

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

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

ВЛИЯНИЕ АЛЮМОКАЛИЕВЫХ КВАСЦОВ НА СИНТЕЗ МИКРОБНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

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

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

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



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

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

Материалы и методы

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

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

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

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



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

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

Результаты и их обсуждение

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

Таблица 1

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

Table 1

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

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

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем.

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



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

Таблица 2

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

Table 2

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

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

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

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

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

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



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

Таблица 3

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

Table 3

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

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

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем.

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

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

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



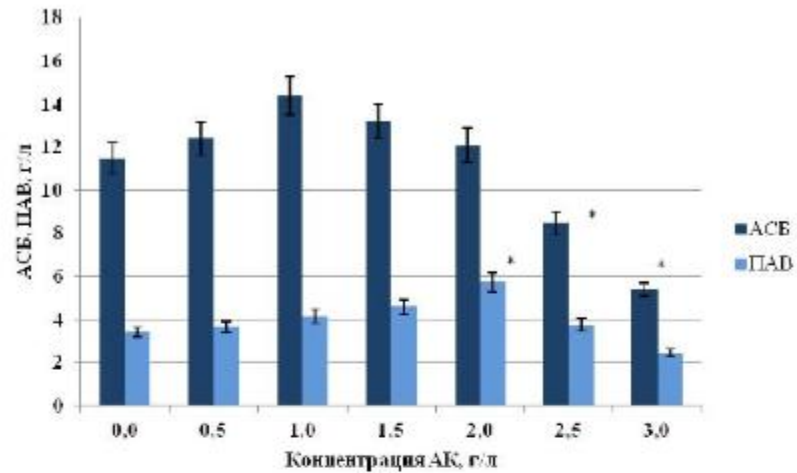


Рис. 1. Влияние алюмокалиевых квасцов на синтез биоПАВ и накопление биомассы штаммом *R. erythropolis* Au-1

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контролем.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

ВПЛИВ АЛЮМОКАЛІЄВИХ ГАЛУНІВ НА СИНТЕЗ МІКРОБНИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ СПОЛУК

Реферат

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



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

Ключові слова: алюмокалієві галуни, рhamnоліпідни, трегалозоліпідни, пептидоліпідни.

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

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

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

Summary

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

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Стаття надійшла до редакції 28.01.2014 р.

