УДК 579.841.1:579.262:57.017.22

IMPACT OF CULTIVATION CONDITIONS ON EMISSION RATES OF BACTERIOCIN-LIKE SUBSTANCES *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITHIN BIOFILM

P. Pisarenko
National University of Food Technologies
O. Balco
D.K. Zabolotniy Institute of Mikrobiology and Virusology NAS of Ukraine

Key words:
Pseudomonas aeruginosa
Biofilm
Bacteriocins

Article history:
Received 10.03.2013
Received in revised form 19.04.2013
Accepted 20.05.2013

Corresponding author:

E-mail:
izmereniel@mail.ru

ABSTRACT

It is shown that Pseudomonas aeruginosa strains UCM B-1, UCM B-12, UKM-900 within a biofilm on a rich medium (meat-peptone broth) form bacteriocin-like substances with the average activity of 12 800 OA/ml, whereas in the low-carbon and energy-impoverished medium (Coser medium with 20% glucose) allocation of these antimicrobic substances doesn't occur. The accurate dependence of bacteriocin-like substances activity of P. aeruginosa and the duration of incubation of cultures on these mediums is specified. The received results indicate the possibility to use Pseudomonas as the producers of bacteriocin-like substances as a part of biological preparations under condition of enrichment of cultivation medium by additional growth factors.

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ВИДІЛЕННЯ БАКТЕРІОЦИНОПОДІБНИХ РЕЧОВИН *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* У СКЛАДІ БІОПЛІВКИ

П.О. Писаренко
Національний університет харчових технологій
О.Б. Балко
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Показано, що у складі біоплівки штами Pseudomonas aeruginosa УКМ В-1, УКМ В-12, УКМ В-900 на багатому поживному середовищі (м'ясо-пептонний бульон) утворюють бактеріоциноподібні речовини з середніми показниками активності 12800 ОА/мл, тоді як у середовищі із пониженим вмістом джерел вуглецю та енергії (середовищі Козера із 20 % глюкози) виділення даних антимікробних речовин не відбувається. Тривалість інкубування культур на даних середовищах не впливає на активність бактеріоциноподібних речовин P. aeruginosa. Застосування вказаних штамів мікроорганізмів, як продуцентів бактеріоциноподібних речовин, у складі біопрепаратів буде ефективним лише за умови внесення до складу препаратів додаткових ростових факторів.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa, біоплівка, бактеріоцини.*

Відомо, що значні втрати врожаю сільськогосподарських рослин можуть бути обумовлені розвитком хвороб, спричинених патогенними мікроорганізмами. Широке використання антибіотиків та пестицидів суттєво обмежується у зв'язку із забрудненням

навколишнього середовища та негативним впливом на здоров'я споживача [1]. У зв'язку з цим широке поширення набувають альтернативні підходи до захисту рослин. Одним із засобів впливу на фітопатогенні мікроорганізми вважається використання бактеріоцинів. Як приклад можна навести застосування бактеріоцинів *Pseudomonas syringae pv. ciccaronei*, які пригнічують розвиток *P. syringae subsp. savastanoi*, збудника хвороби оливкових дерев [2]. Проте, обробка рослин даними речовинами може бути мало ефективною через їх деградацію під впливом різноманітних факторів зовнішнього середовища. Більш перспективним вважається використання штамів-антагоністів, здатних продукувати антимікробні речовини безпосередньо при контакті із патогенними мікроорганізмами. Проте відомо, що у зовнішньому середовищі більшість бактерій існують у складі біоплівки. Використання *P. aeruginosa*, як широко застосовуваного у світовій практиці модельного об'єкту для дослідження функціонування мікроорганізмів у біоплівковій формі, дозволить екстраполювати отримані дані на інші близькоспоріднені види бактерій. Мета роботи: дослідження впливу умов культивування на інтенсивність виділення бактеріоциноподібних речовин *P. aeruginosa* у складі біоплівки

Матеріали та методи: формування біоплівки і здатність до бактеріоциногенності вивчали на штамах *P. aeruginosa* УКМ В-900, УКМ В-12, УКМ В-1 в стаціонарній системі на склі в середовищі Козера з 20 % глюкозою 7 діб. На 3 та 5 добу зразки біоплівки відбирали і переносили для культивування в м'ясо-пептонний бульон (МПБ). Наявність бактеріоціноподобних речовин визначали методом «двошарового агару» на індикаторних культурах *P. aeruginosa* УКМ В-3, УКМ В-10, УКМ В-329; кількісні показники виражали в одиницях активності (ОА) на 1 мл.

В процесі дослідження було показано, що зразки бактеріальної суспензії штамів *P. aeruginosa* УКМ В-1, УКМ В-12 та УКМ В-900, культивовані у середовищі Козера не призводять до затримки росту індикаторних культур *P. aeruginosa* УКМ В-3, УКМ В-10 та УКМ В-329. Дана особливість не змінювалась впродовж усього періоду спостереження — протягом 7 діб. В іншому випадку, коли скельця із біоплівкою *P. aeruginosa* УКМ В-1, УКМ В-12 та УКМ В-900 переносили для подальшого культивування в МПБ, у відібраних суспензіях на 3 і 5 добу виявлялись речовини з антимікробними властивостями. Про це свідчила поява зон лізису індикаторних культурах. При встановленні активності отриманих супернатантів найвищі показники щодо індикаторної культури *P. aeruginosa* УКМ-329 відмічалися у речовин, утворюваних *P. aeruginosa* УКМ В-1, який інкубували в середовищі Козера протягом 3 діб та потім перенесили у складі сформованої біоплівки в МПБ (табл. 1).У аналогічних зразках, відібраних на 5 добу, активність речовин була вдвічі нижчою, що може вказувати на втрату здатності культур до виділення кілерних речовин при тривалому культивуванні. Перевірка речовин із бактеріальної суспензії штаму УКМ В-1 на індикаторній культурі УКМ В-10 показала залежність, зворотну до описаної вище. В даному випадку виявлялось 8-ми кратне підвищення активності речовин, відібраних на 5 добу, порівняно із такими, що отримані на 3 добу. Для підтвердження чи спростування виявленої залежності було перевірено активність бактеріальних суспензій інших штамів. Показано, що показники активності речовин, виділених із суспензії штаму УКМ В-900, не змінювались в протягом всього терміну культивування штаму, а також не залежали від використаного індуктора. Такі ж результати було отримано для культури УКМ В-12, речовини супернатантів якої впливали лише на індикаторну культуру УКМ В-3 і лише у зразках, відібраних на 3 добу інкубування. Треба відмітити, що кількісні показники активності речовин більшості отриманих зразків виявлялись приблизно на однаковому рівні — близько 12800 ОА/мл. Значно нижчими показниками щодо індикаторної культури *P. aeruginosa* УКМ В-10 характеризувались лише речовини із штаму УКМ В-1, який інкубували в МПБ після 3 діб вирощування на середовищі Козера.

Таблиця 1. **Активність речовин, виділених штамами *Pseudomonas aeruginosa* після перенесення зразків біоплівки із середовища Козера з 20 % глюкози в МПБ**

Досліджуваний штам	Тривалість вирощування культури до перенесення зразків в МПБ	Індикаторна культура	Активність речовин у бактеріальній суспензії, ОА/мл
P. aeruginosa УКМ В-1	3 доба	*P. aeruginosa* УКМ В-10	1600
	5 доба		12800
P. aeruginosa УКМ В-1	3 доба	*P. aeruginosa* УКМ В-329	25600
	5 доба		12800
P. aeruginosa УКМ В-12	3 доба	*P. aeruginosa* УКМ В-3	12800
	5 доба		-
P. aeruginosa УКМ В-900	3 доба	*P. aeruginosa* УКМ В-3	-
	5 доба		12800
P. aeruginosa УКМ В-900	3 доба	*P. aeruginosa* УКМ В-329	12800
	5 доба		12800

Висновок

Виділення бактеріоциноподібних речовин *P. aeruginosa* у складі біоплівки спостерігається при культивуванні мікроорганізмів в багатому поживному середовищі та не відбувається у середовищі із пониженим вмістом джерел вуглецю та енергії і не залежить від тривалості інкубування культури у їх складі. Виходячи із наведеного можна зробити висновок, що застосування вказаних мікроорганізмів, як продуцентів бактеріоциноподібних речовин, у складі біопрепаратів буде ефективним лише за умови внесення до складу препаратів додаткових ростових факторів.

Література

1. *Сільськогосподарська* біотехнологія: Учеб / В.С. Шевелуха, Калашнікова О.О. та ін; Під ред. В.С. Шевелуха — 2-е вид. перераб. і доп. — М.: Вищ. шк., 2003. — 496.

2. *Lavermicocca P.S.L., Lonigro F.V., Evidente A., Visconti A.* Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from Pseudomonas syringae pv. ciccaronei // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol. 68, N 3. — P. 1403 – 1407.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОЦИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ

П.А. Писаренко
Национальный университет пищевых технологий
А.Б. Балко
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

Показано, что в составе биопленки штаммы Pseudomonas aeruginosa УКМ В-1, УКМ В-12, УКМ В-900 на богатой питательной среде (мясо-пептонный бульон) образуют

бактериоциноподобные вещества со средними показателями активности 12800 ЕА / мл, тогда как в среде с пониженным содержанием источников углерода и энергии (среде Козера с 20 % глюкозы) выделения данных антимикробных веществ не происходит. Продолжительность инкубации культур на данных средах не влияет на активность бактериоциноподобных веществ P. aeruginosa. Применение указанных штаммов микроорганизмов, как продуцентов бактериоциноподобных веществ в составе биопрепаратов будет эффективным лишь при условии внесения в состав препаратов дополнительных ростовых факторов.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa, биопленка, бактериоцины.*