

Выводы

1. Определили показатели бактериальной контаминации речного рыбного сырья из пробы №1: были выделены микроорганизмы, принадлежащие к родам: *Staphilococcus* и *Yersinia*; из пробы №2: были выделены микроорганизмы, принадлежащие к родам: *Staphilococcus*, *Ascomycetes*, *Pseudomonas*; из пробы №3: были выделены микроорганизмы, принадлежащие к родам: *Staphilococcus*, *Streptococcus*; из пробы №4: были выделены микроорганизмы, принадлежащие к родам: *Staphilococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia*.
2. При исследовании оборудования для транспортировки и хранения речного рыбного сырья были выделены микроорганизмы следующих родов: *Staphilococcus*, *Ascomycetes*, *Bacillus*, *Micrococcacus*.

Библиографический список

1. Бойко А.В. Особенности биологии паразитических вибрионов и совершенствование методов их индикации // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Киев.- 1990.
2. Борисенко В.Ф. Свойства аэромонад и их значение в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах // Автореф. дис. канд.биол.наук. – М. – 1991.

MICROBIOLOGICAL INVESTIGATION OF RIVER FISH

Baharovskaya E.O., Pulcherovskaya L.P., Zolotukhin S.N.

The article presents the microbiological studies river fish. Bacteria are distinguished by different samples from different sites of localization. Identification was carried out.

УДК 759.873.088.5:661.185

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ СИНТЕЗА МИКРОБНЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ И МЕДИЦИНЫ

Парфенюк С.А., 4 курс, факультет биотехнологии и экологического контроля
Чеботарева К.В., 3 курс, факультет биотехнологии и экологического контроля
Андрущенко Я.В., 3 курс, факультет биотехнологии и экологического контроля

Конон А.Д., аспирант 2-го года обучения

Научный руководитель: д.б.н., профессор Пирог Т.П.

Консультант – ведущий инженер Шевчук Т.А.

Национальный университет пищевых технологий, г. Киев, Украина

Наиболее перспективной областью использования микробных поверхностно-активных веществ (ПАВ) является фармацевтическая промышленность и медицина, что обусловлено уникальными физико-химическими и биологическими свойствами этих метаболитов [1]. Так, микробные ПАВ являются нетоксичными, им свойственна высокая

антимикробная, антивирусная и иммуномодулирующая активность [2]. Поверхностно-активные вещества способны препятствовать адгезии патогенных микроорганизмов и предупреждать формирование биопленок, что позволяет рассматривать эти соединения как альтернативу антибиотикотерапии [6]. Высокие эмульгирующие свойства ПАВ обуславливают их использование при получении устойчивых основ для широкой номенклатуры лекарственных средств (кремы, мази, гели). Одним из перспективных направлений использования ПАВ является создание на их основе липосом, способных селективно переносить лекарства к органу-мишени.

Организация промышленного производства микробных ПАВ требует предварительной оценки экономической эффективности этого процесса. На сегодняшний день себестоимость ПАВ микробного происхождения все еще превышает таковую химических аналогов, что обусловлено высокими затратами на биосинтез и выделение целевого продукта. Поэтому исследования, направленные на решение этих проблем, являются ключевыми и приоритетными в биотехнологии микробных ПАВ [3].

Для повышения эффективности технологий микробного синтеза практически ценных метаболитов, в том числе микробных ПАВ, исследователи используют такие приемы как внесение экзогенных предшественников в среду культивирования продуцента; использование смешанных субстратов; создание на определенных фазах роста продуцента неоптимальных условий (например, внесение ионов металлов), в ответ на которые увеличивается синтез целевого продукта; использование отходов других производств в качестве дешевых субстратов.

Ранее было показано, что *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (ИМВ В-7241), выделенный нами из загрязненных нефтью образцов почвы, образует низкомолекулярные поверхностно-активные вещества при росте на гидрофобных (гексадекан, жидкие парафины) и гидрофильных (этанол, глюкоза) субстратах [4]. Селекционированный нами штамм *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 синтезирует необычные по химическому составу ПАВ, представляющие собой комплекс нейтральных, amino- и гликолипидов [4], причем гликолипиды представлены трегалозомиколатами – метаболитами, характерными для бактерий рода *Rhodococcus*, но не *Acinetobacter*.

Цель данной работы – исследовать возможность повышения синтеза ПАВ при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на моно- и смешанных субстратах.

Показатели роста и синтеза ПАВ – концентрация биомассы, поверхностное натяжение (σ_s) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ*, безразмерная величина), индекс эмульгирования культуральной жидкости (E_{24} , %) определяли, как описано в нашей предыдущей работе [4].

Количество синтезированных внеклеточных ПАВ (г/л) определяли весовым методом после экстракции из супернатанта культуральной жидкости модифицированной нами смесью Фолча [4]. ПАВ-синтезирующую

способность определяли как отношение концентрации синтезированных ПАВ (г/л) к концентрации биомассы и выражали в г ПАВ/г биомассы.

Учитывая химическую природу синтезированных штаммом ИМВ В-7241 ПАВ предположили, что внесение в среду с этанолом цитрата (регулятор синтеза липидов), а также C_4 -дикарбоновых кислот (фумарат, предшественник глюконеогенеза) будет сопровождаться интенсификацией синтеза ПАВ. Установлено, что одновременное внесение фумарата (0,01 %) и цитрата (0,01 %) в конце экспоненциальной фазы роста штамма ИМВ В-7241 на среде с этанолом приводило к увеличению количества синтезированных ПАВ на 195 % по сравнению с показателями синтеза на среде без органических кислот. Повышение синтеза ПАВ в присутствии фумарата и цитрата обусловлено увеличением в 1,7–7,0 раз активности ферментов биосинтеза глико- (фосфоенолпируват(ФЕП)-синтетазы и трегалозофосфатсинтазы) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимой глутаматдегидрогеназы), а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатного цикла и ФЕП-карбоксилазной реакции).

При культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на среде с этанолом уже на вторые сутки наблюдали снижение рН культуральной жидкости до 5,5–5,7, а к концу процесса – до 4,5–5,0. Поскольку у большинства бактерий соли органических кислот транспортируются в клетки путем симпорта с протоном [6] и оптимальным для этого является нейтральное значение рН, мы предположили, что нейтрализация в процессе роста штамма (и перед внесением органических кислот) будет сопровождаться повышением синтеза ПАВ. В процессе культивирования рН культуральной жидкости поддерживали на нейтральном уровне подщелачиванием 1 н КОН (NaOH).

Показано, что как и при культивировании на этаноле, так и этаноле с внесением органических кислот, поддержание рН на нейтральном уровне сопровождалось повышением концентрации синтезированных ПАВ и ПАВ-синтезирующей способности по сравнению с показателями процесса без регуляции рН. Отметим, что максимальная интенсификация синтеза ПАВ (концентрация ПАВ 6,0 г/л, ПАВ-синтезирующая способность 6,2 г ПАВ/г биомассы) наблюдалась при одновременном внесении в среду с этанолом фумарата и цитрата, а также использовании раствора КОН для поддержания рН на уровне 7,0. Нейтрализация культуральной жидкости раствором едкого натра сопровождалась снижением количества синтезированных ПАВ и ПАВ-синтезирующей способности на 10–12 % по сравнению с показателями, полученными при регуляции рН с помощью КОН. Интересно отметить, что при культивировании штамма ИМВ В-7241 на этаноле в присутствии органических кислот и использовании КОН в качестве титрующего агента незначительно (на 7–9 %) увеличивался индекс эмульгирования культуральной жидкости по сравнению с аналогичным процессом без регуляции рН.

Дальнейшие эксперименты показали, что катионы натрия являются ингибиторами активности ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- (ФЕП-синтетаза) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа) у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241. Так, при наличии в реакционной

смеси 50 мМ Na⁺ активность ФЕП-синтетазы и глутаматдегидрогеназы снижалась в 1,8 и 5 раз соответственно. Отметим, что в присутствии катионов натрия наблюдали также снижение почти в 2 раза активности ФЕП-карбоксилазы – фермента анаплеротической реакции, восполняющей пул C₄-дикарбоновых кислот (наряду с глиоксилатным циклом) у штамма В-7241, растущего на этаноле.

Еще одним из путей усовершенствования технологий микробного синтеза является использование смешанных субстратов для культивирования продуцентов. Такой подход позволяет избежать непродуктивных потерь углерода и энергии, имеющих место при использовании моносубстратов, а также повысить эффективность трансформации углерода субстратов в продукты микробного синтеза.

На основе теоретических расчетов энергетических потребностей синтеза поверхностно-активных трегалозомономиколоатов и биомассы на энергетически дефицитном субстрате (глицерин) установлена концентрация энергетически избыточного гексадекана, позволяющая повысить эффективность конверсии углерода используемых субстратов в ПАВ. При молярном соотношении концентраций гексадекана и глицерина 1:7 и соотношении С/Н, равном 30, количество синтезируемых внеклеточных ПАВ повышалось в 2,6–3,5 раза по сравнению с таковым на моносубстратах. Повышение образования ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на смеси гексадекана и глицерина обусловлено увеличением в 1,3–2,4 раза активности ферментов их биосинтеза, а также одновременным функционированием двух анаплеротических путей (глиоксилатного цикла и ФЕП-карбоксилазной реакции).

Известно, что в ответ на неблагоприятные факторы внешней среды (например, внесение в среду культивирования ионов металлов) у многих микроорганизмов наблюдается увеличение синтеза протекторных соединений (внеклеточных белков, полисахаридов).

Показано, что внесение максимальной из исследованных концентраций Cu²⁺ (0,5 мМ) в экспоненциальной фазе роста штамма ИМВ В-7241 на среде с этанолом и *n*-гексадеканом сопровождалось увеличением концентрации ПАВ на 50–60 % по сравнению с показателем на среде без катионов меди. Максимальное повышение (на 140 %) количества синтезированных ПАВ было зафиксировано при внесении 0,1 мМ Cu²⁺ в экспоненциальной фазе роста штамма ИМВ В-7241 на среде с жидкими парафинами. Интересным оказался тот факт, что пересев бактерий *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, выращенных на всех субстратах в присутствии Cu²⁺, на среду без катионов меди сопровождался существенным повышением показателей синтеза ПАВ по сравнению с использованием аналогичного инокулята, полученного на среде без Cu²⁺. При этом максимальное (в 2,1–3,5 раза) увеличение концентрации ПАВ было отмечено при культивировании штамма ИМВ В-7241 на жидких парафинах.

Установлено, что одним из механизмов, обуславливающих повышение синтеза ПАВ в присутствии Cu²⁺, является активация катионами меди алкангидроксилазы АлкБ типа у *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241. Так, в

присутствии 0,01 и 0,05 мМ Cu^{2+} алкангидроксилазная активность штамма ИМВ В-7241 повышалась в 3 раза.

Поскольку увеличение синтеза ПАВ наблюдалось и при внесении Cu^{2+} в этанолсодержащую среду, мы предположили, что катионы меди могут также являться активаторами ключевых ферментов C_2 -метаболизма и биосинтеза ПАВ. Показано, что в присутствии Cu^{2+} увеличивалась активность как 4-нитрозо-N,N-диметиланилин(НДМА)-зависимой алкогольдегидрогеназы, так и ферментов биосинтеза поверхностно-активных глико- ((ФЕП)-синтетаза) и аминоклипидов (НАДФ⁺-зависимая глутаматдегидрогеназа) у бактерий *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, растущих на этаноле.

Одним из способов удешевления технологий микробных ПАВ является использование дешевых ростовых субстратов, например, отходов других производств.

Показано, что *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 способен синтезировать ПАВ на таких субстратах, как жидкие парафины, пережаренное подсолнечное масло, меласса, но не на молочной сыворотке. Установлено, что максимальные показатели биосинтеза ПАВ были зафиксированы при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на маслосодержащих субстратах: повышение условной концентрации ПАВ в 2,8–3,3 раза по сравнению с показателями на среде с этанолом. При использовании мелассы в качестве источника углерода наблюдали увеличение количества синтезированных ПАВ на 80 %, а жидких парафинов – на 40 % по сравнению с выращиванием на этанолсодержащей среде. Следует отметить, что при культивировании на всех исследуемых субстратах значение индекса эмульгирования практически не изменялось.

Таким образом, в результате проведенной работы установлена возможность интенсификации синтеза ПАВ в 1,9–3,5 раза при культивировании *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 на моно- и смешанных субстратах. Предложенные в данной работе подходы, в частности внесение экзогенных предшественников и культивирование продуцента на смеси ростовых субстратов, могут быть использованы для разработки не только технологий микробных ПАВ, но и других технологий микробного синтеза.

Библиографический список

1. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J., Marchant R. Microbial biosurfactants production, application and future potential // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – V. 87, № 2. – P. 427–444. 18.
2. Gudiña E.J., Teixeira J.A., Rodrigues L.R. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei* // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2010. – V. 76, N 1. – P. 298 – 304.
3. Mukherjee S., Das P., Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants // *Trends in Biotechnol.* – 2006. –V. 24, N 11. – P. 509–515.
4. Pirog T. P., Antonyuk S.I., Karpenko E.V., Shevchuk T.A. The effect of the cultivation of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain on the synthesis of surfactants // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2009. – V. 45, N 3 – P. 304–310.

5. Rivardo F., Turner R.J., Allegrone G., Ceri H., Martinotti M.G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – V. 83. – P. 541–553.
6. Thaniyavarn J., Chianguthai T., Sangvanish P., Roongsawang N., Washio K., Morikawa M., Thaniyavarn S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2008. – V. 72, N 8. – P. 2061–2068.

INTENSIFICATION OF BIOSURFACTANTS SYNTHESIS USED IN PHARMACEUTICAL INDUSTRY AND MEDICINE

Parfenyuk S.A., Chebotarova K.V., Andruschenko Ya.V., Konon A.D.

The possibility of the intensification of biosurfactant synthesis by *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 while cultivation on mono- and mixed substrates was shown.

It was shown that the addition of exogenous precursor of biosynthesis, copper cations in the exponential growth phase, the use of inoculum, grown to stationary growth phase on the medium with Cu^{2+} , the cultivation on the mixture of growth substrates or industrial wastes resulted in 1,9-3,5 fold increasing concentration of surfactant synthesized by *A. calcoaceticus* IMV B-7241.

УДК 619:578.832.1

ВЫЯВЛЕНИЕ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* МЕТОДОМ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА

Ушмарова Е.Г., Волкова А.А., 5 курс, факультет ветеринарной медицины

Научный руководитель: ассистент Семанина Е.Н.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»

Бордетеллез (инфекционный трахеобронхит, инфекционный ларинготрахеобронхит, «питомниковый кашель», «комплекс вольерного кашля – собачий кашель», «кашель псарен» или «собачий кашель») давно был признан как опасная инфекция дыхательного тракта собак. Первые сообщения об ассоциации бордетеллеза с другими болезнями собак были сделаны в начале 1900-х годов, сейчас бордетеллез расценивается как самостоятельная нозологическая единица. Максимальный интерес ученых к болезни приобрел в последние десятилетия. Бордетеллез распространен во всем мире и играет важную роль в патологии животных [2,3].

В зарубежной и отечественной ветеринарной и медицинской практике вопрос применения фагов бактерий *Bordetella bronchiseptica* с диагностической целью не рассматривался. В доступной нам литературе нет данных об индикации бордетелл методом реакции нарастания титра фага.

Реакция нарастания титра фага на основе бактеориофагов, позволяет существенно сократить сроки лабораторных анализов и проводить с высокой точностью индикацию бактерий [1].