic activity the wells method was used; the proteolytic activity was assessed under the sum of three free amino acids, when tyrosine-based calculation. **Results.** The technological, probiotic, antagonistic and proteolytic properties of the bifidus bacteria and lactobacilli bacterial concentrates for direct application, presented in the Ukrainian market, have been defined. Basing on performed studies, for baby fermented milk products food technology the use of monocultures *L. acidophilus* La-5, monocultures *B. animalis* Bb-12 and monocultures' mix *L. lactis* ssp. *lactis* + *L. lactis* ssp. *cremoris* + *L. lactis* ssp.



*diacetylactis + L. mesenteroides (SC) is recommended. Recommended ratio between SC : L. acidophilus La-5 : B. animalis Bb-12 in the fermentation starter composition should be set as 1.0: 0.1: 1.0 (initial cultures concentration at inoculation – 1×10^6 , 1×10^5 and 1×10^6 CFU/cm³, respectively), therefore, the obtained cultured dairy product bears the regular physical and chemical parameters, high probiotic and anti-allergic properties. **Conclusions.** Developed fermentation starter cultures composition using the direct application of lacto- and bifidus bacteria concentrates, allow the production of fermented dairy baby food products (beverages and protein products) with high probiotic, hypoallergenic and antagonist properties.*

Key words: baby food, milk fermentation, bifidus bacteria, lactobacilli.

Список використаної літератури

1. ДСТУ 7355:1213 Молоко, молочні продукти та закваски. Метод визначення кількості біфідобактерій. – 14 с.
2. Дідух Н.А., Чагаровський О.П., Лисогор Т.А. Заквашувальні композиції для виробництва молочних продуктів функціонального призначення. – Одеса: Видавництво «Поліграф», 2008. – 236 с. – ISBN 978-966-8788-79-6
3. Крусь Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2000. – 386 с.
4. Кузнецов В.В., Липатова Н.Н. Справочник технолога молочного производства. Технология детских молочных продуктов. – Санкт-Петербург: ГИОРД, 2005 г. – 525 с. – ISBN 5-901065-96-4
5. Про затвердження Державної цільової соціальної програми розвитку виробництва продуктів дитячого харчування на 2012-2016 роки. – Електрон. дан. – Режим доступу: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/870-2011-п>
6. Robinson R. Dairy microbiology handbook. New York: Wiley-Interscience, 2002. – 784 p.
7. Ткаченко Н.А., Назаренко Ю.В., Авершина А.С., Українцева Ю.С. Заквашувальні композиції для дитячих кисломолочних продуктів з підвищеними протеолітичними властивостями. – Восточно-Европейский журнал передових технологий. – № 2/12 (68). – 2014. – С. 66–71. – doi: 10.15587/1729-4061.2014.23388
8. Ткаченко Н.А., Українцева Ю.С., Авершина А.С. Медико-біологічні дослідження білкових паст для дитячого харчування // Наукові праці ОНАХТ. – 2016. – Т. 48. – С. 105–110.
9. Ткаченко Н.А., Українцева Ю.С. Фракційний склад білків в пастах для дитячого харчування // Збірник наукових праць ЛНУВМтаБ ім. С.З. Гжицького. – Львів. – 2015. – № 4(64). – Т. 17. – С. 165–173.
10. Biavati B., Bottazzi V., Morelli L. Probiotics and *Bifidobacteria*. – Novara (Italy): MOFIN ALCE, 2001. – 79 p.



References

1. DSTU 7355:1213 **Milk, milk products and starter cultures. Method of determination of bifidobacteria**. Kiyiv: The Ministry of Economic Development and Trade of Ukraine; 2014. 14 p.
2. Diduh NA, Chaharovskiy AP, Lysohor TA. Starter compositions for functional dairy products manufacturing. Odessa: Polygraph; 2008. 236 p.
3. Krus GN, Chaligina AM, Volokitina ZV. Methods for analysis of milk and dairy products. Moscow: Kolos; 2000. 386 p.
4. Kuznetsov VV, Lipatova NN. Handbook for the technologist of dairy processing. The technology of baby dairy products. St. Petersburg: GIORD; 2005. 525 p.
5. Zakon3.rada.gov.ua. On approval of the National Programme of baby food production for 2012-2016 [Internet]. 15.08.2011 [cited 2 March 2016]. Available from: <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/870-2011-п>.
6. Robinson R. Dairy microbiology handbook. New York: Wiley-Interscience; 2002. 784 p.
7. Tkachenko NA, Nazarenko JV, Avershina AS, Ukraintseva JS. Starter compositions for baby cultured milk products with high level of proteolytic properties. Eastern-European Journal of Enterprise Technologies. 2014; 2:66–71.
8. Tkachenko NA, Ukraintseva JS, Avershina AS. Biomedical research of the protein pastes for baby food. The collection «Research Works» of the Odessa National Academy of Food Technologies. 2016; 48:105–110.
9. Tkachenko NA, Ukraintseva JS. Fractional composition of proteins in the pastes for infant food. Collection of scientific works of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology. 2015; 4:165–173.
10. Biavati B, Bottazzi V, Morelli L. Probiotics and Bifidobacteria. Novara: Mofin Alce; 2001. 79 p.

Стаття надійшла до редакції 21.02.2016 р.



УДК 577.11.7:579.842.1/2

Т.В. Булигіна, Л.Д. Варбанець, Л.А. Пасічник, Н.В. Житкевич

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38(044) 256 23 39, e-mail: tati20@ukr.net

РЕЗИСТЕНТНІСТЬ ДО АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІЙ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Мета. Метою дослідження було вивчити стійкість представників *Pantoea agglomerans* до антибіотиків. **Методи.** Для вивчення антибіотикорезистентності диско-дифузійним методом було використано антибіотики та синтетичні антибактеріальні препарати, які відрізнялися за механізмом дії та хімічною будовою. **Результати.** Встановлено, що ріст і розвиток мікробних популяцій більшості штамів пригнічували антибіотики ломефлоксацин, стрептоміцин, мономіцин, тетрациклін, левоміцетин, поліміксин, фуразолідон та гентаміцин. Меншою мірою досліджувані штами були чутливими до бензилпеніциліну, цефуроксиму, цефотаксиму, цефтриаксону, цефазоліну, канаміцину, рифампіцину, ампіциліну та фурадоніну. Стійкість до лінкоміцину та еритроміцину проявили 92,8% досліджуваних штамів *P. agglomerans*, в той час як до ампіциліну та олеандоміцину – 84,8%, до бензилпеніциліну, цефуроксиму та фурадоніну – 78,5%, до цефазоліну та рифампіцину – 71,2%, цефтриаксону – 64,1%, цефотаксиму – 57,1%. **Висновки.** За стійкістю до антибіотиків два штами *P. agglomerans* (8488 та 8490) можна віднести до одного резистентовару, так як вони були стійкими до однакового спектру антибактеріальних препаратів (крім ломефлоксацину), штами *P. agglomerans* П1а, 7960а, 8488, 8490, які виявилися стійкими до всіх досліджуваних цефалоспоринів, можуть бути виділені в окремий резистентовар. Штами *P. agglomerans* (7460, 8456 та 9637) були чутливими до більшості досліджуваних антибактеріальних препаратів.

Ключові слова: *Pantoea agglomerans*, антибіотикорезистентність, резистентовар.

Pantoea agglomerans (раніше *Enterobacter agglomerans*) – грамнегативна бактерія, яка відноситься до родини *Enterobacteriaceae* [3] і поширена в багатьох різноманітних природних і сільськогосподарських середовищах, зокрема, як коменсал, епіфіт або ендوفіт, але інколи і як патоген рослин та тварин.

Відомо, що штами *P. agglomerans* можуть бути антагоністами по відношенню до фітопатогенів [5], мають антибактеріальну та протигрибну активність [2], здатні до конкуренції при колонізації рослин [7]. Тому препарати на основі *P. agglomerans* часто використовують в сільському господарстві як агенти біологічного контролю проти збудника бактеріального опіку яблуні та груші (*Erwinia amylovora* (1882) Баррілл Уінслоу ін. 1999) [4], а також таких бактеріозів, як базальна гниль ядра ячменю і грибні захворювання плодів насіннячкових [1].

© Т.В. Булигіна, Л.Д. Варбанець, Л.А. Пасічник, Н.В. Житкевич, 2016



Нещодавно три комерційні штами були зареєстровані для біоконтролю бактеріального опіку в Новій Зеландії (BlossomBless™ strain P10c [10]), США та Канаді (BlightBan C9-1™ strain C9-1; Bloomtime™ strain E325 [8]).

Незважаючи на більш ніж столітню історію досліджень, в біології виду *P. agglomerans* досі існує багато невирішених проблем. Так залишається не охарактеризована його стійкість або чутливість до антибактеріальних препаратів. На основі отриманих результатів може бути проведено внутрішньовидове диференціювання досліджуваних штамів *P. agglomerans*.

Тому метою даної роботи було дослідити стійкість та чутливість штамів *P. agglomerans* до різних антибактеріальних препаратів.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були чотирнадцять штамів *Pantoea agglomerans* із колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України, які були виділені з різних рослин-хазяїв та різних географічних зон (табл. 1).

Таблиця 1

Джерела виділення штамів *Pantoea agglomerans*

Table 1

Sources of *Pantoea agglomerans* strains isolation

Штам	Рослина-хазяїн та місце виділення
7960a	Томати, Умань (Україна)
7969	Яблуна, Мінськ (Беларусь)
8456, 8488, 8490	Насіння вівса (Румунія)
8606	Бавовна, Санк-Петербурґ (Росія)
8674г	Рослина-хазяїн невідома (Бельгія)
П1а	Пшениця, с. Херсонська 86 (Херсонська обл., Україна)
П324	Пшениця, с. Херсонська 86 (Херсонська обл., Україна)
7460	Насіння жита, с. Саратівське 5 (Дніпропетровська обл., Україна)
7604	Насіння жита, с. Київське 80 (Київська обл., Україна)
9637	Пшениця, с. Поліська 90 (Київська обл., Україна)
9649	Пшениця, с. Поліська 90 (Київська обл., Україна)
9668	Пшениця, с. Столична (Вінницька обл., Україна)



Визначення чутливості бактерій до антибіотиків проводили диско-дифузійним методом [6]. Для досліджень були використані диски із антибіотиками та синтетичними антибактеріальними препаратами: 1. бензилпеніцилін – 10 од.; 2. ампіцилін – 10 мкг; 3. цефуроксим – 30 мкг; 4. цефотаксим – 30 мкг; 5. цефтриаксон – 30 мкг; 6. цефазолін – 30 мкг; 7. канаміцин – 30 мкг; 8. мономіцин – 30 мкг; 9. гентаміцин – 10 мкг; 10. стрептоміцин – 30 мкг; 11. еритроміцин – 15 мкг; 12. олеандоміцин – 15 мкг; 13. тетрациклін – 30 мкг; 14. рифампіцин – 5 мкг; 15. левоміцетин – 30 мкг; 16. лінкоміцин – 15 мкг; 17. поліміксин – 300 од. 18. ломефлоксацин – 10 мкг; 19. фуразолідон – 300 мкг; 20. фурадонін – 300 мкг.

При обліку результатів вимірювали зони затримки росту бактеріальної культури навколо відповідних дисків із антибіотиками. Критерії інтерпретації результатів визначення чутливості досліджуваних штамів для кожного антибіотика різні, згідно із встановленими стандартами NCCLS [6].

Результати та їх обговорення

Для вивчення антибіотикорезистентності досліджуваних штамів *P. agglomerans* було використано антибіотики та синтетичні антибактеріальні препарати, які відрізнялися за механізмом дії (порушують утворення клітинної стінки, пригнічують синтез білка, змінюють проникність клітинних мембран та інгібують їх функції) та хімічною будовою (β -лактами, аміноглікозидами, макролідами, азалідами, тетрациклінами, ансаміцинами, левоміцетини, лінкозаміди, поліміксини, синтетичні - фторхінолони, нітрофурані).

Результати досліджень свідчать, що 71,2% штамів виявилися чутливими до ломефлоксацину, 64,3% – до стрептоміцину, 57,1% – до мономіцину, 49,9% – до тетрацикліну, левоміцетину та поліміксину, 42,8% – до гентаміцину та фурадоніну, 28,6% – до цефотаксиму, цефтриаксону, цефазоліну та канаміцину, 21,4% – до бензилпеніциліну, цефуроксиму, рифампіцину та фурадоніну і всього 7,1% – до ампіциліну (табл. 2). Найбільша кількість (92,8%) досліджуваних штамів *P. agglomerans* проявила стійкість до лінкоміцину та еритроміцину. Крім цього 84,9% досліджуваних штамів виявилися стійкими до ампіциліну та олеандоміцину, 78,5% – бензилпеніциліну, цефуроксиму та фурадоніну, 71,2% – цефазоліну та рифампіциліну, 64,1% – цефтриаксону та майже 50% – до фуразолідону. Цікавим виявився той факт, що із чотирнадцяти досліджуваних штамів чутливими і стійкими до канаміцину, гентаміцину, поліміксину та фуразолідону була майже однакова кількість штамів.

Вивчення дії на штами *P. agglomerans* 20 антибіотиків та синтетичних антимікробних препаратів різної хімічної будови показало, що більшість представників даного виду стійкі до антимікробних агентів. Зовсім не ефективними по відношенню до даного виду бактерій були еритроміцин, олеандоміцин та лінкоміцин. Із отриманих даних видно, що стійкими до бензилпеніциліну були бактерії одинадцяти штамів (П1а, П 324, 7604, 9637, 9649, 7960а, 8456, 8488, 8490, 8606, 8674т), а до ампіциліну – дванадцять (П1а, П324, 9637, 9649, 9668, 7960а, 7969, 8456, 8488, 8490, 8606, 8674т). Представники виду *P. agglomerans*



Таблиця 2
Table 2Чутливість бактерій *Pantoea agglomerans* до різних антибіотиків
Sensitivity of *Pantoea agglomerans* microbial cultures to different antibiotics

Антибіотик	Штами <i>P. agglomerans</i>														% штамів	
	П1а	П324	7460	7604	9637	9649	9668	7960а	7969	8456	8488	8490	8606	8674т	Стойких	Чутливих
	Зона затримки росту (мм)															
Бензилпеніцилін	0 ^R	7 ^R	19 ^S	14 ^R	10 ^R	0 ^R	18 ^S	0 ^R	18 ^S	14 ^R	10 ^R	0 ^R	10 ^R	0 ^R	78,54	21,42
Ампіцилін	6 ^R	0 ^R	30 ^S	14 ^I	0 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	12 ^R	0 ^R	0 ^R	12 ^R	10 ^R	0 ^R	84,86	7,14
Цефуроксим	0 ^R	0 ^R	20 ^S	0 ^R	10 ^R	22 ^S	28 ^S	0 ^R	14 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	12 ^R	0 ^R	78,54	21,42
Цефотаксим	0 ^R	0 ^R	34 ^S	0 ^R	28 ^S	0 ^R	22 ^I	0 ^R	36 ^S	24 ^S	0 ^R	14 ^R	20 ^I	12 ^R	57,12	28,56
Цефтриаксон	0 ^R	0 ^R	28 ^S	0 ^R	8 ^R	0 ^R	32 ^S	12 ^R	22 ^S	0 ^R	0 ^R	0 ^R	26 ^S	14 ^I	64,06	28,56
Цефазолін	0 ^R	18 ^S	0 ^R	20 ^S	10 ^R	22 ^S	32 ^S	0 ^R	14 ^R	10 ^R	12 ^R	10 ^R	10 ^R	0 ^R	71,20	28,56
Канаміцин	14 ^I	12 ^R	20 ^S	16 ^I	18 ^S	12 ^R	12 ^R	14 ^I	10 ^R	18 ^S	8 ^R	10 ^R	12 ^R	16 ^I	42,84	28,56
Мономіцин	20 ^S	12 ^R	22 ^S	0 ^R	18 ^S	8 ^R	12 ^R	24 ^S	28 ^S	20 ^S	16 ^I	14 ^I	34 ^S	20 ^S	28,56	57,12
Гентаміцин	23 ^S	0 ^R	6 ^R	10 ^R	17 ^S	14 ^I	20 ^S	16 ^I	12 ^R	16 ^S	14 ^I	14 ^I	10 ^R	22 ^S	35,70	42,84
Стрептоміцин	35 ^S	22 ^S	12 ^R	0 ^R	30 ^S	26 ^S	0 ^R	36 ^S	0 ^R	40 ^S	44 ^S	16 ^S	12 ^R	18 ^S	35,70	64,06
Еритроміцин	8 ^R	10 ^R	8 ^R	10 ^R	0 ^R	0 ^R	12 ^R	10 ^R	0 ^R	12 ^R	0 ^R	14 ^I	12 ^R	0 ^R	92,82	0
Олеандоміцин	0 ^R	22 ^S	12 ^R	0 ^R	12 ^R	10 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	8 ^R	0 ^R	0 ^R	14 ^I	0 ^R	84,86	7,14
Тетрациклін	15 ^I	17 ^I	26 ^S	0 ^R	20 ^S	16 ^I	18 ^I	8 ^R	14 ^R	28 ^S	26 ^S	26 ^S	22 ^S	26 ^S	21,42	49,98
Рифампіцин	0 ^R	10 ^R	16 ^R	22 ^S	10 ^R	10 ^R	10 ^R	0 ^R	18 ^I	14 ^R	40 ^S	14 ^R	0 ^R	40 ^S	71,20	21,42
Левоміцетин	12 ^R	16 ^I	34 ^S	18 ^I	24 ^S	14 ^R	8 ^R	10 ^R	16 ^I	30 ^S	22 ^S	28 ^S	26 ^S	26 ^S	28,56	49,98
Лінкоміцин	0 ^R	0 ^R	0 ^R	18 ^I	0 ^R	12 ^R	0 ^R	0 ^R	0 ^R	12 ^R	0 ^R	10 ^R	0 ^R	0 ^R	92,82	0
Поліміксин	0 ^R	12 ^R	14 ^R	16 ^R	22 ^S	18 ^R	14 ^R	44 ^S	60 ^S	46 ^S	44 ^S	60 ^S	66 ^S	50 ^S	35,70	49,98
Ломефлоксацин	0 ^R	32 ^S	32 ^S	40 ^S	34 ^S	40 ^S	0 ^R	22 ^S	22 ^S	40 ^S	0 ^R	24 ^S	0 ^R	24 ^S	28,56	71,20
Фуразолідон	17 ^S	12 ^R	18 ^S	0 ^R	24 ^S	18 ^S	0 ^R	0 ^R	12 ^R	40 ^S	44 ^S	16 ^I	0 ^R	0 ^R	49,98	42,84
Фурадонін	14 ^R	14 ^R	10 ^R	10 ^R	10 ^R	12 ^R	0 ^R	14 ^R	14 ^R	18 ^S	22 ^S	20 ^S	14 ^R	10 ^R	78,54	21,42

Примітки: S (sensitive) – чутливі; I (intermediate) – помітно стійкі; R (resistant) – стійкі.

виявилися резистентними до більшості антибіотиків цефалоспоринової групи. Тільки на бактерії окремих штамів діяли цефуроксим, цефотаксим, цефтриаксон та цефазолін. Дуже цікавим є той факт, що чотири штами *P. agglomerans* (П1а, 7960а, 8488, 8490) виявилися стійким до всіх досліджуваних цефалоспоринів.

Із чотирнадцяти досліджуваних штамів шість виявилися стійкими до канаміцину (П324, 9668, 7969, 8488, 8490, 8606), п'ять – до стрептоміцину та гентаміцину (7460, 7604, 9668, 7969, 8606 та П324, 7460, 7604, 7969, 8606 відповідно) та чотири – до мономіцину (П324, 7604, 9649, 9668). Стійкість до тетрацикліну тільки трьох (7604, 7960а, 7969) із чотирнадцяти досліджуваних штамів *P. agglomerans* може свідчити про наявність у них механізмів захисту від даного антибіотика.

Із усіх досліджуваних штамів тільки шість (П1а, П324, 7460, 7604, 9649, 9668) проявили стійкість до поліміксину. Серед усіх досліджуваних штамів тільки чотири (П1а, 9668, 8488, 8606) були стійкими до ломефлораксацину. Стійкими до фуразолідону були сім штамів *P. agglomerans* (П324, 7604, 9668, 7960ф, 7969, 8606, 8674т), а до фурадоніну – одинадцять (П1а, П324, 7460, 7604, 9637, 9649, 9668, 7960ф, 7969, 8606, 8674т).

На сьогодні в літературі зустрічається мало повідомлень про антибіотикорезистентність представників виду *P. agglomerans*. Раніше [9] повідомлялося про існування антибіотикорезистентності представників *P. agglomerans*, які були виділені із порошкоподібної молочної суміші для грудних дітей. Показано, що всі ізоляти *P. agglomerans* були чутливі до тігецикліну, хлорамфеніколу, цефепіму, левофлораксацину, міноцикліну і колістину, а 50% ізолятів були стійкішими до цефотаксиму, моксифлораксацину, котримоксазолу і тикарциліну, 62,5% до карбеніциліну і 37,5% до ампіциліну, піперациліну та мезлоциліну. Аналіз порівняння з отриманими нами результатами виявив такі розбіжності: стійкість ізолятів *P. agglomerans* із рослин до ампіциліну була в 2,3 рази більшою, ніж у ізолятів із молочної суміші, а до цефотаксиму – на 5,4% рази меншою.

Дослідження резистентності *Pantoea agglomerans* до антибіотиків та синтетичних антибактеріальних препаратів свідчить, що найбільшу стійкість досліджувані штами проявили до бензилпеніциліну, ампіциліну, цефуроксиму, цефтриаксону, цефазоліну, еритроміцину, олеандоміцину, рифампіцину, лінкоміцину та фурадоніну.

Таким чином, за результатами антибіотикорезистентності, два штами *Pantoea agglomerans* (8488 та 8490) можна віднести до одного резистентовару, оскільки вони були стійкими майже до однакової кількості антибактеріальних препаратів (крім ломефлораксацину). Чотири штами *P. agglomerans* (П1а, 7960а, 8488, 8490), які виявилися стійкими до всіх досліджуваних цефалоспоринів, можуть бути виділені в окремий резистентовар. Три штами *P. agglomerans* (7460, 8456 та 9637) були чутливими до більшості досліджуваних антибактеріальних препаратів. Всі інші штами відрізняються один від одного за чутливістю до антибіотиків і їх неможливо поділити на групи.



Аналіз одержаних даних свідчить, що відмінності в антибіотикорезистентності досліджуваних штамів *P. agglomerans* не можуть бути пов'язані із географічною зоною та джерелом (рослиною-хазяїном) їх виділення.

T.V. Bulyhina, L.D. Varbanets, L.A. Pasichnyk, N.V. Zhitkevych

Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine,
tel.: +38 (044) 256 23 39, e-mail: tati20@ukr.net

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *PANTOEA AGGLOMERANS*

Summary

Aim. So far as one of the additional criteria of species differentiation may be data on the sensitivity of its representatives to antibiotics the aim of this research was to study the susceptibility of the members of *P. agglomerans* to antibiotics. **Methods.** To study the antibiotic resistance by disco-diffusion method there were used antibiotics and synthetic antibacterial agents which were different by mechanism of action and chemical structure. **Results.** It is established that the growth and development of microbial populations of the majority of strains was inhibited by lomefloxacin, streptomycin, monomycin, tetracycline, chloramphenicol, polymyxin, and gentamicin, which differ in structure and mechanism of action. To a lesser extent, the investigated strains were sensitive to benzylpenicillin, cefuroxime, cefotaxime, ceftriaxone, cefazolin, kanamycin, rifampicin, ampicillin and furadonin. Resistance to lincomycin and erythromycin showed 92.8% of the studied *P. agglomerans* strains, while ampicillin and oleandomycin – 84.8% to benzylpenicillin, cefuroxime and furazone – 78.5%, to cefazolin and rifampicin – 71.2%, ceftriaxone – 64.1%, to cefotaxime – 57.1%. **Conclusion.** Thus, two strains (8488 and 8490) can be attributed to one of the same resistantovar as they were resistant to almost the same number of antibiotics and antibacterial drugs (other than lomefloxacin). Four of *P. agglomerans* strains (IIIa, 7960a, 8488, 8490), which displaying resistance to all cephalosporines tested may be included in separate resistantovar. Three of investigated strains (7460, 8456 and 9637) were sensitive to majority of studied antibiotics and antibacterial preparations. And all the others in individual resistantovar.

Key words: *Pantoea agglomerans*, antibiotic resistance, resistantovar.

Т.В. Булыгина, Л.Д. Варбанец, Л.А. Пасичник, Н.В. Житкевич

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика
Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
e-mail: tati20@ukr.net

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ *PANTOEA AGGLOMERANS*

Реферат

Цель. Целью исследования было изучить устойчивость представителей *Pantoea agglomerans* к антибиотикам. **Методы.** Для изучения антибиотикорезистентности диско-диффузным методом были использованы антибиотики и синтетические антибактериальные препараты, которые отличались по механизму действия и химическому строению. **Результаты.** Установлено, что



рост и развитие микробных популяций большинства штаммов подавляли антибиотики ломефлоксацин, стрептомицин, мономицин, тетрациклин, левомицетин, полимиксин, фуразолидон и гентамицин. В меньшей степени исследуемые штаммы были чувствительны к пенициллину, цефуроксиму, цефотаксиму, цефтриаксону, цефазолину, канамицину, рифампицину, ампициллину и фурадонину. Устойчивость к линкомицину и эритромицину проявили 92,8% исследуемых штаммов *P. agglomerans*, в то время как к ампициллину и олеандомицину – 84,8%, к бензилпенициллину, цефуроксиму и фурадонину – 78,5%, до цефазолина и рифампицина – 71,2%, цефтриаксона – 64,0%, цефотаксиму – 57,1%. **Выводы.** По устойчивости к антибиотикам два штамма (8488 и 8490) можно отнести к одному резистентовару, так как они были устойчивыми почти к одинаковому количеству антибактериальных препаратов (кроме ломефлоксацина), штаммы *P. agglomerans* (ППа, 7960а, 8488, 8490), которые проявили стойкость ко всем исследованным цефалоспорином, могут быть выделены в отдельный резистентовар. Штаммы (7460, 8456 та 9637) были чувствительными к большинству исследованных антибактериальных препаратов. А все остальные в отдельные резистентовары.

Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, антибиотикорезистентность, резистентовар.

Список використаної літератури

1. Braun-Kiewnick A, Jacobsen B.J., Sands D.C. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causative agent of basal kernel blight of barley, by antagonistic *Pantoea agglomerans* // *Phytopathology*. – 2000. – V. 90. – P. 368–375.
2. Coutinho T.A., Venter S.N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen // *Molecular Plant Pathology*. – 2009. – V. 10, N 3. – P. 325–335.
3. Gavini F.J., Beji M.A., Mielcarek C., Izard D., Kerster K., De Ley J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beyerink 1888) Ewing and File 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1989. – V. 39, № 3 – P. 337–345.
4. Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of fire blight: a case study in microbial ecology // *Annu Rev. Phytopathol.* – 1998. – V. 36 – P. 227–248.
5. Muller J., Volksch B., Fritsche W. Interaction between phytopathogenic *Pseudomonas* and plant cell cultures // *Book of Abstracts. 5th International Conference on *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens* (Sept. 3 – 8, 1995). – Berlin, Germany, 1995. – P. 97.
6. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement* // *Clinical and Standards Institute*. – 2005. – 25, N 1 – P. 87–151.
7. Poppe L., Vanhoutte S., Hofte M. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA – 2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits // *European Journal of Plant Pathology*. – 2003. – V. 109, N 9. – P. 963–973.
8. Pusey P.L., Stockwell V.O., Rudell D.R. Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora* // *Phytopathology*. – 2008. – V. 98, N 10. – P. 1136–1143.



9. Rietschel E.T., Brade H., Holst O., Brade L., Muller-Loennies S., Mamat U., Zahringer U., Beckmann F., Seydel U., Branderburg K., Ulmer A.J. Bacterial endotoxin: chemical construction, biological recognition, host response, and immunological detoxication // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 1996. – V. 216. – P. 39–81.

10. Vanneste J.L., Cornish D.C., Yu. J., Voyle M.D. P10c: a new biological control agent for control of fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees // *Acta Hortic.* – 2002. – V. 590. – P. 231–235.

References

1. Braun-Kiewnick, A, Jacobsen, BJ, Sands, DC. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the Causal Agent of Basal Kernel Blight of Barley, by Antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*. 2000;90(4):368–375

2. Coutinho, TA, Venter, SN. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular Plant Pathology*. 2009;10(3):325–335.

3. Gavini, F, Mergaert, J, Beji, A, et al. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and Description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1989;39(3):337–345.

4. Johnson, KB, Stockwell, VO. MANAGEMENT OF FIRE BLIGHT: A Case Study in Microbial Ecology. *Annu Rev Phytopathol Annual Review of Phytopathology*. 1998;36(1):227–248.

5. Müller, J, Völksch, B, Fritsche, W. Interactions Between Phytopathogenic *Pseudomonads* and Plant Cell Cultures. *Developments in Plant Pathology Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens*. 1997:305–310.

6. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Informational Supplement. *Clinical and Standards Institute*. 2005;25(1):87-151.

7. Poppe, L, Vanhoutte, S, Höfte, M. Modes of Action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an Antagonist of Postharvest Pathogens on Fruits. *European Journal of Plant Pathology*. 2003;109(9):963–973.

8. Pusey, PL, Stockwell, VO, Rudell, DR. Antibiosis and Acidification by *Pantoea agglomerans* Strain E325 May Contribute to Suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 2008;98(10):1136–1143.

9. Rietschel, ET, Brade, H, Holst, O, et al. Bacterial endotoxin: chemical construction, biological recognition, host response, and immunological detoxication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:39–81.

10. Vanneste, J, Cornish, D, Yu, J, Voyle, M. P10C: A New Biological Control Agent For Control Of Fire Blight Which Can Be Sprayed Or Distributed Using Honey Bees. *Acta Hortic Acta Horticulturae*. 2002;(590):231–235.

Стаття надійшла до редакції 11.03.2016 р.



УДК 579.017.8

Н.Ю. Васильєва, О.Г. Горшкова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна;
тел.: +38(0482)637915, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ONU329 – СОРБЕНТА ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ДЕСТРУКТОРА ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ

Мета. Оптимізація складу живильного середовища (ЖС) для культивування бактерій *Pseudomonas maltophilia* ONU329 – сорбентів йонів важких металів та деструкторів вуглеводнів нафти з отриманням максимальної кількості біомаси бактерій і біофлорів. **Методи.** Оптимізацію середовища для культивування бактерій *P. maltophilia* ONU329 проводили за допомогою багатофакторного експерименту з подальшою математичною обробкою даних методом ортогональних латинських квадратів. Культивування бактерій здійснювали на шейкері-інкубаторі New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R при 150 об/хв протягом 48 год за температури 29,0 °С. Математичну обробку експериментальних даних проводили шляхом розрахунку ефектів впливу факторів, після проведення досліду, побудованого на підставі дисперсійного аналізу, адаптованого до методу латинських квадратів. **Результати.** Для накопичення максимальної кількості біомаси *P. maltophilia* ONU329 і отримання великої кількості біофлорів у процесі очищення розчинів від йонів важких металів підбрано умови культивування бактерій – склад ЖС: KH_2PO_4 – 1,5 г/л, Na_2HPO_4 – 3,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, NH_4Cl – 1,0 г/л, пептон – 10,0 г/л, глюкоза – 2,0 г/л, дріжджовий екстракт – 5,0 г/л, вода – 1 л; рН 7,2; температура +29 °С. **Висновок.** Результати проведених експериментів з використанням методів оптимізації, заснованих на матриці латинських квадратів, дозволили визначити оптимальні умови для накопичення біомаси штаму *P. maltophilia* ONU329. Отримане живильне середовище сприяє приросту біомаси штаму *P. maltophilia* ONU329 та збільшенню кількості біофлорів у 1,7 рази.

Ключові слова: живильне середовище, оптимізація, метод ортогональних латинських квадратів, *Pseudomonas maltophilia*.

На сьогоднішній день в більшості країн світу із усіх відомих методів очищення води та ґрунту від широкого спектру забруднювачів – йонів важких металів, нафтопродуктів, синтетичних поверхнево-активних речовин, віддають перевагу біологічним методам, які порівняно з механічними, фізичними та хімічними методами є більш ефективними, універсальними і екологічно безпечними за рахунок використання активних непатогенних мікроорганізмів [11, 12].



Перспективним для створення нового ефективного поліфункціонального біопрепарату, призначеного для очистки навколишнього середовища від пелютантів, є штам *Pseudomonas maltophilia* ONU329 – сорбент йонів важких металів [3], деструктор вуглеводнів нафти [4], продуцент біосурфактантів екзогенного типу [5, 6].

Для зменшення часу і витрат, пов'язаних із накопиченням біомаси бактерій, біопрепарат готують у підібраному оптимізованому живильному середовищі у рідинній формі, за спеціальною технологією бактерії іммобілізують на суміші природних сорбентів [9].

При доборі живильних середовищ та оптимізації умов культивування з метою підвищення виходу біомаси широко застосовують методи математичного планування експерименту [2, 8]. Вони дозволяють не тільки одночасно дослідити дію декількох факторів на процес, а й кількісно оцінити ступінь цього впливу.

Метою наших досліджень була оптимізація складу живильного середовища (ЖС) і умов культивування бактерій *Pseudomonas maltophilia* ONU329 – сорбентів йонів важких металів та деструкторів вуглеводнів нафти, для отримання максимальної кількості біомаси бактерій.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам *Pseudomonas maltophilia* ONU329, ізолюваний із забрудненого нафтопродуктами морського середовища. Культивування здійснювали на шейкері-інкубаторі New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R у флаконах зі 100 мл середовища при 150 об/хв протягом 48 год при 29,0 °С. Засів живильного середовища проводили добовою культурою, що виросла на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) у стаціонарних умовах за температури 30,0 °С. Об'єм посівного матеріалу складав 1,0% до об'єму середовища.

Оптимізацію проводили за допомогою методу ортогональних латинських квадратів [1]. Приріст біомаси бактерій визначали за зміною показника оптичної щільності на спектрофотометрі Specol-10 (Perkin Elmer USA) за довжини хвилі 540 нм. Титр клітин визначали методом серійних розведень з подальшим висівом на щільне середовище МПА [2]. Визначення питомої швидкості росту проводили за стандартними методиками [7, 10].

Математичну обробку експериментальних даних проводили шляхом розрахунку ефектів впливу на показники оптимізації на усіх рівнях досліджених факторів [1]. Результати обробляли статистично.

Біотехнологія очищення води від йонів важких металів передбачає використання іммобілізованих у складі біофлорів бактерій. Суть утворення біофлорів полягає в тому, що під дією перекису водню і хлориду кальцію в однорідній суспензії бактерій утворюються біофлорки. При цьому різко збільшується загальна адсорбційна ємність системи і, відповідно, ефективність очищення води від йонів важких металів.

Для оцінки ефективності використання отриманого біопрепарату у біотехнології очистки води від йонів важких металів використовували сульфат цинку.



Модельний розчин солі цинку з концентрацією 40 мг/л по металу [$C^0(Zn^{2+}) = 40$ мг/л] готували розчиненням у 1 л води 176 мг солі $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. Бактерії *Pseudomonas maltophilia* ONU329 нарощували на досліджуваних живильних середовищах. До 15 мл модельного розчину сульфату цинку з вихідною концентрацією по металу 40 мг/л додавали 15 мл суспензії бактерій роду *P. maltophilia* ONU329 у концентрації 10×10^8 клітин/мл та флокулянти (10^{-6} моль/л перекису водню і 0,046 моль/л хлориду кальцію), інтенсивно перемішували впродовж 60 хв на шутелі та 15 хв відстоювали. Після відстоювання і центрифугування проб надосадові розчини аналізували на залишковий вміст у них йонів цинку атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі «Сатурн» у полум'ї суміші «повітря – пропан – бутан». Кількість біофлорів після відстоювання оцінювали за їх об'ємною часткою (об%) відносно 100 мл живильного середовища [13]. Експерименти здійснювали в п'яти повторях. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми і «Microsoft Office Excel 2003».

Результати досліджень та їх обговорення

З метою оптимізації умов культивування, отримання максимальної кількості біомаси бактерій і біофлорів, досліджували вплив на інтенсивність росту бактерій *Pseudomonas maltophilia* ONU-329 джерел азоту, вуглецю та співвідношення вуглецю до азоту в середовищі.

Живильні середовища для культивування бактерій містили у своєму складі усі необхідні для росту компоненти. Мінеральна складова середовищ включала неорганічні джерела азоту (NH_4Cl) та фосфору (KH_2PO_4 і Na_2HPO_4).

Як органічну складову живильних середовищ використовували витяжку з торфу, сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна та комбінацію пептону, дріжджового екстракту та глюкози. Виходячи з економічної доцільності, здешевлення вартості готової біомаси, середовище 3 містило у два рази менше фосфорних солей та у 5 разів менше глюкози, ніж середовища 1 і 2.

Склад середовищ, використаних у досліді, наведено у таблиці 1. Рівень рН кожного з середовищ був 7,2 і залишався незмінним впродовж культивування.

Під час дослідження також перевіряли вплив дистильованої та водогінної води, що використовували для приготування живильних середовищ, на ростові характеристики штаму *P. maltophilia* ONU-329.

При використанні дистильованої води за результатами дослідження було показано, що при культивуванні штаму *P. maltophilia* ONU-329 на середовищах різного складу бактерії виявили неоднакову ростову активність.

На середовищі 3, яке містило такі органічні сполуки як пептон і глюкоза, спостерігали найбільш інтенсивний ріст штаму *P. maltophilia* ONU-329 (табл. 1). Максимальні показники оптичної щільності на цьому середовищі досягали значення 2,2 D. Чисельність клітин на момент виходу культури на стадію стаціонарного росту досягала значення $(42,0 \pm 9,93) \times 10^8$ КУО/мл. Показник питомої швидкості росту штаму *P. maltophilia* ONU-329 на середовищі 3 склав 0,19 год⁻¹.



Таблиця 1

Склад живильних середовищ (г/л)

Table 1

Composition of nutrient media (g/l)

Компонент	Середовище 1	Середовище 2	Середовище 3
KH_2PO_4	3,0	3,0	1,5
Na_2HPO_4	6,0	6,0	3,0
NaCl	5,0	5,0	5,0
NH_4Cl	1,0	1,0	1,0
Пептон	-	-	10,0
Глюкоза	10,0	10,0	2,0
Сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна	-	10,0	-
Витяжка з торфу	10,0	-	-

Також високі показники чисельності клітин *P. maltophilia* ONU-329 ($23,0 \pm 4,96$) $\times 10^8$ КУО/мл спостерігали на середовищі 2, яке містило глюкозу та сірчаноокислотний гідролізат рибокісткового борошна. Показник оптичної щільності на цьому середовищі був дещо меншим і досягав значення 1,9 D. При цьому показник питомої швидкості росту штаму на цьому середовищі був максимальним – 0,29 год⁻¹.

На живильному середовищі 1, яке містило витяжку з торфу в кількості 10,0 г/л і глюкозу в кількості 10 мг/л, відзначався невисокий приріст біомаси бактерій *P. maltophilia* ONU-329, і на перші 48 годин культивування оптична щільність суспензії клітин не перевищувала 1,0 D. Кількість життєздатних клітин також була суттєво меншою – ($36,0 \pm 9,93$) $\times 10^7$ КУО/мл. Значення питомої швидкості росту штаму *P. maltophilia* ONU-329 при використанні середовища 3 також було мінімальним – 0,105 год⁻¹.

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз статистично підтвердив існування вірогідного розходження між показниками, що перевіряли. Достовірність підтверджена за допомогою порівняння табличного і розрахованих значень критерію Фішера. У наших випадках дотримується нерівність $F_{\text{табл}} < F_{\text{факт}}$ і визнається статистична значимість різниці між середніми значеннями: $F_{\text{табл}}(3,4) < F_{\text{факт}}(21,4)$ для показника оптичної щільності, та для показника КУО/мл – $F_{\text{табл}}(3,4) < F_{\text{факт}}(81,4)$.

У другій серії дослідів використовували водогінну воду для приготування живильних середовищ. Було показано, що якість води, яку використовували, суттєво не впливає на динаміку росту штаму *P. maltophilia* ONU-329. Результати дослідження наведені у таблиці 2.



Показники оптичної щільності штаму *Pseudomonas maltophilia* ONU-329
залежно від якості води

Indices of optical density of strain *Pseudomonas maltophilia* ONU-329
depending on water quality

Час куль- тивування, години	Дистильована вода			Водогінна вода		
	Середови- ще 1	Середови- ще 2	Середови- ще 3	Середови- ще 1	Середови- ще 2	Середови- ще 3
0	0,11±0,004	0,12±0,004	0,12±0,004	0,11±0,004	0,12±0,004	0,12±0,004
12	0,56±0,02	0,63±0,01	0,80±0,02	0,34±0,01	0,57±0,02	0,75±0,01
24	0,81±0,02	1,12±0,01	1,50±0,01	0,64±0,02	1,06±0,02	1,45±0,05
36	0,94±0,01	1,60±0,01	1,95±0,02	0,82±0,01	1,53±0,02	1,95±0,07
48	1,00±0,10	2,00±0,50	2,20±0,03	0,90±0,01	1,90±0,04	2,10±0,2
60	0,75±0,01	1,80±0,02	2,20±0,04	0,71±0,01	1,80±0,02	2,10±0,02
72	0,62±0,01	1,68±0,01	1,90±0,02	0,62±0,02	1,70±0,02	1,90±0,04

Отримані дані підтверджені результатами однофакторного дисперсійного аналізу: за розрахованими статистичними показниками $F_{\text{факт}} = 0,33$ у порівнянні з $F_{\text{таб}} = 3,4$. Таким чином, приймається нульова гіпотеза, яка свідчить про рівність середніх значень для обох вибірок.

Враховуючи, що і вихід біомаси при культивуванні на водогінній і дистильованій воді практично не відрізнялися між собою, у промислових умовах, виходячи з економічної доцільності, можна використовувати середовища, приготовлені на водогінній воді.

На другому етапі проводили оптимізацію складу живильного середовища для культивування бактерій за допомогою багатофакторного експерименту за методом ортогональних латинських квадратів з подальшою математичною обробкою отриманих даних. Матрицю планування складала за схемою 3_1^3 , яка дозволяла вивчити в умовах одного експерименту взаємний вплив на ріст культури трьох факторів на трьох рівнях. Облік результатів проводили через 24 години культивування.

Як фактори оптимізації використовували пептон, глюкозу та джерело мінерального фосфору у вигляді суміші солей KH_2PO_4 і Na_2HPO_4 .

У експерименті використовували досліджені чинники у кількості:



- пептон – 10,0 г/л, 15,0 г/л, 20,0 г/л (крок – 5,0 г/л);
- глюкоза – 2,0 г/л, 6,0 г/л, 10,0 г/л (крок – 4,0 г/л);
- фосфати (K_2HPO_4 і Na_2HPO_4) – 1,5 г/л : 3,0 г/л; 3,0 г/л : 6,0 г/л; 4,5 г/л : 9,0 г/л (крок – 1,5 г/л та 3,0 г/л).

У таблиці 3 наведені концентрації чинників, які брали у дослід з усіма можливими комбінаціями та показники параметрів оптимізації. В результаті отриманих даних були обчислені ефекти впливу усіх чинників на рівнях, які наведені у табл. 4.

Було з'ясовано, що максимальні ефекти впливу глюкози отриманні за використання концентрації 2,0 г/л. Максимальні ефекти впливу пептону зареєстровані за мінімальної концентрації цього компонента у живильному середовищі (10,0 г/л). Максимальні ефекти впливу фосфатів відповідають їх концентрації у співвідношенні 1,5 г/л : 3,0 г/л для K_2HPO_4 : Na_2HPO_4 , відповідно.

За вказаних комбінацій компонентів живильних середовищ показник оптичної щільності досягав значення 1,75 D, кількість клітин була максимальною і досягала значення $(96,6 \pm 18,57) \times 10^8$ КУО/мл.

Таблиця 3

Концентрації компонентів живильних середовищ (г/л), які використали у експерименті та показники оптимізації

Table 3

Concentration of the components of nutrient medium (g/l) used in the experiment and indicators of optimization

Варіант досліді	Концентрація компонентів живильних середовищ, г/л			Показники оптимізації	
	Пептон	Глюкоза	K_2HPO_4 : Na_2HPO_4	Оптична щільність	Чисельність клітин, КУО/мл $\times 10^8$
1	10,0	2,0	1,5 : 3,0	1,75	96,6±18,57
2	15,0	2,0	3,0 : 6,0	1,40	15,0±7,45
3	20,0	2,0	4,5 : 9,0	1,50	23,0±4,96
4	10,0	6,0	3,0 : 6,0	1,40	19,0±4,96
5	15,0	6,0	4,5 : 9,0	1,17	12,6±6,25
6	20,0	6,0	1,5 : 3,0	1,50	26,0±2,48
7	10,0	10,0	4,5 : 9,0	0,54	0,2±9,93
8	15,0	10,0	1,5 : 3,0	1,20	16,0±4,96
9	20,0	10,0	3,0 : 6,0	0,85	3,6±9,93



**Ефекти впливу компонентів живильних середовищ
та їх концентрацій на показники оптимізації**

**Effects of the components of culture media
and their concentrations on optimization performance**

Компоненти середовищ	Концентрація компонентів, г/л	Ефект (оптична щільність)	Ефект (КУО/мл)
Пептон	10	0,22	15,1
	15	0,01	-8,9
	20	-0,03	-5,96
Глюкоза	10	-0,04	-16,9
	6	0,07	-4,3
	2	0,3	21,3
КН ₂ РО ₄ : Na ₂ НРО ₄	1,5:3	0,2	22,7
	3:6	-0,06	-10,9
	4,5:9	-0,02	-11,5

Тобто, оптимальне співвідношення вуглець:азот варіювало від 1:4 до 1:5. Отримані дані можна вважати оптимальними для росту культури.

За результатами першого етапу оптимізації середовище має склад (г/л): КН₂РО₄ – 1,5, Na₂НРО₄ – 3,0, NaCl – 5,0, NH₄Cl – 1,0, пептон – 10,0, глюкоза – 2,0.

З метою подальшого підвищення продуктивності штаму *Pseudomonas maltophilia* ONU329 були проведені експерименти з вивчення впливу дріжджового екстракту на динаміку росту бактерій на живильному середовищі, що містить пептон (10,0 г/л) і глюкозу (2,0 г/л). Отримані результати наведені у таблиці 5.

Як бачимо з наведених у таблиці 5 даних, найкращі результати були отриманні при додаванні до середовища дріжджового екстракту у концентрації 5,0 г/л.

Таким чином, після завершення оптимізації з використанням методу ортогональних латинських квадратів та подальшим додатковим визначенням необхідної концентрації дріжджового екстракту, визначили остаточний склад живильного середовища для культивування *Pseudomonas maltophilia* ONU329 наступний (г/л): КН₂РО₄ – 1,5, Na₂НРО₄ – 3,0, NaCl – 5,0, NH₄Cl – 1,0, пептон – 10,0, глюкоза – 2,0, дріжджовий екстракт – 5,0.

Заключним етапом нашої роботи було вивчення впливу складу оптимізованого живильного середовища для культивування *Pseudomonas maltophilia* ONU329 на кількість біофлоків, що утворюються в процесі вилучення важких металів з розчинів із застосуванням мікробної біотехнології. Результати досліджень наведені на рис. 1.



Таблиця 5

Вплив дріжджового екстракту на динаміку росту штаму *Pseudomonas maltophilia* ONU329

Table 5

Effect of yeast extract on growth dynamics of *Pseudomonas maltophilia* ONU329 strain

Концентрація дріжджового екстракту, г/л	Значення показника оптимізації	
	Оптична щільність	Кількість життєздатних клітин (КУО/мл $\times 10^8$)
0	1,85	21,0 \pm 3,96
2,0	1,86	31 \pm 2,48
5,0	1,9	36,0 \pm 9,93

Як видно з наведених даних, кількість біофлоків, що утворюються в процесі очищення розчинів від важких металів, значною мірою залежить від складу живильного середовища, на якому культивували бактерії *Pseudomonas maltophilia* ONU-329. Максимальна кількість біофлоків (23,0 \pm 1,0 об.% та 25,0 \pm 2,0 об.%) утворювалася на середовищах 3 та оптимізованому.

Хімічний аналіз показав, що ступінь вилучення йонів Zn (II) на середовищі 3 та оптимізованому сягала 98,9 \pm 8,77% і 99,9 \pm 5,41%, у той час як на середовищах 1 і 2 – не перевищувала 50,8 \pm 6,36 % і 56,1 \pm 4,11% (рис. 2) [13].

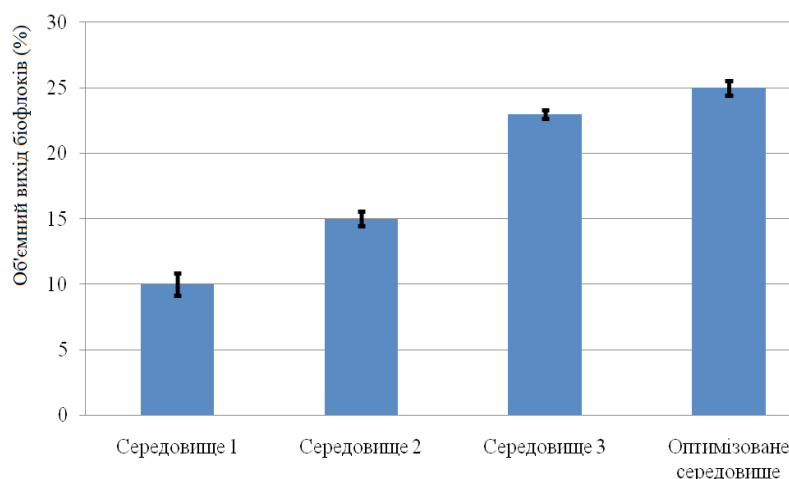


Рис. 1. Вплив складу живильного середовища для культивування *Pseudomonas maltophilia* ONU329 на обсяг біофлоків, що утворюються в процесі вилучення важких металів

Fig. 1. Influence of nutrient medium composition for cultivation of *Pseudomonas maltophilia* ONU329 on the volume of bioflocs produced during the extraction of heavy metals



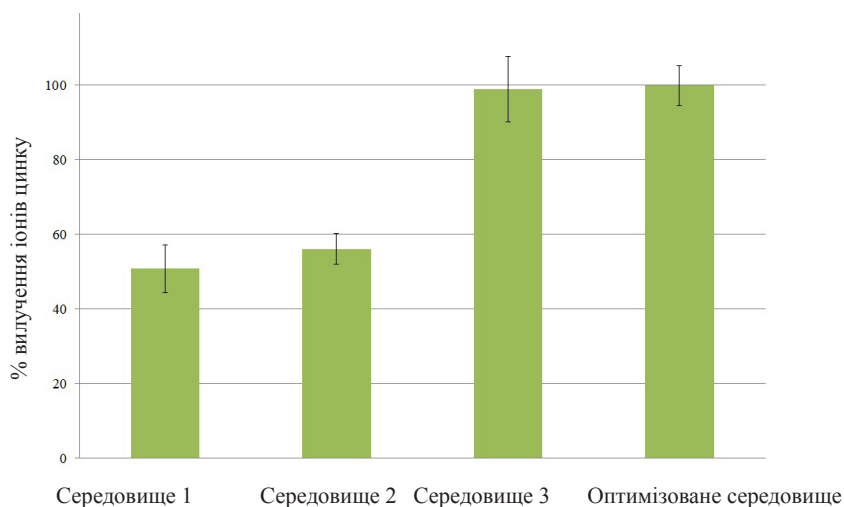


Рис. 2. Ступінь вилучення йонів цинку іммобілізованими клітинами *Pseudomonas maltophilia* ONU329, культивованими на живильних середовищах різного складу

Fig. 2. Extraction degree of zinc ions by immobilized cells of *Pseudomonas maltophilia* ONU 329, cultivated on nutrient media of different composition

Підсумовуючи отримані дані, можна рекомендувати для накопичення максимальної кількості біомаси *P. maltophilia* ONU-329 і отримання великої кількості біофлорів в процесі очищення розчинів від йонів важких металів, такі умови культивування бактерій:

– склад живильного середовища: NaCl – 5,0 г/л; NH₄Cl – 1,0 г/л; KН₂PO₄ – 1,5 г/л; Na₂HPO₄ – 3,0 г/л; пептон – 10,0 г/л; глюкоза – 2,0 г/л; дріжджовий екстракт – 5,0 г/л, вода дистильована або водопровідна – 1 л; рН = 7,2; температура культивування 29 °С.

Н.Ю. Васильєва, Е.Г. Горшкова

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

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ONU-329 – СОРБЕНТА ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ДЕСТРУКТОРА УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ

Реферат

Цель. Оптимизация состава питательной среды (ПС) для культивирования бактерий *Pseudomonas maltophilia* ONU-329 – сорбентов ионов тяжелых металлов и деструкторов углеводородов нефти и получения максимального количества биомассы бактерий и биофлор. **Методы.** Оптимизацию ПС для культивирования бактерий *P. maltophilia* ONU-329 проводили с помощью многофакторного эксперимента с последующей математической обработкой данных



методом ортогональних латинських квадратів. Культивування бактерій здійснювали в інкубаторі-шейкері New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R при 150 об/мін в течение 48 годин при температурі +29,0 °С. Математичку обробку експериментальних даних проводили шляхом розрахунку ефектів впливу факторів після проведення дисперсійного аналізу, адаптованого до методу латинських квадратів. **Результати.** Для накоплення максимальної кількості біомаси *P. maltophilia* ONU-329 і отримання великої кількості біофлокулів в процесі очищення розчинів від іонів важких металів подобрані умови культивування бактерій – склад ПС: KH_2PO_4 – 1,5 г/л, Na_2HPO_4 – 3,0 г/л, NaCl – 5,0 г/л, NH_4Cl – 1,0 г/л, пептон – 10,0 г/л, глюкоза – 2,0 г/л, дріжджовий екстракт – 5,0 г/л, вода – 1 л; рН 7,2; температура +29 °С. **Висновок.** Результати проведених експериментів з використанням методів оптимізації, ґрунтованих на матриці латинських квадратів, дозволили визначити оптимальні умови для накоплення біомаси штаму *P. maltophilia* ONU-329. Отримана поживна середовище сприяє приросту біомаси штаму *P. maltophilia* ONU-329 і збільшенню кількості біофлокулів в 1,7 рази.

Ключові слова: поживна середовище, оптимізація, метод ортогональних латинських квадратів, *Pseudomonas maltophilia*.

N.Yu. Vasylieva, O.G. Gorshkova

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

OPTIMIZATION OF THE NUTRIENT MEDIUM FOR CULTIVATION OF *PSEUDOMONAS MALTOPHILIA* ONU329 STRAIN – SORBENT OF HEAVY METALS IONS AND DESTRUCTOR OF OIL HYDROCARBONS

Summary

Aim. Optimization of the nutrient medium (NM) for cultivation of *Pseudomonas maltophilia* ONU-329 strain – sorbents of heavy metals ions and destructors of oil hydrocarbons to obtain the maximum amount of biomass of bacteria and bioflocules. **Methods.** Optimization of the NM for the cultivation of bacteria *P. maltophilia* ONU-329 was performed using multifactorial experiment with subsequent mathematical processing of the data by the method of orthogonal Latin squares. Cultivation of bacteria was carried out in incubator shaker New Brunswick Scientific INNOVA 43R Incubator Shaker at 150 rpm for 48 hours at temperature +29.0 °C. Mathematical processing of experimental data was performed by calculating the effects of impact factors, after conducting the analysis of variance, adapted to the method of Latin squares. **Results.** To accumulate the maximum amount of biomass of *P. maltophilia* ONU-329 and a large number of bioflocules in the process of purification from heavy metals there were selected the conditions of cultivation of bacteria – composition NM: KH_2PO_4 – 1.5 g/l, Na_2HPO_4 – 3.0 g/l, NaCl – 5.0 g/l, NH_4Cl – 1.0 g/l, peptone – 10.0 g/l, glucose 2.0 g/l, yeast extract – 5.0 g/l, distilled water or water, 1 litre; pH 7.2; temperature +29 °C. **Conclusion.** The experimental results on the study of indicators of optical density and number of colonies grown on medium MPA, using the methods of optimiza-



tion based of the matrix of Latin squares, allowed to determine the best conditions for the accumulation of biomass of *P. maltophilia* ONU-329 strain. The obtained culture medium contributes to the increase of biomass of *P. maltophilia* ONU-329 strain and increases the number of bioflocules in 1.7 times.

Key words: nutrient medium, optimization, Latin squares, *Pseudomonas maltophilia*.

Список використаної літератури

1. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. – М.: Наука, 1985. – 296 с.
2. Васильєва Н.Ю., Гудзенко Т.В., Панченко М.М., Іваниця В.О. Оптимізація складу поживного середовища для ентомопатогенних бактерій штаму *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4(20). – С. 52–63.
3. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Бухтіяров А.Є., Захарія О.М., Лісютин Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Вилучення міді (II) та нікелю (II) із концентрованих водних розчинів глиною, хітозаном та іммобілізованими мікроорганізмами // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 36–43.
4. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Лісютин Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 72–80.
5. Гудзенко Т.В., Іваниця В.О., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Дімова М.І. Вплив поживного середовища на здатність нафтоокиснювальних бактерій роду *Pseudomonas* продукувати біосурфактанти // Scientific Journal “ScienceRise” – 2014, № 5/1(5). – С. 7–11.
6. Гудзенко Т.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Ракітська С.І., Лісютин Г.В., Іваниця В.О. Біотехнологія оздоровлення морського середовища з використанням іммобілізованих мікроорганізмів / Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія. Біологія – 2015, № 3-4 (64). – С. 146–149.
7. Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов: Учеб. пособие / Под ред. В.П. Гончаровой.— Л.: Лен. ун-т, 1983. — 188 с.
8. Максимов В.Н., Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н. Оптимизация состава питательной среды методом планирования эксперимента // Практикум по микробиологии. – М., 1976. – С. 172–181.
9. Нгуен Виет Тиен. Гетеротрофные бактерии техногенных субстратов как основа биопрепаратов-деструкторов нефтяных углеводородов и поверхностно-активных веществ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ульяновск, 2013. – 174 с.
10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Наука, – 1978. – 333 с.



11. Mougín C., Boukcim H., Jolivalt C. *Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology)*. – Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 2009. – 17. – P. 123–149.
12. Obayori O.S., Ilori M.O., Obayori O. S., Adebuseye S.A., Oyetibo G.O., Omotayo A.E. Amund Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas sp. strain* LP1 // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – 25, № 9. – P. 1615–1623.
13. Патент України № 90119, МПК C02F 1/24. Спосіб мікробіологічного очищення води від іонів цинку / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Баранов О.О. (Україна). – N 90119; заявл. 24.12.2013; опубл. 12.05.2014, Бюл. N 9.

References

1. Biryukov VV, Kanter VM. **Optimization of periodic process of microbiological synthesis**. Moscow: Nauka, 1985. 296 p.
2. Vasylieva NYu, Gudzenko TV, Panchenko MM, Ivanytsia VO. Optimiser warehouse posevnoho protection for entomopatogenic the staph bacteria *Bacillus thuringiensis* ONU 15. *Microbiology and biotechnology*. 2012;4(20):52–63.
3. Gudzenko TV, Voliuvach OV, Belyaeva TO, Konup IP., Bukhtiyarov AE, Zachariah AM., Lisyutin GV, Gorshkova EG, Ivanytsia VO. Extraction of copper (II) and nickel (II) from concentrated aqueous solutions by clay, chitosan and immobilized microorganisms. *Microbiology and biotechnology*. 2012;(4):36-43.
4. Gudzenko TV. Voliuvach OV, Belyaeva TO, Puzyreva IV., Lisyutin GV, Gorshkova OG, Ivanytsia VO. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus. *Microbiology&Biotechnology*. 2013;(4):72–80.
5. Gudzenko TV, Ivanytsia VO., Voliuvach A.V., Gorshkova OG, Belyaeva TO, Konup IP, Dimova M. Influence of nutrient medium on the ability nattokinaise bacteria of the genus *Pseudomonas* to produce biosurfactant. *Scientific Journal “ScienceRise”* 2014;(5):7-11.
6. Gudzenko TV, Gorshkova OG, Belyaeva TO, Rakitskaya SI., Lisyutin GV, Ivanytsia VO. Biotechnology for the improvement of the marine environment with the use of immobilized microorganisms. *Scientific notes of Ternopil national pedagogical University named after Volodymyr Hnatiuk. Series. Biology*. 2015;(3-4):146-149.
7. Zhdan-Pushkina SM. *Fundamentals of growth of cultures of microorganisms: Proc. the manual*. Leningrad: Len. University, 1983. 188 p.
8. Maksimov VN, Pimenova MN, Grechushkina NN. Optimization of the nutrient medium by the method of experiment planning. *Workshop on Microbiology*. Moscow: Nauka, 1976: 172-181.
9. Nguyen Viet Tien. Heterotrophic bacteria technogenic substrates as a base of biopreparation-destroyer of oil hydrocarbons and surfactants. **PhD thesis**, Ulyanovsk, 2013. 174 p.
10. Pert SJ. *Fundamentals of cultivation of microorganisms and cells*. Moscow: Science, 1978. 333 p.



11. Mougин C, Boukcim H, Jolivalt C. Advances in Applied Bioremediation (Soil Biology). Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 2009;(17):123-149.
12. Obayori OS, Ilori MO, Obayori OS, Adebusoye SA, Oyetibo GO, Omotayo AE. Amund Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas sp. strain* LP1. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009;(25):1615-1623.
13. Patent of Ukraine 90119/14, MBI C02F 1/24. Method for microbiological purification of water from ions of zinc. Ivanytsia VO, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Gorshkova OG, Belyaeva TO, Konup IP, Baranov OO. (UA). - N 90119; zayavl. 24.12.2013; opubl. 12.05.2014, Byul. N 9.

Стаття надійшла до редакції 24.02.2016 р.



УДК 663.031.1

А.П. Петросьянц

Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна,
тел.: (048) 712 42 68, e-mail: arsenico78@mail.ru

ВИДІЛЕННЯ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ З *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* ЛМ-6 ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП КАТАЛІТИЧНОГО ЦЕНТРУ ФЕРМЕНТУ

Мета. Виділення α -галактозидази з *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Ідентифікація функціональних груп каталітичного центру ферменту. **Методи.** Мікробіологічні – для культивування та накопичення біомаси біфідобактерій. Біотехнологічні – для ідентифікації функціональних груп каталітичного центру гідролітичного ферменту. **Результати.** За матеріалами дослідження отриманий безклітинний екстракт ферменту α -галактозидази, також встановлена його активність. Проведено очищення ферменту. Ідентифіковані функціональні групи каталітичного центру α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Встановлено, що в активному центрі α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 присутні карбоксильна та імідазольна групи білків, які відіграють певну роль у гідролізі галактоолігоцукридів. **Висновки.** Вперше ідентифіковані функціональні групи каталітичного центру ферменту α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Встановлено, що в активному центрі α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 присутні карбоксильна та імідазольна групи білків.

Ключові слова: функціональні групи, каталітичний центр, α -галактозидаза *Bifidobacterium longum* ЛМ-6.

Розвиток біотехнології великою мірою визначається дослідженнями в галузі інженерної ензимології. Завдяки досягненням у цій галузі прикладної біотехнології розв'язуються такі проблеми, як ліквідація дефіциту продуктів харчування, лікувальних засобів, охорона навколишнього середовища. Важливою задачею застосування ферментів є удосконалення технологій виготовлення продуктів харчування, їх якості і безпечності.

В останні роки особливе місце в структурі харчування посідають соєві продукти, розвиваються нові технології з використанням ферментів. Серед гідролаз, що знайшли застосування в цьому напрямі, важливе місце посідають карбогідрози (о-глікозидгідролази, КФ 3.2.1.), які здійснюють гідроліз оліго- та поліцукридів.

Типовий фермент цього класу – α -галактозидаза (3.2.1.22) – відноситься до глікозидаз. Фермент здійснює гідроліз α -1,6-D-галактозидних зв'язків, відщеплюючи галактозидні залишки з нередукувального кінця галактоолігоцукридів [1]. При цьому розщеплюється зв'язок між C_1 атомом залишку галактози і глікозидним атомом кисню [2].

© А.П. Петросьянц, 2016



Активними продуцентами α -галактозидази є рослини, бактерії, гриби [3]. α -галактозидази – ефективні каталізатори, які здійснюють з майже 100%-вим виходом і з великою швидкістю гідролітичну реакцію.

Хоча фізико-хімічні властивості більшості карбоксигідролаз добре вивчені, механізм їх дії здебільшого не з'ясований. Доступних відомостей про будову каталітичного центру α -галактозидаз практично немає, особливо це стосується ідентифікації функціональних груп каталітичного центру α -галактозидаз, виділених з мікробів.

Мета роботи: виділити фермент α -галактозидазу з *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 та ідентифікувати функціональні групи каталітичного центру α -галактозидаз.

Матеріали та методи дослідження

Проведені дослідження з ідентифікації функціональних груп α -галактозидази, виділеної з *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 [4]. Даний штам отримано з колекції мікроорганізмів кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування, Одеської національної академії харчових технологій. Культивування мікробів здійснювали на середовищі Блаурокка і середовищі MRS (De Man, Rogosa, Sharpe). Активність оцінювали за вимірюванням адсорбції *p*-нітрофенолу, який утворюється внаслідок дії на *p*-нітрофеніл α -D-галактопіранозид за довжини хвилі 400 нм [5]. Дезінтеграцію клітин здійснювали на приладі УЗДН-А (диспергатор ультразвуковий).

Для отримання безклітинного екстракту сиру біомасу суспендували у 0,07 М фосфатному буфері (рН 7,4), якій містить 5м М₂-меркаптоетанолу, механічно руйнували клітини в дезінтеграторі протягом 10 хвилин і центрифугували гомогенат при 30 000 g протягом 30 хвилин. Отриману надосадову рідину використовували як безклітинний екстракт.

Осідання ферменту з екстракту проводили етанолом або *n*-пропанолом при 4 °С. Для формування осаду суміш витримували 30 хвилин. Осад відділяли на рефрижераторній центрифугі та висушували ліофільно. Потім осад розчиняли у мінімальному об'ємі фосфатно-цитратного буфера (рН 4,5) та здійснювали висолювання сульфатом амонію при наповнюванні 55–56%.

Подальше очищення проводили гель-фільтрацією на сефадексі G-25 фірми Pharmacia. Розчин ферменту наносили на колонку (1,6x65 см) та елюювали фосфатно-цитратним буфером (0,15 моль/дм³) рН 4,5 зі швидкістю 30–35 см³/год протягом однієї години. Фракції елюату (6 см³) збирали за допомогою колектора фракцій та визначали в них місткість білка за методом Лоурі, а також активність α -галактозидази. Потім фермент очищували гель-фільтрацією на колонці з сефадексом G-100 (2,5x35 см). Елюювання проводили тим же буферним розчином зі швидкістю 8–10 см³/год протягом 30 хвилин.

Гомогенність ферменту визначали методом електрофорезу у ПААГ. Електрофорез проводили у 7,5% гелі при рН 7,5 (трис-гліциновий буфер) протягом 2,5–3,5 годин за напруги 260 В та силі струму 5 мА. Для забарвлення гелів використовували барвник 10% амідочорний 10 В. При визначення мо-



лекулярної маси α -галактозидази методом гель-фільтрації на колонці з сефадексом G-200 використовували білки-маркери: сироватковий альбумін (70 кДа) та γ -глобулін (23 кДа) за допомогою блакитного декстрану. Молекулярна маса α -галактозидази дорівнює 112 кДа. Отриманий фермент шляхом висолювання сульфатом амонію з подальшою гель-фільтрацією на сефадексі G-25 та G-100 підлягав 70-разовому очищенню, питома активність склала 422,9 од/мг. При електофорезі фермент був гомогенним.

Результати та обговорення

Для характеристики функціональних груп активного центру α -галактозидази використали декілька методів (метод визначення дисоціації іонних груп, метод розрахування теплоти іонізації карбоксильної та імідазольної груп), які дозволили ідентифікувати хімічну природу цих груп.

На рис. 1 представлені криві залежності $V=f(\text{pH})$, отримані за гідролізу рафінози (2од. на 150 мг, за $T=10$ і 30 °C та оптимальному pH 6,0). Профіль кривих «активність – pH» має екстремальний характер. Форми гілок кривих характерні для дисоціації іонних груп. Присутність «кислої» (верхня крива) та «лужної» (нижня крива) кривих свідчить про участь у розриві α -1,6-глікозидних зв'язків у рафінози двох каталітично активних груп амінокислот.

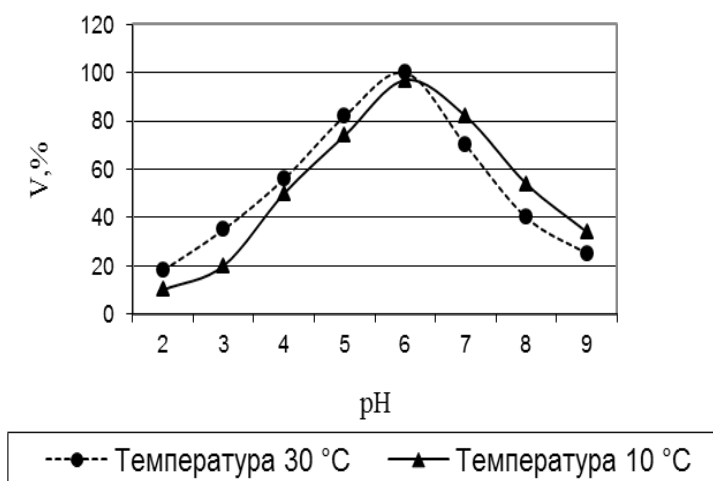


Рис. 1. Залежність активності α -галактозидази від pH при різних температурах.

Примітка: V – активність ферменту.

Fig. 1. Dependence of activity of α -galactosidase from pH at various temperatures.

Note: V – enzyme activity

Математичне описання гілок кривих може бути представленим у вигляді таких рівнянь: для гілки, що йде догори (1):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{\text{pK}_1 - \text{pH}}}$$

для гілки, що йде донизу (2):

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + 10^{pH - pK_2}}$$

де V – активність ферменту за повного наповнення його субстратом,
 V_{\max} – активність ферменту за оптимального рН,
 K_1 і K_2 – константи дисоціації каталітично активних груп α -галактозидази.
 З рівнянь (1) і (2) впливає, що $V = V_{\max} / 2$ при $pH = pK_1$

Таким чином, пряма проведена на графіку $V=f(pH)$, паралельно вісі абсцис на відстані $V_{\max} / 2$, дає точки перетину на гілках кривих, що відповідають рК каталітично активних груп. Як видно з рис. 1, вони відповідають карбоксильній та імідазольній групам білків.

Для теоретичної кривої $pH_{\text{опт}} = (pK_1 + pK_2) / 2$. Теоретичні значення $pH_{\text{опт}}$ зараховані за pK_1 і pK_2 , а також отримані експериментально, вельми близькі між собою – $pH_{\text{опт. за } 30^\circ C} = 5,7$; $pH_{\text{опт. за } 10^\circ C} = 6,0$. Це свідчить про те, що залежність $V=f(pH)$ визначається іонізацією функціональних груп ферменту α -галактозидази.

Для підтвердження участі карбоксильних та імідазольних груп, що беруть участь у розриві α -1,6-глікозидних зв'язків у рафінозі, розраховали теплоту іонізації цих груп (ΔH) за рівнянням Вант-Гоффа:

$$\Delta H = 2,303 \times R \times (pK_2 + pK_1) \times \frac{T_1 + T_2}{T_2 - T_1}$$

де ΔH – теплота іонізації;

R – газова стала, що дорівнює $8,315 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$;

pK_1 – константа іонізації за $T=10^\circ C$;

pK_2 – константа іонізації за $T=30^\circ C$.

Розраховані значення величин рН та ΔH представлені в табл. 1.

Таблиця 1

**Теплота іонізації каталітично активних груп
 α - галактозидази *B. longum* ЛМ-6**

Table 1

**Warmth of ionization catalytically active groups
 α -galactosidase *B. longum* ЛМ-6**

Гілки кривої	рК		ΔpK	ΔH , к Дж/моль
	10°	30°		
Вверх	4,03	3,91	0,12	9,84
Вниз	8,00	7,49	0,51	41,82

$$\Delta H_{\text{вверх}} = 2,303 \times 8,315 \times 0,12 \times \frac{283 \times 303}{20} = 9,84 \text{ кДж/моль}$$



$$\Delta H_{\text{вннз}} = 2,303 \times 8,315 \times 0,51 \times \sqrt{\frac{283 \times 303}{20}} = 41,82 \text{ кДж/моль}$$

Величини pK_1 та pK_2 визначені за зсувом гілок $V=f(pH)$, за різних температур. Як виходить з даних таблиці 1 значення ΔH відповідають карбоксильним та імідазольним групам, що є важливим критерієм ідентифікації функціональних груп активного центру ферменту [6].

В результаті досліджень вперше ідентифіковані функціональні групи каталітичного центру ферменту α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6; встановлено, що в активному центрі ферменту α -галактозидази *Bifidobacterium longum* ЛМ-6 існує карбоксильна та імідазольна групи білків.

УДК 663.031.1

A.P. Petrosyants

Odesa National Academy of Food Technologies, 112, Kanatna st., Odesa, 65039, Ukraine,
tel.: (048) 712 42 68, e-mail: arsenico78@mail.ru

ISOLATION OF AN α -GALACTOSIDASE FROM BIFIDOBACTERIUM LONGUM ЛМ-6 AND IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL GROUPS OF THE CATALYTIC CENTER OF ENZYME

Summary

Aim. Receiving enzyme of an α -galactosidase of *Bifidobacterium longum* LM-6. Identification of the functional groups of the catalytic site of the enzyme. **Methods.** Cultivation and accumulation of biomass of bifidobacteria. Identification of functional groups of the catalytic center of hydrolytic enzyme. **Results.** On acellular extract of enzyme of an α -galactosidase has been received, based on research and also activity of the studied enzyme is defined. The purification of the enzyme by means of the various organic solvents is carried out. The functional groups of the catalytic center of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* LM-6 have been identified. It is established that at the active center of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* LM-6 there are carboxyl and imidazolny groups of proteins, which take part in hydrolysis of galaktooligosakharid. **Conclusions.** The functional groups of the catalytic site of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* LM-6 are identified for the first time. It is established that at the active center of an α -galactosidase *Bifidobacterium longum* LM-6 there are carboxyl and imidazolny groups of proteins.

Key words: functional groups, catalytic center, α -galactosidase, *Bifidobacterium longum* LM-6.



УДК 663.031.1

А.П. Петросьянц

Одесская национальная академия пищевых технологий,
ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина, тел.: (048) 712 42 68,
e-mail: arsenico78@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ИЗ *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* ЛМ-6, И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦЕНТРА ФЕРМЕНТА

Реферат

Цель. Получение фермента α -галактозидазы *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Идентификация функциональных групп каталитического центра фермента.

Методы. Микробиологические – для культивирования и накопления биомассы бифидобактерий. Биотехнологические – для идентифицирования функциональных групп каталитического центра гидролитического фермента. **Результаты.** По материалам исследования был получен безклеточный экстракт фермента α -галактозидазы, так же была определена активность фермента. Была проведена очистка фермента при помощи различных органических растворителей. Произведена идентификация функциональных групп каталитического центра фермента α -галактозидазы *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Установлено, что в активном центре исследуемого фермента присутствуют карбоксильная и имидазольная группы белков, которые участвуют в гидролизе галактоолигосахаридов. **Выводы.** Впервые идентифицированы функциональные группы каталитического центра фермента α -галактозидазы *Bifidobacterium longum* ЛМ-6. Установлено, что в активном центре исследуемого фермента присутствуют карбоксильная и имидазольная группы белков.

Ключевые слова: функциональные группы, каталитический центр, α -галактозидаза, *Bifidobacterium longum* ЛМ-6.

Список використаної літератури

1. Goulas T., Goulas A., Tzortzis G., Gibson G.R. A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties, gene molecular cloning and heterologous expression // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2009. – № 82. – P. 471–477.
2. O'Connell K.J., O'Connell Motherway M., O'Callaghan J., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Ventura M., Stanton C., van Sinderen D. Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003 // *Appl. Environ Microbiol.* – 2013. – № 79. – P. 6280–6292.
3. Варбанец Л.Д., Борзова Н.В. Использование методов химической модификации для стабилизации грибных гликозидаз // «*Біотехнологія*». – 2011. – Т. 4. – № 6. – С. 36–41.
4. Капрельяну Л.В., Петросьянц А.П. Ферментативный гидролиз галактоолисахаридов // *Биотехнология – состояние и перспективы развития: материалы Первого Международного конгресса, Москва, 14-18 окт. 2002 г.* – М., 2002. – С. 380–381.



5. Underkofler L.A., Wulf M.L. Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii* // Society for Industrial Microbiology. – 2000. – Vol. 21, Ch.35. – P. 339–348.

6. Корнеева О.С., Жеребцов Н.А., Черемушкина И. Идентификация каталитически активных групп // Биохимия. – 2001. – Вып. 3 – С. 412–418.

References

1. Goulas T, Goulas A, Tzortzis G, Gibson GR. A novel alpha-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* with transgalactosylating properties, gene molecular cloning and heterologous expression. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2009. – № 82. – p. 471-477.

2. O’Connell KJ, O’Connell Motherway M, O’Callaghan J, Fitzgerald GF, Ross RP, Ventura M, Stanton C, van Sinderen D. Metabolism of four α -glycosidic linkage-containing oligosaccharides by *Bifidobacterium breve* UCC2003. // Appl Environ Microbiol. – 2013. – №79. – p. 6280-6292.

3. Varbanets LD, Borzova NV. Ispolzovanie metodov himicheskoy modifikatsii dlya stabilizatsii gribnyih glikozidaz // «Biotekhnologiya». – 2011. – Т. 4. – № 6. p. 36-41.

4. Kapreliants LV, Petros’yants AP. **Fermentativniy gidroliz galaktoolisakhari-dov** // Biotekhnologiya – sostoyanie i perspektivy razvitiya: materialy Pervogo Mezhdunarodnogo kongresa, Moskva, 14-18 oct. 2002 г. – М., 2002. – С. 380-381.

5. Underkofler LA, Wulf ML. Isolation and characterization of alpha-galactosidase from *Pichia guilliermondii* // Society for Industrial Microbiology. – 2000. – Vol.21, Ch.35.– P.339-348.

6. Korneeva OS, Zherebtsov NA, Cheremushkina I. Identifikatsiya kataliticheskii aktivnyih grupp // Biohimiya. – 2001. – Vyip.3 – p. 412-418.

Стаття надійшла до редакції 02.02.2016 р.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»
У 2015 РОЦІ**

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Авдєєва Л.В. див. Нечипуренко О.О.</i>	1	87
<i>Авдєєва Л.В. див. Нечипуренко О.О.</i>	2	41
<i>Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д., Іваниця В.О.</i> Оптимізація умов культивування <i>Achromobacter</i> sp. 7a – продуцента α-амілази	1	21
<i>Андріяш Г.С., Заболотна Г.М., Ткаченко А.Ф., Шульга С.М.</i> Характеристика штаму <i>Brevibacterium flavum</i> IMB B-7446 та оптимізація біосинтезу треоніну	2	68
<i>Бабенко Д.О. див. Ліманська Н.В.</i>	2	27
<i>Бабій С.В., Лейбенко Л.В., Фесенко А.Ю., Радченко Л.В., Смутько О.Ю., Бояльська О.Г., Міроненко А.П.</i> Філогенетичний аналіз гену нейрамінідази вірусів грипу А(Н3N2), виділених в Україні в сезоні 2013–2014 рр.	2	20
<i>Баранова Г.В. див. Затовська Т.В.</i>	3	58
<i>Бережна Д.С., Іващенко О.А., Поліщук В.П.</i> Оцінка епізоотичної ситуації вірусу хвороби Марєка на території України	1	14
<i>Білявська Л.О.</i> Біосинтез ауксинів ґрунтовими стрептоміцетами – антагоністами фітопатогенних мікроорганізмів і нематод	1	36
<i>Бобир В.В. див. Палій Г.К.</i>	4	67
<i>Боброва О.С., Крістофферсен Й.Б., Іваниця В.О.</i> Метагеномний 16S рРНК аналіз мікробного різноманіття Чорного моря в районі острова Зміїний	2	6
<i>Бондар О.С. див. Демченко Н.Р.</i>	4	53
<i>Бордунос К.С. див. Нечипуренко О.О.</i>	2	41
<i>Бояльська О.Г. див. Бабій С.В.</i>	2	20
<i>Бровко І.С., Титова Л.В., Іутинська Г.О.</i> Вплив ендofітних бактерій сої на формування соєво-ризобіального симбіозу і ризосферне мікробне угруповання	4	36
<i>Буркот В.М. див. Палій Г.К.</i>	4	67
<i>Варбанець Л.Д. див. Авдіюк К.В.</i>	1	21
<i>Василюк О.М. див. Гармашева І.Л.</i>	2	49
<i>Венгер А.М., Волкова Н.Е.</i> Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного	1	60
<i>Висеканцев І.П. див. Пономарьова В.Л.</i>	4	15



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Висотіна І.Б., Воронкова О.С., Вінніков А.І. Моніторинг грибів – контамінантів хлібобулочних виробів	3	50
Вінніков А.І. див. Висотіна І.Б.	3	50
Вінніков А.І. див. Сіда Л.Л.	2	59
Водзінська Н.Ю. див. Семенець А.С.	3	67
Волкова Н.Е. див. Венгер А.М.	1	60
Волювач О.В. див. Іваниця В.О.	4	28
Воробйова Н.В., Корнелюк О.І. Оптимізація бактеріальної експресії рекомбінантного білка АІМР1/Р43 – компонента мультисинтетазного комплексу людини при культивуванні штаму <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)RIL	4	6
Воронкова О.С. див. Висотіна І.Б.	3	50
Воронкова О.С. див. Сіда Л.Л.	2	59
Галкін Б.М. див. Семенець А.С.	3	67
Гармашева І.Л., Василюк О.М., Коваленко Н.К., Олеценко Л.Т. Дослідження природи антагоністичної дії штамів <i>Lactobacillus plantarum</i> щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів	2	49
Гнатуш С.О. див. Масловська О.Д.	2	34
Голота Ю.В. див. Путніков А.В.	2	89
Гончар О.О. див. Палій Г.К.	4	67
Горшкова О.Г. див. Іваниця В.О.	4	28
Гридіна Т.Л. див. Палій Г.К.	4	67
Гудзенко Т.В. див. Іваниця В.О.	4	28
Гудзь С.П. див. Дорош Л.С.	3	76
Давранов К.Д. див. Муродова С.С.	4	61
Декіна С.С. див. Романовська І.І.	3	30
Декіна С.С., Романовська І.І., Сотнікова О.П. Лізоцимвмісний препарат «штучна сльоза»: отримання, властивості	4	46
Демченко Н.Р., Курмакова І.М., Бондар О.С., Третяк О.П. Вплив четвертинних солей амонію на ріст сульфатвідновлювальних бактерій	4	53
Дорош Л.С., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Вплив нітрату на сульфідогенну активність бактерій <i>Desulfomicrobium</i> sp. CRR3	3	76
Дудка І.О. див. Поєдинок Н.Л.	1	77
Жулько І.Д., Ліманська Н.В., Мілкус Б.Н., Іваниця В.О. Віруси та вірусні хвороби винограду (<i>Vitis</i> sp.)	3	6
Заболотна Г.М. див. Андріяш Г.С.	2	68
Загородня С.Д. див. Затовська Т.В.	3	58
Закордонець Л.В. див. Путніков А.В.	2	89



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Затовська Т.В., Нестерова Н.В., Баранова Г.В., Рибалко С.Л., Загородня С.Д. Детекція специфічних антитіл до ВІПГ-1 за допомогою оптичного біосенсора	3	58
Зубов П.М. див. Пономарьова В.Л.	4	15
Іваниця В.О. див. Авдіюк К.В.	1	21
Іваниця В.О. див. Боброва О.Є.	2	6
Іваниця В.О. див. Жунько І.Д.	3	6
Іваниця В.О. див. Ліманська Н.В.	2	27
Іваниця В.О. див. Сергєєва Ж.Ю.	1	44
Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Кортаєва Н.В., Волювач О.В., Гудзенко Т.В., Остапчук А.М. Склад жирних кислот ліпідів штаму <i>Bacillus</i> sp. ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний	4	28
Іващенко О.А. див. Бережна Д.С.	1	14
Іутинська Г.О. див. Бровко І.С.	4	36
Коваленко Н.К. див. Гармашева І.Л.	2	49
Коваленко І.В. див. Палій Г.К.	4	67
Копилов Є.П., Цехмістер Г.В. Целюлазна активність гриба <i>Acromonium</i> sp. 502, виділеного з уражених рослин огірків	2	80
Корнелюк О.І. див. Воробйова Н.В.	4	6
Кортаєва Н.В. див. Іваниця В.О.	4	28
Крістофферсен Й.Б. див. Боброва О.Є.	2	6
Курмакова І.М. див. Демченко Н.Р.	4	53
Левицький А.П. див. Романовська І.І.	3	30
Лейбенко Л.В. див. Бабій С.В.	2	20
Ліманська Н.В. див. Жунько І.Д.	3	6
Ліманська Н.В., Бабенко Д.О., Ямборко Г.В., Іваниця В.О. Виявлення генів плантарицинів у штамів <i>Lactobacillus plantarum</i> – антагоністів фітопатогенних бактерій	2	27
Масловська О.Д., Гнатуш С.О. Окисна модифікація білків та питома активність супероксиддисмутази бактерій <i>Desulfurotonas acetoxidans</i> ІМВ В-7384 за впливу ферум цитрату	2	34
Михайлова О.Б. див. Поєдинок Н.Л.	1	77
Мілкус Б.Н. див. Жунько І.Д.	3	6
Міроненко А.П. див. Бабій С.В.	2	20
Муродова С.С., Давранов К.Д. Аналіз плазмідного складу ДНК солестійких штамів ризосферних мікроорганізмів	4	61
Назарчук О.А. див. Палій Г.К.	4	67
Нестерова Н.В. див. Затовська Т.В.	3	58



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Нечипуренко О.О., Хархота М.А., Авдеєва Л.В. Вплив джерел карбону, нітрогену та солей металів на продуктивність каротинсинтезувальних штамів <i>Bacillus subtilis</i> 1.1 та <i>B. Amyloliquefaciens</i> УКМ в-5113	1	87
Нечипуренко О.О., Хархота М.А., Бордунос К.С., Авдеєва Л.В. Ріст і утворення каротинів штамами <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113 та <i>B. subtilis</i> 1.1 в умовах глибинного культивування	2	41
Овсепян А.М. див. Романовська І.І.	3	30
Олещенко Л.Т. див. Гармашева І.Л.	2	49
Онасенко О.С. див. Пономарьова В.Л.	4	15
Остапченко Л.І. див. Путніков А.В.	2	89
Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика та ідентифікація штаму <i>Bacillus</i> sp. ONU14 з ентомопатогенною активністю	1	6
Остапчук А.М. див. Іваниця В.О.	4	28
Остапчук А.М. див. Путніков А.В.	2	89
Палій Г.К., Назарчук О.А., Бобир В.В., Гончар О.О., Гридіна Т.Л., Палій Д.В., Коваленко І.В., Буркот В.М. Оцінка антибактеріальних та протигрибкових властивостей сучасних антисептиків	4	67
Палій Д.В. див. Палій Г.К.	4	67
Пауліна Я.Б. див. Пилипенко І.В.	3	83
Перетятко Т.Б. див. Дорош Л.С.	3	76
Пилипенко І.В., Пауліна Я.Б., Пилипенко Л.М., Ямборко Г.В. Склад мікробних контамінантів овочевої сировини	3	83
Пилипенко Л.М. див. Пилипенко І.В.	3	83
Поєдинок Н.Л., Михайлова О.Б., Ходаковський В.М., Дудка І.О. Вплив на ростову активність посівного матеріалу культивованих макроміцетів низькоінтенсивного лазерного випромінювання	1	77
Поліщук В.П. див. Бережна Д.С.	1	14
Пономарьова В.Л., Висеканцев І.П., Онасенко О.С., Зубов П.М. Вивчення кріоушкоджень вільних та іммобілізованих в гелі альгінату натрію клітин дріжджів <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	15
Путніков А.В., Голота Ю.В., Сергійчук Т.М., Остапчук А.М., Загородонець Л.В., Остапченко Л.І., Толстанова Г.М. Кількісні та функціональні показники кишкової нормобіоти щурів	2	89
Радченко Л.В. див. Бабій С.В.	2	20
Рибалко С.Л. див. Затовська Т.В.	3	58
Рой А.О., Харкевич О.С. Міколітична активність фосфатмобілізуювальних ґрунтових бактерій роду <i>Bacillus</i> Cohn	1	66
Романовська І.І. див. Декіна С.С.	4	46



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Романовська І.І., Левицький А.П., Декіна С.С., Овсепян А.М. Мукоадгезивний гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином	3	30
Сафронова Л.А. Вплив амінокислот на літичну активність штамів <i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> subsp. <i>Plantarum</i>	1	50
Семенець А.С., Водзінська Н.Ю., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Утворення біоплівки <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 502 за присутності екзогенного нізина	3	67
Сергєєва Ж.Ю., Іваниця В.О. Плазмідні профілі штамів бактерій-антагоністів роду <i>Bacillus</i>	1	44
Сергійчук Т.М. див. Путніков А.В.	2	89
Сіда Л.Л., Воронкова О.С., Сірокваша О.А., Шевченко Т.М., Вінніков А.І. Вплив антисептиків і дезінфекційних препаратів на плівкоутворювальні бактерії	2	59
Сірокваша О.А. див. Сіда Л.Л.	2	59
Смутько О.Ю. див. Бабій С.В.	2	20
Сотнікова О.П. див. Декіна С.С.	4	46
Титова Л.В. див. Бровко І.С.	4	36
Тігунова О.О., Шульга С.М. Використання мутантним штамом <i>C. acetobutylicum</i> лігноцелюлозної сировини як субстрата	3	41
Ткаченко А.Ф. див. Андріяш Г.С.	2	68
Толстанова Г.М. див. Путніков А.В.	2	89
Третяк О.П. див. Демченко Н.Р.	4	53
Фесенко А.Ю. див. Бабій С.В.	2	20
Філіпова Т.О. див. Семенець А.С.	3	67
Харкевич О.С. див. Рой А.О.	1	66
Хархота М.А. див. Нечипуренко О.О.	1	87
Хархота М.А. див. Нечипуренко О.О.	2	41
Ходаковський В.М. див. Поєдинок Н.Л.	1	77
Цехмістер Г.В. див. Копилов Є.П.	2	80
Чуєнко А.І. Мікроміцети – потенційні біодеструктори відходів гумотехнічних матеріалів в умовах України	3	21
Шевченко Т.М. див. Сіда Л.Л.	2	59
Шульга С.М. див. Андріяш Г.С.	2	68
Шульга С.М. див. Тігунова О.О.	3	41
Ямборко Г.В. див. Ліманська Н.В.	2	27
Ямборко Г.В. див. Пилипенко І.В.	3	83



Шановні автори!

До правил оформлення рукописів статей внесено зміни, які будуть діяти з 2016 року. До розгляду редколегія буде приймати рукописи оформлені належним чином за вимогами журналу.

Внесення змін до оформлення списку використаних джерел продиктовано вимогами міжнародних наукометричних баз, для ідентифікації авторів, визначення індекса цитування авторів.

«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, біосенсиори, діагностикуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

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

Рубрики журналу: «Оглядів 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 не більше 15 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 додаються реферати українською, російською та англійською мовами.

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).
 - Молекулярну 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 ммольх/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
 - Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
 - Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і



рисуноків) 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 посилань літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англомовні 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

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 амилаолитической 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 варианту 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.

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

Книги:

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

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

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

Матеріали з'їздів, конференцій:

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

Yin R, Francis F, Bragard C, Liu Y, Chen J. Study on transmission efficiency of CMV transmitted by *Myzus persicae* from different places. In: *Proceedings of 9th International Symposium on Aphids*, Beijing, China. 2013:49–50.

Диссертационные работы:

Koreneva AA. Biological properties of medicinal plants viruses. PhD thesis, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2009: 22.

Сборники:

Dunich A, Mishchenko L. Heavy metals content in virus infected purple coneflower plants. *Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol*. 2013; 65(3):22–26.

Rose PI. Gelatin. In: *Encyclopedia of polymer science and engineering* Eds: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI New York: Wiley; 1987;7, 2nd ed. 488–513.

Shrago MI, Guchok MM, Kalugin YuV. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants. In: *Current Problems of Cryobiology*. Eds. Pushkar NS and Belous AM. Kiev: Naukova Dumka, 1981:157–201.

Патенти, заявки:

A.s. 4411066/14 SSSR, MBI G 01 N 33/50. A method of determining bile acids in biological fluids. Veselskiy SP, Lyashchenko PS, Лукьяненко IA. (SSSR). – N 1624322; zayavl. 25.01.1988; opubl. 30.01.1991, Byul. N 4.

Статті з електронних журналів:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53, available at: www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/

За наявності в статті DOI (Digital Object Identifier), яка є міжнародним ISO стандартом (<http://www.doi.org/>), в списку літератури бажано вказати її ідентифікатор, наприклад:



Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53. Cited 2 times. doi: 10.1134/S1023193508080077

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов перший варіант тексту статті.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

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

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



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

Усі права захищені згідно законодавства України.

Верстка В.Г. Вітвицька

Підписано до друку 22.03.2016 р. Формат 70x100/16.

Ум.-друк. арк. 9,7. Тираж 100 пр.

Зам. № 1354.

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