

УДК 579.61

## ВПЛИВ ЕНХАНСЕРІВ НА ШВИДКІСТЬ ПРОЯВУ КОЛОНІЙ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ НА ЩІЛЬНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Осолодченко Т.П., Батрак О.А., Мізін В.В.,  
Маланчук С.Г., Чупринова С.І., Завада Н.П., Рябова  
І.С., Штикер Л.Г.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.  
Мечникова АМН України», м. Харків

В останній час відмічається іктеріфікація розробок біотехнологічних методів отримання біомаси мікробів для виробництва препаратів білкової природи, значний відсоток яких належить продуктам бактеріального походження (вакцини, анатоксини, пробіотики та інш.) [1-4]. Одним із шляхів вирішення задачі оптимізації синтезу біотехнологічних білкових і небілкових компонентів та нарощування мікробної маси є пошук та моделювання стимуляторів росту мікроорганізмів.

Останнім часом публікується багато наукових праць по вивченню стимулюючого впливу різних фізичних, хімічних та інших чинників на біологічні властивості клітин [5-9]. Широким спектром біологічної активності характеризуються стимулятори хімічного походження – імідазол, ізохінолін та їх похідні, які входять до структури багатьох природних і синтетичних сполук, здатних індукувати інтенсивність росту мікробної популяції [10-12]. Використання енхансерів є важливим досягненням в галузі біотехнологічних виробництв, вони можуть підвищувати як відсоток виходу біотехнологічних білкових продуктів, так і нарощування мікробної маси поза рамками фізіологічної норми на порядок та вище. Таким чином, є теоретична можливість значно прискорити швидкість накопичення мікробної маси і синтез мікроорганізмами білкових продуктів.

Виходячи з вищеведеного, метою нашої роботи стало дослідити здатність енхансерів - каталізаторів внутріклітинних реакцій впливати на кінетику росту, біохімічну активність мікроорганізмів, прискорення колонієутворення, а також розробити оптимальні дози імідазолу та ізохіноліну (окремо і комбіновано) для інтенсивного накопичення мікробної маси штамів-продуцентів. Підвищення ростової та ферментативної активності мікроорганізмів сприятиме збільшенню біомаси клітин і відповідно метаболітів для подальшого їх ефективного застосування в різних галузях господарства, зокрема в біотехнологічній, медичній та фармацевтичній промисловості.

### Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були культури тест-штамів *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Saccharomyces cerevisiae* 1, одержані з музею живих культур мікроорганізмів ДУ ІМІ ім. І.І Мечникова АМН України.

Всі штами зберігалися в напіврідкому середовищі. Життєздатність клітин підтримували

методом пересівів на щільне живильне середовище. Культуральні та морфологічні властивості мікроорганізмів підтверджували висівом на селективні середовища – агар Сабуро, м'ясо-пептонний агар (МПА) та за допомогою мікроскопії клітин. В якості стандартних середовищ обрано МПА і м'ясо-пептонний бульон (МПБ). Для порівняння ростових характеристик використано бульйон Мартена.

Для підвищення швидкості приросту мікробної маси та збільшення відсотку виходу кінцевого продукту обрано стимулятори росту мікроорганізмів хімічного походження - похідні імідазолу та ізохіноліну - групи алостеричних активаторів циклічного аденозинмонофосфату: 2-бензилбензімідазол гідрохлорид – імідазол (А) та 6,7-діметокси-1-(3,4-діметоксибензил)-ізохінолін (В). Дослідження впливу цих енхансерів на швидкість прояву колоній мікроорганізмів, їх розміри, форми та біохімічні властивості проводили з використанням різних концентрацій (0,1 г/мл, 0,01 г/мл, 0,001 г/мл) як окремо, так і сумісно.

Критеріями оцінки впливу хімічних чинників на ріст мікробних культур та грибів визначено: кількість клітин на початку стаціонарної фази росту, кінетика росту, приrost біомаси за визначеною кількістю часу, розмір, швидкість появи та форми колоній, їх колір, стан, фарбування мікробів по Граму.

Виготовлення суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності.

Визначення кількості життєздатних мікроорганізмів вивчали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) у відповідній кількості посівного матеріалу [13, 14]. Контролем служили необроблені хімічними індукторами тест-культури, засіяні в бульйонний субстрат.

Статистичну обробку одержаних результатів проводили загальноприйнятими методами, вірогідність розходжень визначали за t-критерієм Стьюдента.

### Результати та обговорення

Результати досліджень підтверджують, що на темпи росту тест-штамів мікроорганізмів суттєво впливало додавання енхансерів А і В в концентраціях 0,01 мг/мл та 0,001 мг/мл до поживного середовища. Зміни інтенсивності росту *Bacillus subtilis* та *Saccharomyces cerevisiae* відбувалися також в сторону збільшення у порівнянні з контролем, про що свідчать дані таблиці 1.

Результати експериментів свідчать також за те, що при засіві у дозі  $10^9$  мікробних клітин/мл тест-культури досить швидко реагують на стимулюючий вплив активаторів, біомаса їх інтенсивно збільшується. Темпи приросту мікробних клітин найбільш високими виявилися у дослідних зразках поживного середовища, до яких додався активатор А в концентрації 0,01 мг/мл та 0,001 мг/мл, що

підтверджує підвищення біологічної активності бактерій та незначне посилення росту грибів.

Таким чином, похідні імідазолу та ізохіноліну, які додавалися до складу поживного середовища в наноконцентраціях, як стимулятори енергетичного та конструктивного метаболізму біоб'єктів,

прискорювали інтенсивність приросту бактеріальної та грибкової маси. Найбільш виражений індукційний ростовий ефект щодо *Bacillus subtilis* та *Saccharomyces cerevisiae* виявився у 2-бензилбензімідазолу гідрохлориду-імідазолу.

**Таблиця 1. Вплив енхансерів на кінетику росту мікроорганізмів та грибів**

Експозиція, години	Показники концентрації енхансерів, мг/мл	Середні показники (M±m) концентрації мікробних клітин, млрд/мл (10 <sup>9</sup> ), (p<0,05)	
		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1
6	0,01 A	(0,8±0,1)	(0,5±0,2)
6	0,01 B	(0,5±0,1)	(0,6±0,1)
6	0,001 A	(0,4±0,1)	(0,3±0,1)
6	0,001 B	(0,2±0,07)	(0,4±0,1)
<b>6</b>	<b>контроль</b>	<b>(0,2±0,05)</b>	<b>(0,1±0,05)</b>
10	0,01 A	(2,8±0,7)	(3,5±0,4)
10	0,01 B	(2,2±0,3)	(3,3±0,2)
10	0,001 A	(2,9±0,7)	(3,7±0,6)
10	0,001 B	(1,9±0,4)	(3,2±0,5)
<b>10</b>	<b>контроль</b>	<b>(1,7±0,2)</b>	<b>(3,1±0,1)</b>
16	0,01 A	(5,9±0,7)	(5,7±0,6)
16	0,01 B	(5,6±0,5)	(5,3±0,6)
16	0,001 A	(5,2±0,4)	(5,7±0,3)
16	0,001 B	(5,3±0,5)	(5,4±0,5)
<b>16</b>	<b>контроль</b>	<b>(2,6±0,6)</b>	<b>(4,8±0,5)</b>

Дослідження впливу похідних імідазолу та ізохіноліну у вищенаведених концентраціях на час появи перших колоній мікроорганізмів та сахароміцетів свідчить про те, що при концентрації енхансерів 0,01 мг/мл та 0,001 мг/мл кількість колоній вірогідно збільшувалась в порівнянні з контролем. Найбільша ступінь росту досягалась при додаванні в поживне середовище енхансера А в концентрації 0,01мг/мл, де кількість колоній *Bacillus subtilis* (7,8±0,8) Іг КУО/мл та *Saccharomyces cerevisiae* (7,5±0,4) Іг КУО/мл в порівнянні з контролем (1,8±0,4 – 2,1±0,2) Іг КУО/мл. Дані наведено в таблиці 2.

Слід також відзначити, що під впливом енхансерів спостерігалось посилення пігментації колоній мікроорганізмів та збільшення їх розмірів. Застосування активаторів впливало на час появи перших колоній. При концентрації 0,1г/мл А та В перші колонії бактерій з'явились після 6 годин інкубації, при дозі 0,01г/мл значно зменшився термін культивування, а прояв перших колоній мікроорганізмів реєструвався вже після 10 годин інкубації. Внесення 0,001г/мл розчину стимуляторів в середовище сприяло прояву колоній мікроорганізмів через 16 годин.

Таким чином, додавання в поживне середовище енхансерів А та В різко стимулює накопичення біомаси та колонієутворюючу здатність мікроорганізмів та грибів. За літературними джерелами енхансери можуть збільшувати колонієутворення та нарощування біомаси клітин в десять-двадцять разів, в наших же дослідженнях цей

показник не був таким вираженим. Тому подальші досліди були направлені на розробку комбінацій різноманітних енхансерів та їх концентрацій для вибору оптимального співвідношення. На підставі результатів досліджень, описаних раніше [15], по впливу комбінованої дії енхансерів на ріст мікроорганізмів підібрано комплекс, що складався з енхансерів 2-бензилбензімідазол гідрохлоридом (А) та 6,7-діметокси-1-(3,4-діметоксибензил)-ізохіноліном (В) в концентрації 0,001 мг/мл. Ефект від впливу енхансерів в цій комбінації впливає з даних в таблиці 3. Експериментальні докази свідчать, що розроблене співвідношення стимуляторів росту бактерій позитивно впливає на збільшення та накопичення біомаси (в 2-3 рази), активує колонієутворення, а також приводять до підвищення біохімічних процесів, таких як ферментативна активність, посилення пігментації колоній та збільшення їх розмірів.

Таким чином, додавання в поживне середовище в розробленому оптимальному співвідношенні алостеричних активаторів аденозиндеамінази та фосфокінази - енхансерів 2-бензилбензімідазолу гідрохлориду – імідазолу (А) та 6,7-діметокси-1-(3,4-діметоксибензил)-ізохіноліну (В) (в концентрації 0,001мг/мл) обумовлюють деякі зміни біологічних властивостей тест-мікробів, що визивало підвищення швидкості росту, накопичення їх біомаси. Одержані результати свідчать, що комбінація енхансерів А і В в концентрації 0,001мг/мл в декілька разів збільшує кількість мікробних клітин у порівнянні з контролем. При цьому основні біологічні властивості штамів

бактерій і грибів, незважаючи на вплив стимуляторів росту, не змінювались.

**Таблиця 2. Вплив енхансерів на колонісутворюючу здатність мікроорганізмів та грибів.**

Час появи колоній, години	Показники концентрації енхансерів, мг/мл	Показники життєздатних бактерій, КУО/МЛ, (M± m), P<0,05	
		Bacillus subtilis ATCC 6633	Saccharomyces cerevisiae 1
6	0,1A	4,6±0,4	4,3±0,3
6	0,1B	4,7±0,2	4,2±0,5
10	<b>0,01A</b>	<b>7,8±0,8</b>	<b>7,5±0,4</b>
10	0,01B	5,9±0,5	5,1±0,3
16	<b>0,001A</b>	<b>6,5±0,4</b>	<b>7,6±0,5</b>
16	<b>0,001B</b>	<b>6,3±0,6</b>	<b>6,5±0,7</b>
16. Контрольне середовище		1,8±0,4	2,1±0,2

**Таблиця 3. Вплив комбінованої дії енхансерів на кінетику росту вивчаних штамів**

Концентрація енхансерів, %	Показники кількості мікробних клітин штамів мікроорганізмів, МЛРД/МЛ, (×10 <sup>9</sup> ) (M± m), P<0,05	
	Bacillus subtilis ATCC6633	Saccharomyces cerevisiae 1
0,01A 0,01B	9,2±0,6	9,9±0,8
0,001A 0,001B	11,2±0,8	12,1±0,6
Контрольне середовище	3,2±0,6	3,0±0,8

Результати, отримані в лабораторних дослідах, можуть бути використані в подальшому для розробки та удосконалення методу вирощування клітин мікроорганізмів-продуцентів в разі необхідності накопичення мікробної маси та одержання окремих продуктів метаболізму.

#### Список літератури

1. Росихин В.В. Биотехнология: введение в науку будущего [Текст] / В.В. Росихин – Х.: «Колорит». – 2005. – 286 с. – тираж 500 прим.
2. Евтушенко А.Н. Введение в биотехнологию [Текст] / А.Н. Евтушенко, Ю.К. Фомичев – Минск: Беларус. Универ., 2002, 105 с.
3. Глик Б. Молекулярная биотехнология [Текст] / Б. Глик, Дж. Пастернак. - М.: Мир, 2002. – 115 с.
4. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды [Текст] / А. Сассон – М.: Мир. -1987. -411 с.
5. Применение активных частот электромагнитного излучения миллиметрового и сантиметрового диапазона в микробиологии/ А.Х. Тамбиев, Н.Н. Кирикова, А.А. Лукьянов// Научные технологии. - 2002- №1. – С.26-33
6. Пирог Т.Б. Загальна мікробіологія: підручник [Текст] – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.

7. Адлова Г.П., Денисова С.В., Имиджев А.К. и др. Разработка стимуляторов роста бактерий из растений [Текст] / Г.П. Адлова, С.В. Денисова, А.К. Имиджев и др. //ЖМЭИ. – 1998. - №1. – С.13-17
8. Бельх И.А., Зинченко В.Д., Высеканцев И.П. Стимулирующее действие малых доз озона на рост микроорганизмов [Текст] / И.А. Бельх, В.Д. Зинченко, И.П. Высеканцев.//Проблемы криобиологии. – 2004. - № 4. – С.41-45
9. Баронец Н.Г. Получение стимуляторов роста микроорганизмов из лекарственных средств: [Текст] Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07/НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН. – М., 2004. – 23 с.
10. Шаймарданова Г.С., Камбург Р.А., Евстигнеева Р.П. Имидазол и его производные как биологически-активные вещества [Текст] / Г.С. Шаймарданова, Р.А. Камбург, Р.П. Евстигнеева //Хим.- фарм. журн. – 1992. – т.21. - №3. – С.31-38
11. Александров Б.В., Гаврилов М.С., Даутова Р.З., Ниязов Р.Х. Биологическая активность фторсодержащих производных 3,4-дигидроизохинолина [Текст] / Б.В. Александров, М.С. Гаврилов, Р.З. Даутова, Р.Х. Ниязов // Хим.- фарм. журн. – 1992. – т.26. - №1. – С.44-45

12. Витюк Н.В. Анализ связи структура-активность клофелин-подобных имидазолинов на основе перечисленного описания структуры молекулы [Текст] /Н.В. Витюк // Хим.- фарм. журн. – 1997. – т.31. - №4. – С.44-47

13. Лабораторные тесты. Микробиологическая и вирусологическая диагностика/Под ред.Турьянова М.Х., Каппа М. – Ч.1. – М.:Каппа, 1995. – 111 с.

14. Методы общей бактериологии: Пер. с англ. /Под ред. Ф. Герхардта. = Т. 2, М.:Мир, 1984., 472 с.

15. Мартинов А.В., Чупринова С.І., Осолодченко Т.П. та інш. Вплив комбінованої дії стимуляторів хімічного походження на швидкість приросту мікробної маси *Ps. aeguginosa* [Текст] /А.В. Мартинов, С.І. Чупринова, Т.П. Осолодченко, О.А.Батрак, Н.П. Завада, І.С. Рябова, Л.Г. Штикер // Аналіз Мечніківського інституту. – 2008. - № 3. – С 20-24

**УДК 579.61**

**ВПЛИВ ЕНХАНСЕРІВ НА ШВИДКІСТЬ ПРОЯВУ КОЛОНІЙ БАКТЕРІЙ ТА ГРИБІВ НА ЩІЛЬНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ**

**Осолодченко Т.П., Батрак О.А., Мізін В.В., Маланчук С.Г., Чупринова С.І., Завада Н.П., Рябова І.С., Штикер Л.Г.**

Вивчено вплив стимуляторів росту мікроорганізмів (енхансерів) на появу перших колоній та на збільшення біомаси мікробних клітин та клітин грибів. Досліджено, що ростові якості мікроорганізмів значно збільшуються на поживних середовищах з додаванням енхансерів ніж на стандартному МПА. Концентрація енхансерів не значно впливає на швидкість колонієутворення за визначений інтервал часу.

**Ключові слова:** мікроорганізми, гриби, поживне середовище, енхансери.

**УДК 579.61**

**ВЛИЯНИЕ ЭНХАНСЕРОВ НА СКОРОСТЬ ПОЯВЛЕНИЯ КОЛЛОНИЙ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ НА ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ**

**Осолодченко Т.П., Батрак Е.А., Мизин В.В., Маланчук С.Г., Чупринова С.И., Завада Н.П., Рябова И.С., Штыкер Л.Г.**

Изучено влияние стимуляторов роста микроорганизмов (энхансеров) на появление первых колоний и на увеличение биомассы микробных клеток и клеток грибов. Исследовано, что ростовые качества микроорганизмов значительно увеличиваются на питательных средах с добавлением энхансеров по сравнению со стандартным МПА. Концентрация энхансеров незначительно влияет на скорость колониеобразования за определенный интервал времени.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, грибы, питательная среда, энхансеры

**UDK 579.61**

**THE INFLUENCE OF ENHANCERS ON APPEARING RATE OF BACTERIALS AND FUNGOUS COLONIES**

**Osolodchenko T.P., Batrak E. A., Mizin V.V., Malanchuk S.G., Chuprinova S.I., Zavada N. P., Rjabova I.S., Shtiker L.G.**

Influence of growth factors of microorganisms (enhancers) on occurrence of the first colonies and on increase in a biomass of microbic cells and fungous is studied. It is investigated, that increase qualities of microorganisms considerably increase on nutrient mediums with addition enhancers in comparison with standards medium. Concentration enhancers slightly Influences speed of increase in a form make colony of microorganisms and mushrooms for the certain interval of time.

**Key words:** microorganisms, fungous, medium, enhancers