

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

№ 2(38)  
2017

Одеса  
ОНУ  
2017

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

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

### **РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**

А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (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), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), І.П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), 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), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія), С.В. Чеботар (Одеса, 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

**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.uran.ua), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Reseach Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor**

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

© Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова, 2017

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

**CO-EDITOR-IN-CHIEF**

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

**EXECUTIVE SECRETARY**

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

**EDITORIAL BOARD MEMBERS**

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), S.V. Chebotar (Odesa, Ukraine), 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. Iuynska (Kyiv, Ukraine), L.V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N.K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I.K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B.P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I.P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), 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)

**Scientific editor V. O. Ivanytsia**

*Accepted for publishing articles are reviewed*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

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

**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.urau.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.urau.ua), Reseach Bib, e-LIBRARY, IBI Factor**

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,  
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 723-28-39,  
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2017

## ЗМІСТ

### ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

|   |   |
|---|---|
| <b>М.В. Штеніков, В.О. Іваниця</b><br>БАКТЕРІОЦИНИ ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ<br>СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ..... | 6 |
|---|---|

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

|  |    |
|--|----|
| <b>А.С. Пастиря, І.О. Собко, Є.О. Шайхет, В.П. Поліщук</b><br>СЕРОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙОЇ<br>БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ В ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ<br>В ПЕРІОД З 2014 ПО 2016 РОКИ..... | 33 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>М.Б. Галкін, А.С. Семенець, М.О. Фіногенова, Б.М. Галкін,<br/>Т.О. Філіпова</b><br>УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ТА РУХЛИВІСТЬ БАКТЕРІЙ <i>PSEUDOMONAS<br/>AERUGINOSA</i> З РІЗНИМИ РІВНЯМИ ВМІСТУ ЦИКЛІЧНОГО<br>ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ..... | 40 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>О.І. Балко, Л.В. Ярошенко, О.Б. Балко, Л.А. Пасічник,<br/>Л.В. Авдєєва</b><br>АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІОЦИНІВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ЩОДО<br>ФІТОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> ..... | 51 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>О.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Бєляєва,<br/>І.П. Конуп</b><br>ОКИСНЕННЯ ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ І ПРОДУКЦІЯ БІО-ПАР<br>ГРУНТОВИМИ ШТАМАМИ <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> ONU541<br>І <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ONU542..... | 61 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>К.Б. Сардарян, Т.М. Корня</b><br>ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ЕКСТРАКТІВ ВОДРОСТЕЙ<br>В МІКРОКЛОНАЛЬНОМУ РОЗМНОЖЕННІ ДЕЯКИХ ВИДІВ<br>РОСЛИН..... | 72 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>П.І. Гвоздяк, О.В. Сапура</b><br>ДЕНІТРИФІКАЦІЯ ПИТНОЇ ВОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ<br>ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІЙ..... | 81 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>В.В. Баті, Н.В. Бойко</b><br>МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ КВАШЕНОЇ КАПУСТИ ПРИ<br>ФЕРМЕНТАЦІЇ ЗА ТРАДИЦІЙНОЮ ТА МОДЕРНІЗОВАНОЮ<br>ТЕХНОЛОГІЯМИ..... | 90 |
|---|----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>Ю.М. Похилько, Н.О. Кравченко</b><br>СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>LACTOBACILLUS</i> ДО МЕТАБОЛІТІВ<br>ТРАВНОЇ СИСТЕМИ..... | 101 |
|---|-----|

|  |     |
|--|-----|
| ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ..... | 112 |
|--|-----|

## CONTENTS

### OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

|  |   |
|--|---|
| <b>M.D. Shtenikov, V.O. Ivanytsia</b><br>BACTERIOCINS OF FACULTATIVELY-ANAEROBIC<br>ENDOSPOREFORMING BACTERIA..... | 6 |
|--|---|

### EXPERIMENTAL WORKS

|  |    |
|--|----|
| <b>A. Pastyria, I. Sobko, E. Shaykchet, V. Polischuk</b><br>SEROPREVALENCE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN<br>PRIVATE POULTRY BREEDINGS OF UKRAINE<br>FROM 2014 TO 2016..... | 33 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>M.B. Galkin, A.S. Semenets, M.O. Finogenova, B.M. Galkin,<br/>T.O. Filipova</b><br>BIOFILM FORMATION AND MOTILITY OF BACTERIA <i>PSEUDOMONAS</i><br><i>AERUGINOSA</i> WITH DIFFERENT C-DI-GMP LEVEL..... | 40 |
|---|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>O.I. Balko, L.V. Yaroshenko, O.B. Balko, L.A. Pasichnyk,<br/>L.V. Avdeeva</b><br><i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> BACTERIOCIN ACTIVITY AGAINST<br><i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> PHYTOPATHOGENIC STRAINS..... | 51 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>O.G. Gorshkova, T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva,<br/>I.P. Konup</b><br>OIL OXIDIZATION AND BIO-SAFACANTS PRODUCTION BY STRAINS<br>OF <i>PSEUDOMONAS FLUORESCENS</i> ONU541 AND<br><i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ONU542..... | 61 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>K.B. Sardarian, T.M.Kornia</b><br>THE EFFICIENCY OF USING ALGA EXTRACTS IN THE MICROCLONAL<br>REPRODUCTION OF SOME PLANT SPECIES..... | 72 |
|--|----|

|  |    |
|--|----|
| <b>P.I. Gvozdyak, O.V. Sapura</b><br>DENITRIFICATION OF DRINKING WATER BY USING PROBIOTIC<br>BACTERIA..... | 81 |
|--|----|

|   |    |
|---|----|
| <b>V.V. Bati, N.V. Boyko</b><br>MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF SAUERKRAUT IN THE PROCESS<br>OF ITS FERMENTATION ACCORDING TO THE TRADITIONAL AND<br>MODERNIZED TECHNOLOGIES..... | 90 |
|---|----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Yu.M. Pohilko, N.O. Kravchenko</b><br>RESISTANCE OF BACTERIA OF THE GENUS <i>LACTOBACILLUS</i> TO THE<br>METABOLITES OF THE DIGESTIVE SYSTEM..... | 101 |
|--|-----|

|                                   |     |
|-----------------------------------|-----|
| INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS..... | 112 |
|-----------------------------------|-----|

## ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307\\_4663.2017.2\(38\).105024](http://dx.doi.org/10.18524/2307_4663.2017.2(38).105024)

УДК 579.852.1

**М.В. Штеніков, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64,  
e-mail: shtenikovnik@gmail.com

### **БАКТЕРІОЦИНИ ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНИХ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ**

*В огляді наведена інформація щодо бактеріоцинів – низькомолекулярних білків факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій (ФАСБ), що володіють антимікробною активністю, їх класифікації, структури та властивостей. Серед бактеріоцинів ФАСБ виділяють такі, що при синтезі зазнають вторинної модифікації, та такі, що їй не піддаються. Перші в свою чергу поділяються на лантибіотики, циклічні пептиди, сактибіотики, глікоцини, лінійні азольмісні бактеріоцини та лассо-пептиди, які виявлені в ФАСБ поки лише методами біоінформатики. Серед не модифікованих бактеріоцинів ФАСБ виділяють педіоцин-подібні та некласифіковані. Окремо стоїть група бактеріоцинів, які мають високу молекулярну масу та на даний час мало досліджені. Ступінь вивчення різних таксономічних груп ФАСБ на предмет бактеріоциногенності на даний момент є дуже нерівномірним. Основні продуценти належать до родів *Bacillus* та *Raenibacillus*, для деяких родин інформація в літературі відсутня. Вивчення бактеріоцинів ФАСБ – перспективний напрямок як фундаментальних, так і прикладних досліджень.*

*Ключові слова: бактеріоцини, *Bacillus*, *Bacillaceae*, лантибіотики, сактибіотики, азольмісні пептиди, лассо-пептиди.*

#### **ВСТУП**

Розповсюдження резистентності до антибіотиків серед патогенних бактерій останніми десятиріччями набуло загрозливого масштабу. В одній лише Європі протягом 2014 року від хвороб, спричинених антибіотикорезистентними бактеріями померло 25 000 чоловік [5]. Фактично, перед людством посталала загроза повернення до епохи, що передувала відкриттю антибіотиків, коли кожна інфекція актуально загрожувала смертю і шанси вижити залежали лише від імунітету хворого та ефективності підтримувальної терапії. Найочевидніше вирішення проблеми – пошук нових антибіотиків, але це займає багато часу та призводить до значних витрат ресурсів.

Відомо, що лише один з приблизно 10000 потенційних медикаментів проходить всю низку клінічних випробувань та стає клінічним препаратом. Якщо взяти до уваги, що медицина – не єдина сфера, де людство має потребу в антимікробних препаратах, то ситуація стає ще більш загрозливою [50, 75].

Ці обставини змушують шукати альтернативні по відношенню до антибіотиків засоби контролю мікроорганізмів, одними з найбільш перспективних серед яких є бактеріоцини – антимікробні білки прокариот що секретуються [8, 9, 53, 59, 62].

© М.В. Штеніков, В.О. Іваниця, 2017



До позитивних рис бактеріоцинів як антимікробних засобів, можна віднести білкову природу, що робить можливою їх утилізацію організмом людини і тварин без утворення шкідливих проміжних та кінцевих продуктів. Також сюди можна віднести їх активність у низьких концентраціях відносно антибіотиків і низьку специфічність щодо мішені – останній чинник знижує вірогідність виникнення резистентних форм [18]. Значна частка бактеріоцинів без проблем переносять режим пастеризації, частина – режим стерилізації гарячим паром. Також важливою обставиною є простота експресії у генно-інженерних штаммах-продуцентах [10, 27, 39, 48, 54].

На відміну від хімічно різноманітних антибіотиків, всі бактеріоцини є білками, тому їх фізико-хімічні властивості добре піддаються передбаченню, зокрема в тому аспекті, що стосується імунологічних властивостей. Висока антимікробна специфічність до збудника робить їх цілком безпечними для людини і тварин [56].

На сьогоднішній день найбільш активно вивчаються бактеріоцини молочнокислих бактерій (МКБ). Ця обставина не може бути задовільною як мінімум з двох причин. По-перше, різноманітність бактеріоцинів МКБ не може вичерпувати собою різноманітність бактеріоцинів фірмікут взагалі, бо вони являють собою групу зі спеціалізацією до життя у специфічному копіотрофному середовищі, мають ряд неспецифічних засобів активної конкуренції на зразок секреції органічних кислот [3]. По-друге, бактеріоцини МКБ з тих самих причин часто демонструють незадовільну стабільність та/чи ефективність у фізіологічних умовах [66, 68]. В таких умовах потребує фундаментального вивчення феномен бактеріоциногенності, який виявився недооціненим порівняно з явищем синтезу антибіотиків, хоча бактеріоцини і були відкриті на 3 роки раніше за антибіотики. Ці явища мають не лише спільні загальні риси, але і низку відмінностей, окрім характеру біосинтезу сполук двох даних груп. Їх вплив на еволюцію організмів – носіїв цих фенотипових характеристик лишається недослідженим [58, 72].

Метою даної роботи є огляд і аналіз літературних даних щодо бактеріоцинів відомих на цей час у факультативно-анаеробних споруотворювальних бактерій.

## 1. Загальна характеристика бактеріоцинів ФАСБ

Вивчення здатності до синтезу бактеріоцинів на сьогодні було присвячено головним чином молочнокислим бактеріям, що зумовлено їх широким використанням у різних галузях промисловості, важливою роллю у фізіології людини і тварин, та цілковитою безпечністю для них. Проте така стратегія залишає невикористаним значний потенціал бактерій, які не належать до молочнокислих, але теж здатні до синтезу бактеріоцинів. Фактично, гени, що за тими чи іншими ознаками близькі до генів бактеріоцинів, виявлені у близько 99% секвенованих прокариотних геномів [20, 34].

Однією з груп мікроорганізмів, вивчення бактеріоцинів якої можна вважати перспективним, є факультативно-анаеробні споруотворювальні бактерії (ФАСБ). Ця група прокариот включає близько 600 видів, розподілених по близько 60 родах та кількох родин, що належать до одного порядку. ФАСБ дуже різноманітні за фізіологічними, біохімічними та екологічними



характеристиками. Серед них є як убівквісти, розповсюджені майже всюди в межах біосфери, окрім біотопів, придатних лише для існування екстремофілів, так і вузько спеціалізовані форми (наприклад, *Bacillus anthracis*) [41]. Найяскравішою рисою фізіології цих істот є їх здатність до утворення стійких до екстремальних чинників форм – ендоспор, механізм формування яких надзвичайно складний [19, 25, 46].

Серед них є термо-, психро- та мезофіли, з широким спектром оптимуму рН, є форми з різними ступенями галофільності, хоча переважають мезонейтрофільні хемоорганогетеротрофи. Ендоспори кожного виду виходять зі стану спокою, коли потрапляють у сприятливі для даного виду умови довкілля [65].

ФАСБ здатні використовувати широкий спектр джерел органічного вуглецю, включаючи білки, різноманітні ліпіди, вуглеводи (в т.ч. агар-агар), вуглеводні і т.п. Деякі представники є метанотрофами та автотрофами. Утилізують широкий спектр джерел електронів та акцепторів для анаеробного дихання (наприклад, нітрати, хлорати, хромати, селенати, арсенати тощо) [19, 25].

Як і переважна більшість інших прокариот, ФАСБ мають здатність до синтезу низки біологічно активних сполук, що виступають чинником антагонізму до певних категорій мікроорганізмів-конкурентів. Це антибіотики (у першу чергу ліпопептидної природи та полікетиди) і власне бактеріоцини [57, 72].

ФАСБ легко піддаються виділенню в чисту культуру, у переважній більшості випадків легко культивуються та цікаві як з прикладного, так і фундаментального погляду. Проте практичний інтерес до бактеріоцинів ФАСБ зумовлений не лише легкістю культивування продуцентів, але й фізіологічною різноманітністю та специфічними цитологічними рисами [69].

Фундаментальне значення бактеріоциногенності ФАСБ полягає, головним чином, у тому, що дає змогу краще зрозуміти низку фундаментальних аспектів еволюції фірмікутів. По-перше, характер взаємодії таких ознак, що надають значної еволюційної переваги, як бактеріоциногенність і спорування, з одного боку, та бактеріоциногенність і синтез антибіотиків з іншого, по-друге, теоретичну можливість «консервації» у геномах ФАСБ генів бактеріоцинів інших груп прокариот [57].

ФАСБ відомі головним чином на прикладі представників роду *Bacillus*; власне, впродовж тривалого часу діагноз даного таксону зводився до здатності утворювати ендоспори та росту у присутності кисню в атмосферній концентрації. Таксономічне впорядкування групи ФАСБ розпочалося на початку 90-х років завдяки впровадженню методів молекулярної філогенії, через що ФАСБ були розподілені по різних родах і родинях в межах одного порядку [7, 19].

Бактеріоцини являють собою білки, які синтезуються прокариотами та виявляють бактерицидну чи/та бактеріостатичну дію на штами бактерій виду продуцента чи близьких видів. Важливо відзначити, що саме їх синтез, який відбувається на рибосомах, є принциповою характеристикою бактеріоцинів, що відрізняє їх від часто хімічно схожих пептидних антибіотиків. Специфічність дії варіює, залежно від конкретного бактеріоцину, і може бути такою ж широкою, як у деяких антибіотиків. Багато еукариот синтезують антимікробні пептиди, за функціями та структурою схожі на прокариотні, але бактеріоцинами не називаються, хоча в деяких оглядах розглядаються разом [44, 65, 74].





В більшості випадків бактеріоцини являють собою короткі (20–60 амінокислотних залишків), позитивно заряджені або гідрофобні пептиди. Відомі також окремі бактеріоцини з більш високою молекулярною масою (наприклад, А-216 з відносною молекулярною масою 66 кДа), проте вони являють собою скоріше виключення із правил [40].

Однією з суттєвих відмінностей бактеріоцинів від антибіотиків є те, що перші активно синтезуються в експоненційній фазі росту та є первинним метаболітами, а другі – у стаціонарній і є вторинними метаболітами. Характер регуляції експресії генів бактеріоцинів у багатьох випадках не з'ясований. Для субтиліну відомо, що його експресія запускається системою кворум сенсинг, медіатором якої є сам бактеріоцин, що забезпечує наростання його продукції за механізмом позитивного зворотнього зв'язку [71]. Експресія ж самих генів системи кворум сенсинг (рецептора-кінази та транскрипційного регулятора) регулюється фактором транскрипції AbrB. В цілому, системи регуляції експресії генів бактеріоциногенності не менш складні, ніж продукції антибіотиків [14, 33].

Історично так склалося, що вивчення бактеріоцинів різних груп бактерій просувалося нерівномірно, незалежно формувалися системи класифікації та термінологія. Перший бактеріоцин, що синтезується грампозитивною бактерією, був відкритий у 1928 році. Це був нізин, який продукується *Lactococcus lactis*. Серед грампозитивних бактерій найбільш вивченими є бактеріоцини лактобактерій, точніше представників сестринського до Bacillales порядку Lactobacillales [4, 17, 74].

Здатність бактерії продукувати певний бактеріоцин визначаються складним кластером генів, які узгоджено експресуються. В першу чергу це структурний ген самого бактеріоцину (який звичайно позначається літерою А – наприклад, *nisA*, структурний ген нізину, що продукується *L. lactis*), гени що відповідають за процесинг пропептиду та його транспорт, гени автоімунітету та регуляції експресії. Деякі гени кластеру, частіше структурний, іноді бувають дупліковані, що сприяє більш продуктивній експресії. Деякі бактеріоцини синтезуються при активації Sec-системи та не потребують власної транспортної системи, проте це не відноситься до більшості бактеріоцинів [2, 29].

Досить типовим для бактеріоцинів є те, що після синтезу вони піддаються значній вторинній модифікації (рис.1). В першу чергу це стосується протеолітичного відщеплення сигнальних пептидів (наявність яких обов'язкова через потребу у трансмембранному транспорті продукту). Сигнальний пептид може мати значні розміри по відношенню до корової частини пропептиду. Як правило сигнальний пептид розташований на N-кінці молекули. Бактеріоцини не набувають фізіологічної активності до відщеплення сигнального пептиду [76].

Окрім відщепленого сигнального пептиду, зріла молекула бактеріоцину може і не мати інших вторинних модифікацій, проте більшість бактеріоцинів все ж має більш складну структуру. До них належать, зокрема, дисульфідні зв'язки, пептидний зв'язок між N- та C-кінцями, лантионинові містки тощо. Набір вторинних модифікацій не лише надає молекулі специфічності відносно мішені, але й визначає її резистентність по відношенню до чинників навколишнього середовища [6].



Найбільш стабільними є лантибіотики – бактеріоцини, що містять не-протеїногенну амінокислоту лантионін. В ФАСБ, на відміну від лактобактерій, експериментально зафіксовано не всі з перерахованих модифікації, проте дані аналізу геномів цих сіквенсів свідчать про наявність у ФАСБ більш широкого спектру бактеріоцинів, ніж це виявляється класичними методами [47].

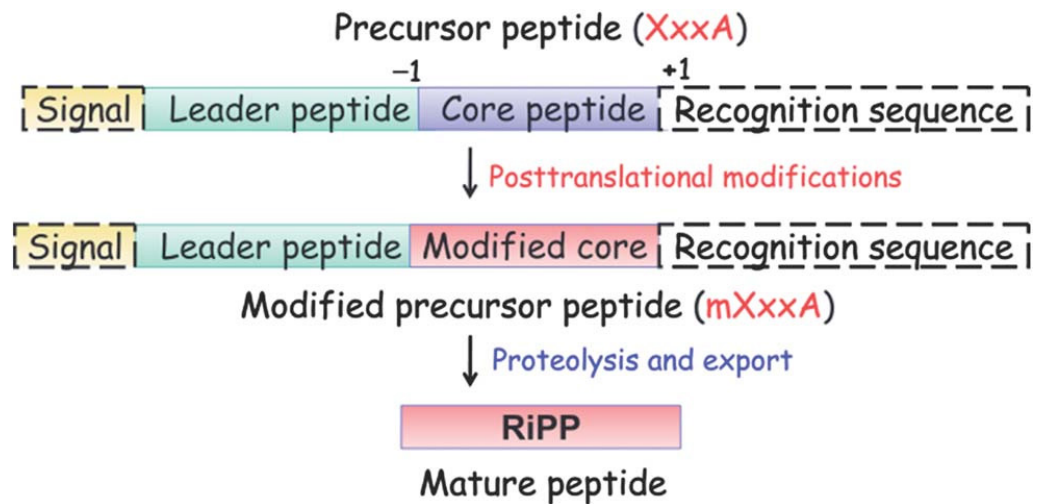


Рис. 1. Загальна схема процесингу молекули бактеріоцина [6]

Fig. 1. The general scheme of bacteriocin processing [6]

Цікавий феномен являють собою двохкомпонентні бактеріоцини, тобто такі, які експресуються у вигляді двох фізично не зв'язаних молекул, які функціонують у синергетичний спосіб. Такі бактеріоцини відомі серед лантибіотиків бацил [2, 59].

Важливо відзначити, що у випадку, коли бактеріоцин зазнає пострасляційної модифікації, то як правило таких модифікацій кілька. Одна з них є характерною та її наявність корелює з гомологією первинної послідовності білків. Це робить можливою певну класифікацію бактеріоцинів, про що мова піде нижче.

Важливою характеристикою кожного бактеріоцину є спектр його активності. Як витікає з визначення, бактеріоцини, як правило, виявляють активність щодо споріднених видів чи навіть до того самого штаму, але позбавленого відповідного кластеру (наприклад, разом з утраченою плазмідом). Частина бактеріоцинів ФАСБ демонструє активність проти грамнегативних бактерій. Для низки бактеріоцинів також спостерігається виражена фунгіцидна та фунгістатична активність [2].

Дія бактеріоцинів грамполозитивних бактерій звичайно пов'язана з формуванням постійних чи тимчасових пор у ЦПМ, що призводять до підвищення її проникності і як наслідок – до втрати мембранного потенціалу (рис. 2). Часто (зокрема, наприклад, у деяких лантибіотиків) безпосереднє зв'язування



молекули бактеріоцину мембраною відбувається через посередництво ліпиду II і таким чином відбувається ще й пригнічення синтезу пептидоглікану.

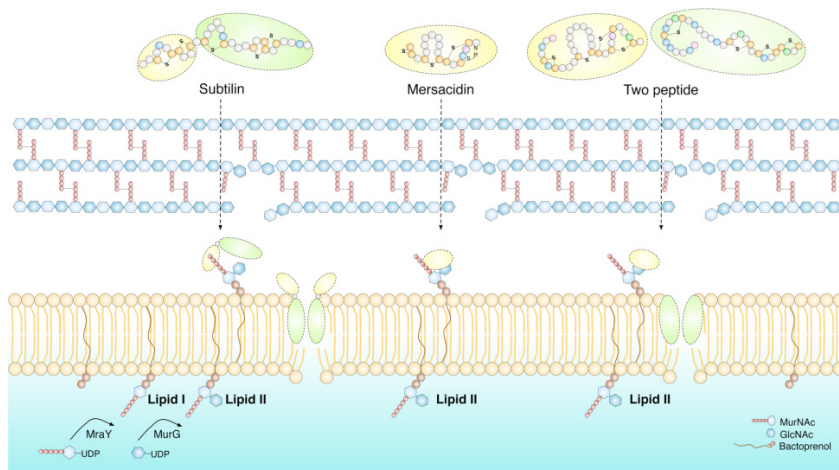


Рис. 2. Схема дії бактеріоцинів групи лантибіотиків [10]

Fig. 2. The scheme of action of bacteriocins of lantibiotic group [10]

Серед бактеріоцинів ФАСБ зустрічаються також бактеріоцини з іншими механізмами дії, більш характерними для відповідних сполук грамнегативних бактерій, зокрема, інгібітори цитоплазматичних ферментів (наприклад, лассо-пептиди) [6]. Ряд бактеріоцинів (в першу чергу це стосується тих, що утворюють пори) не мають певного рецептора, зв'язуються безпосередньо з самою ЦПМ завдяки своєму позитивному заряду. Відмітимо, що вироблення резистентності до таких речовин потребує від генетичного апарату бактерій значно суттєвіших перебудов, ніж формування резистентності до більш специфічних щодо мішені сполук [1, 13, 50, 70].

Можна припустити, що усю сукупність бактеріоцинів можна поділити на кластери, що відповідають продуктам дивергенції вихідного бактеріоцину. В межах таких кластерів повинні спостерігатися аналогії за набором ферментів, що виконують процесинг пропептиду, його секрецію, регуляцію експресії та імунітет, і гомологія відповідних за функціями білків. Виходячи з даної схеми, можна проілюструвати сучасну класифікацію бактеріоцинів не лише прикладами самих білків як представників своєї групи, а й (за можливості) структурами відповідних генних кластерів з зазначенням гомологій. Враховуючи значну філогенетичну гетерогенність бактеріоцинів, дуже сумнівними є перспективи побудови «природної» їх класифікації на зразок сучасної класифікації живих істот. Проте потреба у систематизації бактеріоцинів стає все гострішою через відкриття нових типів молекул. Серед відомих на сьогоднішній день бактеріоцинів лише мала частка вивчена достатньо для того, щоб їх певним чином класифікувати. Крім того, багато описань нових бактеріоцинів зроблені без фундаментального доведення того, що нова сполука є саме бактеріоцином (таким доказом може слугувати, наприклад, виявлення гомологічної до бактеріоцину послідовності у геномному сіквенсі продуцента).

З теоретико-еволюційної точки зору, бактеріоцини являють собою засіб активної конкуренції на між- та внутрішньовидовому рівнях. Крім того, враховуючи ту обставину, що їх генетичні детермінанти часто локалізовані на різноманітних мобільних генетичних елементах (МГЕ), можна припустити їх роль у розповсюдженні МГЕ в прокаріотних популяціях. Фактично, гени бактеріоциногенності надають МГЕ, що їх несуть, селективної переваги. Підлягає з'ясуванню питання, як даний механізм підвищення конкурентоздатності генетичного елемента взаємодіє з іншими, такими як системи токсин-анти-токсин тощо [32, 61].

Бактеріоцини можуть мати як бактеріостатичну, так і бактерицидну дію на штами-мішені. Бактерицидна дія являє собою, як слідує із назви, загибель бактеріальних клітин, бактеріостатична – пригнічення їх росту. Звичайно перша пов'язана із перфорацією мембран та/чи гальмуванням синтезу пептидо-глікану, друга – з пригніченням цитоплазматичних ферментів [44].

Як вже зазначалося вище, здатність до продукції бактеріоцинів детермінується генами, що зазвичай утворюють низку оперонів. Гени бактеріоциногенності зазвичай пов'язані із мобільними генетичними елементами, з якими вступають у відносини аналогічні мутуалістичним, зокрема фаговими геномами та плазмідами, рідше просто знаходяться на хромосомі [79].

Існує два шляхи вивчення бактеріоцинів – пошук нових сполук шляхом скринінгу продуцентів з виділенням чистих речовин для подальшої характеристики, та пошук нових бактеріоцинів у геномних сіквенсах за допомогою спеціального програмного забезпечення, яке орієнтується на сигнатури, характерні для бактеріоцинів різних груп. Підхід з використанням методів *in silico* набув популярності в останні роки та його результати часто виявляються досить несподіваними. Проте знайдені біоінформативно бактеріоцини часто не вдається отримати у вигляді очищеного препарату, придатного для визначення принаймні первинної послідовності [42,79].

Геноми близько 99% прокаріот містять оперони, різною мірою гомологічні відомим детермінантам бактеріоцинів, часто в одному геномі їх кілька [79]. Але на практиці бактеріоцини відомі для нечисленної кількості видів та штамів. Це пояснюється низкою причин. По-перше, експресія генів бактеріоциногенності часто перебуває під підвищеним контролем. Умови для індукції таких генів часто відрізняються від умов лабораторного скринінгу [33], по-друге, специфічність бактеріоцинів може бути такою, що не відповідає наявним індикаторним штамам [64].

Подальший аналіз сфокусовано саме на бактеріоцинах, які були виділені та вивчені у лабораторних умовах [35].

## 2. Класифікація бактеріоцинів ФАСБ

Перша система бактеріоцинів грампозитивних бактерій була запропонована Клаенхаммер у 1993 році [36]. Вона стосувалася лише бактеріоцинів лактобактерій, як найбільш вивченої на той час групи продуцентів бактеріоцинів [26, 36]. Згідно його системи, бактеріоцини поділялися на такі класи:

1. Лантибіотики (пептиди, відносна молекулярна маса яких менша за 5кДа, що містять (метил)лантионін та діють на мембрану);



2. Малі, термостабільні мембраноактивні пептиди, маса яких менша за 10 кДа, що не містять лактионін;
  - 2.1. Пептиди, що активні проти лістерій з характерною послідовністю на N-кінці Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys;
  - 2.2. Двокомпонентні спороутворювальні бактеріоцини;
  - 2.3. Пептиди, що активуються тіолом (потребують відновлених цистеїнових залишків для активації);
3. Високомолекулярні (з молекулярною масою більше 30 кДа) термолабільні пептиди;
4. Складні бактеріоцини, що складаються з білка та ковалентно зв'язаних залишків небілкової природи (ліпідів чи вуглеводів), наявність яких є критичною для активності.

З наведеного вище можна зазначити головний недолік системи Кленхаммера – її емпіризм і малу прив'язку до біохімії та генетики бактеріоцинів, які були мало відомі на час її публікації.

Впродовж років різні автори пропонували свої варіанти номенклатури бактеріоцинів, в тому числі і для бактеріоцинів бацил. В фундаментальному огляді Abriouel та співавторів [2] запропонували підсумовуючу систему, в основу якої було покладено систему бактеріоцинів лактобактерій у редакції Klaenhammer, з низкою інновацій.

Бактеріоцини поділили на 3 класи, два з яких у свою чергу поділяються на підкласи:

1. Вторинно модифіковані бактеріоцини
  - 1.1. Лінійні лантипептиди
  - 1.2. Глобулярні лантипептиди
  - 1.3. Двомолекулярні лантипептиди
  - 1.4. Інші модифіковані лантипептиди
2. Не модифіковані бактеріоцини
  - 2.1. Педіоцин-подібні
  - 2.2. Турицин-подібні
  - 2.3. Інші не модифіковані бактеріоцини
3. Не модифіковані високомолекулярні термолабільні бактеріоцини.

Як можна побачити, майже через 20 років після першої пропозиції Кленхаммера ситуація принципово не змінилася. Речовини дуже різної структури та характеру біосинтезу були об'єднані в широкі категорії системи класифікації [2, 11].

В роботі Zhao і Kuipers (2016) була запропонована революційна класифікація бактеріоцинів грампозитивних бактерій, з урахуванням даних біохімії посттрансляційно модифікованих пептидів. Zhao і Kuipers пропонують поділити усю множину бактеріоцинів, як вивчених, так і невідомих, на дві великі групи: такі, що піддаються посттрансляційній модифікації та такі, що їй не піддаються. Кожна з цих груп має підгрупи, особливо це стосується першої. Суттєвою її відмінністю від системи Abriouel та співавторів є той факт, що виявився розформованим клас 2.2. «турицин-подібні білки», які виявилися групою сактибіотиків.



У подальшому буде описано приклади бактеріоцинів кожного типу за схемою, що включає дані про їх специфічні біохімічні особливості, будову генного кластеру, локалізацію генів (плазмідну чи хромосомну), механізм дії тощо. Для конкретних бактеріоцинів – спектр штамів, проти яких спостерігається активність та її характер (бактерицидна чи бактеріостатична) і повну назву штама-продуцента. Варто мати на увазі, що відомий вид-продуцент може бути не єдиним джерелом даного бактеріоцину і до його продукції часто мають відношення навіть штами, що належать до інших родів [3].

## А. Модифіковані бактеріоцини

### А.1. Лантибіотики

Лантибіотиками називають бактеріоцини, які містять у своєму складі одну з двох чи обидві непротеїногенні амінокислоти – лантионін чи метилантионін (рис. 3). Ці амінокислоти утворюються шляхом посттрансляційної модифікації, під час якої радикали аланіну чи валіну піддаються спочатку дегідрованню, а потім дегідроаланін чи дегідробутирін, відповідно, піддається полімеризації з залишком серину того самого поліпептиду. У випадку аланіну утворюється лантионін, у випадку валіну - відповідно, метилантионін. Іноді лантибіотики несуть, поряд з залишками лантионіну, дегідровані радикали аланіну та валіну без їх подальшого процесингу у відповідні місткові амінокислоти [12].

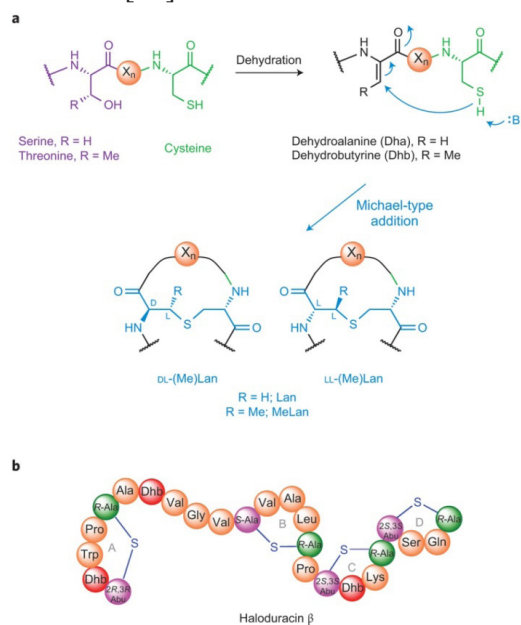


Рис. 3. Схема утворення лантионіну [18]

Fig. 3. The scheme of lanthionine formation [18]

Циклазні домени ферментів II, III та IV класів демонструють гомологію до LanC. Ферменти, що каналізують формування лантионіну демонструють

Лантибіотики являють собою частковий випадок більш широкої категорії лантипептидів – білків, що містять (метил)лантионін [38].

Залежно від набору ферментів, що каталізують синтез (метил)лантионіну, лантибіотики поділяють на 4 класи. До класу I відносять ті, залишки аланіну та валіну яких дегідруються ферментом LanB, а циклізація здійснюється циклазою LanC. Лантибіотики II, III та IV класів модифікуються відповідними біфункціональними ферментами. Ті, що належать до класу II дегідруються і циклізуються одним поліфункціональним ферментом LanM, амінокінцевий домен, молекула якого має дегідратазну активність, а карбоксикінцевий – циклазну. Лантибіотики класу III дегідруються і циклізуються ферментом LanKC, лантибіотики четвертого класу, відповідно, LanL.



відносно низьку субстратну специфічність і амінокислотні заміни, що безпосередньо не задіяні у модифікації, не призводять до припинення синтезу бактеріоцину. Ця обставина сприяє еволюції бактеріоцинів та в теорії полегшує дизайн нових речовин в лабораторних умовах [55]. Цікаво, що лантипептиди III та IV класів не демонструють значної антимікробної активності та, як можна припустити, відіграють роль регуляторів різноманітних фізіологічних процесів [3, 6, 22, 76, 78].

При найменуванні генів, що входять до кластерів конкретних бактеріоцинів, всі гени кластеру отримують загальну трибуквену назву, що утворюється від назви самого бактеріоцину (наприклад, нізину – nis, мерсацидину – mrs і т.п.). Окремі гени, що входять до його складу, отримують назви відповідно до гомологій з відповідними генами описаної вище типової схеми (запропонованої на основі даних про кластер нізину). Структурний ген отримує літеру А, дегідратаза та циклаза (якщо лантибіотик належить до класу I) – В і С, відповідно, і т.д [21]. В цілому, лантибіотики – найбільш вивчена і, мабуть, чисельна група бактеріоцинів [76].

Найбільш вивченим представником цієї групи є субтилін, який продукується *B. subtilis*. Цей білок, що складається з 32 амінокислотних залишків, близький за первинною послідовністю до найбільш вивченого бактеріоцину – нізину. Генний кластер, що детермінує його синтез, складається з чотирьох оперонів: *spa S* (моноцистронний, кодує пропептид субтиліну), *spa BCT* (кодує, відповідно, циклазу, дегідратазу та транспортер), *spa IFEG* (гени імунітету до субтиліну – ліпід-зв'язаний білок-секвестор *spa I* та ABC-транспортер *spa FEG*) та гени білків, що беруть участь у аутоіндукторній регуляції експресії *spa RK* [71]. Як зазначалося вище, субтилін є гомологом нізину, що продукується *L. lactis*, ерицинів S і A *B. subtilis* та ін. Гомологія зберігається головним чином в місцезнаходженні лантронінових петель молекули [2]. Транспортер – продукт генів *spa FEG* відноситься до ABC-транспортерів 2 типу і складається з двох субодиниць Spa F, відповідальних за зв'язування АТФ на цитоплазматичному боці, гідроліз якого постачає енергію для транспорту; кожна з молекул Spa F прикріплена до однієї з молекул Spa E та Spa G [77]. Субтилін активний проти широкого спектру грампозитивних бактерій [16].

Інший представник лантибіотиків – мерсацидин (продуцент – низка штамів *B. amyloliquefaciens*) складається з 20 а.к. залишків і діє також шляхом зв'язування з ліпідом II, проте призводячи лише до припинення синтезу пептидоглікану [10].

Галодурацин (продукується алкалофілом *B. halodurans* C-125) та ліхеніцидин (відомо два штами-продуценти, *B. licheniformis* ATCC 14580 та *B. licheniformis* DSM 13) являють собою двокомпонентні лантибіотики, кожен з яких синтезується у вигляді двох окремих фрагментів, що діють у синергетичний спосіб. Формально вони називаються А1 та А2. Відповідні фрагменти обох бактеріоцинів гомологічні один одному. Галодурацин демонструє бактерицидну активність проти низки грампозитивних бактерій, включаючи представників родів *Listeria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* та *Pediococcus*. Ліхеніцидин демонструє антимікробну активність проти *Listeria monocytogenes*, MRSA, та VRE [2, 59].



Генетичні кластери ліхеніцидину та галодурацину дуже схожі між собою та являють собою варіанти типового лантибіотикового кластеру, описаного вище. Специфічною їх особливістю є наявність, крім відокремлених цитронів для кожної субодиниці, також наявність двох копій білка *lan M* (ці лантибіотики належать до II класу) [79].

### **А.2. Циклічні кільцеві пептиди**

Важливо зауважити, що коли йдеться мова про циклічні бактеріоцини, часто мають на увазі лантибіотики, сактибіотики, про які мова піде нижче або інші бактеріоцини, молекули яких містять макроцикли. До цього класу належать саме бактеріоцини, які, по-перше, циклізовані у специфічний спосіб – пептидний зв'язок утворений між С- та N-кінцями молекули, по-друге, не містять ніяких інших вторинних модифікацій. Характерно також, що цей зв'язок утворюється виключно між лейцином на N-кінці молекули корового пептиду та триптофаном на С-кінці. Прикладом такого бактеріоцину серед тих, що синтезуються ФАСБ, може слугувати амілоцикліцин (продуцент – *B. amyloliquefaciens* FZB42). Пропептид містить 112 амінокислотних залишків, з яких 42 належать лідерному пептиду [6, 79].

Досконало генетика не відома ні для одного продуцента. Будова генного кластеру з'ясована лише частково. Виходячи з даних про частоту виявлення амілоцикліцин-подібних послідовностей у секвенованих геномах, можна припустити відкриття у майбутньому нових циклічних бактеріоцинів [49, 79].

### **А.3. Сактибіотики**

Сактибіотики мають унікальний сірчаний місток, відмінний від дисульфідного чи лантіонінового. Він утворюється між  $\alpha$ -атомом одного амінокислотного залишку та атомом сірки, що входить до складу радикалу другого. Це дало назву даній групі пептидів: Sulfur to Alpha-Carbon antibiotic. Синтезується такий місток у радикальній ферментативній реакції за участі S-аденозилметініну. Цікаво, що сактибіотики для МКБ відомі лише *in silico*, на відміну від ФАСБ, для яких на цей час виділено та охарактеризовано на рівні первинної структури як мінімум чотири досить відмінних один від одного пептиди [3, 64].

Найбільш вивченим є субтилізин А (продуцент – *B. subtilis* ATCC 6633, відомий також у низки близьких видів). Його пропептид складається з 42 амінокислотних залишків, з них 7 на N-кінці утворюють сигнальний пептид. Демонструє бактерицидну активність щодо *Bacillus spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* та низки грамнегативних бактерій. Виявлена сперміцидна активність щодо сперматозоїдів хребетних [2, 3, 6, 79].

Як механізм дії для сактибіотиків пропонується утворення пор у ЦПМ [43]. Приклади – турицин 17, турицин Н, Sporulation Killing Factor *B. atrophaeus*. Три з 5 секвенованих на сьогоднішній день турицинів є сактипептидами [64].

### **А.4. Глікоцини**

Глікоцини – це бактеріоцини, які модифіковані шляхом глікозилювання. Субланцин 168 (*B. subtilis*) містить 37 амінокислотних залишки (пропептид – 56), два дисульфідних зв'язки та залишок глюкози приєднаний через радикал цистеїну.





Гени *bdbA* та *bdbB* кодують ферменти процесингу (оксидоредуктази, які в даному випадку каталізують утворення дисульфідних зв'язків), функції рамок зчитування *yolJ* та *yolF* до недавнього часу лишалися невідомими. Виявилося, що друга з них бере участь у автоімунітеті, тому була перейменована в *sunI*, по аналогії з *LanI*. Продукт *sunI* забезпечує транспорт і є класичним АВС-транспортером з протеолітичною активністю. Пригнічує ріст грампозитивних бактерій (*B. cereus*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*), але грамнегативні до його дії резистентні [2]. Механізм дії не відомий, але є спостереження, що пригніченню піддається не лише процес росту вегетативних клітин, але й процес проростання ендоспор [6, 33, 79].

#### **А.5. Лінійні азолвмісні бактеріоцини**

Як виходить з назви, ці бактеріоцини містять гетероциклічні кільця тіазолу або (метил)оксазолу, що утворюються з цистеїнових, серинових та треонінових залишків в ході складної послідовності хімічних реакцій. Ці реакції організовані у досить стандартну для даного типу бактеріоцинів послідовність та включають АТФ-залежне дегідрування з подальшим ФМН-залежним дегідрогенуванням. Характерними ознаками є специфічна послідовність біля С-кінця пептиду та наявність залишків серину у кожній третій позиції в ділянках молекули, що відповідають майбутнім масивам оксазолових кілець (чи цистеїну, у випадку тіазольних кілець). Ці реакції каталізуються мультиферментним комплексом, гени білків якого входять до кластера відповідного бактеріоцину. Синтез кожного тіазолового кільця потребує послідовної роботи двох ферментів – дегідрази та дегідрогенази, що поєднані фізично [6].

Відомо три представники цієї групи – сонорензин (*B. sonorensis*), плантазоліцини А (*B. amyloliquefaciens*) і В (*B. methylotrophicus*), хімічно ці останні дві сполуки відрізняються відсутністю та наявністю, відповідно, двох метильних груп при одному з атомів азоту [79]. Їх пропептид складається з 41 амінокислотних залишків, яких сигнальний пептид займає 27. Після того, як кластер ферментів, побудований з продуктів оперону *pnzBCD* створює систему гетероциклів, що відбувається у 9 етапів, протеаза *pnzE* видаляє лідерний пептид з утворенням готового плантазоліцину В. Гени *pnzB* та *pnzC* кодують ферменти – відповідно циклодегідратазу та дегідрогеназу, а *pnzD* – білок, на якому збирається вся «конструкція». У *B. amyloliquefaciens* метилювальний фермент *pnzL* перетворює плантазоліцин А на плантазоліцин В шляхом переносу метильних груп [15].

Послідовності, характерні для генних кластерів лінійних азолвмісних бактеріоцинів, були виявлені шляхом геномного майнінгу в геномі збудника сибірської виразки. Механізм дії лишається невідомим. Для мікроцину В17, який має хімічну структуру подібну до лінійних азолвмісних бактеріоцинів, відомий такий, що реалізується за певних умов, механізм дії шляхом пригнічення гірази [6].

#### **А.6. Ласо-пептиди**

Характерною особливістю ласо-пептидів є наявність на N-кінці ларіатної структури, що утворюється через виникнення пептидного зв'язку між кінцевою аміногрупою та карбоксильною групою радикалу глутамінової чи аспарагінової кислоти у 7, 8 чи 9 положенні.



Кластер включає як мінімум три білки – пропептид, цистеїнова протеаза та лактам-синтаза [79]. Як хімічно виділені речовини для ФАСБ та МКБ ці бактеріоцини не відомі, проте вивчені на прикладі низки грамнегативних бактерій та стрептоміцетів. Механізми активності відомих представників різноманітні та включають пригнічення синтезу РНК, протеолізу та навіть генерування активних форм кисню [3, 6].

### **В. Немодифіковані бактеріоцини**

Їх класифікація розроблена значно слабше за класифікацію вторинно модифікованих бактеріоцинів.

#### **В.1. Педіоцин-подібні бактеріоцини**

Педіоцин-подібні бактеріоцини отримали свою назву через схожість з добре вивченим бактеріоцином *Pediococcus acidilactici* – педіоцином PA-1/AsH. Їх характерним маркером є гептапептид YGNGVXC на N кінці. Припускають, що цей консервативний мотив бере участь у розпізнаванні мішені. Для бактеріоцинів цього класу характерна активність щодо лістерій.

Прикладом бактеріоцинів цієї групи є коагулін, що продукується *V. coagulans*. Зрілий білок складається з 44 амінокислотних залишків. Від вищезгаданого педіоцину відрізняється лише однією амінокислотою заміною. Гени розташовані на мобільній плазміді. Кластер включає чотири гени *coaABCD*: структурний *coaA*, ген імунності *coaB* та генABC-транспортеру *coaCD*. Спектр активності включає бактерій родів *Listeria*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* [2].

Механізм дії педіоцин-подібних бактеріоцинів полягає в утворенні пор у мембрані. Молекулярною мішенню слугує молекула фосфаттрансферного транспортеру маннози (субодиниці MptC чи/та MptD). Наслідком зв'язування бактеріоцину з рецептором є перетворення комплексу «бактеріоцин-транспортер» на трансмембранний канал, через який відбувається витік розчинних компонентів цитоплазми. Білок, що забезпечує автоімунітет до педіоцин-подібних бактеріоцинів, не секретується назовні, а є цитоплазматичним комплексом, пошкоджує мембрану, зв'язуючись з ним з цитоплазматичного боку [52].

#### **В.2. Інші не модифіковані пептиди**

Такі бактеріоцини утворюють окрему не класифіковану групу. Причиною відсутності класифікації є дефіцит інформації про певні бактеріоцини чи/та висока специфічність їх будови та генетики. Все ж, серед не класифікованих бактеріоцинів також можна виділити низку груп, спільних за механізмами біосинтезу та первинною послідовністю [67].

Ліхенін – унікальний «анаеробний» бактеріоцин. Синтезується лише в анаеробних умовах, хоча продуцент – факультативний анаероб. В присутності молекулярного кисню в атмосферних концентраціях інактивується. Також не має лідерного пептиду [2, 79]. Бактерії групи *V. cereus* синтезують низку близьких за властивостями сполук під загальною назвою «цереїни». Вони активні проти грамположитивних бактерій та секретуються у Sec-залежний спосіб.

Холіни та холін-подібні бактеріоцини являють собою гомологи однойменних білків, що забезпечують лізис інфікованої бактеріальної клітини на



пізніх етапах бактеріальної інфекції [2, 79]. Близький до холінів бактеріоцин BhlA синтезується деякими видами роду *Bacillus*, зокрема представниками групи *B. cereus*. Він демонструє антибактеріальну активність проти метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* та *Micrococcus luteus* [4].

Нещодавно виділено бактеріоцин *B. thuringiensis*, що виявляє гомологію до білків теплового шоку [31].

### С. Високомолекулярні бактеріоцини

Високомолекулярні бактеріоцини мають відносну молекулярну масу більшу за 10 кДа. На відміну від бактеріоцинів попередніх груп, вони характеризуються термолабільністю та іноді складаються з кількох субодиниць, що поєднуються в активну молекулу. Відома незначна кількість представників цієї групи, зокрема мегацини (*B. megatherium*). Типовий генний кластер відсутній, група гетерогенна, проте нестача інформації робить неможливою її класифікацію на даному етапі [2].

Мегацини А-216 та А-19213 кодуються генами, локалізованими у плазмідах. Механізмом їх дії є фосфоліпазна активність, за типом фосфоліпази А2 [79].

### 3. Бактеріоциногенність різних таксонів ФАСБ

Аеробні спорутоворювальні бактерії порядку Bacillales нерівномірно розподілені між кілька родин, що входять до його складу: Bacillaceae, Paenibacillaceae, Planococcaceae, Thermoactinomycetaceae, Alicyclobacillaceae та Sporolactobacillaceae. Ступінь вивченості представників на предмет бактеріоциногенності дуже неоднорідна. Так, найбільш вивченими в цьому відношенні є представники родини Bacillaceae та рід *Bacillus* зокрема. Дещо меншою мірою – родина Paenibacillaceae та її типовий рід. Такий стан речей робить сумнівними узагальнення щодо усіх ФАСБ на основі наявних даних.

Родина Bacillaceae найбільша і найбільш вивчена з родин ряду Bacillales. На цей час до неї входить 52 роди. Найбільший з них містить 335 видів, з надзвичайно різноманітною екологією (що фактично відображує все, що було сказано про екологію ФАСБ вище). Цікавим є питання про гетерогенність за характером бактеріоциногенності різних родів родини Bacillaceae. Проблема полягає у значно меншому ступені вивчення цих родів порівняно з типовим [19, 30, 37].

Родина Paenibacillaceae близька до Bacillaceae містить близькі для них екологічно види, геноми яких, однак, несуть ознаки довгого самостійного еволюційного шляху. Рід *Paenibacillus* включає близько 200 видів, серед яких є азотфіксатори. У представників родин Paenibacillaceae та Bacillaceae відмічені всі відомі бактеріоцини [23].

Родина *Planococcaceae*, відрізняється від вищеперерахованих тим, що лише близько половини родів не містять здатних до утворення ендоспор видів, хоча допускається, загальний предок даної групи таку властивість мав. Досить цікавим у перспективі є порівняння бактеріоциногенності спорогенних та аспорогенних представників цієї родини. На жаль, дані про бактеріоциногенність представників цієї родини відсутні [19, 63].



Представники родини *Thermoactinomycetaceae*, до якої входять морфоекологічні «двійники» представників роду *Streptomyces*, не вивчені з погляду бактеріоциногенності. Те ж стосується родини *Alcylobacillaceae*, що представлена термоацидофілами. Можливо, специфічна екологія призвела до того, що дані мікроорганізми практично «не потребують» знярядь активної конкуренції. Дослідження з геномного майнінгу не виявили відкритих рамок зчитування бактеріоцинів у геномах досліджених аліциклобацил. Інформації щодо аналогічних досліджень представників *Thermoactinomycetaceae* на цей час не виявлено [19, 23].

Родина *Sporolactobacillaceae* представлена монофілетичною групою бацил, що засвоїла екологію молочнокислих бактерій, не втративши здатності до утворення ендоспор. Роботи з бактеріоциногенності представників даної групи відсутні. Варто мати на увазі, що бактеріоциногенний вид *Bacillus coagulans* відносно нещодавно відносився до цієї родини [23, 63].

### Заклучення

Вивчення бактеріоцинів ФАСБ знаходиться на початку свого шляху. З суто фундаментальної точки зору, дослідження бактеріоцинів ФАСБ повинні пролити світло на закономірності еволюції бактеріальних систем активної конкуренції, їх взаємодію з МГЕ різного типу. Навіть без урахування особливостей цитофізіології бацил дані щодо їх бактеріоцинів важливі для порівняння з даними для інших груп прокариот [80].

Проблема резистентності патогенних бактерій до традиційних антимікробних препаратів може бути принаймні частково вирішена за допомогою бактеріоцинів. Крім того, хімічно вони більш однорідні за антибіотики, їх фізіологічна дія на організм людини легше піддається прогнозуванню [13, 73].

Механізми формування резистентності бактерій до дії бактеріоцинів лише тільки починають вивчати. Одним з теоретично можливих шляхів її виникнення є перенесення генів від продуцентів. Адекватне розуміння природної різноманітності кластерів бактеріоциногенності дасть змогу прогнозувати можливий характер резистентності до конкретного бактеріоцину і враховуючи ці дані впроваджувати ефективні клінічні практики майбутнього [1, 50, 60]. Важливим напрямком прикладних досліджень є синтез нових сполук на основі природних бактеріоцинів [51, 55].

Не дивлячись на очевидний потенціал бактеріоцинів з погляду багатьох галузей промисловості, їх практичне використання залишається досить обмеженим. Це пояснюється недостатніми знаннями про переважну більшість бактеріоцинів, інерцією технологій та масової свідомості, що досі орієнтовані на антибіотики як засоби хіміотерапії та профілактики бактеріозів [5]. Практичні перспективи дослідження бактеріоцинів ФАСБ полягають, в першу чергу, у пошуку нових засобів хімічного захисту від патогенних чи шкідливих для людини мікроорганізмів [24].

Можливими проблемами медичного використання бактеріоцинів є висока імуногенність деяких їх типів, що може призводити до реакцій гіперчутливості і мало вивченими механізмами формування патогенами резистентності до дії бактеріоцинів [45].



Бактеріоцини можуть використовуватися для боротьби з патогенами сільськогосподарських тварин та рослин, що спричиняють значні економічні збитки у світовому масштабі [17, 28].

Перспективним є використання бактеріоцинів при виробництві харчових продуктів для їх довгострокового зберігання замість хімічних консервантів, оскільки вони є нетоксичними для людини білками [53, 68].

**M.D. Shtenikov, V.O. Ivanytsia**

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

## **BACTERIOCINS OF FACULTATIVELY-ANAEROBIC ENDOSPOREFORMING BACTERIA**

### **Summary**

*The survey provides information on low-weight proteins of endosporeforming facultative anaerobic bacteria (EFAB) – bacteriocins that have antimicrobial activity, their classification, structure and properties. The bacteriocins of EFAB are divided into that, which undergoes secondary modification during the synthesis, and such that do not. First, in its turn, they are divided into lantibiotics, cyclic peptides, sactibiotics, glicocins, linearazole-containing and lasso bacteriocins, the last are found in EFAB still only with bioinformatics methods. Among non-modified bacteriocins of EFAB there are separated pediocin-like and unclassified ones. A separate group is represented by heavy bacteriocins that have a high molecular weight, and are currently poorly understood. Knowledge of different taxonomic groups in terms bacteriocinogenity EFAB is very uneven currently. General producers are belonging to the genera Bacillus and Paenibacillus, for some families there is no information in the literature at all. Investigation of EFABbacteriocins is a promising direction both in fundamental and applied research.*

*Key words: bacteriocins, Bacillus, Bacillaceae, lantibiotics, sactibiotics, azol-containing peptides, lasso-peptides.*

**Н.Д. Штеников, В.О. Иваныця**

Одесский Национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64,  
e-mail: shtenikovnik@gmail.com

## **БАКТЕРИОЦИНЫ ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБ- НЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

### **Реферат**

*В обзоре приведена информация о низкомолекулярных белках факультативно-анаэробных спорообразующих бактерий (ФАСБ) – бактериоцинах, которые обладают антимикробной активностью, их классификации, структуре и свойствах. Среди бактериоцинов ФАСБ выделяют подвергающиеся посттрансляционной модификации и не подвергающиеся таковой.*



Первые в свою очередь делятся на лантибиотики, циклические пептиды, сактибиотики, гликоцины, линейные азол-содержащие бактериоцины и лассо-пептиды, выявленные у ФАСБ пока только методами биоинформатики. Среди немодифицированных ФАСБ выделяют педиоцин-подобные и неклассифицированные. Отдельно стоит группа высокомолекулярных бактериоцинов, которые имеют высокую молекулярную массу и на данный момент слабо изучены. Исследованность разных таксономических групп ФАСБ на предмет бактериоциногенности на данный момент очень неравномерна. Основные продуценты принадлежат к родам *Bacillus* и *Raenibacillus*, для некоторых семейств информация в литературе отсутствует. Изучение бактериоцинов ФАСБ – перспективное направление как фундаментальных, так и прикладных исследований.

*Ключевые слова:* бактериоцины, *Bacillus*, *Bacillaceae*, лантибиотики, сактибиотики, азол-содержащие пептиды, лассо-пептиды.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Abee T. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms // FEMS Microbiology Letters. – 1995. – **129**, N 1. – P. 1–10.
2. Abriouel H., Franz C.M., Ben Omar N., Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins // FEMS Microbiology Rev. – 2011. – **35**, N 1. – P. 201–232.
3. Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D., Kuipers O.P. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2016. – **100**, N 7. – P. 2939–2951.
4. Ansari A., Aman A., Siddiqui N.N., Iqbal S. Ali ul Qader S. Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17 // Pak. J. Pharm. Sci. – 2012. – **25**, N 1. – P. 195–201.
5. Antimicrobial Resistance. Global Report on surveillance 2014 // Режим доступа: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)
6. Arnison P.G., Bibb M.J., Bierbaum G., Bowers A.A., Bugni T.S et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature // Nat. Prod. Rep. – 2013. – **30**, N 1. – P. 108–160.
7. Ash C. et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences // Letters in Applied Microbiology. – 1991. – **13**, N 4. – P. 202–206.
8. Balciunas E. M., Martinez F.A.C., Todorov S.D., Bernadette Dora Gombossy de Melo Francob, Attilio Converti, Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review // Food Control. – 2013. – **32**, N 1. – P. 134–142.
9. Bali V., Panesar P.S., Bera M.B., Kennedy J.F. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2016. – **56**. – P. 817–834.
10. Barbosa J., Caetano T., Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus* spp. // J. Nat. Prod. – 2015. – **78**, N 11. – P. 2850–2866.



11. Baruzzi F., Quintieri L., Morea M., Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp.* and applications in food // Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. – 2011. – 2. – P. 1102–1111.

12. Basi-Chipalu S., Dischinger J., Josten M., Szekat C., Zweynert A., Sahl H.-G., Bierbaum G. Pseudomycoicidin, a Class II Lantibiotic from *Bacillus pseudomycooides* // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – 81, N 10. – P. 3419–3429.

13. Bastos M. C., Coelho M.L., Santos O.C. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria // Microbiology. – 2015. – 161. – P. 683–700.

14. Bochmann S.M., Spieß T., Kötter P., Entian K.-D. Synthesis and Succinylation of Subtilin-Like Lantibiotics Are Strongly Influenced by Glucose and Transition State Regulator AbrB // Appl Environ Microbiol. – 2015. – 81. – P. 614–622.

15. Chopra L., Singh G., Choudhary V., Sahoo D.K. Sonorensin: an Antimicrobial Peptide, Belonging to the Heterocycloanthracin Subfamily of Bacteriocins, from a New Marine Isolate, *Bacillus sonorensis* MT93 // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – 80, N 10. – P. 2981–2990.

16. Collins F.W., O'Connor P.M., O'Sullivan O., Rea M.C., Hill C., Ross R.P. Formicin – a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576 // Microbiology. – 2016. – 162, N 9. – P. 1662–1671.

17. Crvallo D.E., Gianmarco S.D., Silva R.J. Health and Environment in Aquaculture. – In Tech, 2012. – 428 p.

18. Czaplewski L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., Fischetti V.A., Foster S., Gilmore B.F., Hancock R.E., Harper D., Henderson I.R., Hilpert K., Jones B.V., Kadioglu A., Knowles D., Ólafsdóttir S., Payne D., Projan S., Shaunak S., Silverman J., Thomas C.M., Trust T.J., Warn P., Rex J.H. Alternatives to antibiotics – a pipeline portfolio review // Lancet Infect Dis. – 2016. – 16, N 2. – P. 239–251.

19. De Vos P., et al. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes. – Springer Heidelberg London New York, 2009. – 1450 p.

20. Dias L., Caetano T., Pinheiro M., Mendo S. The lanthipeptides of *Bacillus methylotrophicus* and their association with genomic islands // Systematic and Applied Microbiology. – 2015. – 38, N 8. – P. 525–533.

21. Donk van der W.A., Nair S.K. Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic Enzymes // Current Opinion in Structural Biology. – 2014. – 29. – P. 58–66.

22. Drider D., Bendali F., Naghmouchi K., Chikindas M.L. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents // Probiotics & Antimicro. Prot. – 2016. – 8, N 4. – P. 177–182.

23. Dworkin M. (Editor-in-Chief) The Prokaryotes Third Edition Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. – Springer, 2006. – 1182 p.

24. Egan K., Field D., Rea M.C., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? // Front. Microbiol. – 2016. – 7. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4824776/>



25. *Fajardo-Cavazos P., Maughan H., Nicholson W.L.* Evolution in the *Bacillaceae* // *Microbiol. Spectrum*. – 2014. –**2**, N 5. – Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104365>
26. *Fickers P.* Antibiotic Compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2012. –**8**,N 1. –P. 38–43.
27. *Field D., Cotter P.D., Hill C., Ross R. P.* Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success // *Front. Microbiol.* – 2015. –**6**. – P. 1363.
28. *Gillor O., Etzion A., Riley M. A.* The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2008. –**81**, N4. – P. 591–606.
29. *Ghadbane M., Harzallah D., Laribi A.I., Jaouadi B., Belhadj H.* Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Bacteriocin Isolated from *Brevibacillus brevis* Strain GM100 // *Biotechnol. Biochem.* – 2013. –**77**,N 1. – P. 151–160.
30. *Gholizadeh S.S., Baserisalehi M., Bahador N.* Study on Bioactive Compounds Produced by Soil Origin *Brevibacillus spp.* // *Nature Environment and Pollution Technology*. – 2013. –**12**, N 2. – P. 209–214.
31. *Huang T., Zhang X., Pan J., Su X., Jin X., Guan X.* Purification and Characterization of a Novel Cold Shock Protein-Like Bacteriocin Synthesized by *Bacillus thuringiensis* // *Sci. Rep.* – 2016. Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5071883/>
32. *Jack R.W., Tagg J.R., Ray B.* Bacteriocins of gram-positive bacteria // *Microbiol. Rev.* – 1995. – **59**, N 2. – P. 171–200.
33. *Ji S., Li W., Baloch A.R., Wang M., Cao B.* Improved production of sublancin via introduction of three characteristic promoters into operon clusters responsible for this novel distinct glycopeptide biosynthesis // *Microbial Cell Factories*. – 2015. –Режим доступу: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0201-0>
34. *Kate S.* Perspectives on lantibiotic discovery – where have we failed and what improvements are required? // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2015. –**10**, N 4. – P. 315–320 .
35. *Khosa S., Lagedroste M., Smits S.H.J.* Protein Defense Systems against the Lantibiotic Nisin: Function of the Immunity Protein NisI and the Resistance Protein NSR // *Front. Microbiol.* – 2016. – 7. – P. 504.
36. *Klaenhammer T.R.* FEMS Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria // *Microbiol. Rev.* –1993. –**12**, N 1-3. – P. 39–85.
37. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature // Режим доступу: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>
38. *Lohans C.T., Vederas J.C.* Structural characterization of thioether-bridged Bacteriocins // *The Journal of Antibiotics*. –2013. –**67**, N 1. – P. 23–30.
39. *López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A., Barboza-Corona J.E., Bideshi D.K.* Antimicrobial Peptides: Current and Potential Applications in Biomedical Therapies // *BioMed Research International*. –2015. –**2015**. –Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365301/>
40. *Malanovic N., Lohner K.* Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria // *Bacteria Pharmaceuticals*. – 2016. –**9**, N 3. – P. 59.





41. *Mandic-Mulec I. et al.* Ecology of *Bacillaceae*. // *Microbiology Spectrum*. – 2015. – **3**, N 1. – P. 1–24.
42. *Marsh A.J., O'Sullivan O., Ross R.P., Cotter P.D., Hill C.* In silico analysis highlights the frequency and diversity of type I lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria // *BMC Genomics*. – 2010. – **11**. – P. 679.
43. *Mathur H., Rea M.C., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P.* The Sactibiotic Subclass of Bacteriocins: An Update // *Current Protein and Peptide Science*. – 2015. – **16**, N 6. – P. 549–558.
44. *Mathur H., Rea M.C., Fallico V., Cotter P.D., Hill C., Ross P.* Flow Cytometry as a Tool to Study the Effects of Bacteriocins on Prokaryotic and Eukaryotic Cells // *J. Mol. Biomarkers Diagn*. – 2016. – **8**. – Режим доступу: <https://www.omicsonline.org/open-access/flow-cytometry-as-a-tool-to-study-the-effects-of-bacteriocins-on-prokaryotic-and-eukaryotic-cells-2155-9929-S8-013.php>
45. *Mercer D.K., O'Neil D.A.* Peptides as the next generation of anti-infectives // *Future Med. Chem*. – 2013. – **5**, N 3. – P. 315–337.
46. *Mondol M.A.M., Shin H.J., Islam M.T.* Diversity of Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: Chemistry and Biological Activity // *Mar. Drugs*. – 2013. – **11**, N 8. – P. 2846–2872.
47. *Mongkolthanaruk W.* Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals // *J. Microbiol. Biotechnol*. – 2012. – **22**, N 12. – P. 1597–1604.
48. *Montalbán-López M., Heel van A.J., Kuipers O.P.* Employing the promiscuity of lantibiotic biosynthetic machineries to produce novel antimicrobials // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2016. – **41**, N 1. – P. 5–18.
49. *Montalbán-López M., Sánchez-Hidalgo M., Cebrián R., Maqueda M.* Discovering the Bacterial Circular Proteins: Bacteriocins, Cyanobactins, and Pilins // *The Journal Of Biological Chemistry*. – 2012. – **287**, N 32. – P. 27007–27013.
50. *Nawrocki K.L., Crispell E.K., McBride S.M.* Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria // *Antibiotics*. – 2014. – **3**, N 4. – P. 461–492.
51. *Newman D.J., Cragg G. M.* Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // *J. Nat. Prod*. – 2016. – **79**. – P. 629–661.
52. *Nissen-Meyer J., Opegård C., Rogne P., Haugen H.S., Kristiansen P.E.* Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins // *Probiotics Antimicrob Proteins*. – 2010. – **2**, N 1. – P. 52–60.
53. *O'Connor P.M., Ross R.P., Hill C., Cotter P.D.* Antimicrobial antagonists against food pathogens; a bacteriocin perspective // *Current Opinion in Food Science*. – 2015. – **2**. – P. 51–57.
54. *Oliveira V.F., Abreu Y.J.L., Fleming L.R., Nascimento J. S.* Anti-Staphylococcal and Antifungal Substances Produced By Endospore-Forming Bacilli // *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. – 2012. – **2**, N 4. – P. 154–157.
55. *Ongey E.L., Neubauer P.* Lanthipeptides: chemical synthesis versus in vivo biosynthesis as tools for pharmaceutical production // *Microb. Cell. Fact.* – 2016. – **15**. – P. 97.
56. *Panasiuk K., Andruschenko Y.* Antimicrobial Substances Of Natural Origin As An Alternative To Antibiotics // *Scientific Works of NUFT*. – 2014. – **20**, N 4. – P. 61–68.



57. *Pidot S.J., Coyne S., Kloss F., Hertweck C.* Antibiotics from neglected bacterial sources // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2014. – **304**, N 1. – P. 14–22.
58. *Pranckutė P., Kaunietis A., Kananavičiūtė R., Lebedeva J., Kuisienė N., Šaleikienė J., Čitavičius D.* Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus sp.* bacteria isolated from different environments // *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. – 2015. – **5**, N 2. – P. 155–161.
59. *Prieto M.L., O'Sullivan L., Tan S.P., McLoughlin P., Hughes H., O'Connor P.M., Cotter P.D., Lawlor P.G., Gardiner G.E.* Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus spp.* // *Mar. Drugs*. – 2012. – **10**, N 10. – P. 2280–2299.
60. *Revilla-Guarinos A., Gebhard S., Mascher T., Zúñiga M.* Defence against antimicrobial peptides: different strategies in Firmicutes // *Environmental Microbiology*. – 2014. – **16**, № 5. – P. 1225–1237.
61. *Riley M.A., Chavan M.A. (Eds.)* Bacteriocins: Ecology and Evolution. – Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007 – 135 p.
62. *Riley M. A., Robinson S. M., Roy C.M., Dorit R.L.* Rethinking the composition of a rational antibiotic arsenal for the 21st century // *Future Med. Chem.* – 2013. – **5**, N 11. – P. 1231–1242.
63. *Rosenberg E.* (Editor-in-Chief) *The Prokaryotes Firmicutes and Tenericutes* Fourth Edition. – Springer, 2014. – 573p.
64. *Salazar-Marroquín E.L., Galán-Wong L.J., Moreno-Medina V.R., Reyes-López M.Á., Pereyra-Alfárez B.* Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications // *Reviews in Medical Microbiology*. – 2016. – **27**, N 3. – P. 95–101.
65. *Sansinenea E., Ortiz A.* Secondary metabolites of soil *Bacillus spp* // *Biotechnol Lett.* – 2011. – **33**, N 8. – P. 1523–1538.
66. *Sella S.R., Vandenberghe L.P., Soccol C.R.* *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review // *Crit Rev Biotechnol.* – 2014. – **35**, N 4. – P. 533–545.
67. *Senbagam D., Gurusamy R., Senthilkumar B.* Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02 // *Asian. Pac. J. Trop. Med.* – 2013. – **6**, N 12. – P. 934–941.
68. *Sharma V., Aseri G.K., Sohal J.S., Khare N., Kumar V.* Exploration of Bacteriocins as Potential Food Preservatives // *International Journal of Pharmaceutical Technology and Biotechnology*. – 2016. – **3**, N 1. – P. 55–82.
69. *Singh P.K., Chittpurna, Ashish, Sharma V., Patil P.B., Korpole S.* Identification, Purification and Characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus sp.* Strain GI-9 // *PLoS One*. – 2012. – **7**, N 3. – Режим доступу: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031498>
70. *Snyder A.B., Worobo R.W.* Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety // *J. Sci. Food. Agric.* – 2014. – **94**, N 1. – P. 28–44.



71. Spieß T., Korn S.M., Kötter P., Entian K.-D. Autoinduction Specificities of the Lantibiotics Subtilin and Nisin // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – **81**, N 22. – P. 7914–7923.
72. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Molecular Microbiology. – 2005. – **56**, N 4. – P. 845–857.
73. Sumi C.D., Yang B.W., Yeo I.C., Hahn Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for Antibiotics Chandra // Can. J. Microbiol. – 2015. – **61**, N 2. – P. 93–103.
74. Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria // Bacteriological Reviews. – 1976. – **40**, N 3. – P. 722–756.
75. Wang G., Mishra B., Lau K., Lushnikova T., Golla R., Wang X. Antimicrobial Peptides in 2014 // Pharmaceuticals. – 2015. – **8**, N 1. – P. 123–150.
76. Willey J.M., van der Donk W.A. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function // Annu. Rev. Microbiol. – 2007. – **61**, N 1. – P. 477–501.
77. Xin B., Zheng J., Xu Z., Song X., Ruan L., Peng D., Sun M. The *Bacillus cereus* Group Is an Excellent Reservoir of Novel Lanthipeptides // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – **81**, N 5. – P. 1765–1774.
78. Zhang Q., Yu Y., Velásquez J.E., van der Donk W.A. Evolution of lanthipeptide synthetases // PNAS. – 2012. – **109**, N 45. – P. 18361–18366.
79. Zhao X., Kuipers O.P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species // BMC Genomics. – 2016. – **17**, N 1. – P. 882.
80. Zheng J., Gänzle M.G., Lin X.B., Ruan L., Sun M. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome // Environmental Microbiology. – 2015. – **17**, N 6. – P. 2133–2143.

## Referens

1. Abee T. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. FEMS Microbiology Letters. 1995;(129):1–10.
2. Abriouel H, Franz CM, Ben Omar N, Gálvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Rev. 2011;(35):201–232.
3. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016(100):2939–2951.
4. Ansari A, Aman A, Siddiqui NN, Iqbal S, Ali ul Qader S. Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. Pak. J. Pharm. Sci. 2012;(25):195–201.
5. Antimicrobial Resistance. Global Report on surveillance 2014 Available at: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)
6. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, Camarero JA, Campopiano DJ, Challis GL, Clardy J, Cotter PD, Craik DJ, Dawson M, Dittmann E, Donadio S, Dorrestein PC, Entian KD, Fischbach MA, Garavelli JS, Göransson U, Gruber CW, Haft DH, Hemscheidt TK, Hertweck C, Hill C, Horswill AR, Jaspars M, Kelly WL, Klinman JP, Kuipers OP, Link AJ, Liu W, Marahiel MA, Mitchell DA, Moll GN, Moore BS, Müller R, Nair SK, Nes IF, Norris GE,



Olivera BM, Onaka H, Patchett ML, Piel J, Reaney MJ, Rebuffat S, Ross RP, Sahl HG, Schmidt EW, Selsted ME, Severinov K, Shen B, Sivonen K, Smith L, Stein T, Süßmuth RD, Tagg JR, Tang GL, Truman AW, Vederas JC, Walsh CT, Walton JD, Wenzel SC, Willey JM, van der Donk W.A. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* 2013;(30):108–160.

7. Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology.* 1991;(13):202-206

8. Balciunas EM, Martinez FAC, Todorov SD, Gombossy de Melo Franco BD, Converti A, Pinheiro de Souza Oliveira R. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control.* 2013;(32):134–142.

9. Bali V, Panesar PS, Bera MB, Kennedy JF. Bacteriocins: Recent Trends and Potential Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2016;(56):817–834.

10. Barbosa J, Caetano T, Mendo S. Class I and Class II Lanthipeptides Produced by *Bacillus spp.* *J. Nat. Prod.* 2015;(78):2850–2866.

11. Baruzzi F, Quintieri L, Morea M, Caputo L. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus spp.* and applications in food. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 2011;(2):1102–1111.

12. Basi-Chipalu S, Dischinger J, Josten M, Szekat C, Zweynert A, Sahl HG, Bierbaum G. Pseudomycoicidin, a Class II Lantibiotic from *Bacillus pseudomycooides*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015;(81):3419–3429.

13. Bastos MC, Coelho ML, Santos OC. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology.* 2015(161):683–700.

14. Bochmann SM, Spieß T, Kötter P, Entian KD. Synthesis and Succinylation of Subtilin-Like Lantibiotics Are Strongly Influenced by Glucose and Transition State Regulator AbrB. *Appl Environ Microbiol.* 2015;(81):614–622.

15. Chopra L, Singh G, Choudhary V, Sahoo DK. Sonorensin: an Antimicrobial Peptide, Belonging to the Heterocycloanthracin Subfamily of Bacteriocins, from a New Marine Isolate, *Bacillus sonorensis* MT93. *Applied and Environmental Microbiology.* 2014;(80):2981–2990.

16. Collins FW, O'Connor PM, O'Sullivan O, Rea MC, Hill C, Ross RP. Formicin – a novel broad-spectrum two-component lantibiotic produced by *Bacillus paralicheniformis* APC 1576. *Microbiology.* 2016;(162):1662–1671.

17. Crvallo DE, Gianmarco SD, Silva RJ. Health and Environment in Aquaculture. *InTech*, 2012. 428 p.

18. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, Foster S, Gilmore BF, Hancock RE, Harper D, Henderson IR, Hilpert K, Jones BV, Kadioglu A, Knowles D, Ólafsdóttir S, Payne D, Projan S, Shaunak S, Silverman J, Thomas CM, Trust TJ, Warn P, Rex JH. Alternatives to antibiotics – a pipeline portfolio review. *Lancet Infect Dis.* 2016;16:239–251.

19. De Vos P, Garrity G, Jones, D, Krieg, NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W. *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes.* Springer Heidelberg London New York, 2009. 1450 p.



20. Dias L, Caetano T, Pinheiro M, Mendo S. The lanthipeptides of *Bacillus methylotrophicus* and their association with genomic islands. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015;(38):525-533.
21. Donk van der WA, Nair SK. Structure and mechanism of lanthipeptide biosynthetic Enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*. 2014;(29):58-66.
22. Drider D, Bendali F, Naghmouchi K, Chikindas ML. Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2016;(8):177-182
23. Dworkin M. *The Prokaryotes Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. Springer, 2006. 1182 p.
24. Egan K, Field D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? *Front Microbiol.* 2016; 7, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4824776/>
25. Fajardo-Cavazos P., Maughan H., Nicholson W.L. Evolution in the *Bacillaceae*. *Microbiol. Spectrum*. 2014; 2, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104365>
26. Fickers P. Antibiotic Compounds from *Bacillus*: Why are they so Amazing? *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 2012;(8):38–43.
27. Field D, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bioengineering Lantibiotics for Therapeutic Success. *Front. Microbiol.* 2015;(6):1363.
28. Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;(81):591–606.
29. Ghadbane M, Harzallah D, Laribi AI, Jaouadi B, Belhadj H. Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Bacteriocin Isolated from *Brevibacillus brevis* Strain GM100. *Biotechnol. Biochem.* 2013;(77):151–160.
30. Gholizadeh SS, Baserisalehi M, Bahador N. Study on Bioactive Compounds Produced by Soil Origin *Brevibacillus spp.* *Nature Environment and Pollution Technology*. 2013;(12):209–214.
31. Huang T, Zhang X, Pan J, Su X, Jin X, Guan X. Purification and Characterization of a Novel Cold Shock Protein-Like Bacteriocin Synthesized by *Bacillus thuringiensis*. *Sci. Rep.* – 2016; 6, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5071883/>
32. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 1995;(59):171–200.
33. Ji S, Li W, Baloch AR, Wang M, Cao B. Improved production of sublancin via introduction of three characteristic promoters into operon clusters responsible for this novel distinct glycopeptide biosynthesis. *Microbial Cell Factories*. 2015; 14, available at: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-015-0201-0>
34. Kate S. Perspectives on lantibiotic discovery – where have we failed and what improvements are required? *Expert Opin. Drug Discov.* 2015;(10):315–320 .
35. Khosa S, Lagedroste M, Smits SHJ. Protein Defense Systems against the Lantibiotic Nisin: Function of the Immunity Protein NisI and the Resistance Protein NSR. *Front. Microbiol.* 2016;(7):1-9.
36. Klaenhammer TR. FEMS Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Microbiol. Rev.* 1993;(12):39–85.



37. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Available: <http://www.bacterio.net/bacillus.html>
38. Lohans CT, Vederas JC. Structural characterization of thioether-bridged Bacteriocins. *The Journal of Antibiotics*. 2013;(67):23–30.
39. López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, Barboza-Corona JE, Bideshi DK. Antimicrobial Peptides: Current and Potential Applications in Biomedical Therapies. *BioMed Research International*. 2015; 2015, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4365301/>
40. Malanovic N, Lohner K. Antimicrobial Peptides Targeting Gram-Positive Bacteria. *Bacteria Pharmaceuticals*. 2016;(9):1–33.
41. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD.. Ecology of *Bacillaceae*. *Microbiology Spectrum*. 2015;(3):1-24.
42. Marsh AJ, O'Sullivan O, Ross RP, Cotter PD, Hill C. In silico analysis highlights the frequency and diversity of type I lantibiotic gene clusters in genome sequenced bacteria. *BMC Genomics*. 2010;(11):1-21.
43. Mathur H, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. The Sactibiotic Subclass of Bacteriocins: An Update. *Current Protein and Peptide Science*. 2015. (16):549–558.
44. Mathur H, Rea MC, Fallico V, Cotter PD, Hill C, Ross P. Flow Cytometry as a Tool to Study the Effects of Bacteriocins on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *J. Mol. Biomarkers Diagn*. 2016; 8, available at: <https://www.omicsonline.org/open-access/flow-cytometry-as-a-tool-to-study-the-effects-of-bacteriocins-on-prokaryotic-and-eukaryotic-cells-2155-9929-S8-013.php>
45. Mercer DK, O'Neil DA. Peptides as the next generation of anti-infectives. *Future Med. Chem*. 2013;(5):315–337.
46. Mondol MAM, Shin HJ, Islam MT. Diversity of Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: Chemistry and Biological Activity. *Mar. Drugs*. 2013;(11):2846–2872.
47. Mongkolthanaruk W. Classification of *Bacillus* Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2012;(22):1597–1604.
48. Montalbán-López M, Heel van AJ, Kuipers OP. Employing the promiscuity of lantibiotic biosynthetic machineries to produce novel antimicrobials. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;(41):5–18.
49. Montalbán-López M, Sánchez-Hidalgo M, Cebrián R, Maqueda M. Discovering the Bacterial Circular Proteins: Bacteriocins, Cyanobactins, and Pilins. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2012;(287):27007–27013.
50. Nawrocki KL, Crispell EK, McBride SM. Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics*. 2014;(3):461–492.
51. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod*. 2016;(79):629–661.
52. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2010;(2):52–60.
53. O'Connor PM, Ross RP, Hill C, Cotter PD. Antimicrobial antagonists against food pathogens; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*. 2015;(2):51-57.



54. Oliveira VF, Abreu YJL, Fleming LR, Nascimento JS. Anti-Staphylococcal and Antifungal Substances Produced By Endospore-Forming Bacilli. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012;(2):154–157.

55. Ongey EL, Neubauer P. Lanthipeptides: chemical synthesis versus in vivo biosynthesis as tools for pharmaceutical production. *Microb. Cell. Fact.* 2016;(15):97.

56. Panasiuk K, Andruschenko Y. Antimicrobial Substances Of Natural Origin As An Alternative To Antibiotics. *Scientific Works of NUFT*. 2014;(20):61-68.

57. Pidot SJ, Coyne S, Kloss F, Hertweck C. Antibiotics from neglected bacterial sources. *International Journal of Medical Microbiology*. 2014;(304):14–22.

58. Pranckutė P, Kaunietis A, Kananavičiūtė R, Lebedeva J, Kuisienė N, Šaleikienė J, Čitavičius D. Differences of antibacterial activity spectra and properties of bacteriocins, produced by *Geobacillus sp.* bacteria isolated from different environments. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2015;(5):155–161.

59. Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, O'Connor PM, Cotter PD, Lawlor PG, Gardiner GE. Assessment of the Bacteriocinogenic Potential of Marine Bacteria Reveals Lichenicidin Production by Seaweed-Derived *Bacillus spp.* *Mar. Drugs*. 2012;(10):2280–2299.

60. Revilla-Guarinos A, Gebhard S, Mascher T, Zúñiga M. Defence against antimicrobial peptides: different strategies in Firmicutes. *Environmental Microbiology*. 2014;(16):1225–1237

61. Riley MA, Chavan MA. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2007. 135 p.

62. Riley MA, Robinson SM, Roy CM, Dorit RL. Rethinking the composition of a rational antibiotic arsenal for the 21st century. *Future Med. Chem.* 2013;(5):1231–1242.

63. Rosenberg E. *The Prokaryotes Firmicutes and Tenericutes*. Springer, 2014. 573p.

64. Salazar-Marroquín EL, Galán-Wong LJ, Moreno-Medina VR, Reyes-López MÁ, Pereyra-Alferez B. Bacteriocins synthesized by *Bacillus thuringiensis*: generalities and potential applications. *Reviews in Medical Microbiology*. 2016;(27):95–101.

65. Sansinenea E, Ortiz A. Secondary metabolites of soil *Bacillus spp.* *Biotechnol Lett*. 2011;(33):1523–1538.

66. Sella SR, Vandenberghe LP, Socol CR. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications – a review. *Crit Rev Biotechnol*. 2014;(35):533–545.

67. Senbagam D, Gurusamy R, Senthilkumar B. Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* NS02. *Asian. Pac. J. Trop. Med*. 2013;(6):934–941.

68. Sharma V, Aseri GK, Sohal JS, Khare N, Kumar V. Exploration of Bacteriocins as Potential Food Preservatives. *International Journal of Pharmaceutical Technology and Biotechnology*. 2016; (3):55–82.



69. Singh PK, Chittipurna, Ashish, Sharma V, Patil PB, Korpole S. Identification, Purification and Characterization of Laterosporulin, a Novel Bacteriocin Produced by *Brevibacillus sp.* Strain GI-9 PLoS One. 2012; 7, available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0031498>
70. Snyder AB, Worobo RW. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *J. Sci. Food. Agric.* 2014;(94):28–44.
71. Spieß T, Korn SM, Kötter P, Entian KD. Autoinduction Specificities of the Lantibiotics Subtilin and Nisin. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015. –(81):7914–7923.
72. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology.* 2005;(56):845–857.
73. Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahn YT. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for Antibiotics Chandra. *Can. J. Microbiol.* 2015;(61):93–103.
74. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews.* 1976;(40):722–756.
75. Wang G, Mishra B, Lau K, Lushnikova T, Golla R, Wang X. Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals.* 2015;(8):123–150.
76. Willey JM, van der Donk WA. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annu. Rev. Microbiol.* 2007;(61):477–501.
77. Xin B, Zheng J, Xu Z, Song X, Ruan L, Peng D, Sun M. The *Bacillus cereus* Group Is an Excellent Reservoir of Novel Lanthipeptides. *Applied and Environmental Microbiology.* 2015;(81):1765–1774.
78. Zhang Q, Yu Y, Vélasquez JE, van der Donk WA. Evolution of lanthipeptide synthetases. *PNAS.* 2012;(109):18361–18366.
79. Zhao X, Kuipers OP. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics.* 2016;(17):1-18.
80. Zheng J, Gänzle MG, Lin XB, Ruan L, Sun M. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environmental Microbiology.* 2015;(17):2133–2143.

Стаття надійшла до редакції 12.06.2017 р.





А.С. Пастиря<sup>1,2</sup>, І.О. Собко<sup>2</sup>, Є.О. Шайхет<sup>2</sup>, В.П. Поліщук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
 ННЦ «Інститут біології та медицини», вул. Глушкова, 2, Київ, Україна, 03022,  
 тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: ann.pastyria@gmail.com

<sup>2</sup>ТОВ «Центр ветеринарної діагностики» вул. Ушинського, 25-А,  
 Київ, Україна, 03151

## СЕРОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОЇ БУРСАЛЬНОЇ ХВОРОБИ В ГОСПОДАРСТВАХ УКРАЇНИ В ПЕРІОД З 2014 ПО 2016 РОКИ

**Мета.** Здійснення серологічного моніторингу вірусу інфекційної бурсальної хвороби у місцях промислового вирощування птиці для оцінки актуальності цього збудника для України. **Методи.** Антитіла до вірусу ІБХ виявляли у 83 господарствах із 20 областей України. Загалом проаналізовано 20126 зразків сироватки крові відібраних від курей (*Gallus domesticus*) вік яких становив від 1 до 506 днів. Для детекції антитіл до вірусу ІБХ використовували метод непрямого імуноферментного аналізу, який здійснювали за допомогою комерційного тест-набору IDEXX IBD (США). Значення оптичної густини визначали за довжини хвилі 650 нм. Титр антитіл розраховували з використанням програмного забезпечення xCheck (США). Значення титрів вище за 396 вважали позитивними. **Результати.** Антитіла до вірусу ІБХ виявлені у сироватці крові курей в усіх досліджених господарствах областей України. Антитіла виявлено у 19236 зразках сироватки крові. Значення титрів антитіл у позитивних зразках складали від 415 до 15576. Середнє значення титрів становило 5952. Відсоток позитивних зразків у різних областях був дуже високим та коливався від 82,5% у Херсонській області до 100% у Чернігівській, Полтавській та інших областях. Антитіла до вірусу ІБХ виявлено у всіх досліджуваних вікових груп птахів. Максимальний рівень антитіл материнського походження фіксували на 1-4 день після народження. **Висновки.** Нами було вперше показано значне поширення вірусу ІБХ в Україні. Отримані дані свідчать про необхідність посилення засобів біобезпеки та профілактики задля контролю поширення цього вірусу в господарствах.

*Ключові слова:* вірус ІБХ, серомоніторинг, антитіла.

Вірус інфекційної бурсальної хвороби (ІБХ) поширений у більшості країн, що спеціалізуються на промисловому вирощуванні домашньої птиці. Вірус ІБХ належить до родини *Birnaviridae*, роду *Avibirnavirus*. Геном вірусу представлений двома сегментами (А – 3,2 тис. п.о. та В – 2,8 тис. п.о.) дволанцюгової РНК. Він уражує курчат 2-7 тижневого віку та призводить до



патологій, що коливаються від імуносупресивного стану до загибелі значної частини поголів'я [2]. Вірус передається горизонтально, аліментарним шляхом. У середовищі вірус зберігається до декількох місяців, тому інфікування може відбуватися навіть після повної заміни поголів'я [3]. Особливої актуальності проблема ІБХ набула в 90-х роках ХХ століття у зв'язку з появою в Європі та Азії нових високовірулентних штамів, а в США – варіантних штамів вірусу ІБХ, інфікування якими спричиняло значні економічні збитки. Причиною появи нових штамів були мутації у гіперваріабельному регіоні гену VP2, що кодує основний структурний білок вірусу [5]. Протягом 10 років нові штами набули поширення у країнах Європи, Азії, Африки та Південної Америки. На 63-й Генеральній Сесії Міжнародного Епізоотичного Бюро в Парижі (15–19 травня 1995 р.) було повідомлено про спалахи ІБХ у 95% країн-членів та оголошено про значну соціально-економічну важливість цього захворювання у світі [3].

Існує два серотипи вірусу. До першого серотипу належать патогенні штами, до другого — непатогенні. Клінічні прояви захворювання дуже варіюють залежно від ступеню вірулентності штамів вірусу ІБХ. На сьогодні виділяють 3 групи патогенних штамів: класичні вірулентні призводять до 20% смертності, високовірулентні — до 70% смертності та варіантні штами, що не спричиняють загибелі, але призводять до значної імуносупресії птиці [2, 6].

Одним із основних методів контролю епізоотичної ситуації в господарствах є серологічний моніторинг. В його основі лежить виявлення антитіл до збудників захворювань за допомогою імуноферментного аналізу. Дані серологічного моніторингу використовують для побудови карт поширення небезпечних збудників та оцінки їх актуальності на досліджуваних територіях [1, 9].

Оскільки епізоотична ситуація за вірусом ІБХ в Україні не досліджена, метою нашої роботи було здійснити серологічний моніторинг для оцінки актуальності цього збудника для України та поширення його у місцях промислового вирощування птиці.

### Матеріали та методи

Для виявлення антитіл до вірусу ІБХ було обрано 83 господарства із 20 областей України. Інформація про клінічні ознаки захворювання надавалася ветеринарними лікарями господарств. Загалом впродовж 2014–2016 років було проаналізовано 20126 зразків сироватки крові відібраних від курей (*Gallus domesticus*) вік яких становив від 1 до 506 днів. Для детекції антитіл до вірусу ІБХ використовували метод непрямого імуноферментного аналізу, який здійснювали за допомогою комерційного тест-набору IDEXX IVD (США). Кров, відібрану від птахів, центрифугували 15 хвилин за 1000 g для отримання сироватки. Готову сироватку, яку попередньо розводили розчинником у співвідношенні 1:500, використовували для дослідження. Всю послідовність аналізу здійснювали за рекомендаціями виробника. Значення оптичної густини визначали за допомогою імуноферментного аналізатора (Sunrise Тесап, Швейцарія) за довжини хвилі 650 нм. Титр антитіл розраховували з використанням програмного забезпечення xCheck (США). Значення титрів вищих за 396 вважали позитивними.



### Результати та обговорення

Антитіла до вірусу ІБХ були виявлені у сироватці крові курей з усіх досліджених господарств та областей України. Ці дані вказують на значне поширення вірусу ІБХ в Україні та неблагополучну епізоотичну ситуацію за цим захворюванням у більшості регіонах.

Протягом дослідження антитіла до вірусу ІБХ виявлено у 19236 зразках сироватки крові. Значення титрів антитіл у позитивних зразках склали від 415 до 15576. Середнє значення титрів становило 5952. Різниця у рівнях антитіл виявлених у зразках сироватки крові може свідчити про різний час інфікування птахів, оскільки рівень антитіл зростає поступово зі збільшенням концентрації вірусу у крові. Високий рівень антитіл може свідчити також про ураження високовірулентними штамми вірусу ІБХ [7].

Відсоток позитивних зразків у різних областях коливався від 82,5% у Херсонській області до 100% у Чернігівській, Полтавській та інших областях (табл.).

Таблиця  
Результати виявлення антитіл до вірусу ІБХ у зразках сироватки крові курей  
Table

#### The results of IBDV antibody detection in chicken serum samples

| Область          | Кількість досліджених господарств | Кількість досліджених сироваток крові |           |           | Відсоток позитивних зразків |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------------|
|                  |                                   | всього                                | негативні | позитивні |                             |
| Вінницька        | 5                                 | 447                                   | 3         | 444       | 99,33                       |
| Волинська        | 1                                 | 20                                    | 0         | 20        | 100                         |
| Дніпропетровська | 4                                 | 472                                   | 60        | 412       | 87,29                       |
| Донецька         | 2                                 | 179                                   | 0         | 179       | 100                         |
| Житомирська      | 1                                 | 20                                    | 0         | 20        | 100                         |
| Запорізька       | 4                                 | 474                                   | 14        | 460       | 94,05                       |
| Київська         | 21                                | 10321                                 | 577       | 9744      | 94,4                        |
| Кіровоградська   | 1                                 | 24                                    | 1         | 23        | 95,83                       |
| Львівська        | 7                                 | 1975                                  | 39        | 1936      | 98,03                       |
| Одеська          | 5                                 | 126                                   | 1         | 125       | 99,21                       |
| Полтавська       | 1                                 | 12                                    | 0         | 12        | 100                         |
| Рівненська       | 2                                 | 548                                   | 7         | 541       | 98,72                       |
| Сумська          | 1                                 | 100                                   | 0         | 100       | 100                         |
| Тернопільська    | 3                                 | 639                                   | 5         | 634       | 99,22                       |
| Харківська       | 3                                 | 150                                   | 9         | 141       | 94                          |
| Херсонська       | 2                                 | 80                                    | 14        | 66        | 82,5                        |
| Хмельницька      | 4                                 | 617                                   | 40        | 577       | 93,52                       |
| Черкаська        | 9                                 | 3442                                  | 120       | 3322      | 96,51                       |
| Чернігівська     | 5                                 | 244                                   | 0         | 244       | 100                         |
| АР Крим          | 2                                 | 236                                   | 0         | 236       | 100                         |
| Всього           | 83                                | 20126                                 | 890       | 19236     | 96,78                       |



Результати серологічного моніторингу поширення вірусу ІБХ в Україні збігаються із загальноєвропейською та загальносвітовою тенденцією. За даними Berg випадки інфекційної бурсальної хвороби були зафіксовані у 95% країн-членів Міжнародного Епізоотичного Бюро, до складу якого входять, зокрема, більшість європейських країн [3]. Jackwood також показав поширення різноманітних штамів вірусу ІБХ не лише в Європі, а й у Північній та Південній Америці, Африці та Азії [5].

Антитіла до вірусу ІБХ виявлені у всіх досліджуваних вікових груп птахів. Наявність антитіл у сироватці крові курчат свідчить про передачу антитіл від перехворілих або вакцинованих курей. Максимальний рівень антитіл материнського походження фіксували на 1–4 день після народження. Отримані результати збігаються з раніше опублікованими даними. Показник рівня антитіл у курчат використовують для розрахунку віку при проведенні вакцинації. Показано, що високі рівні материнських антитіл здатні знищувати вакцинний вірус та погіршувати ефективність вакцинації [4]. Тому серологічний моніторинг слід здійснювати перед проведенням вакцинації, аналізувати рівень антитіл материнського походження у курчат різного віку та визначати вік пташенят у якому рівень антитіл знижується до мінімального допустимого значення (значення титру від 150 до 1000 залежно від виду вакцин) для вакцинопрофілактики [8].

У результаті роботи було показано, що усі досліджені господарства були серопозитивними за вірусом ІБХ. Нами вперше показано значне поширення вірусу ІБХ в Україні. Наявність антитіл відмічено у всіх вікових груп та відмічено найвищі титри антитіл у курчат віком від 1 до 4 днів, що є критичним при застосуванні вакцинопрофілактики інфекційної бурсальної хвороби. Дані наших досліджень доповнюють загальноєвропейську та загальносвітову картину поширення збудника, а також вказують на необхідність запровадження програм контролю епізоотичної ситуації в господарствах України, зокрема здійснення серологічного моніторингу перед застосуванням вакцинопрофілактики інфекційної бурсальної хвороби.

А.С. Пастыря<sup>1,2</sup>, И.А. Собко<sup>2</sup>, Е.А. Шайхет<sup>2</sup>, В.П. Полищук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
ННЦ «Институт биологии и медицины», ул. Глушкова, 2, Киев, Украина, 03022,  
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: ann.pastyria@gmail.com

<sup>2</sup>ООО «Центр ветеринарной диагностики» ул. Ушинского, 25-А,  
Киев, Украина, 03151

## СЕРОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ РАСПОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ В ХОЗЯЙСТВАХ УКРАИНЫ В ПЕРИОД С 2014 ПО 2016 ГОДА

### Реферат

*Цель.* Осуществление серологического мониторинга вируса инфекционной бурсальной болезни в местах промышленного выращивания птицы для оценки актуальности этого возбудителя для Украины.



**Методы.** Антитела к вирусу ИБВ выявляли в 83 хозяйствах из 20 областей Украины. Всего было проанализировано 20126 образцов сыворотки крови отобранных от кур (*Gallus domesticus*) возраст которых составлял от 1 до 506 дней. Для детекции антител к вирусу ИБВ использовали метод непрямого иммуноферментного анализа, который осуществляли с помощью коммерческого тест-набора IDEXX IBD (США). Значение оптической плотности определяли при длине волны 650 нм. Титр антител рассчитывали с использованием программного обеспечения xCheck (США). Значение титров выше 396 считали положительными. **Результаты.** Антитела к вирусу ИБВ были обнаружены в сыворотке крови кур из всех исследованных хозяйств областей Украины. Антитела были обнаружены в 19236 образцах сыворотки крови. Значение титров антител в положительных образцах составляли от 415 до 15576. Среднее значение титров составило 5952. Процент положительных образцов в различных областях был очень высоким и колебался от 82,5% в Херсонской области до 100% в Черниговской, Полтавской и других областях. Антитела к вирусу ИБВ были обнаружены во всех исследуемых возрастных группах птиц. Максимальный уровень антител материнского происхождения фиксировали на 1–4 день после рождения. **Выводы.** Нами впервые показано широкое распространение вируса ИБВ в Украине. Полученные данные свидетельствуют о необходимости усиления средств биобезопасности и профилактики для контроля распространения этого вируса в хозяйствах.

*Ключевые слова:* вирус ИБВ, серомониторинг, антитела.

**A. Pastyria<sup>1,2</sup>, I. Sobko<sup>2</sup>, E. Shaykchet<sup>2</sup>, V. Polischuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre

“Institute of Biology and Medicine, 2, Glushkova Str., Kyiv, Ukraine, 03022;

tel.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: ann.pastyria@gmail.com

<sup>2</sup>Center of Veterinary Diagnostics” LTD, 25-A, Ushinskogo Str., Kyiv, Ukraine, 03151

## SEROPREVALENCE OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN PRIVATE POULTRY BREEDINGS OF UKRAINE FROM 2014 TO 2016

### Summary

**Aim.** Implementation of serological monitoring of infectious bursal disease virus in poultry households to study the relevance of this pathogen in Ukraine. **Methods.** Presence of IBDV antibodies was analyzed in 83 farms of 20 regions of Ukraine. Overall 20,126 serum samples from selected chicken (*Gallus domesticus*) which ages ranged from 1 to 506 days were analyzed. For the IBDV antibodies detection there were used the indirect ELISA method, which was carried out using commercial test kits IDEXX IBD (USA). The optical absorbance value was determined by wavelength of 650 nm. Antibody titers were calculated using software xCheck (USA). Titer values above 396 were considered as positive. **Results.** IBDV antibodies were found in the serum of chickens from all the analyzed farms and regions of Ukraine. Antibodies were detected in 19.236 samples of blood serum. The value of antibody titers in positive samples varied from 415 to 15576. Mean titers were 5952. The percentage of positive samples in different areas was very high and ranged from 82.5% in the Kherson region to 100% in the Chernihiv,



*Poltava and other regions. IBDV antibodies were detected in all age groups of birds. The maximum level of maternal antibodies were observed at 1–4 days after birth. Conclusions. We have shown the significant spread of IBDV in Ukraine. These data suggest the need to strengthen of biosecurity and management in order to prevent the spread of the virus in the farms.*

*Key words: IBDV, seroprevalence, antibodies.*

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Abraham-Oyiguh J., Adewumi M.O., Onoja A.B. Suleiman I. Seroprevalence of Infectious Bursal Disease Virus in Local Chickens in Udu Local Government Area of Delta State, South East Nigeria / J. Abraham-Oyiguh, M.O. Adewumi, A.B. Onoja, I. Suleiman // Journal of Immunoassay and Immunochemistry. – 2015 – Vol. 36. – № 4. – P. 398–404.*
2. *Alkie T.N., Rautenschlein S. Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects / T.N. Alkie, S. Rautenschlein // Veterinary Medicine: Research and Reports. – 2016. – Vol. 7. – P. 9–18.*
3. *Berg T.P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review / T.P. Berg // Avian Pathology. – 2000. – Vol. 29. – P. 175–194.*
4. *De Wit J.J. Gumboro disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula / J.J. De Wit // Polish Veterinary Journal. – 1998. – Vol. 3. – № 3. – P. 19–22.*
5. *Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents / D.J. Jackwood, S. Sommer-Wagner // Virology. – 2007. – Vol. 365. – № 2. – P. 369–375.*
6. *Muller H., Mundt E., Etteradossi N. Current status of vaccines against infectious bursal disease / H. Muller, E. Mundt, N. Etteradossi // Avian Pathology. – 2012. – Vol. 41. – № 2. – P. 133–139.*
7. *Rehman Z.U., Meng C., Umar S., Munir M. Interaction of infectious bursal disease virus with the immune system of poultry / Z.U. Rehman, C. Meng, S. Umar, M. Munir // World's Poultry Science Journal. – 2016. – Vol. 72, № 4. – P. 805–820.*
8. *Schultz R.D. Veterinary vaccines and diagnostics / R.D. Schultz // Academic press. Advances in veterinary medicine. – 1999. – Vol. 41. – P. 481–522.*
9. *Swai E.S., Kessy M.J., Sanka P.N., Mtui P.F. A serological survey for infectious bursal disease virus antibodies in free range chickens in Northern Tanzania / E.S. Swai, M.J. Kessy, P.N. Sanka, P.F. Mtui // Journal of the South African Veterinary Association. – 2011. – Vol. 82. – № 1. – P. 32–35.*

### Referens

1. Abraham-Oyiguh J, Adewumi MO, Onoja AB, Suleiman I. Seroprevalence of infectious bursal disease virus in local chickens in Udu Local Government Area of Delta State, South East Nigeria. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2015;(36):398–404.
2. Alkie TN, Rautenschlein S. Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2016;(7):9–18.



3. Berg TP. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*. 2000;(29):175–194.
4. De Wit JJ. Gumboro disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. *Polish Veterinary Journal*. 1998;(3):19–22.
5. Jackwood DJ, Sommer-Wagner SE. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*. 2007;(365):369–375.
6. Muller H, Mundt E, Etteradossi N. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology*: 2012;(41):133–139.
7. Rehman ZU, Meng C, Umar S, Munir M. Interaction of infectious bursal disease virus with the immune system of poultry. *World's Poultry Science Journal*. 2016;(72):805–820.
8. Schultz RD. *Veterinary vaccines and diagnostics*. Academic press. *Advances in veterinary medicine*. 1999;(41):481–522.
9. Swai ES, Kessy MJ, Sanka PN, Mtui PF. A serological survey for infectious bursal disease virus antibodies in free range chickens in Northern Tanzania. *Journal of the South African Veterinary Association*. 2011;(82):32–35.

Стаття надійшла до редакції 16.05.2017 р.



**М.Б. Галкін, А.С. Семенець, М.О. Фіногенова,  
Б.М. 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 ТА РУХЛИВІСТЬ БАКТЕРІЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* З РІЗНИМИ РІВНЯМИ ВМІСТУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ**

**Мета роботи:** встановлення особливостей утворення біоплівки штамами *Pseudomonas aeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату (цикло-ди-ГМФ) та переміщення їх клітин шляхом плавання, роїння і смикання. **Матеріали та методи.** У дослідженні були використані штами дикого типу *P. aeruginosa* PA01 і штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (PA01 ΔwspF1) рівнями цикло-ди-ГМФ. Культивування проводили в 24-гункових плоскодонних планшетах Nucleon у середовищі LB при 37 °C впродовж 24 годин. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим. Рухливість клітин визначали на чашках Петрі з використанням середовищ з різним вмістом агару: плавання 0,3%, роїння 0,6% та смикання 1,5%. Структуру біоплівок оцінювали за допомогою світлової та лазерної конфокальної мікроскопії. **Результати.** Встановлено, що *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 порівняно з *P. aeruginosa* PA01 і PA01 ΔwspF1 утворює біоплівку з порушеною структурою, маса якої знижена у 3,7 і 5 разів, відповідно. У той же час, кількість планктонних клітин над біоплівкою *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 була вищою ніж у двох інших штамів. За морфологією біоплівки штамів *P. aeruginosa* PA01 і PA01 ΔwspF1 виявилися подібними: містили 3D структури, які у разі штаму дикого типу були за розміром більшими і чітко відокремленими одна від одної. Біоплівка *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 рівномірно покривала поверхню, була дуже тонкою і не містила тривимірних компонентів. Встановлено, що найбільш рухливими при здійсненні усіх типів переміщення по поверхні є клітини штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Штами *P. aeruginosa* PA01 і PA01 ΔwspF1 мали однакову активність при переміщенні шляхом плавання і смикання, але різнилися за здатністю до роїння – у *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 цей процес блокований. Діаметр зони розповсюдження клітин *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 шляхом роїння становив 62 мм і в 1,4 рази перевищував показник *P. aeruginosa* PA01 – 43 мм. Морфологія зон роїння цих штамів суттєво різнилася за низкою ознак. **Висновки.** Низький внутрішньоклітинний вміст цикло-ди-ГМФ перешкоджає утворенню повноцінної біоплівки і сприяє планктонному способу існування *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 та активному переміщенню клітин різними поверхнями. Підвищений рівень цикло-ди-ГМФ забезпечує формування біоплівки з більшою у порівнянні з контрольним штамом масою, і гальмує процес роїння у *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1.





*Ключові слова:* циклічний дигуанозинмонофосфат, *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pJN2133, *Pseudomonas aeruginosa* PA01  $\Delta$ uspF1, структура біоплівки, рухливість, тип переміщення.

Рухливість клітин *Pseudomonas aeruginosa* грає ключову роль у колонізації і розповсюдженні бактерій різними поверхнями. Вона також сприяє формуванню біоплівок – тривимірних структурованих спільнот мікроорганізмів, зв'язаних з поверхнею [11]. Клітини *P. aeruginosa* здатні здійснювати три типи рухів, які забезпечуються різними структурами: плавання і роїння з використанням джгутиків та смикання, залежне від пілей 4 типу [18]. Циклічний дигуанозинмонофосфат (цикло-ди-ГМФ) виявився в центрі уваги дослідників у результаті останніх досягнень в області мікробної геноміки і підвищеного інтересу до багатоклітинних мікробних угруповань [10, 14, 15]. Цитоплазматичний цикло-ди-ГМФ є вторинним месенджером бактерій, який регулює численні фізіологічні процеси: систему міжклітинної комунікації, утворення біоплівок, рухливість, диференціювання, вірулентність [2, 3, 5]. Залежно від концентрації цього регулятора бактерії здійснюють перехід від вільного, рухливого способу життя до прикріпленого існування у складі біоплівок [14]. Встановлено, що цикло-ди-ГМФ комплексно впливає на різні стадії формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*, починаючи з адгезії клітин до поверхні і до етапу розпаду. Ця сполука регулює біосинтез компонентів матриксу біоплівки, сигнальних молекул системи кворуму, біосурфактантів [8, 12]. Залежність напрямку змін інтенсивності тих чи інших процесів від внутрішньоклітинної концентрації цикло-ди-ГМФ призвела до конструювання численних мутантних штамів з гіпер- або гіпопродукцією вторинного месенджера. Їх використання дозволяє поглибити знання щодо ролі цієї молекули, зокрема, на молекулярному рівні, у процесах внутрішньоклітинної сигналізації, а також встановити можливість управління утворенням і розпадом біоплівок через вплив на систему обміну цикло-ди-ГМФ.

Метою даного дослідження було визначення особливостей утворення біоплівки штамми *P. aeruginosa* з різними рівнями цикло-ди-ГМФ та переміщення їх клітин шляхом плавання, роїння і смикання.

### Матеріали та методи

В роботі були використані штам дикого типу *P. aeruginosa* PA01 з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова і штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) та підвищеним (PA01  $\Delta$ uspF1) рівнями циклічного дигуанозинмонофосфату, люб'язно надані О. Ржепішевською з університету м. Умео, Швеція. Культивування здійснювали при 37 °С у рідкому середовищі LB з таким складом (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0.

Визначення маси біоплівки та кількості планктонних клітин проводили за культивування у 24-лункових плоскодонних планшетах Nuclon впродовж 24 годин. Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм. Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин біоплівки фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв,



висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хвилин барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 1,5 мл лізувального розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густина вимірювали при довжині хвилі 592 нм [4].

Усі спектрофотометричні вимірювання здійснювали на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary).

Для оцінки морфології біоплівки стерильні покривні скельця розміром 24×24 мм вносили у пластикові стерильні чашки Петрі діаметром 35 мм, які містили по 2 мл середовища з клітинами *P. aeruginosa* ( $10^3$  КУО/мл). Чашки зі скельцями інкубували 24 год при 37 °С. Після інкубації скельця відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96% спиртом 10 хв. Після фіксації зразки забарвлювали 1% водним розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Після висушування скельця мікроскопіювали з використанням мікроскопу Primo Star PC, Carl Zeiss та фотографували за допомоги камери Olympus DCM (3,0 M pixels). У разі лазерної конфокальної мікроскопії препарати забарвлювали низькомолекулярним флюорохромом SYTO9, який здатний проникати через непошкоджені плазматичні мембрани, зображення отримували з використанням об'єктиву 40×/1,3 на LSM 510 (Carl Zeiss, Germany).

Для оцінки рухливості клітин нічну культуру у кількості 2 мкл вносили у центр чашки Петрі з агаризованим середовищем, яке містило м'ясо-пептонний бульйон – 8,0 г/л, глюкозу – 50,0 г/л і агар, та інкубували 24 год при 37 °С. Для різних типів руху агар додавали до кінцевих концентрацій 0,3%, 0,6% і 1,5% у разі плавання, роїння та смикання, відповідно. При дослідженні плавання і роїння суспензію клітин наносили на поверхню агару, смикання – шляхом уколу на дно чашки Петрі під агар. У разі смикання по закінченні інкубації агар видаляли, а клітини забарвлювали 1% кристалічним фіолетовим. Результати оцінювали за діаметром зони розповсюдження клітин від точки інюкуляції [13].

Усі експерименти проводили у 3-х незалежних дослідях з 3–6 повторами у кожному. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників ( $\bar{X}$ ) та їх стандартну помилку ( $S\bar{X}$ ). Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [1].

### Результати та їх обговорення

Використані у роботі штами *P. aeruginosa* з низьким (PA01 pJN2133) і з високим (PA01  $\Delta$ wspF1) по відношенню до батьківського штаму вмістом цикло-ди-ГМФ були сконструйовані у лабораторії Caroline S. Harwood [8].

Визначення характеру трьох типів руху, притаманних псевдомонадам, показало, що досліджувані штами відрізняються за плаванням лише у кількісному відношенні (рис. 1, табл. 1). Так, відстані розповсюдження клітин *P. aeruginosa* PA01 і PA01  $\Delta$ wspF1 були практично однаковими, у той час,



як клітини штаму PA01 рJN2133 переміщувалися більш активно і діаметр відповідної зони був більшим у 1,8 рази. Дослідження здатності до роїння, показало, що на тлі високого внутрішньоклітинного рівня цикло-ди-ГМФ у *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ wspF1 повністю блокований цей тип руху.

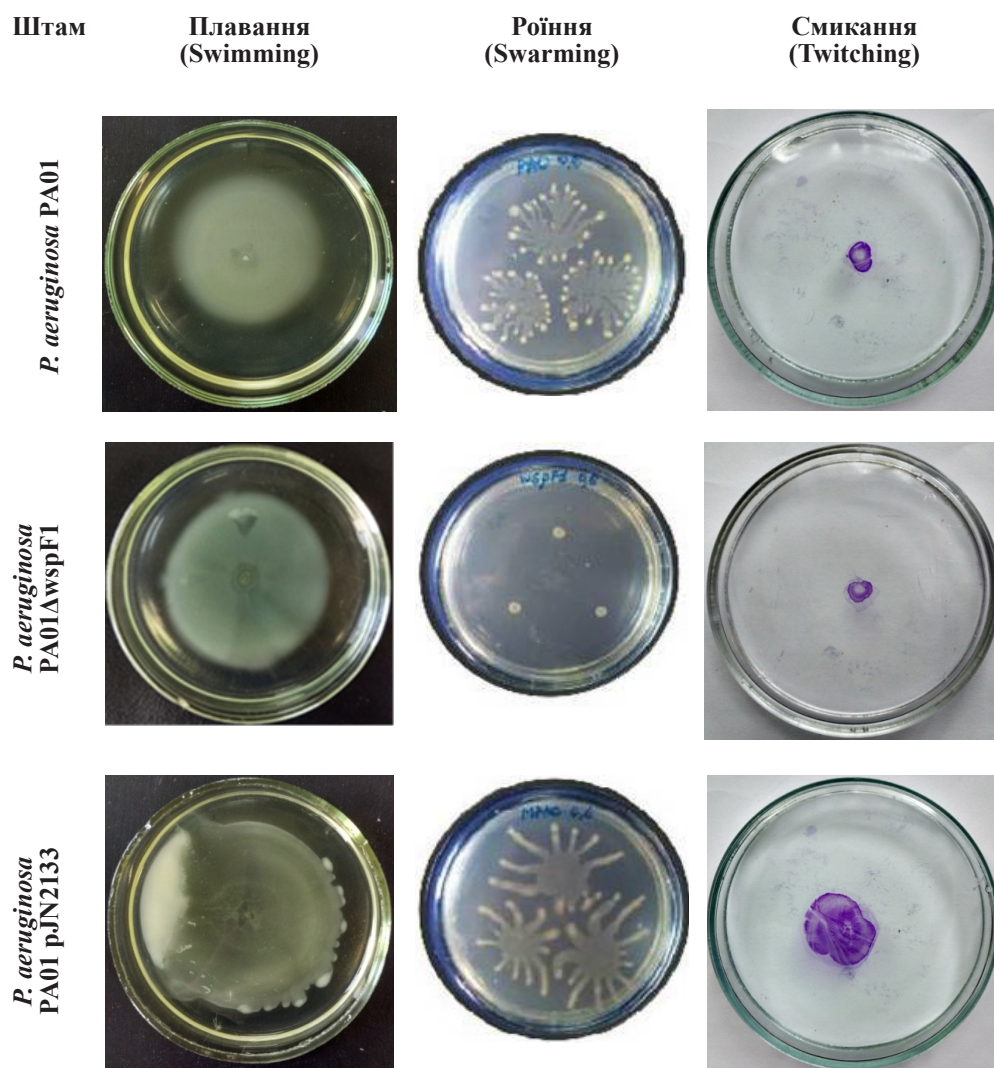


Рис. 1. Колонії бактерій *P. aeruginosa* з різними рівнями цикло-ди-ГМФ, за різних типів їх руху (смикання – забарвлення кристалічним фіолетовим)

Fig. 1. Motility images of *P. aeruginosa* cells with different level of c-di-GMP (twitching motility – crystal violet staining)

Клітини двох інших штамів активно переміщуються шляхом роїння, але зони їх свармінгу суттєво відрізняються за морфологічними ознаками. Ці відмінності були докладно описані нами раніше [17]. Клітини штаму PA01 рJN2133 з дуже низьким вмістом цикло-ди-ГМФ переміщувалися по твердій

поверхні під шаром агару шляхом смикання на відстань у 4–5 разів більшу, ніж *P. aeruginosa* PA01 та PA01  $\Delta$ wspF1.

Таблиця 1

Діаметр зон (мм) розповсюдження клітин досліджуваних штамів *P. aeruginosa* за різних типів руху

Table 1

Motility zone diameter (mm) of *P. aeruginosa* cells of studied strains

| Штам                                     | Плавання (Swimming) | Ройння (Swarming) | Смикання (Twitching) |
|--|---------------------|-------------------|----------------------|
| <i>P. aeruginosa</i> PA01                | 38 ± 3              | 43 ± 3            | 6 ± 0                |
| <i>P. aeruginosa</i> PA01 $\Delta$ wspF1 | 39 ± 3              | 5 ± 0*            | 5 ± 0                |
| <i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133        | 68 ± 4*             | 62 ± 5*           | 24 ± 2*              |

Примітка: \* - різниця достовірна ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з *P. aeruginosa* PA01  
 Note: \* – significant difference ( $p \leq 0,05$ ) compared with *P. aeruginosa* PA01

Враховуючи, що зростання рівня цикло-ди-ГМФ є сигналом для переходу клітин бактерій від вільного існування до прикріпленого [5–7,11], оцінювали здатність досліджуваних штамів формувати біоплівки та особливості морфології останніх. На рис. 2 наведено загальний вигляд добових біоплівок за даними світлової і лазерної конфокальної мікроскопії.

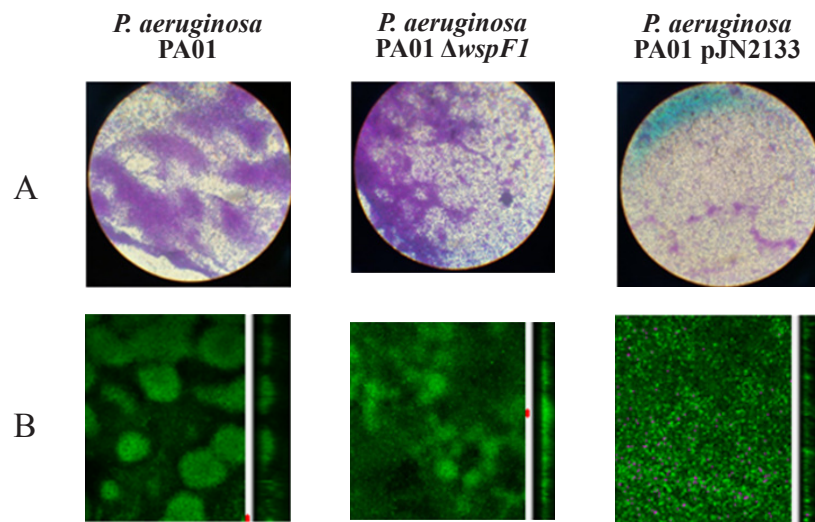


Рис. 2. Фото біоплівок, утворених бактеріями *P. aeruginosa* з різними рівнями цикло-ди-ГМФ  
 (А – світлова мікроскопія, забарвлення кристалічним фіолетовим;  
 В – лазерна конфокальна мікроскопія, забарвлення SYTO9)

Fig. 2. Images of biofilms, forming by *P. aeruginosa* cells with different level of c-di-GMP  
 (A – light microscopy, crystal violet staining;  
 B – laser confocal microscopy, SYTO9 staining)



Оцінка стану біоплівки досліджуваних штамів виявила суттєві відмінності в їх загальному вигляді та структурі між штамами *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ *wspF1*, з одного боку, та штамом *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, з другого. За даними світлової мікроскопії у біоплівках *P. aeruginosa* PA01 і PA01  $\Delta$ *wspF1* добре видно багатоклітинні тривимірні структури, у той час, як біоплівка *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 таких утворень не містить і виглядає "моношаровою" (рис. 2А). Крім того, у біоплівці штаму PA01 pJN2133 її компоненти: клітини і позаклітинний матрикс, розташовані рівномірно на поверхні скла.

Дані лазерної конфокальної мікроскопії підтверджують характеристики біоплівки, одержані за допомогою світлового мікроскопа (рис. 2В). Оскільки SYTO9, на відміну від кристалічного фіолетового, забарвлює тільки клітини у складі біоплівки *P. aeruginosa* PA01 чітко видні відокремлені одна від одної 3D структури, які у літературі називають грибоподібними. У біоплівці *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ *wspF1* такі структурні одиниці мають у 2–3 рази менший діаметр і розташовані близько одна до одної, а деякі злиті між собою. Біоплівка *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 є однорідною і дуже тонкою.

Кількісні характеристики біоплівки досліджуваних штамів наведені у табл. 2.

Таблиця 2

**Маса добової біоплівки і кількість планктонних клітин досліджуваних штамів *P. aeruginosa***

Table 2

**Biofilm mass and planktonic cells content of *P. aeruginosa* studied strains**

| Показник                            | <i>P. aeruginosa</i> PA01 | <i>P. aeruginosa</i> PA01 $\Delta$ <i>wspF1</i> | <i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133 |
|-------------------------------------|---------------------------|---|-----------------------------------|
| Кількість планктонних клітин, ОГ540 | 0,227 $\pm$ 0,035         | 0,252 $\pm$ 0,038                               | 0,362 $\pm$ 0,047                 |
| Маса біоплівки, ОГ592               | 1,666 $\pm$ 0,184         | 2,216 $\pm$ 0,193                               | 0,450 $\pm$ 0,052*                |

Примітка: \* – різниця достовірна ( $p \leq 0,05$ ) у порівнянні з *P. aeruginosa* PA01

Note: \* – significant difference ( $p \leq 0,05$ ) compared with *P. aeruginosa* PA01

Одержані результати свідчать, що найщільнішу біоплівку утворює штам *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ *wspF1*. Її маса перевищує масу біоплівки батьківського штаму на 33%. У той же час, маса біоплівки штаму *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 є меншою у 3,7 рази порівняно з *P. aeruginosa* PA01 і у 5 разів порівняно зі штамом PA01  $\Delta$ *wspF1*. Кількість планктонних клітин, що знаходяться у рідкому середовищі над біоплівкою, у разі *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 перевищує на 44–60% цей показник для обох інших штамів.

Підсумовуючи одержані результати, можна відмітити, що штам з низьким вмістом цикло-ди-ГМФ має підвищену активність за усіма типами руху різними поверхнями. Це частково пояснює особливості біоплівки, утвореної *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Іншим чинником, що зумовлює формування тонкої біоплівки з малою масою, є знижена здатність клітин даного штаму до адгезії [14–17].



Крім того, враховуючи, що процес утворення біоплівки контролюється не тільки цикло-ди-ГМФ, а також системою міжклітинної комунікації, не можна виключити пригнічення функціонального стану системи кворуму у даного штаму. Цікавою є залежність процесу формування біоплівки *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 від умов культивування. На відміну від даного дослідження, в якому культивування здійснювалося у стаціонарних умовах, при застосуванні проточних камер цей штам взагалі не утворював біоплівки [8].

Таким чином, одержані результати дозволяють зробити висновок, що бактерії *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 з низьким внутрішньоклітинним вмістом цикло-ди-ГМФ не утворюють повноцінної біоплівки. Їм притаманний планктонний спосіб існування та активне переміщення клітин різними поверхнями. У бактерій *P. aeruginosa* PA01  $\Delta wspF1$  з підвищеним рівнем цикло-ди-ГМФ формуються біоплівки з більшою порівняно з контрольним штамом масою і гальмується процес роїння.

**Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, М.А. Финогенова,  
Б.Н. 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

## **ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И ПОДВИЖНОСТЬ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМИ УРОВНЯМИ СОДЕРЖАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА**

### **Реферат**

**Цель работы.** Выявление особенностей образования биопленки штаммами *Pseudomonas aeruginosa* с разными уровнями циклического дигуанозинмонофосфата (цикло-ди-ГМФ) и перемещения их клеток путём плавания, роения и подергивания. **Материалы и методы.** В исследовании использовали штамм дикого типа *P. aeruginosa* PA01 и штаммы с низким (PA01 рJN2133) и повышенным (PA01  $\Delta wspF1$ ) уровнями цикло-ди-ГМФ. Культивирование проводили в 24-луночных плоскодонных планшетах Nucleon в среде LB при 37 °C в течение 24 часов при исследовании образования биопленки. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, массу биопленки – по методу окраски кристаллическим фиолетовым. Подвижность клеток определяли на чашках Петри с использованием сред с разным содержанием агара: плавание 0,3%, роение 0,6% и подергивание 1,5%. Структуру биопленок оценивали с помощью световой и лазерной конфокальной микроскопии. **Результаты.** Установлено, что *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 по сравнению с *P. aeruginosa* PA01 и PA01  $\Delta wspF1$  образует биопленку с нарушенной структурой, масса которой снижена в 3,7 и 5 раз, соответственно. В то же время, количество планктонных клеток над биопленкой *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 было большим, чем у двух других штаммов. По морфологии биопленки штаммов *P. aeruginosa* PA01 и PA01  $\Delta wspF1$  оказались подобными: содержали 3D структуры, которые в случае штамма дикого типа были больше и четче отделены друг от друга. Биопленка *P. aeruginosa* PA01 рJN2133 равномерно покрывала поверхность, была очень тонкой и не



содержала трехмерных компонентов. Показано, что наиболее подвижными при осуществлении все типов перемещения по поверхности являются клетки штамма *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Штаммы *P. aeruginosa* PA01 i PA01 ΔwspF1 владели одинаковой активностью при перемещении путем плавания и подергивания, но отличались по способности к роению – у *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1 этот процесс заблокирован. Диаметр зоны распространения клеток *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 путем роения составил 62 мм и в 1,4 раза превышал показатель *P. aeruginosa* PA01 – 43 мм. Морфология зон роения этих штаммов существенно отличается по ряду признаков. **Выводы.** Низкое внутриклеточное содержание цикло-ди-ГМФ препятствует образованию полноценной биопленки и способствует планктонному способу существования *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 и активному перемещению клеток по разным поверхностям. Повышенный уровень цикло-ди-ГМФ обеспечивает формирование биопленки с большей, по сравнению с контрольным штаммом, массой и тормозит процесс роения у *P. aeruginosa* PA01 ΔwspF1.

**Ключевые слова:** циклический дигуанозинмонофосфат (цикло-ди-ГМФ), *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pJN2133, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 ΔwspF1, структура биопленки, подвижность, типы перемещения.

**M.B. Galkin, A.S. Semenets, M.O. Finogenova, B.M. 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 AND MOTILITY OF BACTERIA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITH DIFFERENT C-DI- GMP LEVEL**

### **Summary**

**Aim.** Biofilm formation abilities determination in *Pseudomonas aeruginosa* strains with different cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) level and swimming, swarming, and twitching motilities. **Materials and methods.** Wild type strain *P. aeruginosa* PA01 and strains with low (PA01 pJN2133) and high (PA01 ΔwspF1) level of c-di-GMP were used as test-organisms. Bacteria were cultivated in 24-wells Nuclon plates in LB medium at 37 °C for 24 hours for biofilm formation. Determination of planktonic cells amount was carried out spectrophotometrically, biofilm formation – by CV-test. Cells motility was tested on Petri dishes with different agar content: swimming 0.3%, swarming 0.6%, and twitching 1.5%. **Results.** It was shown that *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 form biofilm with impaired structure and in 3.7 and 5 times less intensive than *P. aeruginosa* PA01 and PA01 ΔwspF1. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 planktonic cells amount was higher than in wild type strain and PA01 ΔwspF1. According to the morphology of a biofilm of strains *P. aeruginosa* PA01 and PA01 ΔwspF1 were similar: they contained 3D structures, which in the case of the wild type strain were larger and more clearly separated from each other. The biofilm *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 evenly covered the surface, was very thin and did not contain three-dimensional components. It is shown that cells of *P. aeruginosa*



PA01 pJN2133 strain are the most mobile in all types of surface movement. Strains of *P. aeruginosa* PA01 and PA01  $\Delta$ sspF1 possessed the same activity when moving by swimming and twitching, but differed in their ability to swarm – in *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ sspF1 this process is blocked. *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 swarming motility zones diameter was 62 мм and it were in 1,4 times higher than at *P. aeruginosa* PA01 – 43 мм. Swarming motility zones morphology was different. **Conclusions.** The low intracellular content of c-di-GMP interferes with the formation of a full-fledged biofilm and promotes the planktonic mode of *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 and the active movement of cells across different surfaces. An increased level of c-di-GMP provides the formation of a biofilm with a larger mass compared to the control strain and inhibits the swarming process in *P. aeruginosa* PA01  $\Delta$ sspF1.

**К е у w o r d s:** cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP), *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Pseudomonas aeruginosa* PA01 pJN2133, *Pseudomonas aeruginosa* PA01  $\Delta$ sspF1, biofilm structure, motility, types of movement.

### СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в мекдико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2001. – 260 с.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Cotter P.A., Stibitz. S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // Curr. Opin. Microbiol. – 2007. – V. 10. – P. 17–23.
6. Galkin M. *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm fomatation 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. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.

12. Parsek M.R., Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // *Trends in Microbiol.* – 2005. – V. 13. – P. 27–33.

13. Rashid M.H., Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa* // *PNAS.* – 2000. – V. 97. – P. 4885–4890.

14. 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.

15. 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.

16. 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.

17. Semenets A.S., Galkin M.B., Filipova T.O. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level // *Microbiology & Biotechnology.* – 2016 – T. 33, № 1. – P. 19–28.

18. Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections // *Trends Microbiol.* – 2016. – V. 24. – P. 327–337.

## Referens

1. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v mediko-biologicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260p. (in Russian).

2. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2010;75:827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

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. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
12. 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.
13. Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*. 2000;97:4885-4890. doi: 10.1073/pnas.060030097.
14. 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.
15. 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
16. 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
17. Semenets AS, Galkin MB, Filipova TO. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level. *Microbiology & Biotechnology*. 2016;33:19-28. <http://mbt.onu.edu.ua/article/view/65360/60613>.
18. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol*. 2016;24:327–337. doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008.

Стаття надійшла до редакції 09.06.2017 р.



**О.І. Балко, Л.В. Ярошенко, О.Б. Балко, Л.А. Пасічник,  
Л.В. Авдєєва**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: olga-balko@ukr.net

## **АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІОЦИНІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE***

**Мета.** Дослідити активність бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* щодо фітопатогенних штамів *Pseudomonas syringae*. **Методи.** Вплив лізатів *P. aeruginosa* на бактерії *P. syringae* перевіряли методами «двошарового агару» та серійних двократних розведень. Підвищення концентрації піоцинів у складі досліджуваних лізатів досягали шляхом послідовної двохетапної оптимізації умов культивування штамів-продуцентів та індукції бактеріоцинів. Концентрування бактеріоцинів здійснювали висолюванням 70% сульфатом амонію. **Результати.** Бактеріостатична активність вихідних лізатів *P. aeruginosa* коливалася в межах 20–40 ОА/мл щодо окремих штамів *P. syringae*. Встановлено, що діючими речовинами у складі лізатів були низькомолекулярні піоцини S-типу. Показано, що активність бактеріоцинів можна підвищити завдяки вирощуванню штамів-продуцентів при 28 °С в середовищі LB за інтенсивної аерації та/або внесенні налідиксової кислоти до кінцевої концентрації 100 мкг/мл в кінці експоненціальної фази росту культур продуцентів і забезпеченні контакту із бактеріальною суспензією протягом трьох годин. Ефективність застосування оптимізації умов культивування та індукції бактеріоцинів залежала від штаму-продуцента. Запропоновані підходи дозволили підвищити активність лізату PAE-22 більш, ніж у 40 разів, наслідком чого було розширення спектру впливу піоцинів на усі штами *P. syringae* та збільшення зон відсутності росту до 26 мм. **Висновки.** Низькомолекулярні піоцини S-типу *Pseudomonas aeruginosa* характеризуються помірним та високим рівнем активності до більшості досліджених штамів *P. syringae*. Синтез бактеріоцинів лізату PAE-22, активних щодо фітопатогенних культур, залежить від умов вирощування штаму-продуцента, тоді як лізату PAE-8 – від оптимізації процесу індукції. На активність піоцинів у складі інших лізатів – PAE-19, PAE-24 і PAE-41, впливають обидва вказані чинники.

**Ключові слова:** бактеріоцини, *Pseudomonas aeruginosa*, антимікробна активність, фітопатогенні бактерії, *Pseudomonas syringae*.

За даними продовольчої і сільськогосподарської комісії ООН (FAO), бактеріальні хвороби спричиняють втрату близько 30% урожаю сільськогосподарських культур [10]. Серед збудників бактеріальних хвороб рослин



значною частотою виділення (50–80% – на зернобобових і до 90% – на зернових культурах) і високою шкодочинністю характеризуються штами *Pseudomonas syringae* [4]. Цьому мікроорганізму притаманна висока стійкість (90–100%) до більшості комерційних препаратів пестицидів та агрохімікатів [3].

Як наслідок, постає необхідність пошуку нових, альтернативних до існуючих препаратів, засобів впливу на фітопатогенні мікроорганізми. За антибактеріальною активністю бактеріоцини не поступаються клінічним антибіотикам [7]. Раніше нами було виявлено низку штамів *Pseudomonas aeruginosa* – продуцентів високоактивних бактеріоцинів (піоцинів) [1].

Метою даної роботи було дослідити активність бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* щодо фітопатогенних штамів *Pseudomonas syringae*.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були бактеріоцини, отримані із 11 штамів *Pseudomonas aeruginosa*, УКМ В-1, УКМ В-6, УКМ В-7, УКМ В-9, УКМ В-13, УКМ В-330, УКМ В-332, УКМ В-333, УКМ В-335, УКМ В-349, УКМ В-353, що зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів (УКМ, Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України). Для оцінки антимікробної активності піоцинів використовували тест-штами *P. aeruginosa* УКМ В-3 і УКМ В-10, а також штами бактерій збудників бактеріальних хвороб рослин: *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026 (рекласифікований вид *P. syringae*), *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atropfaciens* УКМ В-1013 і ІМВ 9290 (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України), *P. syringae* pv. *lachrymans* УКМ В-1039.

Для отримання вихідних лізатів в суспензії культур-продуцентів у логарифмічній фазі росту вносили налідиксову кислоту до кінцевої концентрації 20 мкг/мл, інкубували 3–4 год, процес індукції зупиняли додаванням хлороформу. Лізати очищали від бактеріального детриту шляхом низькошвидкісного центрифугування на центрифусі ОПН-8 при 4 тис. г протягом 30 хв. Отримані супернатанти фільтрували через стерильні паперові фільтри і зберігали у щільно закритих ємностях при 4 °С, використовуючи хлороформ як консервант [1]. Лізат, отриманий із штаму *P. aeruginosa* УКМ В-1 позначали як РАЕ-1; із штаму УКМ В-6 – як РАЕ-5; УКМ В-7 - РАЕ-6, УКМ В-9 - РАЕ-8, УКМ В-13 - РАЕ-14, УКМ В-330- РАЕ-19, УКМ В-332 - РАЕ-21, УКМ В-333 - РАЕ-22, УКМ В-335 - РАЕ-24, УКМ В-349 - РАЕ-38, УКМ В-353 - РАЕ-41.

Властивості речовин отриманих лізатів досліджували відповідно до описаних раніше методик [1].

Концентрування бактеріоцинів здійснювали методом висолювання 70% сульфатом амонію протягом доби при 4 °С. Осад отримували при 30 тис. г і 4 °С протягом 30 хв та ресуспендували в 6 мл 20 мМ Тріс-буферу (рН 7,5). Зразки діалізували через діалізну мембрану (3,5 кДа) проти 50 мл 20 мМ Тріс-буферу протягом доби при 4 °С із однократною заміною діалізного буферу. Очистку від нерозчинних домішок проводили за допомогою низькошвидкісного центрифугування на центрифусі ОПН-8 при 4 тис. г протягом 30 хв. [12].

Антимікробну активність лізатів визначали методом «двошарового агару» [8].



У випадку появи зон відсутності росту однакового діаметру активність піоцинів оцінювали за прозорістю даних зон [13]. Кількісні показники активності лізатів визначали методом серійних двократних розведень. Активність речовин визначали за максимальним розведенням, здатним викликати утворення зони лізису. Отримані результати виражали в одиницях активності – ОА/мл [11].

### Результати та їх обговорення

На початковому етапі роботи досліджено активність вихідних лізатів 11 продуцентів бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* щодо 6 штамів *Pseudomonas syringae* та встановлено, що компоненти РАЕ-1, РАЕ-5, РАЕ-6 пригнічували лише *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026 і *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 (табл. 1), а показники їх кілерної активності становили 20 і 40 ОА/мл, відповідно.

Таблиця 1

Активність бактеріоцинів у складі вихідних лізатів *Pseudomonas aeruginosa* щодо штамів *Pseudomonas syringae*

Table 1

The activity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocins in initial lysates against *Pseudomonas syringae* strains

| Лізати | Тест-штами <i>Pseudomonas syringae</i> |            |          |            |            |            |
|--------|--|------------|----------|------------|------------|------------|
|        | УКМ В-1027                             | УКМ В-1039 | ІМВ 9290 | УКМ В-1154 | УКМ В-1013 | УКМ В-1026 |
| РАЕ-1  | –                                      | –          | –        | +          | –          | ±          |
| РАЕ-5  | –                                      | –          | –        | +          | –          | ±          |
| РАЕ-6  | –                                      | –          | –        | +          | –          | ±          |
| РАЕ-8  | –                                      | –          | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-14 | –                                      | –          | –        | –          | –          | +          |
| РАЕ-19 | –                                      | –          | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-21 | –                                      | –          | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-22 | –                                      | –          | –        | –          | –          | +          |
| РАЕ-24 | –                                      | –          | –        | –          | –          | +          |
| РАЕ-38 | –                                      | –          | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-41 | –                                      | –          | –        | –          | –          | –          |

Примітки: Тут і в табл. 2 і 3 вказано прозорість зон затримки росту в ділянках нанесення зразків бактеріоцинів: – відсутність зони затримки росту; ± прозорість незначна; + прозорість слабка; ++ прозорість виражена; +++ прозорість чітка.

Note: There and in tabl. 2 and 3 it is denoted the transparency of growth inhibition area in points of bacteriocin application: – the absence of growth inhibition, ± little transparency, + weak transparency, ++ marked transparency, +++ clear transparency.

Лізати РАЕ-14, РАЕ-22, РАЕ-24 затримували ріст виключно *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026, хоча їх активність щодо даного штаму виявилась вдвічі вищою, ніж у попередніх зразків – 40 ОА/мл. Досліджувані лізати характеризувалися бактеріостатичним ефектом і утворювали зони затримки росту діаметром близько 6–8 мм. Інші використані штами фітопатогенних



бактерій до компонентів вихідних зразків виявилися не чутливими.

Отримані лізати додатково перевіряли на активність щодо *P. aeruginosa* УКМ В-3 і УКМ В-10 – високочутливих до дії бактеріоцинів штамів. Встановлено, що усі 11 лізатів пригнічували ріст штамів *P. aeruginosa* УКМ В-3 і УКМ В-10 із утворенням виражених зон лізису. Таким чином, показано, що у складі вихідних лізатів містяться речовини, здатні затримувати ріст не лише штамів *P. aeruginosa*, але й *P. syringae*, хоча спектр їх активності щодо останніх є доволі вузьким.

В подальшому вивчали властивості речовин у складі досліджуваних лізатів. Було встановлено, що дані антимікробні компоненти при перенесенні із сформованих зон лізису на чистий газон індикаторної культури не утворювали фагових бляшок, не впливали на власні культури-продуценти, не візуалізувалися при електронній мікроскопії, не осаджувалися при ультрацентрифугуванні, не розщеплялися після обробки ДНКазою та РНКазою, проте втрачали активність після термоінактивації при 80 °С і обробки трипсином. Досліджувані речовини характеризувалися вузьким спектром дії, оскільки впливали виключно на бактерії роду *Pseudomonas* і не пригнічували ріст інших мікроорганізмів. Як і в попередніх дослідженнях [1], отримані результати підтвердили належність даних речовин до низькомолекулярних бактеріоцинів - піоцинів S-типу.

В геномі *P. aeruginosa* показано одночасне існування низки генів піоцинів і відмічено множинність їх виділення [7]. Наявність декількох генів зумовлює можливість різної інтенсивності їх експресії під впливом певних індуквальних факторів [9]. Це дало нам підстави припустити, що вузький спектр і низький рівень активності досліджуваних лізатів щодо штамів фітопатогенних бактерій пов'язані з низьким вмістом активних щодо *P. syringae* бактеріоцинів. Посилення експресії генів даних піоцинів здійснювали шляхом послідовної двохетапної оптимізації культивування та індукції бактеріоцинів. Ефект від кожного етапу оцінювали за активністю лізатів 6 штамів-продуцентів *P. aeruginosa*. Згідно із попередніми дослідженнями [2], оптимальні умови культивування забезпечувалися вирощуванням штамів при 28 °С в багатому живильному середовищі LB за інтенсивної аерації. Перевірка активності лізатів після проведеного етапу оптимізації культивування показала максимальне розширення спектру активності лізату РАЕ-22 (табл. 2).

Натомість, вплив даних умов культивування на активність бактеріоцинів у складі лізатів РАЕ-19, РАЕ-24 і РАЕ-41 був менш вираженим.

На наступному етапі роботи оцінювали вплив оптимізації процесу індукції на активність піоцинів *P. aeruginosa*. За результатами попередніх досліджень [2], виділення бактеріоцинів з максимальними показниками активності відбувається при внесенні індуктора – налідиксової кислоти до кінцевої концентрації 100 мкг/мл в кінці експоненціальної фази росту культур продуцентів та інкубуванні з бактеріальною суспензією протягом 3 годин (табл. 3).



Таблиця 2

Активність бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* щодо *Pseudomonas syringae* після оптимізації умов культивування штамів-продуцентів

Table 2

The activity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocins against *Pseudomonas syringae* after optimization of strain- producer cultivation conditions

| Лізати | Тест-штами <i>Pseudomonas syringae</i> |            |          |            |            |            |
|--------|--|------------|----------|------------|------------|------------|
|        | УКМ В-1027                             | УКМ В-1039 | ІМВ 9290 | УКМ В-1154 | УКМ В-1013 | УКМ В-1026 |
| РАЕ-8  | –                                      | –          | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-19 | ±                                      | ±          | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-21 | –                                      | ++         | –        | –          | –          | –          |
| РАЕ-22 | –                                      | ±          | ±        | ±          | ±          | +          |
| РАЕ-24 | ±                                      | ±          | –        | –          | –          | +          |
| РАЕ-41 | ±                                      | ±          | –        | –          | –          | –          |

Таблиця 3

Активність бактеріоцинів *Pseudomonas aeruginosa* щодо *Pseudomonas syringae* після оптимізації процесу індукції

Table 3

The activity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocins against *Pseudomonas syringae* after induction optimization

| Лізати | Тест-штами <i>Pseudomonas syringae</i> |            |          |            |            |            |
|--------|--|------------|----------|------------|------------|------------|
|        | УКМ В-1027                             | УКМ В-1039 | ІМВ 9290 | УКМ В-1154 | УКМ В-1013 | УКМ В-1026 |
| РАЕ-8  | –                                      | ±          | –        | ++         | ±          | +          |
| РАЕ-19 | ±                                      | ±          | –        | ++         | +          | ++         |
| РАЕ-21 | –                                      | ++         | –        | ++         | +          | +          |
| РАЕ-22 | –                                      | ±          | ±        | ++         | ±          | ++         |
| РАЕ-24 | ±                                      | ±          | –        | ++         | +          | ++         |
| РАЕ-41 | ±                                      | ±          | –        | +++        | +          | ++         |

Показано, що за вказаних умов підвищувалася активність більшості лізатів і спостерігали розширення спектру їх дії до штамів фітопатогенних бактерій. Максимально виражений ефект було досягнуто для лізату РАЕ-8. Бактеріоцини даного лізату на попередньому етапі не впливали на жоден із штамів фітопатогенних бактерій, тоді як після проведення оптимізації індукції спричиняли затримку росту одразу чотирьох культур. Натомість, активність піоцинів РАЕ-22 на даному етапі суттєво не змінювалася. Таким чином, після проведення обох етапів оптимізації лізати РАЕ-8 і РАЕ-21 виявляли антимікробну активність щодо чотирьох із шести штамів *P. syringae*. Бактеріоцини лізатів РАЕ-19, РАЕ-24 і РАЕ-41 додатково впливали на *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, а РАЕ-22 – пригнічували ріст *P. syringae* pv. *atrofaciens*



ІМВ 9290, стійкого до впливу інших лізатів. Необхідно відмітити, що активність піоцинів PAE-8 зростала виключно після оптимізації процесу індукції, а лізату PAE-22 – при забезпеченні оптимальних умов культивування штаму-продуцента. Вплив індукувальних чинників на інтенсивність виділення піоцинів, пов'язаний із ResA-залежною системою активації і є характерним для бактеріоцинів даного виду [7]. Натомість, стимуляція синтезу піоцинів за допомогою оптимізації умов культивування описана вперше, хоча була відмічена у бактеріоцинів інших бактерій [6].

Незважаючи на досягнуте розширення спектру активності, отримані бактеріоцини характеризувалися слабкою бактеріостатичною дією. Це проявлялося затримкою росту фітопатогенних культур лише в місці їх нанесення і втратою активності при 4–8 кратному розведенні лізатів. Відомо, що для лізису однієї бактеріальної клітини необхідна певна кількість молекул піоцинів S-типу [5]. Проведені етапи оптимізації, очевидно, підвищили вміст піоцинів до рівня, необхідного для лізису більшості штамів *P. syringae*. Це дало нам підстави припустити, що подальше концентрування піоцинів у складі лізатів дозволить додатково розширити спектр і підвищити показники активності. Як об'єкт для подальших досліджень вибрано лізат PAE-22, який характеризувався нетиповим спектром активності. Отриманий після концентрування лізат впливав на усі досліджувані культури *P. syringae*, зокрема *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 (табл. 4), що не спостерігали на попередніх етапах.

Таблиця 4

**Активність бактеріоцинів лізату PAE-22 щодо штамів *Pseudomonas syringae* після проведеного концентрування методом висолювання сульфатом амонію**

Table 4

**The activity of PAE-22 lyzate bacteriocins against *Pseudomonas syringae* after concentration by ammonium sulfate salting**

| Штам<br><i>Pseudomonas syringae</i> | Діаметр зони<br>затримки росту, мм |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| УКМ В-1039                          | 9±1                                |
| УКМ В-1027                          | 14±1                               |
| ІМВ 9290                            | 17±2                               |
| УКМ В-1013                          | 19±1                               |
| УКМ В-1154                          | 21±2                               |
| УКМ В-1026                          | 21±2                               |

Як видно з отриманих результатів, окрім передбачуваного розширення спектру впливу лізату було відмічено збільшення зон затримки росту. Діаметри зон лізису більшості штамів коливалися в діапазоні 9–20 мм, а на *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 і *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* УКМ В-1026 – перевищували 20 мм. При цьому, пригнічення росту штаму УКМ В-1026 продовжувалося навіть протягом другої доби культивування, що проявлялось збільшенням зони затримки росту до 26 мм. Це свідчить про помірний та високий рівень активності концентрованого лізату PAE-22 щодо більшості фітопатогенних штамів *P. syringae* і пов'язано із підвищенням концентрації бактеріоцинів. В даному випадку піоцини спричиняли лізис культури





не лише в ділянці їх нанесення, як вихідні лізати, але й дифундували через напіврідкий агар, що проявлялося збільшенням діаметру зон затримки росту. Визначення кілерної активності концентрованого лізату PAE-22 показало, що по відношенню до усіх досліджуваних штамів *P. syringae* вказаний показник становив 1600 ОА/мл. Як було відмічено раніше, вихідний лізат даного штаму впливав лише на *P. savastanoi* рв. *phaseolicola* УКМ В-1026, а його активність становила 40 ОА/мл. Отже, використані методи культивування та концентрування дозволили підвищити вміст піоцинів PAE-22 щонайменше у 40 разів.

Таким чином, низькомолекулярні піоцини S-типу *Pseudomonas aeruginosa* характеризуються помірним та високим рівнем активності відносно більшості досліджених штамів *Pseudomonas syringae*. Активність бактеріоцинів лізату PAE-22 щодо фітопатогенних культур залежить від умов вирощування штаму-продуцента, тоді як лізату PAE-8 – від оптимізації процесу індукції. На активність піоцинів у складі інших лізатів – PAE-19, PAE-24 і PAE-41 впливають обидва вказані фактори.

**O.I. Balko, L.V. Yaroshenko, O.B. Balko, L.A. Pasichnyk,  
L.V. Avdeeva**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,  
154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine, tel.:+38 (044) 526 24 09,  
e-mail: olga-balko@ukr.net

## ***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOCIN ACTIVITY AGAINST *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PHYTOPATHOGENIC STRAINS**

### **Summary**

**The aim of work** was the research of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin activity against *Pseudomonas syringae* phytopathogenic strains. **Methods.** The influence of eleven *P. aeruginosa* lysates on six *P. syringae* cultures was tested by double-layer agar and serial two-fold dilution methods. The pyocin concentration in lysate composition was increased by consecutive two-step optimization including conditions of strain-producer cultivation and induction of bacteriocins. The bacteriocin concentration was conducted by salting-out with 70% ammonium sulphate. **Results.** The bacteriostatic activity of initial *P. aeruginosa* lysates varied from 20 to 40 AU/ml against certain *P. syringae* strains. The low-molecular-weight pyocins of S-type were found to be the active components of the lysates. It was revealed that bacteriocin activity can be increased by means of strain-producer cultivation at 28°C in LB medium under intensive aeration and/ or addition of nalidixic acid to 100 mkg/ml final concentrations in the end of exponential growth stage under contact with bacterial suspension for three hours. The effectiveness of cultivation condition optimization and bacteriocin induction depended on a strain-producer. The introduced approaches brought in increase of PAE-22 lysate activity more than in 40 times, resulting into the widening of bacteriocin spectrum against all *P. syringae* strains and extension of growth absence areas to 26 mm. **Conclusions.** *Pseudomonas aeruginosa* low-molecular-weight S-type bacteriocins are characterized by moderate and high activity levels against the majority of researched *P. syringae* strains. The activity of PAE-22 lysate bacteriocins against



*phytopathogenic strains depended on cultivation conditions, whereas PAE-8 lysate – on induction optimization. Both mentioned factors influenced on bacteriocin activity of other lysates: PAE-19, PAE-24 and PAE-41.*

*Key words: bacteriocins, Pseudomonas aeruginosa, antimicrobial activity, phytopathogenic bacteria, Pseudomonas syringae.*

**О.І. Балко, Л.В. Ярошенко, А.Б. Балко, Л.А. Пасичник,  
Л.В. Авдеева**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,  
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: olga-balko@ukr.net

## **АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОЦИНОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE***

### **Реферат**

**Цель.** Изучение активности бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* против фитопатогенных штаммов *Pseudomonas syringae*. **Методы.** Влияние одиннадцати лизатов *P. aeruginosa* на шесть культур *P. syringae* было исследовано методами «двухслойного агара» и серийных двукратных разведений. Повышение концентрации пиоцинов в составе исследуемых лизатов проводили путем последовательной двухэтапной оптимизации условий культивирования штаммов-продуцентов и индукции бактериоцинов. Для концентрирования бактериоцинов использовали высаливание 70% сульфатом аммония. **Результаты.** Бактериостатическая активность исходных лизатов *P. aeruginosa* колебалась в пределах 20–40 ЕА/мл в отношении некоторых штаммов *P. syringae*. Активными компонентами в составе лизатов являлись низкомолекулярные пиоцины S-типа. Показано, что активность бактериоцинов можно повысить путем культивирования штаммов-продуцентов в среде LB при 28 °C и интенсивной аэрации и/или внесении налидиксовой кислоты в конечной концентрации 100 мкг/мл в конце экспоненциальной фазы роста культур продуцентов и обеспечении контакта с бактериальной суспензией в течение трех часов. Эффективность использования оптимизации условий культивирования и индукции бактериоцинов зависели от штамма-продуцента. Предложенные подходы позволили повысить активность лизата PAE-22 более чем в 40 раз, вследствие чего наблюдалось расширение спектра действия пиоцинов на все штаммы *P. syringae* и увеличение зон отсутствия роста до 26 мм. **Выводы.** Низкомолекулярные пиоцины S-типа *Pseudomonas aeruginosa* характеризуются средним и высоким уровнем активности относительно большинства исследованных штаммов *P. syringae*. Активность бактериоцинов лизата PAE-22 против фитопатогенных культур зависит от условий культивирования штамма-продуцента, тогда как для лизата PAE-8 – от оптимизации процесса индукции. На активность пиоцинов в составе других лизатов: PAE-19, PAE-24 и PAE-41, влияют оба указанных фактора.

**Ключевые слова:** бактериоцины, *Pseudomonas aeruginosa*, антимикробная активность, фитопатогенные бактерии, *Pseudomonas syringae*.



### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Балко А.Б., Авдеева Л.В. Скрининг продуцентів бактериоциноподібних речовин, активних по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіол. журн. – 2012. – 74, № 2. – С. 8–13.
2. Балко А.Б., Видасов В.В., Авдеева Л.В. Оптимизация условий индукции бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, № 1. – С. 79–85.
3. Буценко Л.М., Булеца Н.М., Пасічник Л.А. Збудники бактеріальних хвороб пшениці за дії абіотичних факторів // Вісник аграрної науки. – 2015. – № 9. – С. 31–35.
4. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.А., Гринник І.В., Патица В.П. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: монографія. – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
5. Daw M.A., Falkner F.R. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. // Micron. – 1996. – 27, № 6. – P. 467–479.
6. Duen-yau Chuang, Yung-chei Chien, Huang-Pin Wu Cloning and Expression of the *Erwinia carotovora subsp. carotovora* Gene Encoding the Low-Molecular-Weight Bacteriocin Carocin S1 // Journal of Bacteriology. – 2007. – 189, № 2. – P. 620–626.
7. Ghequire M.G.K., De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas* // FEMS Microbiol. Rev. – 2014. – 38. – P. 38523–38568.
8. Ling H., Saeidi N., Rasouliha B.H., Chang M.W. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage // FEBS Lett. – 2010. – 584, N. 15. – P. 3354–3358.
9. Michel-Briand Y & Baysse C The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. // Biochimie. – 2002. – 84. – P. 499–510.
10. Roberts R.A.J. Insurance of crops in developing countries. // FAO Agricultural Services Bulletin (FAO). – 2005. – 159. – 78 p.
11. Saeed S., Rasool A.J., Ahmed S., Khanum T., Khan M.B., Abbasi A., Ali S.A. New insight in Staphylococcin research: Bacteriocin and/or BLIS produced by *S. aureus* AB188 // W.J. Microbial. Biotech. – 2006. – 22, N 7. – P. 713–722.
12. Sano Y., Kageyama M. Purification and properties of an S-type pyocin, pyocin AP41 // J. Bacteriol. – 1981. – 46, N. 2. – P. 733–739.
13. Tovkach F.I. Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins. // Microbiology – 1998. – 67, N. 6. – P. 636–642.

### References

1. Balko AB, Avdeeva LV. Screening of producers of bacteriocin-like substances, active toward *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. j. 2012;74(2):8-13. (In Ukrainian)
2. Balko AB, Vidasov VV, Avdeeva LV. Optimization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin induction. Microbiol. j. 2013;75(1):79-85. (In Ukrainian)
3. Butsenko LM, Buletsa NM, Pasichnyk LA. Agent of wheat bacterial disease under abiotic factors action. Journal of Agricultural Science. 2015;(9):31–35. (In Ukrainian)



4. Gvozdiak RI, Pasichnyk LA, Yakovlieva LM, Moroz SM, Lytvynchuk OO, Zhytkevych NV, Khodos SF, Butsenko LM, Dankevych LA, Hrynyk IV, Patyka V.P. Fitopatohenni bakterii. Bakterialni khvoroby roslyn: monohrafiia: T.1. – Kyiv: TOV «NVP «Interservis», 2011. 444 s. [In Ukrainian].
5. Daw MA, Falkiner FR. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. *Micron*. 1996;(27):467–479.
6. Duen-yau Chuang, Yung-chei Chien, Huang-Pin Wu. Cloning and Expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Gene Encoding the Low-Molecular-Weight Bacteriocin Carocin S1. *Journal of bacteriology*. 2007;189(2):620–626.
7. Ghequire MGK, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2014;(38):38523–38568.
8. Ling H, Saeidi N, Rasouliha BH, Chang MW. A predicted S-type pyocin shows a bactericidal activity against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates through membrane damage. *FEBS Lett.* 2010;584(15):3354-3358.
9. Michel-Briand Y & Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*. 2002;(84):499–510.
10. Roberts RAJ. Insurance of crops in developing countries. *FAO Agricultural Services Bulletin (FAO)*. 2005;(159): 78.
11. Saeed S, Rasool AJ, Ahmed S, Khanum T, Khan MB, Abbasi A, Ali SA. New insight in Staphylococcal research: Bacteriocin and/or BLIS produced by *S. aureus* AB188. *W.J. Microbial. Biotech.* 2006;22(7):713-722.
12. Sano Y, Kageyama M. Purification and properties of an S-type pyocin, pyocin AP41. *J. Bacteriol.* 1981;46(2):733-739.
13. Tovkach FI. Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins. *Microbiology*. 1998;67(6):636-642.

Стаття надійшла до редакції 18.04.2017 р.



**О.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач,  
Т.О. Беляєва, І.П. Конуп**

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

## **ОКИСНЕННЯ ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ І ПРОДУКЦІЯ БІО-ПАР ГРУНТОВИМИ ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ONU541 І *BACILLUS MEGATERIUM* ONU542**

**Мета.** Виявлення особливостей окиснення вуглеводнів нафти і продукції біо-ПАР ґрунтовими штамами мікроорганізмів роду *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542. **Методи.** Видову приналежність досліджуваних мікроорганізмів визначали за спектрами жирних кислот їх клітинних ліпідів. Залишковий вміст вуглеводнів нафти визначали методом ІЧ-спектроскопії на "ІКС-29" в діапазоні 2700–3200 см<sup>-1</sup>. Про продукцію мікроорганізмами біосурфактантів судили по зниженню величини поверхневого натягу рідких культур бактерій та їх супернатантів та по емульгуювальній здатності (за індексом емульгування – Е24, %). **Результати.** Показано залежність між нафтодеструктивною здатністю досліджуваних штамів бактерій та їх здатністю продукувати біосурфактанти. Штам *P. fluorescens* ONU541 більшою мірою ніж штам *B. megaterium* ONU542 окиснює вуглеводні нафти (на 74,6%) та продукує поверхнево-активні метаболіти. Досліджувані штами *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 здатні продукувати біосурфактанти за умови їх культивування протягом п'яти діб у живильному середовищі складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; глюкоза – 2 (рН 7,0-7,2). **Висновок.** Встановлено нафтодеструктивну активність та здатність продукувати біосурфактанти ґрунтових штамів *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542. Доведено, що за сумісної присутності досліджуваних штамів мікроорганізмів ступінь деструкції нафти сягає 90% в жорстких умовах навколишнього середовища: при очищенні засолених ділянок ґрунту о. Змішаний з хронічним нафтовим забрудненням.

**Ключові слова:** *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542, деструктори нафти, продуценти поверхнево-активних речовин.

Способи ліквідації хронічних нафтових забруднень, що ґрунтуються на розкладанні нафтопродуктів мікроорганізмами, визнані ефективними і екобезпечними. Ступінь очистки води або ґрунту від нафти при обробці їх біопрепаратом значно підвищується у разі продукції нафтоокиснювальними мікроорганізмами біосурфактантів (мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР)). Вони сприяють утворенню високодисперсної емульсії, внаслідок чого полегшується контакт мікробних клітин з гідрофобним субстратом і прискорюється



процес окиснення важко засвоєваних нафтових фракцій вуглеводнів [5, 6]. Рациональне використання біосурфактантів залежить у першу чергу від економічної ефективності їх виробництва. Одним із способів здешевлення вартості технології отримання цих продуктів мікробного синтезу є використання дешевих субстратів – промислових відходів та спеціально підібраних компонентів живильного середовища (ЖС), здатних підтримувати рН очищувального середовища на рівні 7,0–7,2 [7, 16].

Мікробні ПАР характеризуються порівняно із синтетичними аналогами широким спектром функціональної активності і мають низку переваг, таких як: стабільність фізико-хімічних властивостей в широкому діапазоні температур і значень рН середовища, нетоксичність, здатність до біодеградації [6]. Мікробні ПАР поділяються на дві основні групи. До першої входять низькомолекулярні, власне біосурфактанти: гліколіпіди (глюколіпіди, рамноліпіди, трегалозоліпіди, софороліпіди) і ліпопептиди (сурфактин, стрептофактин, поліміксин, грамїцидин). До другої відносять високомолекулярні сполуки – емульсани або біоемульгатори [13], що представлені поліцукридами, ліпополіцукридами, протеїнами, ліпопротеїнами і їх комплексами. Перша група включає молекули, які ефективно знижують поверхневий і міжфазний натяг. Друга група об'єднує полімери, які більш ефективні для стабілізації емульсій типу «олія у воді» [12]. Із великої групи мікробних ПАР, які продукують представники родів *Pseudomonas* і *Bacillus*, особливу увагу приділяють рамноліпідам, ліпопептидам (сурфактину зокрема) та високомолекулярним екзополіцукридам [4, 8, 11]. Однак актуальною задачею екобіотехнології залишається пошук нових мікроорганізмів, що володіють нафтоокиснювальною та ПАР-продукуючою здатністю.

Мета роботи – виявлення особливостей окиснення вуглеводнів нафти і продукції біо-ПАР ґрунтовими штамми *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542.

### Матеріали та методи

Об'єктами дослідження слугували штами бактерій, виділені із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний, які за сукупністю морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних ознак, визначених з використанням класичних бактеріологічних методів та тест-системи API 50 CHB Medium (bioMérieux, Франція) та порівняльним аналізом жирнокислотних профілів бактерій досліджуваних штамів за допомогою системи MIDI Sherlock з використанням бібліотек спектрів жирних кислот аеробних мікроорганізмів RSTBA6 6.2 віднесено до виду *Pseudomonas fluorescens* ONU541 і *Bacillus megaterium* ONU542 [2].

Залишковий вміст вуглеводнів нафти у контрольних і дослідних пробах (бактеріальних суспензіях) визначали методом ІЧ-спектрометрії, як було описано раніше [10]. Аналітичні сигнали реєстрували аналізатором “ІКС-29” в інфрачервоній зоні спектра в діапазоні хвильових чисел 2700–3200  $\text{cm}^{-1}$ , де фіксували валентні коливання  $\text{CH}_3$ - і  $\text{CH}_2$ - груп аліфатичних і аліциклічних сполук і бокових ланцюгів ароматичних вуглеводнів, а також вуглець-водневих зв'язків ароматичних сполук. Оскільки вуглеводні різних сортів нафти є



сумішшю сполук окремих класів, що мають відмінні між собою властивості, то перед вивченням нафтоокиснювальної активності ( $A$ , %) мікроорганізмів – ефективності біодеструкції, що оцінювали за формулою (1):

$$A = \left( \frac{K_H^0 - K_{H(\text{практ})}}{K_H^0} \right) \times 100\%, \quad (1)$$

де  $K_H^0$ ;  $K_{H(\text{практ})}$  – вихідна і залишкова (практична) концентрації нафти (мг/л), встановили градуйовану логарифмовану залежність різниці оптичних густин досліджуваного і контрольного розчинів ( $\Delta D$ ) від концентрації нафти ( $K_H$ ). Різницю  $\Delta D$  розраховували при хвильових числах, що відповідають максимуму і мінімуму смуги поглинання, за формулою (2):

$$\Delta D = - \ln (T_1/T_2), \quad (2)$$

де  $T_1$  – значення пропускання (%) в максимумі смуги поглинання при  $(2926 \pm 15) \text{ см}^{-1}$ ;  $T_2$  – значення пропускання (%) в мінімумі смуги поглинання при  $(2700 \pm 15) \text{ см}^{-1}$ .

Екстрагування вуглеводнів із проб здійснювали з використанням чотирьохлористого вуглецю марки “х.ч.”. Органічний розчинник об’ємом 25 мл змішували з відповідним об’ємом (до 10 мл) досліджуваної проби, інтенсивно струшували впродовж хвилини, після чого давали пробі відстоятися впродовж 15 хв. Шар екстрагента, куди переходили вуглеводні нафти (екстракт) відділяли від сторонніх залишків, далі екстракт пропускали через хроматографічну колонку, заповнену оксидом алюмінію (ІІ ступеня активності по Брокману, ТУ 6-09-3916-75). Далі, користуючись градуйованою залежністю ( $\Delta D$ ) від концентрації нафти ( $K_H$ ), визначали залишкову (або практичну) концентрацію нафти, яка пов’язана з залишковою вимірною концентрацією нафти рівнянням (3):

$$K_{H(\text{практ})} = \frac{K_{H(\text{вимір.})} \times \text{Об}_1 \times n}{\text{Об}_2} \quad (3)$$

де  $\text{Об}_1$  – об’єм чотирьохлористого вуглецю, взятого для екстракції;  $\text{Об}_2$  – об’єм проби;  $n$  – коефіцієнт розбавлення елюату.

Опрацювання експериментальних даних: значень  $K_{H(\text{вимір.})}$  і  $K_{H(\text{практ})}$  здійснювали за допомогою програми Excel.

Здатність мікроорганізмів продукувати біосурфактанти перевіряли залежно від органічних компонентів, що входили до складу живильного середовища (ЖС) М-9. Культивування мікроорганізмів здійснювали на інкубаторі шейкері New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R у флаконах зі 100 мл середовища при 150 об/хв п’ять діб за температури 30 °С. Засів живильного середовища проводили добовою культурою, що виростає на МПБ у стаціонарних умовах (термостат) при температурі 30 °С. Об’єм посівного матеріалу склав 1,0% до об’єму середовища М-9 ЖС<sub>1</sub>, що містило компоненти (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; глюкоза – 2; пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5 (рН 7,0–7,2) та до об’єму живильного середовища М-9 ЖС<sub>II</sub> із п’ятьма компонентами (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;



NaCl – 5; NH<sub>4</sub>Cl – 1; глюкоза – 2 (рН 7,0–7,2). Обидва живильні середовища містили глюкозу у кількості 0,2%, яка, за даними літератури, підвищує синтез цільового поверхнево-активного продукту у 2–4 рази [7].

При проведенні скринінгу продуцентів мікробних ПАР серед колекційних культур бактерій здатність продукувати біосурфактанти оцінювали згідно з [14, 15] загальноприйнятими методами – по зниженню рівня поверхневого натягу і за появою емульгувальної активності рідких культур та їх безклітинних супернатантів, одержаних центрифугуванням. Визначали зниження величини поверхневого натягу [ $\sigma$ , мН/м] рідких культур бактерій (КБ) та їх безклітинних супернатантів (СП) відносно дистильованої води [ $\sigma(\text{H}_2\text{O})$ , мН/м] та живильного середовища за відсутністю мікроорганізмів [ $\sigma(\text{ЖС}_1)$  і  $\sigma(\text{ЖС}_{II})$ , мН/м] та за емульгувальною здатністю їх супернатантів відносно соняшникової олії [15]. Значення поверхневого натягу ( $\sigma$ ) живильного середовища бактеріальних культур та супернатантів вимірювали за температури  $25 \pm 1$  °С методом відриву пластинки з поверхні рідини (метод Вільгельмі), емульгувальну здатність оцінювали за індексом емульгування ( $E_{24, \%}$ ) [15, 16].

Експерименти здійснювали в п'яти повторах. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Office Excel 2003» із визначенням  $t$ -критерію Стьюдента. Статистично вірогідною вважали різницю при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

Експериментальна перевірка спроможності відібраних із нафтозабрудненого ґрунту о. Зміїний штамів *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542 до утилізації вуглеводнів нафти з вихідною концентрацією 1000 мг/л показала (табл. 1), що обидва штами при їх культивуванні у ЖС<sub>II</sub> із додаванням глюкози в кількості 2,0 г/л розкладають у стаціонарних умовах вуглеводні нафти протягом 60 діб при температурі 30 °С на 60,3–74,6% з урахуванням поправки на контрольні проби. За рахунок фізико-хімічного процесу випаровування легких фракцій нафти залишкова концентрація нафти у ЖС<sub>II</sub> без внесення бактеріальних культур протягом всього терміну експозиції, як і слід було очікувати, зменшувалася з 1000,0 до  $885,0 \pm 57,0$  мг/л (на 11,5%). На користь того, що штам *B. megaterium* ONU541 порівняно зі штамом *P. fluorescens* ONU542 продукував переважно екзогенні поверхнево-активні метаболіти свідчать дані щодо залишкового вмісту вуглеводнів нафти у емульгованому стані. Їх залишковий вміст у бактеріальних суспензіях із штамом *B. megaterium* ONU542 у 3,5 рази більший ( $56,0 \pm 5,0$  мг/л) за залишковий вміст емульгованої нафти у бактеріальних суспензіях із штамом *P. fluorescens* ONU541 ( $16,0 \pm 2,0$  мг/л).

Отримані дані дозволяють констатувати, що продукування штамом *P. fluorescens* ONU541 поверхнево-активних метаболітів змішаного типу більшою мірою призводить до деструкції вуглеводнів нафти – на 74,6% при залишковому вмісті важко окиснювальних фракцій нафти 225 мг/л.

Проведені пілотні випробування показали, що за сумісної присутності досліджуваних штамів мікроорганізмів ступінь деструкції нафти значно вищий і сягає 90% в жорстких реальних умовах навколишнього середовища: при очищенні засоленних ділянок ґрунту о. Зміїний з хронічним нафтовим забрудненням.





Це дало можливість припустити, що досліджувані штами *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 є також продуцентами біосурфактантів.

Таблиця 1

**Деструкція вуглеводнів нафти штамами  
*P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542\***

Table 1

**Degradation of petroleum hydrocarbons by the strains of  
*P. fluorescens* ONU 541 and *B. megaterium* ONU542\***

| Штам                         | Залишковий вміст вуглеводнів нафти (мг/л)           |                    |                       | Ступінь деструкції нафти, % |
|------------------------------|---|--------------------|-----------------------|-----------------------------|
|                              | на межі поділу фаз бактеріальна суспензія - повітря | в придонній плівці | в емульгованому стані |                             |
| <i>P. fluorescens</i> ONU541 | 204,0±20,0  | 5,0±0,5            | 16,0±2,0              | 74,6                        |
| <i>B. megaterium</i> ONU542  | 290,0±25,0  | 5,0±0,5            | 56,0±5,0              | 60,3                        |

\*Примітка: вихідна концентрація вуглеводнів нафти у контролі – 1000,0 мг/л; ступінь втрати вуглеводнів нафти у контролі протягом 60 діб за рахунок фізико-хімічних процесів – 11,5% (залишкова концентрація вуглеводнів нафти 885,0±57,0 мг/л)

\* Note: the initial concentration of hydrocarbons of oil in the control – 1000,0 mg/l; The degree of loss of petroleum hydrocarbons in control for 60 days due to the physico-chemical processes – 11,5% (residual concentration of petroleum hydrocarbons 885,0 ± 57,0 mg/l)

Тому друга частина роботи була спрямована на дослідження здатності цих бактерій продукувати поверхнево-активні метаболіти залежно від умов культивування і складу живильного середовища М-9. Експериментально встановлено, що досліджувані мікроорганізми у середовищі ЖС<sub>I</sub> за температури 30 °С протягом трьох діб практично не продукують біосурфактанти: значення поверхневого натягу бактеріальних культур з урахуванням похибки методу Вільгельмі (±0,5 мН/м) знаходилися на рівні значення поверхневого натягу середовища за відсутності мікроорганізмів  $\sigma(\text{ЖС}_I)$  51,2 мН/м. І лише на п'яту добу мікроорганізми виділяли у середовище метаболіти із слабо помітними поверхнево-активними властивостями. Рівноважні значення поверхневого натягу [ $\sigma$ , мН/м] культур бактерій *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542, культивованих впродовж різних проміжків часу, встановлювалися за температури 25±2 °С не менше 2-х годин.

Результати по тензіометричному дослідженню поверхнево-активних властивостей рідких культур бактерій *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542 та отриманих їх супернатантів (СП) наведені в таблиці 2.

Як видно із наведених у таблиці 2 даних, при дослідженні поверхневих властивостей бактеріальних культур і їх супернатантів необхідно враховувати поправку на живильне середовище за відсутністю мікроорганізмів, оскільки за наявності значної кількості органічних речовин поверхневий натяг розчинів по відношенню до дистильованої води теж зменшується:  $\sigma(\text{ЖС}_I) = 51,2 \pm 2,0$  мН/м;  $\sigma(\text{ЖС}_{II}) = 67,9 \pm 2,0$  мН/м.



Таблиця 2

Поверхнево-активні властивості рідких культур досліджуваних бактерій\* та їх супернатантів при рості у середовищах різного складу

Table 2

Surface-active properties of liquid cultures of bacteria\* and the supernatant with growth in various media

| Штам/<br>середовище                                    | Значення поверхневого натягу ( $\sigma$ ), мН/м |                      |   |   |   |   |
|--|---|----------------------|---|---|---|---|
|  | $\sigma_{\text{КБ}}$                            | $\sigma_{\text{СП}}$ | $\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{КБ}}$ | $\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{СП}}$ | $\sigma_{\text{води}} - \sigma_{\text{КБ}}$ | $\sigma_{\text{води}} - \sigma_{\text{СП}}$ |
| <i>P. fluorescens</i><br>ONU541/(ЖС <sub>I</sub> )**   | 45,0±2,2  | 47,6±2,5             | 6,2                                       | 3,6                                       | 27,0  | 24,4  |
| <i>B. megaterium</i><br>ONU542/(ЖС <sub>I</sub> )**    | 42,4±1,8  | 46,4±2,4             | 8,8                                       | 4,8                                       | 29,6  | 25,6  |
| <i>P. fluorescens</i><br>ONU541/(ЖС <sub>II</sub> )*** | 48,3±2,1  | 56,3±2,5             | 19,6                                      | 11,6                                      | 23,7  | 15,7  |
| <i>B. megaterium</i><br>ONU542/(ЖС <sub>II</sub> )***  | 48,9±2,2  | 50,2±2,7             | 19,0                                      | 17,7                                      | 23,1  | 21,8  |

Примітки: \* - культивування бактерій 5 діб за температури 28±2 ° С;  
 \*\* - ЖС<sub>I</sub> за відсутності бактерій (Контроль 1),  $\sigma(\text{ЖС}_I) = 51,2 \pm 2,0$  мН/м;  
 \*\*\* - ЖС<sub>II</sub> за відсутності бактерій (Контроль 2),  $\sigma(\text{ЖС}_{II}) = 67,9 \pm 2,0$  мН/м  
 Notes: \* - cultivation of bacteria for 5 days at temperature 28 ± 2 ° C;  
 \*\* -  $\text{NM}_I$  in the absence of bacteria (Control 1),  $\sigma(\text{NM}_I) = 51.2 \pm 2.0$  mN/m;  
 \*\*\* -  $\text{NM}_{II}$  in the absence of bacteria (Control 2),  $\sigma(\text{NM}_{II}) = 67.9 \pm 2.0$  mN/m

При культивуванні штаму *B. megaterium* ONU542 у збагаченому пептоном і дріжджовим екстрактом ЖС<sub>I</sub> значення  $\sigma(\text{КБ})$  і  $\sigma(\text{СП})$  знижувалося по відношенню до контролю 1 (ЖС<sub>I</sub>), відповідно, з 51,2±2,0 до 42,4±1,8 і 46,4±2,4 мН/м. Це вказує на помірну здатність цих бактерій продукувати у ЖС<sub>I</sub> біосурфактанти. Меншу здатність продукувати у ЖС<sub>I</sub> біосурфактанти виявляв штам *P. fluorescens* ONU541: значення  $\sigma(\text{КБ})$  і  $\sigma(\text{СП})$  знижувалося порівняно з ЖС<sub>I</sub> з 51,2±2,0 до 45,0±2,2 і 47,6±2,5 мН/м.

За відсутності пептону, дріжджового екстракту та мікроорганізмів поверхневий натяг середовища ЖС<sub>II</sub> зменшувався з 73 мН/м (для дистильованої води) [експериментальна стала  $K(\text{H}_2\text{O})^{25}=0,2028$ ] до 67,9 мН/м.

Перевірка здатності досліджуваних бактерій продукувати біосурфактанти у середовищі ЖС<sub>II</sub> показала дещо інші результати (табл. 2, рис. 1). Продукція поверхнево-активних речовин досліджуваних культур та їх супернатантів зростала у ЖС<sub>II</sub>. Різниця [ $\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{КБ}}$ ] і [ $\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{СП}}$ ] збільшувалася для ґрунтових штамів *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 – у 2,2–3,7 рази: від 6,2–8,8 до 19,0–19,6 і від 3,6–4,8 до 11,6–17,7 одиниць  $\sigma$ . Слід зазначити, що аналогічні дані по здатності продукувати біосурфактанти у живильному середовищі з невеликою кількістю нітрогену та мікроелементів за присутності глюкози було встановлено [3] для штаму *P. aeruginosa* DSM2659. Відомо, що особливістю нітрогенного і карбонового харчування для більшості видів бактерій роду *Pseudomonas* є те, що вони не потребують чинників росту і здатні асимілювати мінеральні форми азоту як єдиного джерела живлення [9], продукування біосурфактантів може відбуватися у ЖС з невеликою кількістю нітрогену та мікроелементів за присутності глюкози [3], при цьому екзополі



цукриди мікроорганізмів не тільки відіграють особливу роль у підтримці сприятливих умов для їх продуцентів і можуть використовуватися як джерело карбону. Відомо [7], що глюкоза є екзогенним попередником біосинтезу ПАР.

Вважається [15], що перспективними як продуценти біо-ПАР є мікроорганізми, в середовищі культивування яких спостерігається зниження значення поверхневого натягу нижче 40–50 мН/м.

Оцінка здатності мікроорганізмів, виділених із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний *P. fluorescens* ONU541 та *B. megaterium* ONU542, представлена на діаграмі (рис. 1), яка добре демонструє, що для обох мікроорганізмів оптимальним живильним середовищем із досліджених є ЖС<sub>II</sub>.

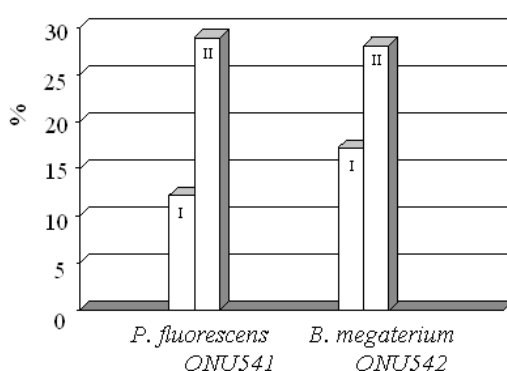


Рис. 1. Здатність *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542 продукувати біосурфактанти у живильних середовищах I - ЖС<sub>I</sub>, II - ЖС<sub>II</sub>

Fig. 1. The ability *P. fluorescens* ONU541 and *B. megaterium* ONU542 to produce biosurfactants in nutrient media I - NM<sub>I</sub>, II - NM<sub>II</sub>

Необхідно зазначити, що на основі такого компонентного складу ЖС, здатного підтримувати рН середовища на рівні 7,0–7,2, у попередній роботі [16] нами запропоновано виготовляти поверхнево-активні біопрепарати для очищення навколишнього середовища від хронічних нафтових забруднень. Штами *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 у середовищі ЖС<sub>II</sub> за відсутності у його складі органічних компонентів дещо більше продукують метаболіти з поверхнево-активними властивостями. Слід зазначити, що іншими дослідниками теж виявлена ймовірність появи біосурфактантів на гідрофільному живильному середовищі у деяких штамів *B. subtilis*. У трьох продуцентів біосурфактантів – *B. subtilis* ІБ-17, *B. subtilis* ІБ-18 і *B. subtilis* ІБ-19 на середовищі, яке містило крохмаль, було встановлено інтенсивне утворення поверхнево-активних речовин, що відбувалося в логарифмічній фазі росту бактерій [1].

Емульгувальні властивості одержаних із бактеріальних культур супернатантів, оцінені за індексом емульгування ( $E_{24}$ ), були досить високими по відношенню до соняшникової олії ( $E_{24} > 60\%$ ).

Таким чином, в даній роботі встановлено нафтодеструктивну активність та здатність продукувати біосурфактанти ґрунтових штамів *P. fluorescens*

ONU541, *B. megaterium* ONU542. Досліджувані штами найбільш активно продукували біосурфактанти за умов їх культивування за температури 30 °С протягом п'яти діб у живильному середовищі ЖС<sub>II</sub>, що відрізняється тим, що як мінеральні компоненти використовують (у г/л води):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3,0;  $\text{NaCl}$  – 5,0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0; а як органічний компонент – глюкозу в кількості 2,0 г/л. Цей компонентний склад живильного середовища ЖС<sub>II</sub> є перспективним при виготовленні нафтоокиснювального поверхнево-активного біопрепарату, призначеного для ремедіації ґрунту. За сумісної присутності досліджуваних штамів мікроорганізмів ступінь деструкції нафти сягає 90% в жорстких умовах навколишнього середовища: при очищенні засолених ділянок ґрунту о. Зміїний з хронічним нафтовим забрудненням.

**Е.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач,  
Т.А. Беляева, И.П. Конуп**

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

## **ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ И ПРОДУКЦИЯ БИО-ПАВ ШТАММАМИ *P. FLUORESCENS* ONU541 И *B. MEGATERIUM* ONU542**

### **Реферат**

**Цель.** Обнаружение особенностей окисления нефти и продукции био-ПАВ ґрунтовыми штаммами микроорганизмов рода *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542. **Методы.** Видовую принадлежность исследуемых микроорганизмов определяли по спектрам жирных кислот их клеточных липидов. Остаточное содержание углеводородов нефти определяли методом ИК-спектрометрии на "ИКС-29" в диапазоне 2700–3200 см<sup>-1</sup>. О продукции микроорганизмами биосурфактантов судили по снижению величины поверхностного натяжения жидких культур бактерий и их супернатантов и по эмульгирующей способности (по индексу эмульгирования – E24, %). **Результаты.** Показана зависимость между нефтеструктивной способностью исследуемых штаммов бактерий и их способностью продуцировать биосурфактанты. Штамм *P. fluorescens* ONU541 в большей степени по сравнению со штаммом *B. megaterium* ONU542 окисляет нефть (на 74,6%) и продуцирует поверхностно-активные метаболиты. Исследуемые штаммы *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 способны продуцировать биосурфактанты при условии их культивирования в течение пяти суток в питательной среде (ПС) состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; глюкоза – 2 (рН 7,0–7,2). **Вывод.** Установлены нефтеструктивная активность и способность продуцировать биосурфактанты ґрунтовых штаммов *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542. Доказано, что при совместном присутствии исследуемых штаммов микроорганизмов степень деструкции нефти достигает 90% в жестких условиях окружающей среды: при очистке засоленных участков ґрунта острова Зміїний с хроническим нефтяным загрязнением.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542, деструкторы нефти, продуценты поверхностно-активных веществ.



**O.G. Gorshkova, T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach,  
T.O. Beliaeva, I.P. Konup**

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

## **OIL OXIDIZATION AND BIO-SAFACTANTS PRODUCTION BY STRAINS OF *P. FLUORESCENS* ONU541 AND *B. MEGATERIUM* ONU542**

### **Summary**

**Aim.** Detection of the peculiarities of oil oxidation and bio-surfactant production by soil strains of microorganisms of the genus *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542. **Methods.** Species belonging to the investigated microorganisms were determined from the spectra of fatty acids of their cellular lipids. The residual content of petroleum hydrocarbons was determined by IR-spectrometry on "IKS-29" in the range of 2700–3200 cm<sup>-1</sup>. The products of microorganisms of biosurfactants were determined by the decrease in the surface tension of liquid cultures of bacteria and their supernatants and by their emulsifying ability (by the emulsification index – E24,%). **Results.** The dependence between the oil destructive ability of the strains of bacteria studied and their ability to produce biosurfactants is shown. The *P. fluorescens* ONU541 strain is more than the *B. megaterium* strain ONU542 oxidizes oil (by 74.6%) and produces surface-active metabolites. The studied strains of *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 are able to produce biosurfactants provided they are cultivated for five days in a nutrient medium (NM) of composition (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>–1.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–3; NaCl–5; NH<sub>4</sub>Cl–1; glucose–2 (pH 7.0–7.2). **Conclusion.** Oil destructive activity and the ability to produce biosurfactants of soil strains of *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 have been determined. It has been proved that in the joint presence of the investigated strains of microorganisms, the degree of destruction of oil reaches 90% under harsh environmental conditions: during cleaning of saline soil sections of the Zmeiny Island with chronic oil contamination.

*Key words:* *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542, oil destructors, producers of surfactants

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Іванисько О.В. Біосинтез поверхнево-активних речовин бактеріями роду *Bacillus* // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013. – № 2. – С. 8–14.
2. Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Гудзенко Т.В., Остапчук А.М. Склад жирних кислот ліпідів штаму *Bacillus sp.* ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4 (32). – С. 28–35.
3. Кузьменко А.В. Біосинтез поверхнево-активних речовин представниками роду *Pseudomonas* // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013. – № 1. – С. 17–32.
4. Мухліс Абедалабас, Галкін М.Б., Пахомова Є.Ю., Філіпова Т.О. Вплив екзогенних аутоіндукторів Quorum Sensing на синтез рамноліпідів *Pseudomonas Aeruginosa* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 38–45.



5. *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.
6. *Петриков К.В.* Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*: Автореф. дис. ...канд. хим. наук. Москва, 2011. – 23 с.
7. *Пирог Т.П., Софилканич А.П., Покора К.А., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А.* Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus Erythropolis* As-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccine* IMB B-7405 на промышленных отходах // *Мікробіол. журн.* – 2014. – Т. 76, № 2. – С. 17–23.
8. *Покинъброта Т.Я.* Технология получения и свойства рамнолипидных поверхностно-активных веществ бактерий рода *Pseudomonas*: Автореф. дис. ...канд. техн. наук. Киев, 2009 – 21 с.
9. *Смирнов В.В., Киприанова Е.А.* Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наук. думка, 1990. – 264 с.
10. *Gudzenko T.V., Voliuvach O.V., Belyaeva T.O., Puzyreva I.V., Lisyutin G.V., Gorshkova O.G., Ivanytsia V.O.* Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus // *Microbiology&Biotechnology*. – 2013. – № 4 (24). – P. 72–80.
11. *Kumar M., León V., Materano A., Sisto De, Ilzins O.A., Luis L.* Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – 24, № 7. – P. 1047–1057.
12. *Perfumo A., Rancich I., Banat I.M.* Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – 672. – P. 135–145.
13. *Sheppard J.D., Mulligan C.C.N.* The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1987. – 27 – P. 110–116.
14. *Willumsen P.A., Karlson U.* Screening of bacteria, isolated from contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers // *Biodegradation*. 1997. – 7. – P. 415–423.
15. *Патент RU № 2320715, МПК C12N 1/20, C12N 1/26, C12Q 1/02, C12Q1/04.* Способ отбора нефтеокисляющих бактерий-продуцентов биосурфактантов / Волченко Н.Н., Карасева Э.В., Самков А.А. (Российская Федерация). – № 2320715; заявл. 02.05.2006; опубл. 27.03.2008, Бюл. № 7.
16. *Патент України на корисну модель № 102337. МПК C12N 1/02 (2006.1), C12R 1/38 (2006.1).* Склад поживного середовища для продукування поверхнево-активних речовин нафтоокиснювальними мікроорганізмами / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Коноп І.П. (Україна). – № 102337; 2015р. заявл... ; опубл. 26.10.2015, Бюл. № 20.

## References

1. *Ivanysko OV.* Biosynthesis of surfactants bacteria of the genus *Bacillus*. *Problems of environmental biotechnology*. 2013;(2):8–14.



2. Ivanytsia VO, Gorshkova OG, Korotaeva NV, Voliuvach OV, Gudzenko TV, Ostapchuk AM. Fatty acid composition of lipids of strain *Bacillus* sp. O3-5 isolated from oil-contaminated soil of the Zmiiny island. *Microbiology and biotechnology*. 2015;(4):28–35.

3. Kuzmenko AV. Biosynthesis of surfactants representatives of the genus *Pseudomonas*. *Problems of environmental biotechnology*. 2013;(1):17–32.

4. Muhlis Abedalabas, Galkin MB, Pakhomov EY, Filipova T. Effect of exogenous autoinduktoriv Quorum Sensing synthesis ramnolipidiv *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiology and biotechnology*. 2013;(4):38–45.

5. Nguyen Viet Tien. Heterotrophic bacteria technogenic substrates as a base of biopreparation-destroyer of oil hydrocarbons and surfactants. PhD thesis, Ulyanovsk, 2013: 174.

6. Petrikov LV. Biological surfactants produced by microorganisms, oil destructors of the genus *Pseudomonas* and *Rhodococcus*. PhD thesis, Moscow, 2011: 23.

7. Pirog TP, Sofilkanich AP, Pokora KA, Shevchuk TA, Iutinskaya GA. Synthesis of surfactants by *Rhodococcus Erythropolis* As-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccine* IMV B-7405 on industrial waste. *Microbiol. J.* 2014;76(2):17–23.

8. Pokinbroda TY. Technology and properties ramnolipidnyh surfactants bacteria of the genus *Pseudomonas*. PhD thesis, Kiev, 2009: 21.

9. Cmirnov VV, Kiprianova EA. Bakterii roda *Pseudomonas*. – Kiev: Nauk. dumka, 1990. 264.

10. 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 and biotechnology*. 2013;4 (24):72–80.

11. Kumar M, León V, Materano A, Sisto De, Ilzins OA, Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24(7):1047–1057.

12. Perfumo A, Rancich I, Banat IM. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;(672):135–145.

13. Sheppard JD, Mulligan CCN. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1987;(2):110–116.

14. Willumsen PA, Karlson U. Screening of bacteria, isolated from contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1997;(7):415–423.

15. Patent RU № 2320715/2006, MBI C12N 1/20, C12N1/26, C12Q 1/02, C12Q1 / 04. The method of selection of oil-oxidizing bacteria producing biosurfactants. Volchenko NN, Karasev EV, Samkov AA. (Russian Federation). - N 2320715; zayavl. 02.05.2006; opubl. 27.03.2008, Byul. N 7.

16. Patent of Ukraine N 102337/2015, MBI C12N 1/02, C12R 1/38. The composition of the nutrient medium for production of surfactants by oil-oxidizing microorganisms. Ivanytsia VO, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Gorshkova OG, Belyaeva TO, Konup IP. (UA). - N 102337; zayavl. 15.08.2014; opubl. 26.10.2015, Byul. N 20.

Стаття надійшла до редакції 19.04.2016 р.



**К.Б. Сардарян<sup>1</sup>, Т.М. Корня<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 68 76 42,  
e-mail: karinasardarian@gmail.com

<sup>2</sup> ТОВ «Науково-виробничий центр «ІН ВІТРО ПЛАНТ»  
вул. Отамана Головатого 84а, Одеса, 65003, Україна, тел.: +38 (067) 41 54 369,  
e-mail: invitroklon@gmail.com

**ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ЕКСТРАКТІВ  
ВОДРОСТЕЙ В МІКРОКЛОНАЛЬНОМУ  
РОЗМНОЖЕННІ ДЕЯКИХ ВИДІВ РОСЛИН**

**Мета.** Дослідження розвитку експлантів деяких культурних рослин в умовах *in vitro* на МС середовищі з додаванням екстрактів водоростей. **Матеріали та методи.** В роботі використано стандартне живильне середовище Мурасіге та Скуга (1962) з половинним вмістом солей. В роботі застосовували декілька контрольних варіантів: 1) середовище МС без добавок; 2) з додаванням 0,1 мг/л штучних гормонів – БАП (бензінамінопурин); 3) 0,1 мг/л ГК (гіберелова кислота); 4) 0,1 мг/л ІМК (індолілмасляна кислота) після автоклавування. В дослідних варіантах екстракти водоростей *Ceramium virgatum* Roth., *Ulva intestinalis* L., *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek., *Ulva compressa* L. вносили в живильне середовище в концентраціях 5 та 10% (об/об) після його автоклавування. Ефект визначали за змінами ростових показників. **Результати.** Досліджено водні екстракти деяких видів водоростей та їх біологічну активність. Визначено вплив екстрактів на розвиток експлантів деяких культурних рослин в умовах *in vitro*. Показано, що сила та направленість змін, що викликані екстрактами, залежала від виду водоростей. Зі збільшенням концентрації екстрактів деяких водоростей в живильному середовищі, спостерігали передозування мінеральними речовинами. Доцільним є використання екстрактів на рівні мікроелементів. **Висновки.** Синтетичне живильне середовище може бути доповнене екстрактами водоростей, що сприятимуть збільшенню кількості експлантів (клонів).

*Ключові слова:* біологічно активні речовини, водорості, екстракт, ростові показники.

Однією з унікальних властивостей водоростей є склад їх біомаси і пластичність обміну речовин. Біомаса водоростей містить білок зі всіма незамінними амінокислотами, жирні кислоти, в тому числі  $\omega^3$ , вітаміни, мікроелементи, різноманітні специфічні біологічно активні речовини, серед яких: абсцизини, ауксини, цитокініни, гібереліни, етилен, поліаміни, брасиностероїди, жасмонат, саліцилати і олігоцукриди. На сьогодні у водоростях виявлені практично всі відомі фітогормони вищих рослин [4]. Досить тривалий час водорості використовувалися як джерело промислово важливих поліцукридів, таких як агар, карагінан, фукоідан та ін. [3,7].

© К.Б. Сардарян<sup>1</sup>, Т.М. Корня<sup>2</sup>, 2017





Останнім часом збільшилася кількість досліджень, присвячених вивченню біологічно активних речовин екстрактів водоростей [1,2].

Нами вже було проведено ряд досліджень, що підтверджують стимулювальний ефект екстрактів водоростей на деякі рослини, що вирощувалися *in vivo* [5,6].

Метою роботи було дослідження розвитку експлантів деяких культурних рослин в умовах *in vitro* на середовищі Мурасіге та Скуга з додаванням екстрактів водоростей.

### Матеріали та методи

В роботі використано стандартне живильне середовище Мурасіге та Скуга (МС) [9] з половинним вмістом солей. Для виявлення різної природи біологічно активних речовин водоростевих екстрактів в роботі застосовували декілька контрольних варіантів: 1) загальний контроль на виявлення біологічно активних речовин в екстрактах водоростей – стандартне середовище МС без додавань; 2) середовище МС з додаванням 0,1 мг/л штучного гормону бензинамінопурина (БАП) – для виявлення цитокінінової активності; 3) середовище МС з додаванням 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК) – контроль ауксинової активності; 4) середовище МС з додаванням 0,1 мг/л гібереллової кислоти (ГК) – контроль гіберелінової активності.

Водорості, що були зібрані в Одеській затоці Чорного моря в жовтні 2016 р., відносяться до так званої групи ефемероїдів, тобто таких, що вегетують протягом усього року, утворюючи декілька поколінь.

В дослідних варіантах екстракти водоростей *Ceramium virgatum*, *Ulva compressa*, *U. intestinalis* і *Cladophora vagabunda* вносили в живильне середовище в концентраціях 5 та 10% (об/об) після його автоклавовання. Варіанти з екстрактами водоростей були моновидовими.

Екстракти водоростей отримували шляхом дрібнофракційного подрібнення їх фітомаси (5–10 г) з додаванням дистильованої води (100 мл). Потім з подальшою фільтрацією суспензії та холодною стерилізацією екстракту фільтруванням через фільтр Millipore з розміром пор 0,22 мкм. Всі отримані екстракти водоростей додавали до живильного середовища після його автоклавовання та охолодження до температури 45 °С.

Для мікроклонування і подальшого вирощування на живильному середовищі використовували рослини з різними потребами до його складу, а саме: Ожина садова (*Eubatus sp.*) – невибаглива до мінерального складу; Орхідея декоративна (*Dendrobium sp.*) – епіфіт, що вимагає мінімальної кількості мінеральних речовин; Венерина мухоловка (*Dionaea muscipula* J. Ellis) комахоїдна рослина, яка нестачу азотних речовин компенсує за рахунок білка комах.

Типи експлантів дослідних рослин представляли собою органи та частини органів (для ожини – сегменти пагону, для мухоловки та орхідеї – регенеранти, отримані з калюсу) ізольовані від стерильної рослини.

Культивування експлантів рослин і постановку дослідів виконували в лабораторії мікроклонального розмноження «ІН ВІТРО ПЛАНТ».

Рослини вирощували при температурі 24 °С за світлового режиму 1/16 годин. З метою виявлення впливу екстрактів водоростей на досліджувані



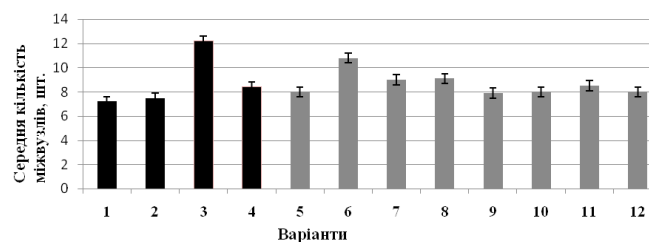
об'єкти одноразово знімали ростові показники у мікророслин через однаковий проміжок часу культивування для всіх видів рослин – 28 діб, коли було отримано повністю сформовані рослини, готові до адаптації в ґрунті.

Ефект дії екстрактів водоростей оцінювали: для Ожини садової *Eubatus* sp. за середньою кількістю сформованих корінців, їх довжиною, площею листової пластинки і числом міжвузлів; у Орхідеї *Dendrobium* sp. – за середньою кількістю сформованих мікророслин і площею листової пластинки; для Мушоловки *Dionaea muscipula* – за загальною площею листової поверхні.

В дослідженні використовували метод багатofакторного дисперсійного аналізу ANOVA для вибірок з нормальним розподілом, а також метод порівняння груп за довірчим інтервалом.

### Результати дослідження та їх обговорення

Найбільш високі показники середньої кількості міжвузлів спостерігали при вирощуванні мікророслин ожини на живильному середовищі з екстрактом *C. virgatum* в концентрації 10% (рис. 1). Цей показник був подібним до варіанту середовища з цитокініном (БАП), що, можливо, пов'язано з високим вмістом даної групи фітогормонів в екстракті *C. virgatum*.



**Рис. 1. Середня кількість міжвузлів мікророслин ожини.**

Примітка (тут і на рис. 2–6): 1 – контроль (стандартне середовище МС без додань), 2 – середовище МС з додаванням 0,1 мг/л штучного гормону БАП, 3 – середовище МС з додаванням 0,1 мг/л ІМК, 4 – середовище МС з додаванням 0,1 мг/л ГК, 5 – середовище МС з додаванням 5% екстракту *C. virgatum*, 6 – середовище МС з додаванням 10% екстракту *C. virgatum*, 7 – середовище МС з додаванням 5% екстракту *U. intestinalis*, 8 – середовище МС з додаванням 10% екстракту *U. intestinalis*, 9 – середовище МС з додаванням 5% екстракту *C. vagabunda*, 10 – середовище МС з додаванням 10% екстракту *C. vagabunda*, 11 – середовище МС з додаванням 5% екстракту *U. compressa*, 12 – середовище МС з додаванням 10% екстракту *U. compressa*.

**Fig. 1. The average number of blackberry micro plants inter-nodes.**

Note (here and in fig.2–6): 1 – control (standard MS medium without additions), 2 – MS medium with the addition of 0.1 mg/L artificial hormone BAP, 3 – medium MS with the addition of 0.1 mg/l IMC, 4 – MS medium with the addition of 0.1 mg/l CC, 5 – MS medium with the addition of 5% extract of *C. virgatum*, 6 – MS medium supplemented with 10% extract of *C. virgatum*, 7 – MS medium with the addition of 5% extract of *U. intestinalis*, 8 – MS medium supplemented with 10% extract of *U. intestinalis*, 9 – MS medium with the addition of 5% extract of *C. vagabunda*, 10 – MS medium supplemented with 10% extract of *C. vagabunda*, 11 – MS medium with the addition of 5% extract *U. compressa*, 12 – MS medium supplemented with 10% extract *U. compressa*.



Порівняно з стандартним середовищем, кількість міжвузлів збільшилася на 50% ( $P \leq 0,05$ ), що можна пояснити збільшенням кількості пагонів. Отримані дані показують, що даний екстракт можна використовувати на етапі мікрокло-нування ожини для збільшення кількісного виходу мікророслин.

Встановлено, що максимальною кількістю корінців мікророслин ожини була у варіанті з екстрактом *U. intestinalis* в концентрації 10% (рис. 2). Порівняно з контролем (середовище МС без добавок) цей показник був вищим на 48% ( $P \leq 0,05$ ). Ефект був подібним до варіанту досліді з ІМК. Тому, очевидно, даний екстракт може бути використаний на етапі вкорінення мікророслин ожини. В той же час 10% екстракт з *C. vagabunda* пригнічував ріст кореневої системи мікророслин.

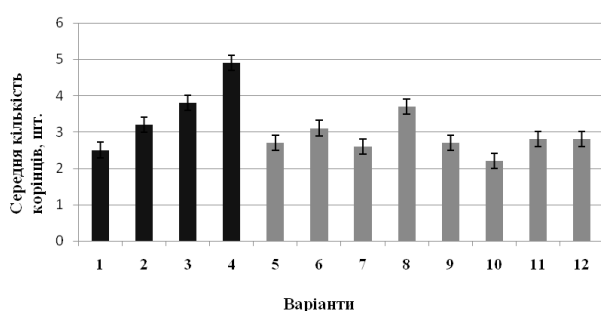


Рис. 2. Середня кількість корінців мікророслин *Eubatus Natchez*

Fig. 2. The average number of micro plants *Eubatus Natchez* roots

З додаванням екстрактів водоростей *U. compressa* (концентрація 10%, *C. vagabunda* (5%), *C. virgatum* (5% та 10%) спостерігався інтенсивний ріст та галуження кореневої системи мікророслин ожини, що значно перевищували показники контрольних рослин (середовище МС без добавок) на 39,0%, 34,5%, 32,0%, 37,0% ( $P \leq 0,05$ ), відповідно (рис. 3). Це може бути пов'язане з оптимальним вмістом поживних речовин в екстрактах, що сприяють нормальному росту та розвитку мікророслин.

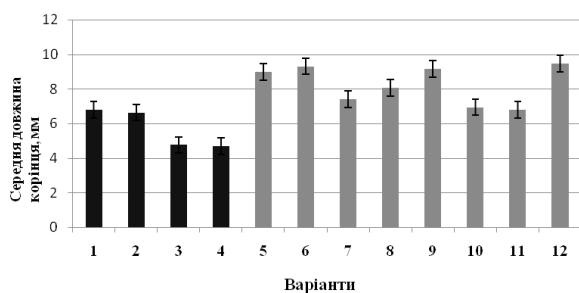


Рис. 3. Середня довжина корінців *Eubatus Natchez*

Fig.3. The average length of *Eubatus Natchez* roots



У плотьодної мухоловки за дії екстракту *C. vagabunda* за концентрації 5% було виявлено помітне збільшення листової поверхні (рис. 4). Цей показник значно перевищував такий у контрольному варіанті (середовище МС без добавок) на 77,4% ( $P \leq 0,05$ ). Оскільки збільшення пасток мухоловки в природі відбувається переважно за рахунок білкового живлення комахами, то можна припустити, що даний екстракт має кормовий білок. Отже, він може бути використаний для прискореного нарощування розмірів плотьодних мікророслин в штучних умовах культивування на етапі підготовки до адаптації в ґрунті.

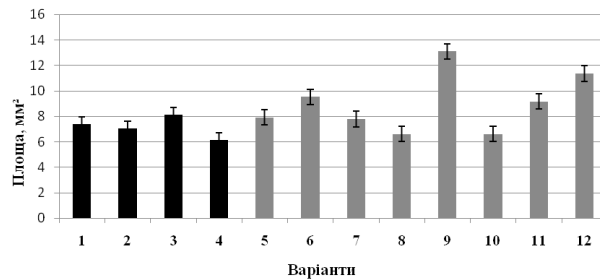


Рис. 4. Площа листової поверхні *Dionaea muscipula*

Fig. 4. The average leaf area of *Dionaea muscipula*

Площа листової пластинки орхідеї збільшувалася при вирощуванні мікророслин на екстракті *C. virgatum* за концентрації 5% порівняно з контролем (середовище МС без добавок) на 47% ( $P \leq 0,05$ ) (рис.5). В той же час пригнічувальний вплив на збільшення площі листової пластинки мав 5% екстракт *U. intestinalis*.

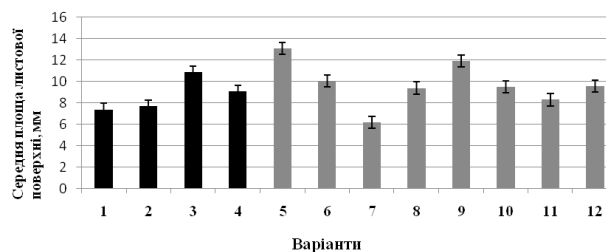


Рис. 5. Середня площа листової пластинки *Dendrobium* sp.

Fig. 5. The leaf area of *Dendrobium* sp.

Ефективність мікроклонального розмноження орхідеї є досить високою у варіантах з 10% екстрактом *C. vagabunda* і сягає 177%, а *U. compressa* – 123%, з 5% екстрактом *U. compressa* – 97%, а *C. vagabunda* – 46% ( $P \leq 0,05$ ) порівняно з контролем без добавок (рис. 6). Зважаючи на те, що БАП та ІМК у певних співвідношеннях впливають на збільшення кількості сформованих мікророслин, можемо зробити висновок, що у складі зазначених екстрактів є достатня кількість гормонів ауксинового та цитокінінового ряду. Отже, використання даних екстрактів за правильно підібраної концентрації може збільшити кількість експлантів (клонів). Найменша кількість клонів спостерігалася за дії 5 та 10% екстракту *U. intestinalis*.



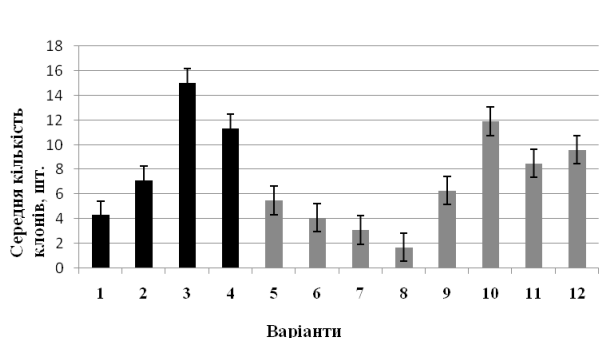


Рис. 6. Середня кількість сформованих мікророслин *Dendrobium sp.*

Fig. 6. The average number of formed micro plants *Dendrobium sp.*

У деяких дослідних варіантах при подальшому культивуванні орхідеї за вказаних концентрацій екстрактів водоростей спостерігали пригнічення росту рослин. Це проявлялося зміною кольору листя – від зеленого до жовто-зеленого, появою некротичних плям, а в деяких випадках відбувався і їх повний лізис. Це, очевидно, пов'язано з деяким передозуванням мінеральними речовинами, що містилися в екстрактах водоростей. Тому, доцільним для росту експлантів орхідей було використання екстрактів водоростей із зменшеною в 10 разів концентрацією.

Ефективність дії водоростевих екстрактів і його направленість повною мірою залежали від виду водоростей, що використовувалася для приготування витяжки. Ряд екстрактів чинили стимулювальну дію на певні етапи розвитку рослин, але деякі мали і пригнічувальний вплив.

Отже, синтетичне живильне середовище може бути доповнене екстрактами водоростей, оскільки останні мають позитивний ефект в культурі *in vitro*, можливо саме через унікальний склад макро- та мікроелементів, вітамінів та гормонів, частина з яких спричиняє вплив, подібний до впливу похідних від синтетичних гормонів.

Дякуємо за ідею та допомогу у виконанні досліджень у роботі проф. Ткаченку Ф.П.

**К.В. Sardarian<sup>1</sup>, Т.М.Корнія<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>I.I. Mechnykov Odesa National University,  
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (098) 210 96 50,  
e-mail: karinasardarian@gmail.com

<sup>2</sup>LTD. "The Scientific and production center of "IN VITRO PLANT"  
84a, Otamana Holovatoho St., Odesa, 65003, Ukraine, tel.: +38 (067) 4154369,  
e-mail: invitroklon@gmail.com

## THE EFFICIENCY OF USING ALGA EXTRACTS IN THE MICROCLONAL REPRODUCTION OF SOME PLANT SPECIES

### Summary

**Aim.** To study the development of explants of some cultivated plants *in vitro* conditions using MC medium with addition of algae extracts.



**Materials and methods.** The standard Murashige and Skoog nutrient medium (1962) with a half content of salts was used in our work. There were used several control options: 1) MC medium without additives; 2) medium with addition of 0.1 mg/l of artificial hormones – BAP (benzylaminopurine); 3) 0.1 mg/l GA (gibberelic acid); 4) 0.1 mg/l of IBA (indolylbutyric acid) after autoclaving. In the experimental variants, algae *Ceramiumvirgatum*Roth., *Ulvaintestinalis* L., *Cladophoravagabunda* (L.) Hoek., *Ulvacompressa* L. were introduced into a nutrient medium in 5 and 10% (V/V) concentrations after its autoclaving. The effect was determined by the change of the growth indicators. **Results.** Water extracts of some species of algae and their biological activity were studied. The impact of extracts on the development of explants of some cultivated plants in vitro conditions was determined. It was shown that the strength and direction of changes caused by the extracts depended on algae species. The overdose with mineral substances was observed with the increase of concentration of some algae extracts in nutrient medium. It is reasonable to use extracts at the level of microelements. **Conclusions.** Synthetic nutrient medium can be supplemented with algae extracts, it will cause increasing of the quantity of explants (clones).

*Key words:* biologically active substances, algae, extract, growth indicators.

### К.Б. Сардарян<sup>1</sup>, Т.М. Корня<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 68 76 42,  
e-mail: karinasardarian@gmail.com

<sup>2</sup>ООО «Научно-производственный центр» ИН ВИТРО ПЛАНТ »  
ул. Атамана Головатого 84а, Одесса, 65003, Украина, тел.: + 38 (067) 41 54 369,  
e-mail: invitroklon@gmail.com

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКСТРАКТОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ В МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

### Реферат

**Цель.** Исследование развития эксплантов некоторых культурных растений в условиях *in vitro* на среде Мурашиге и Скуга (1962) с добавлением экстрактов водорослей. **Материалы и методы.** В работе использована стандартная питательная среда Мурашиге и Скуга (МС) с половинным содержанием солей. Для сравнения применяли несколько контрольных вариантов: среда МС без добавок; с добавлением 0,1 мг/л искусственных гормонов - БАП (бензиминопурин) 0,1 мг/л ГК (гибберелловая кислота), 0,1 мг/л ИМК (индолмасляная кислота) после автоклавирования. В опытных вариантах экстракты водорослей *Ceramium virgatum* Roth., *Ulva intestinalis* L., *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek., *Ulva compressa* L. вносили в питательную среду в концентрациях 5 и 10% (об/об) после его автоклавирования. Эффективность экстрактов водорослей определяли по изменениям ростовых показателей в испытуемых растениях. **Результаты.** Исследованы водные экстракты некоторых видов водорослей и их биологическая активность. Определено влияние экстрактов на развитие эксплантов некоторых культурных растений в условиях *in vitro*. Показано, что стимулирующая эффективность и ее направленность, вызванные экстрактами, зависели от вида водорослей.



С увеличением концентрации экстрактов некоторых водорослей в питательной среде, наблюдали передозировки минеральными веществами. Поэтому целесообразно их использование с концентрацией не более 5%. **Выводы.** Синтетическая питательная среда может быть дополнена экстрактами водорослей, которые способствуют увеличению количества эксплантов (клонов).

*Ключевые слова:* биологически активные вещества, водоросли, экстракты, ростовые показатели.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Тараховская Е.Р., Маслов Ю.И., Шишова М.Ф. Фитогормоны водорослей // Физиология растений. – 2007. – 54, № 2. – С. 1–9.
2. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. – К.: Наук. думка, 1988. – 256 с.
3. Гуд М. Дж.П., Сешикала Д., Сингара Чаря М.А. Антибактериальная активность и биохимический состав некоторых пресноводных водорослей реки Годовари (Индия) // Альгология. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 21–28.
4. Мусатенко Л.И. Рост и гормональный комплекс водорослей-макрофитов // Альгология. – 1999. – Т. 9, № 2. – С. 97–98.
5. Ткаченко Ф.П., Топтиков В.А. Экстракты морских водорослей как стимуляторы начальных этапов развития растений ячменя // Вісник Харківського нац. ун-ту імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія». – 2008. – Вип. 7, № 814. – С. 199–204.
6. Ткаченко Ф.П., Сардарян К.Б. Влияние водорослевых экстрактов на начальные этапы развития *Calendula officinalis* // Міжнародна науково-практична конференція «Наука на службі сільського господарства». – Миколаїв, 2013. – С. 185–186.
7. Сардарян К.Б., Чернякевич С.С. Формування розсади томатів за передпосівної обробки їх насіння екстрактами водорослей-макрофітів // VI Відкритий з'їзд фітобіологів Причорномор'я (Херсон-Лазурне, 19 травня 2015. – Херсон, 2015. – С. 67.
8. Шаларь В.В., Шаларь В.М., Маня Ш. Применение синезеленых водорослей в качестве стимулятора роста культурных растений // Мат. III Международ. конф. «Актуальные проблемы современной альгологии». – Харьков: ХНУ, 2005. – С. 179–180.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962. – 15 (3). – P. 473–497.

### References

1. Tarakhovskaya ER, Maslov YI, Shishova MF. Algae phytohormones. *Plants Physiology*. 2007; 54( 2):1-9.
2. Sirenko LA, Kasicka VN. Biological active substances of algae and water quality. Kiev.: Naukova Dumka, 1988: 256.
3. Hood MJ., Sasikala D, Singhara of Char MA. Antibacterial activity and biochemical composition some freshwater algae of the river Godavari (India). *Algologia*. 2008; 18 (1):21-28.



4. Musatenko LI. Growth and hormonal complex of algae-macrophytes *Algologia*.1999; 9( 2):97-98.
5. Tkachenko FP, Toptikov VA. Marine algae extracts as stimulators of the initial stages of development barley plants. *The Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: «Biology»*.2008; 7(814):199-204.
6. Tkachenko FP, Sardaryan KB. The influence of algal extracts to initial stages the growth *Calendula officinalis*. International scientific-practical conference "Science for agriculture ", Nikolaev. 2013:185 – 186.
7. Sardaryan KB, Chernjakevich SS. Formation of tomato seedlings for pre-treatment of their seeds extracts of seaweeds. VI Congress of phytobiologic, Kherson. 2015: 67.
8. Şalari VV, Şalari VM, Many S. The using of blue-green algae as a stimulant of growth cultural plants. *Mat. III Intern. Conf. "Actual problems of modern Algology"*.Kharkiv: KhNU, 2005: 179-180.
9. Murashige T.,Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, 1962; 15 (3) :473–497.

Стаття надійшла до редакції 10.04.2017 р.





**П.І. Гвоздяк, О.В. Сапура**

Інститут колоїдної хімії та хімії води імені А.В. Думанського НАН України,  
бульв. Вернадського, 42, Київ, 03142, тел.: +38 (044) 424 35 79,  
e-mail: gvozdyak@ukr.net

## **ДЕНІТРИФІКАЦІЯ ПИТНОЇ ВОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ ПРОБІОТИЧНИХ БАКТЕРІЙ**

**Мета.** Вивчення очищення питної води від нітратів за допомогою пробіотичних бактерій *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, а також *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus*, які входять до складу відповідних медичних препаратів. **Методи.** Мікробіологічні, хімічний, фізико-хімічний, газово-хроматографічний, статистичної обробки. **Результати.** Показано, що при повільному (0,1 м/год) фільтруванні води з вмістом нітратів 300 - 500 мг/дм<sup>3</sup> через зернисті (пісок, активоване вугілля) та волокнисту (хімічне волокно у вигляді носія ВІЯ) загрузки з попередньо іммобілізованими на них пробіотичними бактеріями концентрація нітратів зменшувалася до рівня нижче 2,5 мг/дм<sup>3</sup>. Життєдіяльність та денітрифікувальну здатність мікроорганізмів підтримували додаванням до досліджуваної води етилового спирту в кількості 0,1 см<sup>3</sup> на кожні 100 мг КNO<sub>3</sub>. Газ, що утворювався під час денітрифікації, складався на 95–97% з N<sub>2</sub>, 0,1–0,3% – CO<sub>2</sub>, іноді C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (<1%), решта (2–3%) – H<sub>2</sub>O і не містив H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S. **Висновки.** Встановлена можливість очищення питної води від нітратів у надлишкових концентраціях за допомогою пробіотичних бактерій.

*Ключові слова:* питна вода, нітрати, пробіотичні мікроорганізми, пробіотична денітрифікація.

Концентрація нітратів у питній воді лімітується міжнародними і вітчизняними стандартами до 45–50 мг NO<sub>3</sub> в 1 дм<sup>3</sup>, а в так званій «доочищеній воді» – навіть до 5 мг/дм<sup>3</sup> [1]. Це зумовлено тою обставиною, що, як відомо, нітрати у підвищеній концентрації в питній воді згубно впливають на організм людини, а у дітей легко відновлюються до нітритів, які взаємодіють з гемоглобіном крові, спричиняючи утворення метгемоглобіну, що призводить до хвороби крові, званої як «посиніння шкірних покривів» («blue baby syndrome») [2]. У всьому світі суттєво зростає забруднення природних вод нітратами, що змушує закривати криниці та використовувати дорогі багатоступеневі методи очищення питної води [3, 4]. Україна не є винятком у цьому відношенні, і у нас також спостерігається неухильне щорічне збільшення кількості понаднормово забруднених нітратами джерел питної води, та в криницях багатьох областей України цей рівень сягає 950 мг NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в 1 дм<sup>3</sup> [2, 5].

Існує ряд хімічних (відновлення залізом, алюмінієм, паладієм тощо)



фізико-хімічних (електродіаліз, йонний обмін, нанофільтрування, зворотний осмос) та біологічних (гетеротрофна і автотрофна денітрифікація, застосування мембранних біореакторів) методів звільнення води від нітратів, однак на практиці використовується лише йонний обмін, зворотний осмос, електродіаліз та гетеротрофна (біологічна) денітрифікація [1, 6].

Біологічна денітрифікація – широко розповсюджений природний процес, що у значній мірі спричиняється до життєво важливого кругообігу Нітрогену в Біосфері [6], а разом і до самоочищення поверхневих вод. Відновлення нітратів здійснюють представники різних родів архей [7], бактерій [8] та навіть деякі гриби [9]. За відсутності кисню вони використовують оксиди Нітрогену як акцептори електронів, донорами яких служать, головним чином, органічні сполуки, а також певні неорганічні речовини [10]. Біологічна денітрифікація як явище відома в науці майже півтора століття, а як свідомий технологічний процес застосовується з 1964 р. [11, 12], однак у підготовці питної води стикається з певними труднощами, пов'язаними, в основному, з гігієнічними застереженнями щодо безпеки мікроорганізмів-денітрифікаторів, а також з технологічними складнощами іммобілізації бактерій на підхожих носіях [13].

Метою даного дослідження було вивчення процесу очищення питної води від надлишку в ній нітратів за допомогою пробіотичних бактерій, які, як відомо, не тільки нешкідливі, а й вважаються корисними для здоров'я людей різних вікових груп.

### Матеріали і методи

У досліджах використовували ліофілізовані маси живих мікробних клітин *Bacillus subtilis* та *Bacillus licheniformis* медичного препарату «Біоспорин-Біофарма» (Україна) та *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* і *Streptococcus thermophilus* препарату «Йогурт у капсулах» фірми «Pharma science» (Канада). Культури вирощували на живильному агарі складу: пептон ферментативний, суміш амінокислот, натрій хлористий, агар мікробіологічний, натрій вуглекислий кислий, Державного підприємства «Експериментальний завод медпрепаратів» ІБОНХ НАН України та іммобілізували на попередньо простерилізованих: 1) піску, через який фільтрують питну воду на Дніпровській водогінній станції ПАТ «АК «Київводоканал»; 2) піску гранодіоритному [15] (розмір фракції 3,0..5,0 мм), за ТУ У 324584-01-80-01; 3) гранульованому активованому вугіллі мікропористому бітумному з високими адсорбційними властивостями та волокнистому носієві «ВІЯ» за ТУ 995990.

Воду з крану Святошинського району міста Києва, відстояну протягом доби, з внесеними до неї по 300–500 мг  $KNO_3$  та по 0,5–0,7 см<sup>3</sup> етилового спирту на 1 дм<sup>3</sup> води, пропускали знизу вверх спочатку під гідростатичним тиском, а потім за допомогою перистальтичного насоса в режимі повільного фільтрування (зі швидкістю 0,1 м/год) через 20–25 см шар іммобілізованого пробіотиками піску, гранодіориту і активованого вугілля в колонках діаметром 30 мм, 50 мм та 80 мм, відповідно. Іммобілізований пробіотиками носій ВІЯ монтували у колонці діаметром 20 мм і висотою шару 100 см з розрахунку 10 кг носія в 1 м<sup>3</sup> фільтра.



Досліди проводили при кімнатній температурі (12 °С – 25 °С) протягом 300 діб з перервами на 1 і 3 місяці. Хімічний аналіз води на вміст нітрат-йона проводили за методом трихвильової фотометрії в ультрафіолеті, вимірюючи оптичну густину розчину при 220, 230, і 240 нм на спектрофотометрі СФ-16 [16] та за допомогою паперового Nitrat-Test фірми «Merck» (Німеччина). Кількість мікроорганізмів в очищеній воді визначали за ДСТУ 7525:2014 «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості».

Для визначення складу газу, що утворюється при звільненні води від нітратів за допомогою пробіотичних бактерій, в біореактори – ПЕТ-пляшки місткістю 5,5 дм<sup>3</sup> – вносили по 1 дм<sup>3</sup> носія (піску, активованого вугілля) з іммобілізованими на ньому бактеріальними культурами, що входять до складу фармацевтичних препаратів – пробіотиків, 3 дм<sup>3</sup> відстояної води з водогону, 6 г KNO<sub>3</sub> і 12 см<sup>3</sup> етанолу.

Пляшки закривали гумовими корками з отворами зі скляними патрубками, на які одягали гумові шланги, які після повного витіснення повітря з ПЕТ-пляшок перекривали затискачами. Біореактори інкубували в термостаті (28 °С) протягом 3–4 діб, і газ, що утворювався, спрямовували в попередньо заповнені 20%-ним водним розчином NaCl газові піпетки. Аналіз газу здійснювали на газовому хроматографі 6890 N («Agilent» США) у лабораторії при Інституті газу НАН України. Умови аналізу: детектор – катарометр; аналіз легких газів проводили на колонці MOLSIV завдовжки 15 м, вуглеводнів – на колонці PLOTQ завдовжки 15 м. Зразки газу вводили безпосередньо в дозатор хроматографа.

Досліди ставили в чотирьох повторностях.

Статистичне опрацювання результатів дослідження проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Вірогідність різниці ( $p < 0.05$ ) оцінювали за t-критерієм Стьюдента; використовували прикладну програму «Microsoft Excel».

### Результати та їх обговорення

Запропоновані ще 1829 року англійським інженером Дж. Сімпсоном так звані «повільні» або «англійські» фільтри для підготовки питної води [17] переживають зараз певне відродження. Відомо, що на будь-яких завантаженнях таких фільтрів – піску, активованому вугіллі тощо – інтенсивно розвиваються мікроорганізми, утворюючи потужну біоплівку, яка сприяє очищенню води. Водночас дослідження останніх років свідчать про неабияку розмаїтість організмів, що створюють таку біоплівку, про присутній в ній вміст і не дуже бажаних мікробів [21].

Аби уникнути такого розвитку подій, було запропоновано не покладатися на спонтанне створення біоплівки з тих мікроорганізмів, які існують у воді, що очищається, а іммобілізувати на завантаженнях фільтрів епідемічно безпечні, корисні для здоров'я людини пробіотичні бактерії [14; 18].

У розвиток цієї ідеї ми іммобілізували на завантаженнях фільтрів для води саме пробіотичних бактерій, які до того ж здатні здійснювати процес денітрифікації – відновлення нітратів до молекулярного Нітрогену з використанням етилового спирту як джерела електронів, енергії та вуглецю.



Використовували ретельно перевірених штамів бактерій, які входять до складу медичних препаратів і продаються в аптечній мережі.

Завантажені носіями з іммобілізованими на них пробіотичними бактеріями лабораторні колонки-фільтри довелося спочатку промити протягом двох діб в режимі «повільного» фільтрування для остаточного їх «дозрівання» і запобігання вимиванню з них надлишкової кількості пробіотичних бактерій. Подальше пропускання води з підвищеним у декілька разів порівняно з гранично допустимою концентрацією ( $45 \text{ мг/дм}^3$ ) вмістом нітратів ( $300 - 500 \text{ мг KNO}_3$  в  $1 \text{ дм}^3$  води) та етанолу ( $0,5 - 0,7 \text{ см}^3$  в одному  $\text{дм}^3$  води) зі швидкістю  $0,1 \text{ м/год}$  приводило до стабільного зниження концентрації нітратів до рівня менше  $2,5 \text{ мг/дм}^3$  (за методом трьоххвильової фотометрії в ультрафіолеті) і до їх відсутності (за паперовим нітрат-тестом).

Мікробіологічний аналіз очищеної води показав наявність бактерій (за культуральними ознаками та мікроскопією – практично тільки використовуваних пробіотиків) у кількостях  $30-70$  колонієутворювальних одиниць в  $1 \text{ см}^3$  води.

Однак згодом з'ясувалося, що газ, який утворюється в результаті денітрифікації безпосередньо в місцях, де знаходяться іммобілізовані бактерії, тобто в тілі фільтра, своєрідно колюматує завантаження, утруднює проходження води крізь піщані та вугільні фільтри. Збільшення гідростатичного тиску води, що подавалася на фільтрування, до  $2,5 \text{ м}$  не дало бажаних результатів. Перехід до колонок більшого діаметра ( $80 \text{ мм}$ ), періодичне обережне перемішування завантаження тонким металевим шпателем на деякий короткий час покращувало ситуацію, проте не вирішувало проблеми. Заповнення фільтра крупнозернистою (розміром  $3-5 \text{ мм}$ ) фракцією гранодіоритного піску з іммобілізованими на ньому пробіотичними культурами продовжило нормальну безперебійну роботу фільтра до  $10-12$  діб, а тоді доводилося перезаряджати фільтр. Потрібно також звернути увагу на те, що висота шару завантаження (піску, вугілля) фільтра в лабораторних умовах була у декілька разів меншою від шару класичного «англійського» фільтра ( $100 \text{ см}$ ). Подальші дослідження проводили з подачею води, що очищається, на фільтри знизу-вверх за допомогою перистальтичних насосів, підтримуючи швидкість фільтрування до  $0,1 \text{ м/год}$ . Концентрація нітратів у воді на виході з фільтра не перевищувала  $2,5 \text{ мг/дм}^3$ , число мікроорганізмів в  $1 \text{ см}^3$  рідко сягало  $100-110$ , рН зростало на  $0,2-0,5$  одиниць; ОВП знижувалося з  $-15... - 21 \text{ мВ}$  до  $-50... - 57 \text{ мВ}$ .

Використання волокнистих носіїв ВІА з іммобілізованими на них пробіотичними культурами в колонці з висотою шару  $100 \text{ см}$  не забезпечувало надійного утримування мікроорганізмів, їх кількість у воді на виході з колонки у декілька разів і навіть на порядки перевищувала норму, затверджену ДСТУ 7525:2014 «Вода питна. Вимоги та методи контролювання якості», і тому довелося пропускати воду після цього фільтра через додатковий фільтр з шаром піску завтовшки  $5 \text{ см}$  для відділення мікробних клітин від позбавленої нітратів води. Місячна і навіть тримісячна перерва у фільтруванні води через загрузку з пробіотичними культурами не спричинялася до втрати денітрифікувальної здатності іммобілізованих бактерій: вже через  $18-24$  год. після відновлення повільного фільтрування забрудненої нітратами води концентрація нітратів знижувалася до  $2 \text{ мг/дм}^3$  і нижче (рис. 1).



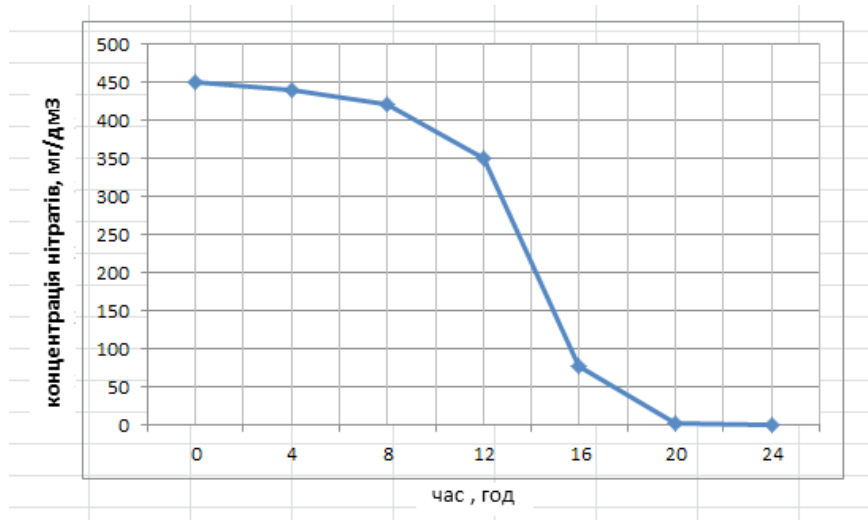


Рис. 1. Динаміка пробіотичної денітрифікації на піщаному фільтрі після тримісячної перерви

Fig. 1. Dynamics of probiotic denitrification in sand filter after a three-month break

Як показав хроматографічний аналіз, газ, що утворювався в результаті пробіотичної денітрифікації в періодичних умовах культивування мікроорганізмів в 5,5 дм<sup>3</sup> ПЕТ-пляшках, на 95–97% складається з N<sub>2</sub>; у ньому міститься незначна (0,1–0,3%) кількість CO<sub>2</sub>, іноді C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> – менше 1%, решта (2–3%) – H<sub>2</sub>O; відсутні – водень, метан, сірководень. У процесі такої періодичної (без протоку води з нітратами) денітрифікації рН води збільшується з початкових 6,2 до 8,6 і навіть 9,5 одиниць; окисно-відновний потенціал (ОВП) знижується з +50 mV до -80... -130 mV.

Таким чином, в результаті проведеної роботи показана можливість очищення питної води від небезпечного забруднення – нітратів – у надлишкових концентраціях за допомогою екологічно та гігієнічно безпечних, корисних для здоров'я людини пробіотичних бактерій.

*Автори висловлюють подяку к.т.н. Б.М. Борисову за надання гранодіоритного завантаження та громадській організації «МАМА-86» за паперові нітрат-тести, В.П. Демчиній за аналіз газів.*

**П.І. Гвоздяк, Е.В. Сапура**

Институт коллоидной химии и химии воды имени А.В. Думанского НАН Украины,  
бульв. Вернадского, 42, Киев, 03142, тел.: (044) 424 35 79,  
e-mail: gvozdyak@ukr.net

**ДЕНИТРИФИКАЦИЯ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ  
БАКТЕРИЙ**

**Реферат**

**Цель.** Изучение эффективности очистки питьевой воды от нитратов с помощью пробиотических бактерий *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, а также *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, которые входят в состав соответствующих медицинских препаратов. **Методы.** Микробиологические, химический, физико-химический, газовой-хроматографический, статистические. **Результаты.** Показано, что при медленном (0,1 м/час) фильтровании воды, содержащей 300–500 мг/дм<sup>3</sup> нитратов, через зернистые (песок, активированный уголь) и волокнистую (химическое волокно в виде носителя ВИЯ) загрузки с предварительно иммобилизованными на них пробиотическими бактериями концентрация нитратов уменьшается до уровня ниже 2,5 мг/дм<sup>3</sup>. Жизнедеятельность и денитрифицирующую способность микроорганизмов поддерживали добавкой к исследуемой воде этилового спирта в количестве 0,1 см<sup>3</sup> на каждые 100 мг KNO<sub>3</sub>. Образующийся в результате денитрификации газ состоял на 95–97% из N<sub>2</sub>, 0,1–0,3% – CO<sub>2</sub>, иногда C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (<1%), остальные (2–3%) – H<sub>2</sub>O и не содержал H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S. **Выводы.** Установлена возможность очистки питьевой воды от нитратов в избыточных концентрациях с помощью пробиотических бактерий.

*Ключевые слова:* питьевая вода, нитраты, пробиотические микроорганизмы, пробиотическая денитрификация.

**P.I. Gvozdyak, O.V. Sapura**

A. V. Dumansky Institute of Colloid Chemistry and Chemistry of Water  
National Academy of Sciences of Ukraine, 42, Vernadsky Boulev., Kyiv, 03142,  
tel. : +38 (044) 424 35 79, e-mail: gvozdyak@ukr.net

**DENITRIFICATION OF DRINKING WATER BY USING  
PROBIOTIC BACTERIA**

**Summary**

**Aim.** The study of the efficiency for the drinking water purification from nitrates with the help of probiotic bacteria *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, as well as *Lactobacillus acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, being a part of the drug preparations. **Methods.** Microbiological, chemical, physicochemical, gas-chromatographic, statistical. **Results.** It is shown that the slow (0.1 m<sup>3</sup>h<sup>-1</sup>) filtration of water with contents 300–500 mg<sup>l</sup>-1 of nitrate through grains of sand and activated carbon or the chemical fiber under the pretext of carrier «ВИЯ» with immobilized probiotic bacteria on them led



to the reduction of the nitrate concentration below 2,5 mg\*l-1. Ethanol (0.1 ml to each 100 mg KNO<sub>3</sub>) was added to treated water to support the microbial growth. The denitrification gas consisted of 95–97% of N<sub>2</sub>, 0,1–0.3% – CO<sub>2</sub>, sometimes C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (<1%), and (2–3%) – H<sub>2</sub>O and did not contain H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S.

**Conclusions.** The possibility of potable water purification from nitrates in excess concentration with the help of probiotic bacteria is established.

*Key words:* drinking water; nitrates, probiotic microorganisms, probiotic denitrification.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гончарук В.В. SOS: Питьевая вода // Химия и технология воды. – 2010. – 32, № 5. – С. 463–512.
2. Bondarenko Y.G., Samotuga V.V., Papach V.V., Bilyk L.I. Medical-hygienic evolution of the impact of the nitrates of water of decentralized water delivery sources on the health status of the children of the early age. *Environment and Health*. – 2011. – № 4. – P. 23–25.
3. Archana, Sharma S.K., Sobti R.Ch. Nitrate Removal from Ground Water: A Review. *E-Journal of Chemistry*. – 2012. – 9(4). – P. 1667–1675.
4. Burow, K.R., Nolan, B.T., Rupert, M.G., Dubrovsky, N.M. Nitrate in groundwater of the United States. *Environmental Science and Technol.* – 2010. – 44 (13). – P. 4988–4997.
5. Коваль В.В., Наталочка В.О., Ткаченко С.К., Міненко О.В. Динаміка забруднення вод сільськогосподарського призначення нітратами в умовах Полтавської області // Вісник Полтавської державної аграрної академії . – 2011 . – № 2. – С. 32–36.
6. Mike S.M.J. The microbial nitrogen cycle. *Environ. Microbiol.* – 2008. – 10(11). – P. 2903–2909.
7. Cabello P., Roldán M. D., Moreno-Vivián C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*. –2004. – 150 (11). – P. 3527–3546.
8. Knowles R. Denitrification. *Microbiol. Rev.* – 1982. –46 (1). – P. 43–70.
9. Shoun H., Kim, D.H., Uchiyama, H., Sugiyama J. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Lett.* – 1992. – 73(3). – P. 277–281.
10. Kuenen J. G. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat. Rev. Microbiol.* – 2008. –6(4). – P. 320–326.
11. Хенце М., Армоз П., Ля-Кур-Янсен Й., Арван Э. Очистка сточных вод. Биологические и химические процессы. – М. Мир, – 2006. – 480 с.
12. Lu H., Chandran K., Stensel D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research*. – 2014. – 64. – P. 237–254.
13. Иванов В.Н., Уланов М.Н., Стабникова Е.В. Денитрификация питьевой воды клетками *Paracoccus denitrificans* в природной и искусственно сформированной биопленках // Химия и технология воды. – 2001. – 23, № 2. – С. 209–218.
14. Ширококов В.П., Янковський Д.С., Димент Г.С. Мікробна екологія людини з кольоровим атласом. [Навч. посібн.] Київ: ТОВ «Червона Рута-Турс». – 2009. – 312 с.



15. Патент № 30382 України, МПК В01 Д 24/00. Спосіб очищення води. Борисов Б.М., Гедзь В.С., Байранов В.В. Промислова власність– 2001. – Бюл. № 11.
16. Калиниченко И.Е., Демуцкая Л.Н. Определение нитратов в питьевой воде методом трехволновой фотометрии в ультрафиолете // Журнал аналитической химии. – 2004. – 59, № 3. – С. 240–244.
17. Хлопин Г.В. Курс общей гигиены. М. –Л. : Госиздат– 1930. – 556 с.
18. Патент № 98326 України, МПК С02F 3/34 (2006.01). Спосіб біологічного доочищення питної води. Гвоздяк П.І. // Промислова власність. – 2012. – Бюл. № 9.
19. Zhang Y, Angelidaki I. A new method for in situ nitrate removal from groundwater using submerged microbial desalination-denitrification cell (SMDDC) *Water Research*. – 2013. – 47, № 5. – P. 1827–1836.
20. В. В. Гончарук, Н.А. Клименко, Л.А. Савчина, Т.Л. Врубель, И.П. Козятник. Современные проблемы технологии подготовки питьевой воды // Химия и технология воды. – 2006. – 28, № 1. – С. 3–95.
21. Lautenschlager K., Hwang Ch., Ling F., Liu W.-T., Boon N., Koster O., Egli Th., Hammes F. Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. // *Water Res.* – 2014. – 62. – P. 40–52.

### References

- Goncharuk VV. SOS: Drinking water. *Journal of Water Chemistry and Technology (Khimiya i Tekhnologiya Vody)*. 2010; 32(5): 255-281.
- Bondarenko YG, Samotuga VV, Papach VV, Bilyk LI. Medical-hygienic evolution of the impact of the nitrates of water of decentralized water delivery sources on the health status of the children of the early age. *Environment and Health*. 2011; (4): 23-25.
- Archana, Sharma SK, Sobti RCh. Nitrate Removal from Ground Water: A Review. *E-Journal of Chemistry*. 2012; 9(4): 1667-1675.
- Burow KR, Nolan BT, Rupert MG, Dubrovsky NM. Nitrate in groundwater of the United States. *Environmental Science and Technol.* 2010; 44 (13): 4988–4997.
- Koval VV, Natalochka VA, Tkachenko SK, Minenko OV. Dynamics of water pollution by nitrates agricultural land in the Poltava region conditions. *Journal of Poltava State Agrarian Academy*. 2011; (2): 32–36.
- Mike SMJ. The microbial nitrogen cycle. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(11) : 2903–2909.
- Cabello P, Roldán MD, Moreno-Vivián C. Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*. 2004; 150 (11): 3527–3546.
- Knowles R. Denitrification. *Microbiol. Rev.* 1982; 46 (1): 43–70.
- Shoun H, Kim DH, Uchiyama H, Sugiyama J. Denitrification by fungi. *FEMS Microbiology Lett.* 1992; 73(3): 277–281.
- Kuenen JG. Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; 6(4): 320–326.





11. Henze M, Harremoës P, La Cour Jansen J, Arvin E. Wastewater treatment. Biological and Chemical Processes. Moscow "Mir", 2006; 480 p.
12. Lu H, Chandran K, Stensel D. Microbial ecology of denitrification in biological wastewater treatment. *Water Research*. 2014; ( 64): 237-254.
13. Ivanov VN, Ulanov MN, Stabnikova EV. Denitrification of drinking water by cells of *Paracoccus denitrificans* in natural and artificially formed biofilms. *Journal of Water Chemistry and Technology (Khimiya i Tekhnologiya Vody)*. 2001; 23(2) : 64-70.
14. Shyrobokov VP, Yankovsky DS, Dyment GS. Microbial ecology of man. Kyiv: LLC "Ruta Tours", 2009; 312p .
15. Patent of Ukraine, 30382. A method of water purification. *Borisov BM, Gedz VS, Bayranov VV*. Bull. N 11. 2001.
16. Kalynychenko IE, Demutskaya LN. Determination of nitrate in drinking water by three-wave ultraviolet photometry. *Journal of Analytical Chemistry*. 2004; 59( 3): 240-244.
17. Hlopin GV. The course of general hygiene. Gosizdat, Moscow-Leningrad. 1930; 556 p.
18. Patent of Ukraine, 98326. Method of biological purification of drinking water. *Gvozdyak PI* . Bull. N.9.2012 .
19. Zhang Y, Angelidaki I. A new method for *in situ* nitrate removal from groundwater using submerged microbial desalination-denitrification cell (SMDDC). *Water Research*. 2013; – 47( 5): 1827 –1836.
20. Goncharuk VV, Klimenko NA, Savchina LA, Vrubel TL, Kozyatnik IP. Water treatment and demineralization technology. Current issues in the technology of drinking water conditioning. *Journal of Water Chemistry and Technology (Khimiya i Tekhnologiya Vody)* .2006; 28(1): 2-94.
21. Lautenschlager K, Hwang Ch, Ling F, Liu W, Boon N, Koster O, Egli Th, Hammes F. Abundance and composition of indigenous bacterial communities in a multi-step biofiltration-based drinking water treatment plant. *Water Res*. 2014; ( 62): 40–52.

Стаття надійшла до редакції 16.05.2017 р.



УДК 579.674

**V.V. Bati, N.V. Boyko**

State High Educational Institution “Uzhhorod National University”, Faculty of Medicine,  
1, Narodna Sq., Uzhhorod, Transcarpathian region, Ukraine 88000,  
e-mail: viktoriiabati@gmail.com

## **MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF SAUERKRAUT IN THE PROCESS OF ITS FERMENTATION ACCORDING TO THE TRADITIONAL AND MODERNIZED TECHNOLOGIES**

***Aim.** The aim of this work is detection of the differences in the quantitative and qualitative content of the microorganisms involved in fermentation of traditional Ukrainian food – sauerkraut (cabbage) under various conditions of its production. **Methods.** Microbiological methods for the isolation (cultivation on selective chromogenic medium) and identification of isolated microorganisms: using the semi-automatic biochemical test systems and laser desorption technique (MALDI). **Results.** The changes in qualitative and quantitative composition of microorganisms in tested sauerkraut samples taken at different stages of fermentation process by the traditional local (original) recipe and produced by upgraded modern technology have been revealed. In particular, the strains of *Lactobacillus delbrueckii* were isolated from all tested samples of fermented product, while the strain of *L. casei* was isolated only from sauerkraut samples made according to the original recipe. In these same samples, as opposed to those that were manufactured by industrial technology, the number of isolated strains of enterococci was insignificant. **Conclusion.** The results obtained confirmed the significant differences in qualitative and quantitative content of isolated microorganisms isolated from tested sauerkraut samples depending of methodology of its fermentation. The important differences in the composition of microorganisms associations at the beginning and at the end of sauerkraut fermentation have also been detected and defined.*

*Key words:* traditional food, sauerkraut, original recipe, fermentation, microbial composition.

### **Introduction**

The biochemical changes connected to microorganisms' content that occur during fermentation, are an indicator of the final product quality. This was confirmed by our earlier analysis of chemical content of the main components therefore included in the national composition databases [1].

The study of food products of plant origin, and especially fermentation, is extremely important today, since they are the source of a variety of probiotic and prebiotic substances [2]. Isolated key beneficial microorganisms from fermented cabbage when made traditionally is of great interest and requires further examination



since it is important for sustainable obtaining a qualitative and safe product, and furthermore it might be useful as probiotic base (starter) in the manufacture of modern functional food for personalized implementation. The technological processing of food is crucial in ensuring and maintaining the ingredient's useful properties. Fermentation makes food more digestible, because during the fermentation process foods are not only enriched with biologically active compounds (BAC) but also with microorganisms that enter into the gastrointestinal tract (GIT) with the food [3]. Because local traditional recipes vary, fermentation of plant products also varies and this in turn encourages the production of valuably unique combinations of products. On the other hand, such preparation procedures ensure the availability of nutrients, vitamins, minerals and unique strains of microorganisms. It is proved that lactic acid, which is formed during fermentation, combined with live probiotic microorganisms inhibits the development of opportunistic microorganisms in the gut and normalizes the composition of intestinal microbiota [4, 5]. There is also some evidence of the anti-tumor properties of sauerkraut [6, 7].

Due to the health benefits provided, it is important to use traditional foods manufactured by the original technology in view of the available data of epigenetic studies that show of human microbiota's changes occurred via DNA methylation dependent of eating habits. Our preliminary research that first performed chemical analysis of a number of traditional and also fermented foods made according to the original recipes reported the data for the creation of the first national food composition database [2].

In this paper, we aim to demonstrate that qualitative and quantitative content of microorganisms of the fermented product is depending on the stage and define by fermentation technology.

### Materials and methods

*In vitro* and *in situ* microbiological assessment of the sauerkraut samples was conducted. For isolation and next cultivation of microorganisms – MRS Agar, Bifidobacterium Broth, URI select Agar, Perfringens Agar (OPSP), Orange Serum Agar (HiMedia, India), Dehydrated Culture Media Brilliance™ Candida Agar (formerly Oxoid Chromogenic Candida Agar (OCCA), USA) and nutrient media, Blood culture Medium had been used. Initial diagnosis of genera and species diagnosis of the microbial isolates was conducted using selective chromogenic media (CHROMagar™, USA).

The identification of bacterial species was carried out using substantiated methods; modified algorithms and semi-automatic biochemical test systems ENTERO-test 24 and ANAERO-test 23 (Erba Lachema, Brno, CZ). For confirming (specified) identification, mass spectrometry (MALDI) was used. All Lactobacillus strains isolated from sauerkraut' samples and other fermented traditional for Black Sea region countries' foods were tested for their sensitivity to antibiotics in order to identify their marker characteristics, and their antimicrobial and immunomodulatory properties was also studied [8].

Sauerkraut' samples were taken under a sampling protocol described elsewhere [2] and in accordance with national standard.

To compare microbial and organoleptic features of sauerkraut produced



by the original technology (v. Bedevlya, Tyachiv district) with similar fermented products the samples obtained from city supermarkets (“Dastor” and “Sil’po”) and homemade (Uzhhorod) were studied.

Pro- and anti-microbial properties of sauerkraut liquid soluble substance (juice) were determined at 24; 48; 72 hours. The juice of fermented cabbage was firstly passed through a filter for its sterilisation (with 44 µm pores (BD Falcon, USA)) and ability to grow of chosen bacterial strains the representatives of commensal, beneficial and detrimental microbial groups was studied in vitro and detected in counted of colony forming units (CFU/ml).

Among the selected for this study bacterial strains were isolated earlier clinical cultures: agents of nosocomial infections, opportunistic pathogens (*Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacea*) and pathogenic bacteria caused gastro-intestinal disorders (*Salmonella enterica* and *Shigella dysenteriae*), and also commensal gut microorganisms (*Escherichia coli* 058, *E. coli* (Schaedler), *Enterococcus faecalis* and *Morganella morganii*) as well as other beneficial microbiota representatives (*Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* 8130, *Bacillus subtilis* 090). All the strains are belonged to our Centre’ authors’ collection microbial cultures.

All experiments were performed in triplicate and data were processed using the software Origin 8.0.

### Results and Discussion

Traditional original technology of homemade sauerkraut (v. Bedevlya, Tyachiv district) is unique and historically documented, and therefore corresponds to the definition of “traditional food”. The specific conditions of its manufacture – in particular, are in using the “centenarian” oak barrels containing original microbial starters on its surface. The product is prepared by traditional technology by aging it for 4 days in a warm place (t=24-28 °C). After 5-6 days, cabbage is taken from the barrel, rearranged into a glass container with a lid to stop fermentation. Other methods of digestion differ primarily by using conventional removable tanks for fermentation.

In the first days of fermentation *Candida dubliniensis*, *C. famata*, *Enterococcus faecium*, *Cryptococcus humicola*, *Lactobacillus casei*, in amount of 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> CFU/ml, respectively had been detected and isolated. Thus, we can assume that these bacterial species were in the original microbial starting cultures that initiated the fermentation process. No significant changes in the microorganisms’ species had been observed, while their total amount increased on the 3<sup>rd</sup> day, and particularly for *E. faecium* up to 10<sup>8</sup> CFU/ml. On the 11<sup>th</sup> day two strains of *Candida* – *C. dubliniensis*, *C. famata* were isolated and *L. casei* had also been detected at 10<sup>7</sup> CFU/ml, while *C. humicola* was completely replaced by *Bifidobacterium dentium* –which were at 10<sup>8</sup> CFU/ml. According to the genetic sequencing this last mention here strain finally had been attributed to *L. plantarum* (by the similarity to *L. plantarum* JCM 1149 strain, RDP 1.000).

After the fermentation process all the other sauerkraut samples made by urban technology and obtained from supermarkets (“Silpo” and “Dastor”) were analyzed. No significant differences in the number of bifidobacteria (>10<sup>6</sup>) had been found. Lactobacilli strains belong to various species and distinguished by their source of isolation.



Namely, from supermarkets samples of sauerkraut the strains of *L. delbrueckii* were isolated in an amount of  $5 \times 10^6$  CFU/ml while from the samples made by urban technology the strains of *L. casei* was found to be at  $10^6$  CFU/ml. Enterococci were found only in supermarket samples at  $10^5$  CFU/ml. These data particularly have been reported earlier with the other results of the microbial content of other fermented products from Black Sea region countries within BaSeFood project [9, 10]. The obtained results are summed up in Table 1, indicating a significant difference in the species composition of microorganisms isolated from different samples of studied sauerkraut.

Table 1

**Microbial strains isolated from sauerkraut in the previous qualitative analysis**

|  |
|--|
| <p><b>Sauerkraut: isolated strains of microorganisms from all the tested samples</b><br/>                 Lactobacillaceae / <i>Lactobacillus</i> /<br/> <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>L. curvatus</i>, <i>L. paraplantarum</i>,<br/> <i>L. coryniformis</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i><br/>                 Leuconostocaceae / <i>Leuconostoc</i> /<br/> <i>Leuconostoc fallax</i>, <i>L. citreum</i>, <i>L. argentinum</i>, <i>L. mesenteroides</i><br/>                 Pediococcus<br/> <i>Pediococcus pentosaceus</i><br/>                 Clostridiaceae/<i>Clostridium</i> /<br/> <i>Clostridium buturicum</i><br/>                 Candida<br/> <i>Candida dubliniensis</i>, <i>C. famata</i></p> |
|--|

**Selected microbial species, changes, qualitative assay:**

| Sample, NO | Candida | Saccharomyces | Escherichia | Staphylococcus | Lactobacillus | Enterococcus | Proteus | Bacillus | Pseudomonas |
|------------|---------|---------------|-------------|----------------|---------------|--------------|---------|----------|-------------|
| 1          | +       | +             | +           | +              | +             | +            | +       | —        | ++          |
| 2          | +       | +             | +           | +              | —             | —            | +++     | —        | +++         |
| 3          | —       | —             | ++          | +++            | —             | +            | ++      | —        | ++          |
| 4          | ++      | +             | +           | +              | +             | —            | —       | —        | —           |
| 5          | +++     | +             | +           | —              | ++            | ++           | —       | —        | —           |
| 6          | +++     | +             | —           | —              | +++           | +            | —       | +        | —           |

Note: 1–3 – probes selected in supermarkets, 4 – sauerkraut of home-made fermentation, 5–6 – probes selected in v. Bedevlya (original traditional preparation recipe of sauerkraut, research in situ), + (++, +++) – means the presence of isolated microorganism and its relative allocation frequency, “—” – its absence in test samples.

Figure 1 shows the results of stage dependent microbiological assessment of sauerkraut (in dynamics) selected in v. Bedevlya (original traditional preparation recipe of sauerkraut, research *in situ*).

As seen in Figure 1, on the first day of assay the strains of *L. casei*, *C. humicola*, *E. faecium*, *C. famata*, *C. dubliniensis* within  $10^4$ – $10^5$  CFU/ml have been isolated. After the 3rd day the same species of microorganisms was allocated but in increased number – up to  $10^7$  –  $10^8$  CFU/ml. On the 11th day of study, we



have shown the reduction of *E. faecium* down to  $10^6$  CFU/ml, growth inhibition of *C. humicola*, and isolated in high amount ( $10^7$ – $10^8$  CFU/ml) *B. dentium*, when the number of *C. dubliniensis* and *C. famata* has not significantly changed. On the 20th day there were isolated mainly *L. delbrueckii* ( $10^7$  CFU/ml), *L. casei* ( $10^6$  CFU/ml) and *B. dentium* ( $10^7$ – $10^8$  CFU/ml).

We found also a significant difference in the composition of microbial associations at the beginning and at the end of fermentation.

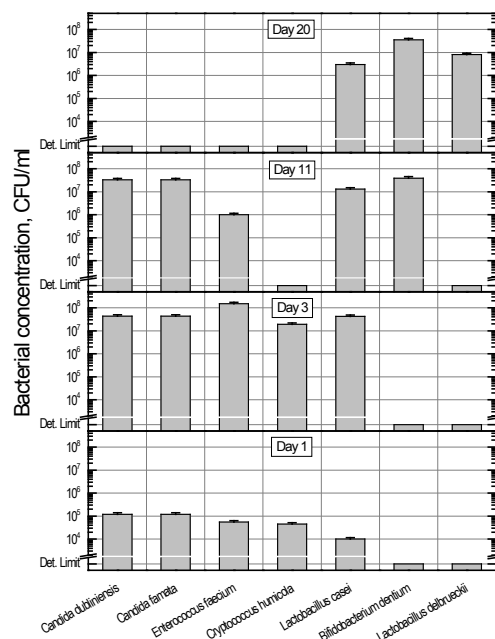


Fig. 1. Microorganisms isolated in situ in the village Bedevlya (Tyachiv district, Transcarpathian region) from fermented foods (homemade sauerkraut)

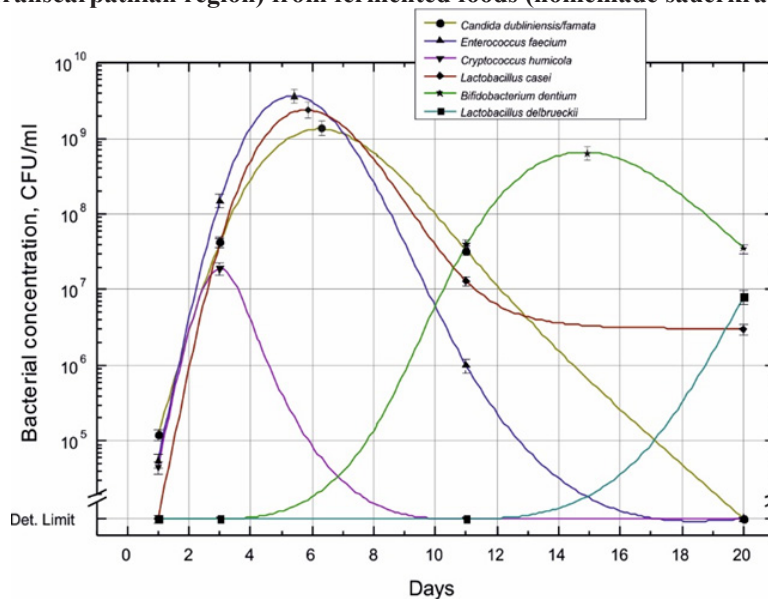


Fig. 2. Regularities of cultivation of microbial cultures' cocktail during fermentation of homemade sauerkraut obtained by traditional technology



Table 2

Results of organoleptic evaluation of studied samples

| Indicator   | Standard data   | Results of the studied samples of sauerkraut   |   |  |
|-------------|---|--|---|--|
|             |   | from supermarket   | local "home" cooking technology   | rural traditional homemade original technology   |
| Consistence | juicy, tight, crisp or moderately tight and crisp for second grade  | juicy, tight, moderately crisp   | juicy, tight, crisp   | juicy, tight, crisp  |
| Appearance  | cabbage evenly shredded, no wider than 5 mm, vegetable ingredients, spices are evenly distributed in the cabbage.   | Inherent to this type of product, meets the standard   | Inherent to this type of product, meets the standard  | Inherent to this type of product, meets the standard   |
| Taste       | sour-salty, pleasurable, without bitterness. For second grade more sharply expressed sour-salty taste   | sour-salty, pleasurable, without bitterness  | sour-salty, pleasurable, without bitterness   | sour-salty, pleasurable, without bitterness  |
| Smell       | aromatic, typical for sauerkraut. In the cabbage with herbs and spices clearly felt aroma of added spices. Juice has cabbage flavour  | aromatic, typical for sauerkraut, clearly felt aroma of added spices; juice has flavor of spices | aromatic, typical for sauerkraut, clearly felt aroma of added spices; juice has cabbage flavor. | aromatic, typical for sauerkraut, clearly felt aroma of added spices; juice has cabbage flavor |
| Color       | light straw with a yellowish tinge. In the cabbage with herbs and spices can be shades depending on the color of added condiments and spices. For second grade cabbage - light yellow with a greenish tinge | light yellow with a greenish tinge. Expressed shades of spices                                   | light straw with a yellowish tinge. Expressed shades of spices                                  | light straw with a yellowish tinge. Expressed shades of spices                                 |

Table 3

Results of co-cultivation of sauerkraut juice with tested microorganisms *in vitro* studies

| №  | Tested microorganisms, author's strains      | Number of microorganisms, CFU/ml |                           |                           |
|----|--|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
|    |  | 24 hours                         | 48 hours                  | 72 hours                  |
| 1  | <i>B. subtilis</i> 090                       | $(9\pm 0,4)\times 10^6$          | $(7\pm 0,1)\times 10^6$   | $(5,5\pm 0,3)\times 10^6$ |
| 2  | <i>B. subtilis</i> 8130                      | 107                              | $(5\pm 0,2)\times 10^7$   | $(9\pm 0,1)\times 10^8$   |
| 3  | <i>E. coli</i> (Schaedler)                   | $(5\pm 0,2)\times 10^7$          | 0                         | 0                         |
| 4  | <i>E. coli</i> 058                           | $(7\pm 0,3)\times 10^6$          | 0                         | 0                         |
| 5  | <i>S. enterica</i>                           | $(1,5\pm 0,1)\times 10^8$        | 106                       | 0                         |
| 6  | <i>S. dysenteriae</i>                        | 108                              | $(5\pm 0,3)\times 10^5$   | 0                         |
| 7  | <i>E. cloacae</i>                            | $(1,5\pm 0,2)\times 10^8$        | 106                       | 0                         |
| 8  | <i>S. aureus</i>                             | $(6\pm 0,3)\times 10^8$          | $(2\pm 0,1)\times 10^4$   | 0                         |
| 9  | <i>M. morgani</i>                            | 108                              | $(3\pm 0,2)\times 10^4$   | 0                         |
| 10 | <i>L. acidophilus</i>                        | $(1,2\pm 0,1)\times 10^7$        | $(3,5\pm 0,4)\times 10^8$ | $(4\pm 0,1)\times 10^8$   |
| 11 | <i>E. faecalis</i>                           | $(4\pm 0,3)\times 10^7$          | 103                       | 0                         |
| 12 | <i>B. dentium</i><br>( <i>L. plantarum</i> ) | $(5\pm 0,5)\times 10^7$          | 108                       | $(2\pm 0,1)\times 10^8$   |

Figure 2 shows the particularity and growing specificity of each single strain's characteristics in certain microbial co-cultures' cocktail via putting it into the general regularities of fermentation process. The strain of *E. faecium* was found in sufficient quantities on the 4<sup>th</sup> day, when the sauerkraut was ready for use. On the 11<sup>th</sup> day this strain was also isolated, but in smaller quantities. Opposing increasing functions were shown for strain *L. delbrueckii*, which was discovered only on the 20<sup>th</sup> day ( $10^7$  CFU/ml). All isolated cultures after a detailed study, detection of strain-specific markers and certification procedure were deposited in the Collection of Microbial Cultures of Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Science of Ukraine (IMV NASU) for further use in the preparation of traditional dishes of personalized application [11]. In comparison by organoleptic characteristics all the studied samples of sauerkraut meet the requirements of the national standard [12]. Comparison results shown in Table 2.

Earlier we reported of pro- and anti-microbial properties of isolated microorganisms [8] and content of biologically active compounds of sauerkraut produced by the original recipe [1]. Here we present the results of the studied effect of sauerkraut juice containing microbial starters' metabolites on tested microorganisms which belongs to various groups of microorganisms – commensal, beneficial, potentially pathogenic and detrimental bacterial strains (Table 3).

As it can be seen from Table 3, sauerkraut juice is characterized by antimicrobial activity concerning the commensal strains of microorganisms *E. coli* 058, *E. coli* (Schaedler), *E. faecalis* and *M. morgani* and also against the agents of human nosocomial – *S. aureus*, *E. cloacae* and gastro-intestinal – *S. enterica* and *S. dysenteriae* infections. At the same time, we have observed the neutral influence of the sauerkraut juice on spore forming bacteria and its stimulating effect on strains *L. acidophilus* and *B. dentinum* (*L. plantarum*).





### Conclusions

As a result of performed in dynamics microbiological study of Ukrainian fermented product (sauerkraut), produced according to the traditional recipe, original strains of microorganisms that initiate and trigger fermentation process, namely *C. dubliniensis*, *C. famata*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *E. faecium*, *C. humicola*, *B. dentium* (*L. plantarum*) have been isolated and identified.

The key microorganisms defying and ensuring the quality of fermented cabbage as one of the prioritized national foods have been also revealed.

The differences in species and quantitative composition of microorganisms in the beginning, during and at the end of fermentation in dependence of manufacturing technology of the product have been carefully monitored, detected and interpreted.

By microbiological and organoleptic indexes all the studied sauerkraut samples made by different technologies, in general corresponded the general requirements for products of this type, but differed significantly in quality, consistency, smell and odor.

The best studied food product was sauerkraut made by the original traditional technology (Bedevlya village, Tyachiv district). We have studied pro- and antimicrobial properties of sauerkraut juice, showed its ability in vitro to inhibit growth of commensal (*E. coli* 058, *E. coli* (Schaedler), *E. faecalis*, *M. morgani*), potentially pathogenic (*S. aureus*, *E. cloacae*), and pathogenic microorganisms (*S. enterica*, *S. dysenteriae*) and stimulate the growth of lactobacilli (*L. acidophilus*, *B. dentinum* (*L. plantarum*)) while not exerting any detectable effect on spore forming aerobic bacteria (*B. subtilis*, strains 090 and 8130).

Isolated from fermented in local conditions by original traditional recipe sauerkraut key beneficial microorganisms are in high interest for its further examination and next application for the sustainable obtaining a qualitative and safe product(s), and on the other hand for their potential usage as probiotic strains (starters) in the manufacture of modern functional food of personalized implementation. Isolated Lactobacillus strains are deposited in the Depository of microbial cultures of IMV NASU for further use in the preparation of traditional dishes of personalized application.

**В.В. Баті, Н.В. Бойко**

Державний вищий навчальний заклад «Ужгородський національний університет»,  
медичний факультет, пл. Народна, 1, Ужгород, Закарпатська область, Україна 88000,  
e-mail: viktoriiabati@gmail.com

## МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ КВАШЕНОЇ КАПУСТИ ПРИ ФЕРМЕНТАЦІЇ ЗА ТРАДИЦІЙНОЮ ТА МОДЕРНІЗОВАНОЮ ТЕХНОЛОГІЯМИ

### Реферат

**Мета.** Метою даної роботи є дослідження відмінностей у кількісному і якісному складі мікроорганізмів, що беруть участь у процесі ферментації української традиційної страви – квашеної капусти за різних умов її виготовлення. **Методи.** Мікробіологічні методи досліджень для виділення



(культивування на селекційних хромогенних середовищах) та ідентифікації ізольованих мікроорганізмів з використанням напіваавтоматичних біохімічних тест-систем і методу лазерної десорбції (MALDI). **Результати.** Встановлено зміни мікробіологічного складу зразків капусти квашеної, відібраних на різних стадіях бродіння в процесі її ферментації за традиційною локальною і модернізованою сучасною технологіями. Зокрема штами *Lactobacillus delbrueckii* були ізольовані з усіх протестованих зразків ферментованого продукту, тоді як штам *L. casei* виділяли лише із зразку квашеної капусти, виготовленої за оригінальною рецептурою. У цих же збірках на противагу тим, які були виготовлені за промисловою технологією, кількість ізольованих штамів ентерококів була незначною. **Висновки.** Отримані результати свідчать про суттєві відмінності у якісному і кількісному складі ізольованих мікроорганізмів у досліджених збірках в залежності від методології бродіння квашеної капусти. Встановлено наявність істотної різниці у складі асоціації мікроорганізмів на початку і в кінці бродіння квашеної капусти.

*Ключові слова:* традиційні страви, квашена капуста, оригінальна рецептура, процес ферментації, мікробний склад.

### В.В. Бати, Н.В. Бойко

Государственное высшее учебное заведение «Ужгородский национальный университет», медицинский факультет, пл. Народная, 1, Ужгород, Закарпатская область, Украина 88000, e-mail: viktoriiabati@gmail.com

## МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КВАШЕНОЙ КАПУСТЫ, ИЗГОТОВЛЕННОЙ СОГЛАСНО ТРАДИЦИОННОЙ И МОДЕРНИЗИРОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ БРОЖЕНИЯ

### Реферат

**Цель.** Целью данной работы является тщательное исследование различий в количественном и качественном составе микроорганизмов, принимающих участие в процессе ферментации украинского традиционного блюда – квашеной капусты (белокочанной) при различных условиях ее изготовления. **Методы.** Микробиологические методы исследований для выделения (культивирования на селекционных хромогенных средах) и идентификации изолированных микроорганизмов: с использованием полуавтоматических биохимических тест-систем и метода лазерной десорбции (MALDI). **Результаты.** Определены изменения микробиологического состава образцов квашеной капусты, отобранных на различных стадиях брожения в процессе ее ферментации по традиционной локальной (оригинальной) рецептуре и изготовленной по модернизированной современной технологии. В частности штаммы *Lactobacillus delbrueckii* были изолированы из всех протестированных образцов ферментированного продукта, тогда как штамм *L. casei* выделяли только с образца квашеной капусты, изготовленной по оригинальной рецептуре. В этих же образцах в противовес тем, которые были изготовлены по промышленной технологии, количество изолированных штаммов энтерококков было незначительным. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о существенных различиях в качественном и количественном составе изолированных микроорганизмов в исследованных



образцах в зависимости от методологии брожения квашеной капусты. Показано наличие существенной разницы в составе ассоциаций микроорганизмов в начале и в конце брожения квашеной капусты.

Ключевые слова: традиционные блюда, квашеная капуста, оригинальная рецептура, процесс ферментации, микробный состав.

## References

1. Costa H., Albuquerque T., Sanches-Silva A., Vasilopoulou E., Trichopoulou A., D'Antuono F., Alexieva I., Costea C., Fedosov S., Hayran O., Karpenko D., Kilasonia Z., Finglas P. New nutritional composition data on selected traditional foods consumed in Black Sea Area countries // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2013. – Vol. 93. – P. 3524–3534.
2. Boyko N., Petrov V., Bati V., Levchuk O., Jorjadze M., Sapundzhieva T., Alexieva I., Hayran O., Beteva E., C. Costea, Kaprelyants L., Danesi F., Kroon P., Finglas P., Costa H., D'Antuono F. Traditional Foods of Black Sea Region countries as potential sources of prebiotic compounds and probiotic microorganisms // *International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics*. – Kosice, Slovakia, 2012. — p. 16–17.
3. Plengvidhya V., Breidt Jr. F., Zhongjing Lu, Fleming H. P. DNA Fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – 73, № 23. – P. 7697–7702.
4. Hang D.Y., Hui Y.H., Ghazala S., Graham D.M., Murrell K.D., Nip W.K. Western fermented vegetables: sauerkraut // In: *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*, – Marcel Dekker, 2003. – P. 223–230.
5. Johanningsmeier, S., Fleming, H., Breidt, R. Malolactic activity of lactic acid bacteria during sauerkraut fermentation. // *Journal of Food Science*. – 2004 – 69, №8. – P. 222–227.
6. John P. T. Sauerkraut: anti-cancer fermented food that restores gut flora / *Health Impact News*. – 2016. – Available at: <http://healthimpactnews.com/2014/sauerkraut-anti-cancer-fermented-food-that-restores-gut-flora/>.
7. Patton D. Sauerkraut consumption may fight off breast cancer // *Nutra ingredients*. – 2005. – Available at: <http://www.nutraingredients.com/Research/Sauerkraut-consumption-may-fight-off-breast-cancer>.
8. Бати В. В., Бойко Н. В. Біологічні властивості штамів лактобактерій виділених із продуктів харчування рослинного походження та їстівних рослин // *Жур. "ScienceRise: Biological Science"*. – 2016. – 25, 8/1. – С. 6–14.
9. Bati V.V., Boyko N.V. The microbial diversity and its dynamics in the ethnic fermented foods of the Black sea region // *Microbiological journal*. – 2016. – Т. 78, № 5. – С. 53–64.
10. Project ID: 227118, BASEFOOD: Sustainable exploitation of bioactive components from the Black Sea Area traditional foods. – Available at: [http://cordis.europa.eu/project/rcn/90979\\_en.html](http://cordis.europa.eu/project/rcn/90979_en.html).
11. Bati V., Meleshko T., Levchuk O., Boyko N. Healthy ethical food as evidence basis for the preventive personalized nutrition // 2<sup>nd</sup> International Conference “Personalized Medicine & Global Health”. – Astana, Republic of Kazakhstan, 2015. – P. 83–84.



12. ISO 3858-73. Sauerkraut. Technical conditions. – Available at: <http://www.proagro.com.ua/reference/standard/veget/8946.html>.

### References (2)

1. Costa H, Albuquerque T, Sanches-Silva A, Vasilopoulou E, Trichopoulou A, D'Antuono F, Alexieva I, Costea C, Fedosov S, Hayran O, Karpenko D, Kilasonia Z, Finglas P. New nutritional composition data on selected traditional foods consumed in Black Sea Area countries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013; 93: 3524–3534.
2. Boyko N, Petrov V, Bati V, Levchuk O, Jorjadze M, Sapundzhieva T, Alexieva I, Hayran O, Beteva E, Costea C, Kaprelyants L, Danesi F, Kroon P, Finglas P, Costa H, D'Antuono F. Traditional Foods of Black Sea Region countries as potential sources of prebiotic compounds and probiotic microorganisms. In: *Proceedings of the International Scientific Conference on “Probiotics and Prebiotics”*. Ed. Kosice, Slovakia: Pamida International LTD, 2012: 16-17.
3. Plengvidhya V, Breidt J, Zhongjing L, Fleming H. DNA Fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(23): 7697–7702.
4. Hang D, Hui Yu, Ghazala S, Graham D, Murrell K, Nip W (Eds.). Western fermented vegetables: sauerkraut. In: *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*: Marcel Dekker, 2003: 223 – 230.
5. Johanningsmeier S, Fleming H, Breidt R. Malolactic activity of lactic acid bacteria during sauerkraut fermentation. *Journal of Food Science*. 2004; 69(8):222–227.
6. John PT. Sauerkraut: anti-cancer fermented food that restores gut flora. *Health Impact News*. 2016: available at: <http://healthimpactnews.com/2014/sauerkraut-anti-cancer-fermented-food-that-restores-gut-flora/>.
7. Patton D. Sauerkraut consumption may fight off breast cancer. *Nutra ingredients*. 2005: available at: <http://www.nutraingredients.com/Research/Sauerkraut-consumption-may-fight-off-breast-cancer>.
8. Bati VV, Boyko NV. The biological properties of lactobacilli strains isolated from food of plant origin and edible plants. *Journal “ScienceRise: Biological Science”*. 2016; 5 (8/1): 6-14.
9. Bati VV, Boyko NV. The microbial diversity and its dynamics in the ethnic fermented foods of the Black sea region. *Microbiol. journal*. 2016; 78(5): 53 – 64.
10. Project ID: 227118, BASEFOOD: Sustainable exploitation of bioactive components from the Black Sea Area traditional foods. Available at: [http://cordis.europa.eu/project/rcn/90979\\_en.html](http://cordis.europa.eu/project/rcn/90979_en.html).
11. Bati VV, Meleshko TV, Levchuk OB, Boyko NV. Healthy ethical food as evidence basis for the preventive personalized. 2<sup>nd</sup> International Conference “Personalized Medicine & Global Health”. Astana, Republic of Kazakhstan, 2015: 83-84.
12. ISO 3858-73. Sauerkraut. Technical conditions. Available at: <http://www.proagro.com.ua/reference/standard/veget/8946.html>.

Стаття надійшла до редакції 17.05.2017 р.



**Ю.М. Похилько, Н.О. Кравченко**

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва  
НААН, вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна,  
тел.: +38 (046) 223 17 49, e-mail: pohilko.yura@gmail.com

## СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS* ДО МЕТАБОЛІТІВ ТРАВНОЇ СИСТЕМИ

**Мета.** Метою даної роботи було визначити вплив рН метаболітів травної системи на активність росту молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів. **Методи.** У роботі використано 11 штамів молочнокислих бактерій, виділених з шлунково-кишкового тракту кролів. Стійкість бактерій до метаболітів травної системи визначали шляхом їх культивування в середовищі MRS з жовчю, гідроген хлоридом, натрій хлоридом, фенолом. **Результати.** Встановлено, що досліджувані штами виживали при рН середовища 4,0–9,0. Всі штами мали високу стійкість до концентрації жовчі (20, 40%), гідроген хлориду (3%), натрій хлориду (5%), фенолу (0,5%), кількість життєздатних клітин – 103–105 КУО/мл після 48 год культивування. **Висновки.** Встановлено, що досліджувані штами лактобацил були стійкими до високих концентрацій жовчі та фенолу, 70% – до низьких значень рН, 50% – до натрій хлориду, 20% – до гідроген хлориду.

*Ключові слова:* молочнокислі бактерії, стійкість, гідроген хлорид, жовч, натрій хлорид, фенол.

На сьогоднішній день з метою корекції балансу кишкової мікробіоти організму людини та тварин широко застосовують препарати, що отримали назву «пробіотики». Під даним терміном об'єднують біологічно активні добавки, що містять життєздатні бактерії та їх метаболіти, що проявляють антагоністичну активність до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів [1].

У ветеринарній медицині пробіотичні препарати використовують для мікробної корекції кишківника після антибіотико- та хіміотерапії, для стимулювання неспецифічного імунітету, профілактики та лікування шлунково-кишкових інфекцій тварин [2].

При селекції мікроорганізмів для створення пробіотичних препаратів основну увагу приділяють їх антагонічній активності. Однак на практиці далеко не всі пробіотичні препарати виявляють заявлений результат. Причини недостатньої ефективності пробіотичних мікроорганізмів, що входять до складу більшості препаратів, є їх слабка стійкість до впливу травних соків та жовчі, як наслідок, нестабільність прояву пробіотичної дії [3].

Тому створення нових ефективних пробіотиків на основі цілеспрямовано відібраних штамів пробіотичних мікроорганізмів, стійких до метаболітів травної системи організму-господаря є актуальним завданням.



Пробіотики, які сьогодні застосовуються для усунення проблем шлунково-кишкового тракту кролів є універсальними та рекомендуються для різних видів тварин, в тому числі і для кролів.

Проте, враховуючи особливості системи травлення кролів, будь-яке порушення в роботі якої може бути небезпечним не тільки для здоров'я, але і для їх життя в цілому, актуальним постає питання створення пробіотичного препарату на основі біологічно активних представників нормобіоценозу шлунково-кишкового тракту саме цих тварин. Перспективною групою мікроорганізмів для створення пробіотичного препарату для кролів є бактерії роду *Lactobacillus*, які мають статус «GRAS», тобто їх використання є абсолютно безпечним. Також варто зазначити, що чисельність молочнокислих бактерій в шлунково-кишковому тракті кролів перевищує чисельність біфідобактерій [4], а отже їх функціональна роль більш значуща.

Відомо, що молочнокислі бактерії, а особливо лактобацили, стійкі до кислотної реакції середовища [5]. Промислові штами бактерій роду *Lactobacillus*, які використовуються для виготовлення пробіотичних препаратів, як правило можуть розвиватися на середовищах при значеннях рН 4 та нижче [5, 6]. За даними Кігель Н. Ф., скринінг 85 промислових штамів показав, що лише 29 % від їх загальної кількості витримували певний час у живильному середовищі з рН 9,6, 31% – резистентні до 4,5% NaCl, 65% – до 40% медичної жовчі та 70% – до рН 3 та 0,3% фенолу [7]. Однак, постає питання чи поширюється дана закономірність на МКБ, виділених з кішківника кролів. З метою оцінки придатності використання досліджуваних штамів у промисловості важливим є визначення стійкості досліджуваних штамів до метаболітів травної системи.

Метою даної роботи було визначити вплив рН метаболітів травної системи на активність росту молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів.

### Матеріали і методи

У роботі використано штами молочнокислих бактерій (МКБ): *L. lactis* 4/1, *L. casei* 5/4, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 16/3, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 31/2, *L. delbrueckii* 39/2, виділені зі шлунково-кишкового тракту кролів, селекціоновані та ідентифіковані в лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН [8]. Для порівняння отриманих результатів, використовували бактерії виду *L. acidophilus*, тому що пробіотичні препарати найчастіше мають в своєму складі бактерії даного виду [6, 7]. Штам молочнокислих бактерій *L. acidophilus* ССМ 4833, отриманий з депозитарію Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ.

З метою визначення граничних значень рН для росту МКБ, досліджували бактерії культивували на середовищі MRS [5] з 0,15% агару. Значення рН встановлювали 10% розчином оцтової кислоти (CH<sub>3</sub>COOH) та 10% розчином натрій гідроксиду (NaOH). В пробірки, що містили 9 мл напіврідкого середовища MRS з заданим значенням рН середовища від 2 до 11 або концентрацією NaCl (1–6%), HCl (1–4%), жовчі (20, 40%) та фенолу (0,5%), вносили один мілілітр суспензії бактерій, що містила 1×10<sup>6</sup> КУО/мл та культивували



за температури  $37 \pm 0,5$  °C упродовж 48 годин [5], у зв'язку з особливостями умов травлення кролів.

Кількість молочнокислих бактерій визначали методом граничних розведенень, висіваючи їх на щільне елективне середовище [5].

Загальну кількість бактерій розраховували за формулою:

$$X = Z \times 10^n / Y$$

Де  $X$  – кількість бактерій;

$Z$  – кількість колоній, що виростили;

$10^n$  – розведення;

$Y$  – посівна доза.

Статистичне опрацювання результатів експериментів проводили використовуючи програму Microsoft Excel 2013.

### Результати досліджень та їх обговорення

Результати наших досліджень показали, що стійкість до низьких рН є штамовспецифічною ознакою. Встановлено, що всі досліджувані штами молочнокислих бактерій не росли на середовищі MRS після 48 годин культивування при значенні  $\text{pH} \leq 3$  та  $\text{pH} \geq 10$  (табл. 1). Вісім досліджуваних штамів витримували рН 4,0 середовища упродовж 48 годин. Чисельність мікроорганізмів через дві доби культивування була в межах від  $10^3$  до  $10^9$  КУО/мл. За результатами експерименту визначено оптимальне для росту всіх досліджуваних культур МКБ значення рН 5–7. Встановлено, що 70% штамів МКБ виділених з кишківника кролів, були стійкими до низьких значень рН середовища. Висока стійкість до низьких значень рН (4–6) досліджуваних штамів, на нашу думку, цілком закономірна, адже джерело їх виділення кишківник кролів. Оскільки, ферментативна активність травного соку шлунку кролів є більшою, ніж у інших травоядних тварин, у зв'язку з підвищеною кислотністю. Загальна кислотність шлункового соку кролика у 2–2,5 рази більша ніж у інших тварин, а вміст вільної соляної кислоти – від 0,11 до 0,27%, що відповідає рН 4 середовища. Варто зазначити, що корм, який споживають кролі, може проходити декілька циклів травлення та знаходиться в шлунково-кишковому тракті дуже довго, у зв'язку з слабкою здатністю до перистальтики кишківника даних тварин.

Оскільки, натрій хлорид – речовина, що бере участь в утворенні соляної кислоти шлункового соку і постійно міститься в макроорганізмі, бактерії, що входять до складу пробіотичних препаратів, повинні бути резистентними до даного чиннику.

На думку деяких дослідників та науковців, стійкість МКБ до осмотичного тиску зумовлена здатністю даних бактерій накопичувати бетаїн, який не метаболізується [6, 9]. Відомо, що промислові штами МКБ здатні рости в середовищі, що містить 1 М розчину натрій ацетату, калій хлориду або натрій хлориду, а деякі толерантні до 1,8 М NaCl.

Нами встановлено, що при внесенні до живильного середовища до 3% NaCl, ріст досліджуваних штамів суттєво не знижувався, титр становив  $10^8$ – $10^9$  КУО/мл після 48 год культивування. Зі збільшенням концентрації солі до 4–5% менш стійкими виявилися штами: *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3,



*L. delbrueckii* 39/2, *L. acidophilus* 49/1 та штам *L. acidophilus* ССМ 4833. Решта штамів були резистентними та продовжували рости, титр бактерій становив  $10^6$  КУО/мл при концентрації 5% NaCl. Збільшення масової частки NaCl до 6% у живильному середовищі призвело до повного пригнічення росту мікроорганізмів. Стійкість МКБ, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, до NaCl наведена в таблиці 2, з якої видно, що 50% штамів виявилися стійкими.

Відомо, що HCl є серйозною перешкодою для проникнення мікроорганізмів до товстого відділу кишечника макроорганізму [6]. Однак, деякі МКБ, особливо ізольовані з більш кислих середовищ, успішно долають несприятливі умови і заселяються в товстому відділі кишечника. Як зазначалося вище у здорових кролів шлунок має вищу кислотність, порівняно з людиною та іншими тваринами, а тому даний показник є вагомим при створенні пробіотичного препарату для цих тварин.

З'ясовано, що після 48 годин інкубації на середовищі MRS з 1% HCl найбільш стійкими виявилися досліджувані штами *L. lactis* 4/1 та *L. helveticus* 13/2, титр цих культур становив  $10^8$  КУО /мл. Решта штамів були менш резистентними до гідроген хлориду (табл. 2). При культивуванні досліджуваних штамів МКБ на середовищі, що містило 3% HCl, чисельність бактерій значно знижувалася і становила  $10^3$ – $10^5$  КУО/мл після 48 год культивування, лише 20% штамів, виділених з кишечника кролів, були відносно стійкими.

Встановлено, що шість штамів, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів, проявили толерантність до HCl більшою мірою, порівняно з типовим штамом молочнокислих бактерій *L. acidophilus* ССМ 4833. Варто зазначити, що повне пригнічення досліджуваних бактерій спостерігалось при внесенні в живильне середовище 4% соляної кислоти.

Стійкість до жовчі травної системи є необхідною умовою для колонізації та метаболічної активності бактерій у кишечнику господаря, оскільки відомо, що клітинні мембрани мікроорганізмів є дуже чутливими до жовчних кислот [10]. Ця ознака забезпечує досягнення МКБ тонкого та товстого відділу кишечника та підтримку нормобалансу його мікробіоти. Як відомо, МКБ впливають на засвоєння холестерину макроорганізмом, за рахунок жовчно-сольового обміну цих бактерій [11]. Механізми, за допомогою яких пробіотичні бактерії здатні витримати стрес, спричинений жовчними солями залишаються нез'ясованими, однак на думку деяких дослідників стійкість ґрунтується на гідролізі жовчних солей [12]. Як правило, вона зумовлена трьома основними механізмами: а) секвеструванням солей і жовчних кислот; б) декон'югацією жовчних кислот; в) біотрансформацією (тобто епімеризацією, дегідруванням і дегідроксилуванням) солей жовчних кислот.

За рахунок цих механізмів, штами бактерій роду *Lactobacillus*, які використовуються в промисловості є стійкими до високих концентрацій жовчі та ростуть при значних її концентраціях (інколи > 40%) [12].

В зв'язку з цим, наступним етапом наших досліджень було встановлення стійкості штамів МКБ до жовчі. Після 48 годин інкубації шести досліджуваних штамів: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 16/3, *L. acidophilus* 31/2, *L. acidophilus* 49/1, *L. acidophilus* ССМ 4833 на середовищі MRS з 20% жовчі, було виявлено, що їх титри суттєво не відрізнялися, порівняно з контрольними.





Таблиця 1

Вплив рН середовища на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Table 1

Effect of pH media on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml (M±m, n=3)

| Штам                           | pH 4                          | pH 5                          | pH 6                          | pH 7                          | pH 8                          | pH 9                          |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i> CCM 4833 | $(3,2 \pm 0,24) \times 10^3$  | $(6,25 \pm 0,56) \times 10^8$ | $(4,4 \pm 0,65) \times 10^9$  | $(5,3 \pm 0,39) \times 10^8$  | $(4,7 \pm 0,43) \times 10^6$  | $(4,8 \pm 0,45) \times 10^3$  |
| <i>L. lactis</i> 4/1           | -                             | $(2,25 \pm 0,41) \times 10^7$ | $(5,3 \pm 0,39) \times 10^9$  | $(2,0 \pm 0,35) \times 10^8$  | $(4,4 \pm 0,65) \times 10^6$  | $(3,2 \pm 0,24) \times 10^4$  |
| <i>L. casei</i> 5/4            | -                             | $(1,4 \pm 0,16) \times 10^8$  | $(4,4 \pm 0,65) \times 10^9$  | $(6,25 \pm 0,56) \times 10^8$ | $(5,3 \pm 0,39) \times 10^5$  | $(2,95 \pm 0,29) \times 10^3$ |
| <i>L. helveticus</i> 13/2      | $(2,4 \pm 0,31) \times 10^3$  | $(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$ | $(4,4 \pm 0,23) \times 10^9$  | $(2,8 \pm 0,25) \times 10^7$  | $(2,6 \pm 0,12) \times 10^5$  | $(6,25 \pm 0,56) \times 10^3$ |
| <i>L. plantarum</i> 16/1       | -                             | $(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$ | $(5,3 \pm 0,39) \times 10^9$  | $(2,5 \pm 0,32) \times 10^8$  | $(4,8 \pm 0,74) \times 10^6$  | $(2,95 \pm 0,26) \times 10^3$ |
| <i>L. plantarum</i> 16/3       | $(4,4 \pm 0,35) \times 10^3$  | $(2,05 \pm 0,08) \times 10^8$ | $(2,0 \pm 0,35) \times 10^9$  | $(3,36 \pm 0,20) \times 10^8$ | $(2,25 \pm 0,41) \times 10^5$ | $(5,4 \pm 0,43) \times 10^3$  |
| <i>L. plantarum</i> 17/2       | $(2,25 \pm 0,41) \times 10^3$ | $(2,5 \pm 0,30) \times 10^8$  | $(1,8 \pm 0,27) \times 10^9$  | $(2,6 \pm 0,12) \times 10^8$  | $(3,2 \pm 0,24) \times 10^6$  | $(3,30 \pm 0,34) \times 10^3$ |
| <i>L. plantarum</i> 17/3       | $(3,45 \pm 0,31) \times 10^3$ | $(6,5 \pm 0,58) \times 10^7$  | $(8,4 \pm 0,67) \times 10^9$  | $(2,95 \pm 0,29) \times 10^8$ | $(6,25 \pm 0,56) \times 10^5$ | $(3,15 \pm 0,27) \times 10^3$ |
| <i>L. acidophilus</i> 31/2     | $(5,8 \pm 0,55) \times 10^3$  | $(3,4 \pm 0,3) \times 10^7$   | $(9,4 \pm 0,85) \times 10^9$  | $(5,4 \pm 0,39) \times 10^8$  | $(4,05 \pm 0,38) \times 10^6$ | $(4,8 \pm 0,45) \times 10^3$  |
| <i>L. delbrueckii</i> 39/2     | $(4,8 \pm 0,74) \times 10^3$  | $(4,7 \pm 0,43) \times 10^6$  | $(2,95 \pm 0,28) \times 10^8$ | $(1,9 \pm 0,36) \times 10^7$  | $(2,95 \pm 0,29) \times 10^4$ | $(7,4 \pm 0,23) \times 10^3$  |
| <i>L. acidophilus</i> 49/1     | $(2,5 \pm 0,32) \times 10^3$  | $(3,36 \pm 0,20) \times 10^6$ | $(2,25 \pm 0,41) \times 10^8$ | $(5,4 \pm 0,27) \times 10^7$  | $(2,4 \pm 0,31) \times 10^4$  | $(4,4 \pm 0,65) \times 10^3$  |

Примітка: у цій таблиці «-» – відсутність життєздатних клітин.

Note: in this table «-» – lack of viable cells.

Таблиця 2

Вплив NaCl на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл (M±m, n=3)

Table 2

Effect of NaCl on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml (M±m, n=3)

| Штами                          | Контроль (без NaCl)         | Масова частка NaCl            |                                 |                                |                                |                                |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                                |                             | 1%                            | 2%                              | 3%                             | 4%                             | 5%                             |
| <i>L. acidophilus</i> ССМ 4833 | (6,9±0,21)×10 <sup>9</sup>  | (5,8±0,21)×10 <sup>9</sup>    | (2,25±0,36)×10 <sup>9</sup>     | (1,35±0,24)×10 <sup>8</sup>    | (4,15±0,36)×10 <sup>6</sup>    | (2,2±0,31)×10 <sup>4</sup>     |
| <i>L. lactis</i> 4/1           | (8,2±0,88)×10 <sup>9</sup>  | (3±1,1)×10 <sup>9</sup>       | (0,94±0,043)×10 <sup>9***</sup> | (4,85±0,33)×10 <sup>8</sup>    | (9,79±0,51)×10 <sup>7</sup>    | (1,75±0,36)×10 <sup>6**</sup>  |
| <i>L. casei</i> 5/4            | (9,2±0,52)×10 <sup>8</sup>  | (1,3±0,14)×10 <sup>8*</sup>   | (2,7±0,127)×10 <sup>8**</sup>   | (9,2±0,52)×10 <sup>8***</sup>  | (1,9±0,36)×10 <sup>7**</sup>   | (7,4±0,23)×10 <sup>6</sup>     |
| <i>L. helveticus</i> 13/2      | (7,4±0,35)×10 <sup>9</sup>  | (7,4±0,23)×10 <sup>9*</sup>   | (8,4±0,23)×10 <sup>9*</sup>     | (5,3±0,39)×10 <sup>9</sup>     | (4,35±0,40)×10 <sup>8**</sup>  | (3,2±0,24)×10 <sup>6**</sup>   |
| <i>L. plantarum</i> 16/1       | (8,95±0,41)×10 <sup>9</sup> | (8,1±0,20)×10 <sup>9*</sup>   | (6,18±1,88)×10 <sup>9</sup>     | (4,8±0,74)×10 <sup>8**</sup>   | (2,45±1,3)×10 <sup>7</sup>     | (2,5±0,32)×10 <sup>6</sup>     |
| <i>L. plantarum</i> 16/3       | (7,35±0,41)×10 <sup>9</sup> | (3,5±0,17)×10 <sup>8**</sup>  | (3,15±0,27)×10 <sup>8***</sup>  | (2,95±0,29)×10 <sup>8</sup>    | (4,7±0,43)×10 <sup>7</sup>     | (2,25±0,41)×10 <sup>6</sup>    |
| <i>L. plantarum</i> 17/2       | (8,75±0,61)×10 <sup>9</sup> | (3,36±0,20)×10 <sup>9</sup>   | (2,0±0,35)×10 <sup>9</sup>      | (5,3±0,39)×10 <sup>8**</sup>   | (2,35±0,22)×10 <sup>6**</sup>  | (7,3±0,52)×10 <sup>4**</sup>   |
| <i>L. plantarum</i> 17/3       | (9,05±0,31)×10 <sup>9</sup> | (8,3±0,27)×10 <sup>9**</sup>  | (4,7±0,43)×10 <sup>9</sup>      | (1,35±0,24)×10 <sup>8</sup>    | (5,1±0,46)×10 <sup>6***</sup>  | (4,70±0,42)×10 <sup>4***</sup> |
| <i>L. acidophilus</i> 31/2     | (8,35±0,2)×10 <sup>9</sup>  | (6,9±0,2)×10 <sup>9**</sup>   | (2,35±0,22)×10 <sup>9**</sup>   | (4,05±0,38)×10 <sup>9**</sup>  | (4,70±0,42)×10 <sup>8***</sup> | (3,8±1,2)×10 <sup>6</sup>      |
| <i>L. delbrueckii</i> 39/2     | (8,0±0,17)×10 <sup>9</sup>  | (2,6±0,12)×10 <sup>9*</sup>   | (4,95±0,41)×10 <sup>9**</sup>   | (3,30±0,34)×10 <sup>8**</sup>  | (3±1,1)×10 <sup>6</sup>        | (4,4±0,65)×10 <sup>4**</sup>   |
| <i>L. acidophilus</i> 49/1     | (6,75±0,31)×10 <sup>9</sup> | (4,1±0,17)×10 <sup>9***</sup> | (4,8±0,45)×10 <sup>9***</sup>   | (8,35±0,68)×10 <sup>8***</sup> | (6,25±0,56)×10 <sup>7*</sup>   | (4,8±0,74)×10 <sup>4</sup>     |

Примітка: у цій таблиці \* – p&lt;0,05–0,02; \*\* – p&lt;0,01; \*\*\* – p&lt;0,001.

Note: in this table \* – p&lt;0,05–0,02; \*\* – p&lt;0,01; \*\*\* – p&lt;0,001.



Таблиця 3

Вплив HCl на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

Table 3

Effect of HCl on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

| Штам                           | Контроль (без HCl)            | Масова частка HCl                 |                                   |                                   |
|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|                                |                               | 1%                                | 2%                                | 3%                                |
| <i>L. acidophilus</i> CCM 4833 | $(6,90 \pm 0,21) \times 10^9$ | $(3,90 \pm 0,45) \times 10^7^*$   | $(6,20 \pm 0,88) \times 10^5$     | $(2,85 \pm 0,29) \times 10^4$     |
| <i>L. lactis</i> 4/1           | $(8,20 \pm 0,88) \times 10^9$ | $(2,30 \pm 0,30) \times 10^8$     | $(3,20 \pm 0,32) \times 10^6$     | $(3,00 \pm 0,30) \times 10^{5*}$  |
| <i>L. casei</i> 5/4            | $(9,20 \pm 0,52) \times 10^8$ | $(3,04 \pm 0,42) \times 10^7$     | $(1,70 \pm 0,35) \times 10^{6**}$ | $(5,30 \pm 0,46) \times 10^{3*}$  |
| <i>L. helveticus</i> 13/2      | $(7,40 \pm 0,35) \times 10^9$ | $(2,40 \pm 0,31) \times 10^8$     | $(2,95 \pm 0,41) \times 10^6$     | $(4,05 \pm 0,38) \times 10^{5**}$ |
| <i>L. plantarum</i> 16/1       | $(8,95 \pm 0,41) \times 10^9$ | $(2,95 \pm 0,26) \times 10^7^*$   | $(3,15 \pm 2,41) \times 10^9$     | $(2,70 \pm 0,27) \times 10^4$     |
| <i>L. plantarum</i> 16/3       | $(7,35 \pm 0,41) \times 10^9$ | $(3,20 \pm 0,24) \times 10^{6*}$  | $(1,75 \pm 0,21) \times 10^{6**}$ | $(3,00 \pm 1,33) \times 10^3$     |
| <i>L. plantarum</i> 17/2       | $(8,75 \pm 0,61) \times 10^9$ | $(7,30 \pm 0,52) \times 10^{6*}$  | $(4,15 \pm 0,41) \times 10^{6*}$  | $(2,70 \pm 0,27) \times 10^3$     |
| <i>L. plantarum</i> 17/3       | $(9,05 \pm 0,31) \times 10^9$ | $(2,40 \pm 0,38) \times 10^6$     | $(1,25 \pm 0,27) \times 10^{5*}$  | $(2,70 \pm 0,27) \times 10^3$     |
| <i>L. acidophilus</i> 31/2     | $(8,35 \pm 0,20) \times 10^9$ | $(5,30 \pm 0,39) \times 10^7$     | $(4,15 \pm 0,67) \times 10^{6*}$  | $(8,40 \pm 0,23) \times 10^{4**}$ |
| <i>L. delbrueckii</i> 39/2     | $(8,00 \pm 0,17) \times 10^9$ | $(4,85 \pm 0,33) \times 10^{7**}$ | $(2,85 \pm 0,67) \times 10^{6*}$  | $(1,35 \pm 0,24) \times 10^{4*}$  |
| <i>L. acidophilus</i> 49/1     | $(6,75 \pm 0,31) \times 10^9$ | $(2,35 \pm 0,22) \times 10^{7**}$ | $(3,90 \pm 1,21) \times 10^6$     | $(8,40 \pm 0,23) \times 10^4$     |

Примітка: у цій таблиці \* –  $p < 0,05-0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .Note: in this table \* –  $p < 0,05-0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Відносно менш стійкими до 20% жовчі були штами: *L. casei* 5/4, *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. delbrueckii* 39/2, титр бактерій яких становив  $10^8$  КУО/мл. Однакову толерантність до вищої концентрації жовчі (40%) спостерігали у всіх досліджених штамів. Життєздатність через 48 годин після культивування складала  $10^8$  КУО/мл (табл. 4).

Такі показники стійкості досліджуваних пробіотичних бактерій до наявності жовчі у живильному середовищі, на нашу думку, зумовлені джерелом їх виділення. Відомо, що МКБ належать до представників облигатної мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини та тварин, в тому числі і кролів. У зв'язку з цим, наявність даного метаболіту травної системи в середовищі існування для досліджуваних бактерій є природним.

Важливим є визначення толерантності МКБ до фенолу (0,5%), оскільки лише стійкі форми пробіотичних мікроорганізмів здатні приживатися у шлунково-кишковому тракті макроорганізму. Усі досліджувані штами молочнокислих бактерій проявляли стійкість до фенолу. Життєздатність через 48 годин після культивування на середовищі, що містило 0,5% фенолу складала  $10^8$  КУО/мл (табл. 4).



Таблиця 4  
 Вплив жовчі та фенолу на ріст молочнокислих бактерій, КУО/мл ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )  
 Table 4  
 Effect of bile and phenol on the growth of lactic acid bacteria, CFU/ml ( $M \pm m$ ,  $n=3$ )

| Штам                           | Контроль (без жовчі та фенолу) | Масова частка фенолу 0,5%       | Масова частка жовчі              |                                  |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                |                                |                                 | 20%                              | 40%                              |
| <i>L. acidophilus</i> CCM 4833 | $(6,9 \pm 0,21) \times 10^9$   | $(3,05 \pm 0,28) \times 10^8$   | $(1,8 \pm 0,28) \times 10^9$     | $(3,45 \pm 0,24) \times 10^8$    |
| <i>L. lactis</i> 4/1           | $(8,2 \pm 0,88) \times 10^9$   | $(3,36 \pm 0,20) \times 10^8$   | $(4,35 \pm 0,40) \times 10^9$    | $(2,0 \pm 0,35) \times 10^{8*}$  |
| <i>L. casei</i> 5/4            | $(9,2 \pm 0,52) \times 10^8$   | $(3 \pm 1,1) \times 10^8$       | $(5,3 \pm 0,39) \times 10^{8*}$  | $(1,30 \pm 0,14) \times 10^{8*}$ |
| <i>L. helveticus</i> 13/2      | $(7,4 \pm 0,35) \times 10^9$   | $(7,4 \pm 0,23) \times 10^{8*}$ | $(9,79 \pm 0,51) \times 10^9$    | $(1,35 \pm 0,24) \times 10^{8*}$ |
| <i>L. plantarum</i> 16/1       | $(8,95 \pm 0,41) \times 10^9$  | $(7,4 \pm 0,23) \times 10^{8*}$ | $(9,2 \pm 0,52) \times 10^{8**}$ | $(1,9 \pm 0,36) \times 10^{8*}$  |
| <i>L. plantarum</i> 16/3       | $(7,35 \pm 0,41) \times 10^9$  | $(4,8 \pm 0,45) \times 10^8$    | $(7,4 \pm 0,23) \times 10^{9**}$ | $(2,5 \pm 0,32) \times 10^{8*}$  |
| <i>L. plantarum</i> 17/2       | $(8,75 \pm 0,61) \times 10^9$  | $(1,9 \pm 0,36) \times 10^8$    | $(6,18 \pm 1,88) \times 10^8$    | $(2,0 \pm 0,35) \times 10^8$     |
| <i>L. plantarum</i> 17/3       | $(9,05 \pm 0,31) \times 10^9$  | $(3,15 \pm 0,27) \times 10^8$   | $(1,2 \pm 0,25) \times 10^{8*}$  | $(4,8 \pm 0,74) \times 10^8$     |
| <i>L. acidophilus</i> 31/2     | $(8,35 \pm 0,2) \times 10^9$   | $(2,35 \pm 0,22) \times 10^8$   | $(3 \pm 1,1) \times 10^9$        | $(4,1 \pm 0,17) \times 10^8$     |
| <i>L. delbrueckii</i> 39/2     | $(8,0 \pm 0,17) \times 10^9$   | $(1,35 \pm 0,24) \times 10^8$   | $(2,2 \pm 0,29) \times 10^{8*}$  | $(3,45 \pm 0,24) \times 10^8$    |
| <i>L. acidophilus</i> 49/1     | $(6,75 \pm 0,31) \times 10^9$  | $(4,70 \pm 0,42) \times 10^8$   | $(7,3 \pm 0,62) \times 10^9$     | $(6,9 \pm 0,2) \times 10^{8**}$  |

Примітка: у цій таблиці \* –  $p < 0,05-0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .  
 Note: in this table \* –  $p < 0,05-0,02$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Таким чином, встановлено, що усі досліджувані штами МКБ стійкі до високих концентрацій жовчі та фенолу, 70% – до низьких значень рН, 50% – натрій хлориду, 20% – гідроген хлориду. Ця властивість дозволить даним бактеріям витримати несприятливі умови шлунково-кишкового тракту та потрапити у товстий відділ кишківника макроорганізму при пероральному введенні.

З отриманих результатів можна зробити висновок, що досліджувані штами: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2 є перспективними для створення пробіотичних препаратів, оскільки вони виявилися найбільш стійкими до метаболітів травної системи.



**Ю.Н. Похилько, Н.А. Кравченко**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина,  
тел. : +38 (046) 223 17 49, e-mail: pohilko.yura@gmail.com

## УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* К МЕТАБОЛИТАМ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

### Реферат

**Цель.** Целью данной работы было определить влияние pH метаболитов пищеварительной системы на активность роста молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта кроликов. **Методы.** В работе использовано 11 штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта кроликов. Устойчивость бактерий к метаболитам пищеварительной системы определяли путем их культивирования в среде MRS с желчью, водород хлорида, натрия хлорида, фенолом. **Результаты.** Установлено, что исследуемые штаммы выживали при pH среды 4,0–9,0. Все штаммы имели высокую устойчивость к концентрации желчи (20, 40%), хлорида водорода (3%), хлорида натрия (5%), фенола (0,5%), количество жизнеспособных клеток – 103–105 КОЕ / мл после 48 часов культивирования. **Выводы.** Установлено, что исследуемые штаммы лактобацилл были устойчивыми к высоким концентрациям желчи и фенола, 70% – к низким значениям pH, 50% – к хлориду натрия, 20% – к водороду хлорида. **Ключевые слова:** молочнокислые бактерии, устойчивость, водорода хлорид, желчь, натрия хлорид, фенол.

**Yu.M. Pohilko, N.O. Kravchenko**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture NAAS, 97,  
Shevchenko str., Chernigiv, 14027, tel. : +38 (046) 223 17 49,  
e-mail: pohilko.yura@gmail.com

## RESISTANCE OF BACTERIA OF THE GENUS *LACTOBACILLUS* TO THE METABOLITES OF THE DIGESTIVE SYSTEM

### Summary

**Aim.** The purpose of this study was to determine the effect of the pH of metabolites in the digestive system on the growth activity of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits. **Methods.** The paper used 11 strains of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits. Stability of bacteria to the metabolites of the digestive system was determined by culturing them in MRS medium with bile, hydrogen chloride, sodium chloride, phenol. **Results.** It was found that the strains studied survived at a pH of 4.0 to 9.0. All the strains had high resistance to bile concentration (20, 40%), hydrogen chloride (3%), sodium chloride (5%), phenol (0.5%), viable cells - 103–105 CFU / ml after 48 hours cultivation. **Conclusions.** It was found that the studied strains of lactobacilli were resistant to high concentrations of bile and phenol, 70% to low pH, 50% to sodium chloride, and 20% to hydrogen chloride. **Key words:** lactic acid bacteria, resistance, hydrogen chloride, bile, sodium chloride, phenol.



## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гамко Л.Н., Сидоров И.И., Талызина Т.Л., Черненко Ю.Н. Пробиотики на смену антибиотикам. – Брянск: Издательство Брянского ГАУ, 2015. – 136 с.
2. Моркляк М.І., Брижчук А.А. Фармакологічні аспекти використання пробіотиків // Ветеринарна медицина України – 2015. – № 6. – С. 42–42.
3. Даниленко С.Г. Дослідження впливу різних факторів на життєздатність молочнокислих бактерій // Продовольчі ресурси. Серія: Технічні науки – 2014. – № 3. – С. 130–134.
4. Похилько Ю.М., Кравченко Н.О. Склад мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту молодняку кролів залежно від раціону // Науково-технічний бюлетень – 2016. – 17, № 1. – С. 141–146.
5. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования – М.: Наука, 1975. – 384 с.
6. Enrica P. Interactive probiotics // Department of Life Sciences and Systems Biology University of Torino – Italy: CRC Press, 2014. – P. 274.
7. Кігель Н.Ф., Насирова Г.Ф. Критерії відбору заквашувальних культур // Вісник аграрної науки. – 2002. – № 2. – С. 58–60.
8. Ю.Н. Похилько, Н.О. Кравченко. Виділення із травної системи кролів молочнокислих бактерій, перспективних для створення пробіотичних препаратів // Біоресурси і природокористування. – 2016. – 8, №5–6. – С. 63–66.
9. Li Chun, et al. NaCl stress impact on the key enzymes in glycolysis from *Lactobacillus bulgaricus* during freeze-drying. // Brazilian Journal of Microbiology – 2015. – № 46.4. – P. 1193–1199.
10. Ridlon J. M., Harris S. C., Bhowmik S. Kang, D. J., Hylemon, P. B. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria // Gut microbes – 2016. – 7 № 1. – С. 22–39.
11. Ruiz L., Margolles A., Sánchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Frontiers in Microbiology – 2013. – № 4(396). – P. 1–8.
12. Safitri, Ratu, et al. The Tolerance of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus curvatus* Originated From Bovine Colostrum Towards Acidity and Bile Salts as Probiotics Candidate // Advance Journal of Food Science and Technology – 2016. – 11(1) – P. 60–63.

## References

1. Gamko LN, Sidorov II, Talyzina TL, Chernenok N. Probiotics replace antibiotics. Bryansk State University of Agriculture Publisher, Bryansk, 2015. 136 p.
2. Morklyak MI, Bryzhchuk AA. Pharmacological aspects of probiotics. Veterinarna medicina Ukraini. 2015; (6): 42-42.
3. Danilenko SG. The influence of various factors on the viability of lactic acid bacteria. Prodovol'chi resursi. Seriya: Tekhnichni nauki. 2014; (3): 130-134.
4. Pokhilko YuM, Kravchenko NO. Composition of microbiota of the gastrointestinal tract of rabbits depending on ration. Naukova - tehnicny bulletin. 2016; 17 (1): 141 - 146.
5. Kvasnikov EI. Lactic acid bacteria and the way of their use. Nauka, Moscow, 1975. 384 p.



6. Enrica P. Interactive probiotics // Department of Life Sciences and Systems Biology University of Torino – Italy: CRC Press, 2014. – P. 274.

7. Kigel' NF, Nasirova GF. Criteria for the selection of starter cultures // Visnik agrarnoyi nauki. 2002; № 2: 58-60.

8. Pokhilko YuM, Kravchenko NO. Isolation from the digestive system of rabbits lactic acid bacteria, promising for the development probiotic preparations // Bioresursi i prirodokoristuvannya. 2016; 8, №5–6: 63–66.

9. Li Chun, et al. NaCl stress impact on the key enzymes in glycolysis from *Lactobacillus bulgaricus* during freeze-drying. Brazilian journal of microbiology. 2015; 46.4: 1193-1199.

10. Ridlon JM, Harris SC, Bhowmik S, Kang DJ, Hylemon PB. Consequences of bile salt biotransformations by intestinal bacteria. Gut microbes. 2016; 7(1): 22-39.

11. Ruiz L, Margolles A and Sónchez B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Frontiers in microbiology. 2013;4(396): 1-8.

12. Safitri R et al. The Tolerance of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus curvatus* originated from bovine colostrum towards acidity and bile salts as probiotics candidate. Advance journal of food science and technology. 2016, 11(1): 60-63.

Стаття надійшла до редакції 01.12.2016 р.



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

**Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:**

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-5/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання мети статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом 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 шрифтом Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

**При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:**

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
  - назва статті великими літерами;
  - прізвища та ініціали автора (авторів);





- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200- 250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

- назва статті великими літерами;
- прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200 - 250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

- Повний текст статті мовою оригіналу.

**Текст статті має включати такі складові:**

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

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

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

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

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

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



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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

### **Розділ “Матеріали і методи”:**

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

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

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

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

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



**Список використаної літератури**

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

**Зразки посилання літератури**

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані 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*. – 9<sup>th</sup> ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

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

**На журнальні статті**

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

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



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

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

#### **На тези доповідей**

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

#### **На депоновані наукові роботи**

1. Лопатина Н.В., Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У. Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. “Микробиол. журн.” – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-В92.

#### **На стандарти**

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

#### **На автореферати дисертацій**

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

### **Зразки посилань літератури в романській абетці**

#### **References**

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

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

#### **Статті в журналах:**

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

Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> 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/](http://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 С. О. Остапенко  
Підписано до друку 23.06.2017 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 10,32. Тираж 100 пр.  
Зам. № 1596.

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