

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 579.22+579.66

І. О. ГРЕЦЬКИЙ, О. М. ГРОМОЗОВА, С. К. ВОЦЕЛКО

Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143

ВИКОРИСТАННЯ КОМПОЗИЦІЙ ПОЛІСАХАРИДІВ МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛЮМІНЕСЦЕНТНИХ БАКТЕРІЙ *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM* IMB B-7071

Розроблена гелева композиція на основі природного екзополісахариду ксантану (ЕПС) і екзополісахаридполіакріламід (ЕПАА) для здешевлення поживного середовища для культивування люмінесцентних бактерій. За показниками інтенсивності люмінесценції і збереженням життєздатності оптимальною для культивування *Photobacterium phosphoreum* є композиція ЕПАА і ЕПС у пропорції (70%+30%) з концентрацією NaCl 3%.

Ключові слова: біоломінесценція, *Photobacterium phosphoreum*, ксантан, екзополісахаридполіакріламід

У наш час, у зв'язку з бурхливим розвитком технологій, забруднення навколишнього середовища входить до числа актуальних проблем людства. Більшість аналітичних методів, що широко використовуються для моніторингу поллютантів, потребують коштовного обладнання і громіздкої попередньої обробки зразків, взятих з навколишнього середовища. Тому на противагу класичним аналітичним методам значний інтерес представляють клітинні біосенсиори на основі мікроорганізмів. Серед всіх видів біосенсорних пристроїв увагу привертають біотести на основі люмінесцентних бактерій, засновані на винятковій чутливості цих мікроорганізмів до різноманітних речовин [3]. Інтенсивність випромінювання світла люмінесцентними бактеріями є інтегральним показником їх метаболізму, що обумовлює високу чутливість та швидкість відповіді на різноманітні впливи, простоту і економічність цих біотестів [2].

Ключовим вузлом таких пристроїв є сенсорний біоелемент, до складу якого входять люмінесцентні бактерії, від фізіологічного стану яких залежать всі ключові характеристики біосенсора. Однією з необхідних вимог до якості люмінесцентних бактеріальних сенсорів є їх здатність зберігати високу інтенсивність світіння протягом тривалого часу. Успіх отримання такого рецептора визначається вибором прийняттого носія та методу іммобілізації бактерій.

Для отримання біомаси люмінесцентні бактерії використовують складні поживні середовища, до вмісту яких входять такі компоненти як пептон, дріжджовий екстракт, рибні та м'ясні витяжки та ін. [9]. Недоліком таких поживних середовищ є складність їх приготування та відносно висока вартість компонентів. У зв'язку з цим, актуальним є розробка та здешевлення середовища для підвищення тривалості і стабільності високої активності люмінесцентних мікроорганізмів.

На сьогодні відомий спосіб використання екзополісахаридів (ЕПС) мікробного походження при приготуванні поживних середовищ [7], в якому показана його доцільність і ефективність. Дані ЕПС є високомолекулярними екзогенними продуктами біосинтезу

мікроорганізмів, що мають ряд переваг порівняно з хімічними аналогами: стійкість до механічної деструкції, температури і низьких значень рН, нетоксичність і біодеградабельність.

Метою цієї роботи була розробка та здешевлення рідкого середовища з використанням ЕПС, яке б забезпечувало тривалу і високу люмінесценцію бактерій *Photobacterium phosphoreum*.

Матеріал і методи досліджень

Об'єкт дослідження – штам морських люмінесцентних бактерій *Ph. phosphoreum*, зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером ІМВ В-7071. Штам був виділений з чорноморського катрана *Squalus acanthias* і ідентифікований за культурально-морфологічними ознаками [6]. Ідентифікація виду бактерій була підтверджена секвенуванням гена 16S рРНК. Отримана послідовність нуклеотидів представлена в базі даних GenBank під реєстраційним номером KF656787 [1].

Для отримання біомаси люмінесцентних бактерій використовували поживне середовище наступного складу (г/л): пептон - 5,0; дріжджовий екстракт – 1,0; NaCl – 30,0; Na₂HPO₄ – 5,3; KH₂PO₄ x 2H₂O – 2,1; (NH₄)₂HPO₄ – 0,5; MgSO₄ x H₂O – 0,1; гліцерин – 3,0 мл/л, вода дистильована – до 1 л, рН 7,6 [4].

Після культивування в 750 мл колбах з об'ємом поживного середовища 100 мл у режимі постійного перемішування (145 об/хв) протягом 18 годин при температурі 22°C, відбирали зразок. Кількість клітин встановлювали в рахунковій камері Горяєва. Суспензію люмінесцентних бактерій розводили до оптичної густини OD = 0,1, що відповідає концентрації 2×10^7 кл/мл.

Кількісну оцінку інтенсивності світіння бактерій проводили за допомогою експериментальної установки, в основі якої лежить фотоелектронний помножувач (ФЕП). При вимірюванні інтегрального світлового потоку у видимій області спектру світіння від зразка з бактеріями ($\lambda = 490$ нм) за допомогою світлочутливого високоапертурного об'єктива ($A = 0,7$) фокусувалося на фотокатод ФЕП-115 ($U = 1,3$ кВ при $I = 1,5$ мА.) з максимумом чутливості при 440-490 нм. Інтенсивність світіння виражали в значеннях біолюмінесцентного індексу – БЛІ, як відношення інтенсивності люмінесценції дослідного зразка до інтенсивності світіння контрольного зразка: БЛІ = I_0/I_k [8]

Для створення композиції для культивування люмінесцентних бактерій використовувались полісахаридні сполуки на основі наступних компонентів: ЕПС ксантан, продуцентом якого являється *Xantomonas campestris pv. campestris* ІМВ В - 8158; ЕПАА – екзополісахаридполіакриламід, сополімер, синтезований полімеризацією акриламиду (АА) і ксантану [2]. ЕПАА отримували полімеризацією акриламиду у водному розчині бактеріальних полісахаридів (ксантану) при співвідношенні вказаних компонентів 7:3 у присутності окисно-відновних ініціаторів.

У роботі використовували препаративні композиції на основі гелевих наповнювачів: природного екзополісахариду (ЕПС) ксантану та ЕПАА, отриманих при різних співвідношеннях акриламиду (АА) і полісахариду:

1. А- ЕПС;
2. В- ЕПАА (співвідношення АА і ЕПС складає 7:3);
3. С- ЕПАА 30% В + 70% ЕПС;
4. D- ЕПАА 70% В + 30% ЕПС.

При дослідженні динаміки виживання *P. phosphoreum* гелеві композиції і культуральну рідину люмінесцентних бактерій (у співвідношенні 1:1) додавали у стерильні флакони, перемішували і залишали на довготривалій термін при кімнатній температурі. Динаміку виживання бактерій в інокуляті вивчали визначенням кількості життєздатних клітин методом серійних розведень з наступним висівом на агаризоване середовище.

Всі дослідження проводили не менше ніж у 3-х повторностях. Отримані дані обробляли статистично загальноприйнятими методами варіаційної статистики [5]. Розрахунки, графіки, гістограми та статична обробка виконані за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel 2007*.

Результати досліджень та їх обговорення

Однією з необхідних вимог до якості мікробних препаратів є їх здатність зберігати високу активність біоагента протягом тривалого часу. Тому першим етапом роботи було створення композиції, яка складається з ЕПАА та ЕПС ксантану, що забезпечує високу життєздатність та світіння люмінесцентних бактерій при їх зберіганні протягом місяця.

Серед одержаних даних, найкращий результат серед варіантів із застосуванням ЕПАА отримано при використанні композиції 30%+70%.

При подальшому внесенні різних композицій в інокулюм вивчалась кількість життєздатних клітин бактерій *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 за різних температур зберігання. Після 30 діб зберігання при культивуванні при температурі +4°C перевищував контроль і становив більше ніж 10^{10} клітин/мл. При культивуванні при температурі +21°C титр життєздатних клітин значно зменшувався за період зберігання (табл.1).

Виходячи з отриманих даних, переважний варіант спостерігався при використанні композиції ЕПАА та ЕПС ксантану 30%+70%.

При зберіганні при температурі +4°C найкращий термін тривалості люмінесценції становив 30 діб для суміш ЕПАА і ксантану (70%+30%). У інших композиціях цей показник складав меншу величину. При культивуванні при температурі +21°C тривалість світіння клітин зменшувалася до 21 доби зберігання (табл. 1).

Таблиця 1

Показники світіння бактерій при культивуванні на різних за складом гелях

Показник	ЕПАА		суміш ЕПАА і ксантану (70%+30%)		суміш ЕПАА і ксантану (30%+70%)		1% ксантан	
	+4°C	+21°C	+4°C	+21°C	+4°C	+21°C	+4°C	+21°C
Середня тривалість світіння, доба	17	7	30	10	21	10	14	7
Середня кількість на 30 добу, КУО/мл	$6,6 \times 10^{10}$	4×10^4	$1,1 \times 10^{10}$	2×10^4	$1,7 \times 10^{12}$	4×10^6	$3,6 \times 10^{11}$	6×10^5

Дані результати дозволили обрати варіант суміші ЕПАА і ксантану в пропорції (70%+30%) як пріоритетний для подальших досліджень внаслідок більш тривалої люмінесценції.

Наступним етапом роботи був пошук найкращої концентрації для композиції, яка б забезпечувала високу життєздатність та світіння люмінесцентних бактерій при зберіганні протягом місяця.

Після внесення у стерильні флакони (у співвідношенні 1:1) суспензії бактерій 1×10^{10} кл/мл та суміші ЕПАА і ксантану в пропорції (70%+30%) при різних концентраціях. Зразки перемішували і залишали на довготривалі зберігання (1 місяць) при температурі +4°C. Контрольний варіант замість гелевої композиції містив синтетичне поживне середовище. Через певні проміжки часу (1 тиждень) визначали рівень люмінесценції та її тривалість для кожного зразка.

При зберіганні при температурі +4 °С найкращий термін тривалості люмінесценції становив 30 діб для суміш ЕПАА і ксантану (70%+30%) у концентрації 2-4%. При інших концентраціях цей показник знижувався.

Встановлена динаміка змін інтенсивності люмінесценції бактерій *P. phosphoreum* ІМВ В-7071 на різному за концентрацією гелевому середовищі (табл. 2). Після 1 тижня зберігання при температурі +4°C інтенсивність світіння зразків 1%, 2%, 3% ,4% мало відрізнялась одна від одної. Однак при культивуванні на гелевому середовищі з концентрацією 8% інтенсивність світіння зменшувалась в 1,5 рази за тих самих умов.

Показники люмінесценції бактерій при культивуванні на гелях різних концентрацій

Термін культивування	Концентрація гелю				
	1%	2%	3%	4%	8%
7 доба культивування	12,3	12,7	13,1	12,9	8,7
14 доба культивування	7,5	8,9	10,6	10,3	5,3
21 доба культивування	3,9	6,5	7,5	6,8	-
28 доба культивування	-	0,3	1,2	0,7	-

Дані результати дозволили обрати варіант суміші ЕПАА і ксантану в пропорції (70%+30%) з концентрацією 3% як зразок з найбільш тривалою та потужною люмінесценцією.

Висновки

Встановлено, що липкогена композиція в якості субстрату сприяє підвищенню тривалості люмінесценції бактерій та забезпечує інтенсивніший розвиток мікроорганізмів відносно інших середовищ.

Трофічна роль ЕПС для бактерій, дозволяє вважати ці речовини як важливий фактор, який впливає на функціонування мікробних угруповань.

Мікроорганізми можуть використовувати екзополісахариди як енергетичні субстрати і донори електронів у реакціях дегідрування, які є обов'язковим етапом окисно-відновних процесів у клітині мікроорганізму, а також як джерел карбонового метаболізму, включаючи компоненти їх деструкції в загальний обмін.

За показниками інтенсивності люмінесценції і збереженням життєздатності оптимальним середовищем для культивування *P. phosphoreum* є композиція ЕПАА і ЕПС в пропорції (70%+30%) з концентрацією NaCl 3%.

Таким чином, гелеві композиції на основі природного ЕПС ксантану та ЕПАА є перспективними компонентами для підвищення властивостей мікробних препаратів з пролонгованим терміном зберігання та стабільними властивостями, а також підвищенням інтенсивності світіння бактерій.

1. Бази даних нуклеотидів NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
2. Пат. 24856 Україна, МПК (2002) 6 С08F220/56. Спосіб одержання співполімеру поліакриламід (ЕПАА) / Є.М. Видюченко, С.К. Воцелко, Р.І. Гвоздяк, В.П. Гнідець, О.О. Литвинчук, Г.С. Сарібеков, В.А. Болоховська. — заявл.12.09.2007; опубл. 15.02.2002, Бюл. № 10.
3. Кратасюк В. А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В.А. Кратасюк // Успехи микробиологии. — 1987. — № 21. — С.3—30.
4. Куц В. В. Физиологические и эмиссионные характеристики *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM* из Белого моря / В.В. Куц, А.Д. Исмаилов. // Микробиология. — 2009. — 78, № 5. — С. 612—617.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. школа, 1990. — 351 с.
6. Малыгина И. Ю. Светящиеся бактерии Черного и Азовского морей / И.Ю. Малыгина, А.М. Кацев // Экология моря. — 2003. — 64. — С.18—23.
7. Пат. 60348 Україна, МПК (2003)7 С12N1/20 Композиція для інокуляції насіння бобових рослин на основі бульбочкових бактерій та липкогена ЕПАА /Р.І. Гвоздяк, О.О. Литвинчук, Л.М. Ващенко, С.К. Воцелко, Л.А. Пасічник, Г.С. Сарібеков, В.П. Гнідець. — заявл.31.05.2000; опубл. 15.10.2003, Бюл. №1 0.
8. Родичева Э. К. Биолюминесцентные биотесты на основе светящихся бактерий для экологического мониторинга / Э.К. Родичева, А.М. Кузнецов, С.Е. Медведева // Вестник ОГУ-РАН. — 2004. — № 5 — С. 96—100.
9. Светящиеся бактерии / [И.И. Гительзон, Е.К. Родичева, С.Е. Медведева и др.]. — Новосибирск: Наука, 1984. — 279 с.

И. А. Грецкий, Е. Н. Громозова, С. К. Воцелко

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПОЗИЦИЙ ПОЛИСАХАРИДОВ МИКРОБНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ
PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM IMV B-7071

Разработана гелевая композиция на основе природного экзополисахарида ксантана и экзополисахаридполиакриламида для удешевления питательной среды для культивирования люминесцентных бактерий. По показателям интенсивности люминесценции и сохранения жизнеспособности оптимальной для культивирования *P. phosphoreum* является композиция ЭПАА и ЭПС в пропорции (70%+30%) с концентрацией NaCl 3%.

Ключевые слова: биолюминесценция, *Photobacterium phosphoreum*, ксантан, экзополисахаридполиакриламид

I. A. Gretskey, E. N. Gromozova, S. K. Votselko

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Ukraine

USE OF THE POLYSACCHARIDES COMPOSITION OF MICROBIAL ORIGIN FOR
CULTIVATION LUMINOUS BACTERIA *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM* IMV B-7071

Nowadays pollution is biggest problems of people that caused by development of technology. Many analytical methods for monitoring of pollutants are costly because need an expensive equipment and cumbersome pretreatment of samples of environment. The most interested that classical methods show biosensor based on cell of microorganisms.

From all types of biosensor devices are more interest Biotest of luminescent bacteria, based on the exceptional sensitivity of these microorganisms to various substances. The intensity of light emission fluorescent bacteria is an integral factor of their metabolism, which causes high sensitivity and speed of response to various influences, simplicity and efficiency of bioassays.

Bioelement is the key of devices and consists of luminescent bacteria. The physiological state of one is the top characteristics of the biosensor. The main of necessary is quality requirements luminescent bacterial sensors and their ability to maintain a high intensity luminescence for a long time. The success of the receipt of receptor depends on choice acceptable carrier and method of immobilization of bacteria.

Biomass of luminescent bacteria gets from complex nutrient medium, which contents components like as peptones, yeast extract, fish and meat hoods and others. The defect of medium is difficulty their production and relatively a high cost components. In this case, development and price redaction is the importance for increase of duration and stability of highest activity of luminescent microorganisms.

It is known the method uses of exopolysaccharides (EPS) of microbial origin in the preparation of medium. There is expedience and effectiveness of this method. The EPS is exogenous macromolecular by biosynthesis of microorganisms that have several advantages to chemical analogues: resistance to mechanical degradation, temperature and low pH, non-toxic and biodegradability.

The aim of this work was development and price reduction of liquid medium, based on EPS. EPS may be provide duration and high luminescence of *Photobacterium phosphoreum*.

The IMV B-7071 strain of the luminous marine bacterium *P. phosphoreum* from the culture collection of the Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine was used as the object of the study. The species identification of the bacteria was confirmed by the sequencing of 16S rRNA gene region. The nucleotide sequence was submitted to the GenBank nucleotide sequence database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) under accession number KF656787.

To create a composition for culturing fluorescent bacteria used polysaccharide compounds based on the following components: EPS xanthan by *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMV B - 8158; EPAА – exopolysaccharide acrylamide, copolymer synthesized by polymerization of acrylamide (AA) and xanthan. EPAА obtained by polymerization of acrylamide in an aqueous

solution of bacterial polysaccharides (xanthan) in the ratio of these components 7: 3 in the presence of redox initiators.

The first step was creation of composition that consist of EPAA and EPS xanthan that provides high vitality and glow luminescent bacteria during storage for a month. The best result among the options using the EPAA obtained using a composition of 30% + 70%.

We studied the viable cells of bacteria *P. phosphoreum* IMV B-7071 at different variants compositions of inoculum that storage at different temperatures.

After 30 days of storage when cultured at + 4°C higher than the control and amounted to more than 10^{10} cells / ml. When cultured at + 21°C titer of viable cells decreased significantly over the period of storage.

Found that sticky composition as the substrate improves the duration of luminescence bacteria and provides intensive development of microorganisms in relation to other media.

Microorganisms can be used exopolysaccharides as energy substrates and electron donors in dehydrogenation reactions, which is a mandatory step phase redox processes in the cell of microorganism, as well as sources of carbon metabolism, including the destruction of components in the overall exchange.

Data of luminescence intensity and persistence viability has shown optimal environment for culturing *P. phosphoreum*. It is composition of EPAA and EPS at proportion (70% + 30%) with concentration of 3% NaCl.

Summarize, a gel composition based on natural gum and xanthan EPS EPAA are promising components for improving the properties of microbial preparations with prolonged shelf life and stable properties, and increase the intensity of luminescence bacteria.

Key words: bioluminescence, Photobacterium phosphoreum, xanthan, exopolyacrylamide

Рекомендує до друку

Надійшла 16.02.2017

Н. М. Дробик

УДК 575.11

¹М. А. КРИЖАНОВСЬКА, ²К. О. БІГУНЯК

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка

вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, 460027

²ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

вул. Майдан волі, 1, Тернопіль, 46001

ЗАМІНА РОДЗИНОК НА ВОДНУ ВИТЯЖКУ СУШЕНІ У ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIGEN

У статті представлені результати експериментального вивчення можливості заміни родзинок на водну витяжку сушені у поживних середовищах для розведення *Drosophila melanogaster* Meigen у лабораторних умовах. Встановлено, що новорозроблений рецепт поживного середовища проявляє позитивний вплив на розвиток дрозофіли, а саме: сприяє підвищенню її чисельності у лінії *Normal* на 16,7% ($P < 0,999$), лінії *vestigial* на 26,3% ($P < 0,95$). Підтверджена можливість застосування його у генетичному аналізі під час вивчення аутосомного успадкування прямого ($\chi^2 = 0,88$) та оберненого ($\chi^2 = 3,42$) реципрокних схрещувань, з достовірною вірогідністю, відповідно: $P > 0,2$ і $P > 0,05$.

Ключові слова: Drosophila melanogaster, розведення дрозофіли, поживне середовище