

УДК 579.61

**ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ СТИМУЛЯТОРІВ
ХІМІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ШВИДКІСТЬ
ПРИРОСТУ МІКРОБНОЇ МАСИ PSEUDOMO-
NAS AERUGINOSA**

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

**Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова АМН України»**

На протязі останнього десятиріччя все більшу актуальність здобувають дослідження по вивченню хімічних, фізичних, біологічних та інших стимулюючих факторів, здатних впливати на біологічні властивості мікроорганізмів – ферментативну та адгезивну активність, кінетику росту, захисні процеси та інші, а головне – придатних застосовуватися для прискорення колонієутворення, накопичення маси біотехнологічно значимих мікроорганізмів та стимулюванню продукції клітинами корисних сполук [1-9].

Водночас не можна не визначити, що біотехнологічні продукти мікробного походження в останній час займають все більшу нішу як серед лікарських засобів, так і серед технічних продуктів, тому інтенсивно продовжується пошук та моделювання речовин, здатних збільшувати як відсоток виходу біотехнологічних продуктів білкової природи, так і нарощування мікробної маси поза рамками фізіологічної норми, шляхом прискорення часу поділу клітин.[1, 10, 11] Вищесказане свідчить, що в основі цих біотехнологічних процесів полягає використання біохімічної активності мікроорганізмів .

Таким чином, слід визначити, що на цей час продовжує залишатися актуальною та перспективною проблема пошуку речовин, які можуть значно прискорювати нарощування більшої кількості рекомбінантних мікроорганізмів-продуцентів, що буде сприяти збільшенню відсотку виходу біотехнологічних продуктів, а також розробці та впровадженню нових ефективних та рентабельних технологій виробництва продуктів мікробного синтезу для потреб медичної мікробіології, біотехнології, фармації, ветеринарії, сільського господарства та багатьох галузей промисловості.

Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є пошук та використання стимуляторів росту мікробної маси, які могли б стати складовою комплексу поживного середовища за рахунок включення в нього активних речовин хімічного походження, або за рахунок безпосереднього впливу на саму клітину фізичних факторів – низькоенергетичних електромагнітних випромінювань, мішенню яких стануть клітинні мембрани мікроорганізмів та їх окремі ділянки [1, 5, 6, 7, 12].

Постійно зростаючі масштаби використання культур клітин як субстрату при виготовленні біопрепаратів і біологічно активних речовин зумовлюють необхідність пошуку та моделювання речовин, здатних збільшувати швидкість росту бактерій та накопичення біомаси.

Як свідчить огляд експериментальних та літературних джерел, останнім часом публікується багато наукових праць по вивченню стимулюючого впливу різних хімічних та фізичних чинників на біологічні властивості клітин. Широким спектром біологічної активності характеризуються імідазол і ізохінолін та їх похідні, які входять до структури багатьох природних і синтетичних сполук, що здатні значно індукувати збільшення мікробних клітин [6, 7].

В якості перспективних стимуляторів росту мікроорганізмів хімічного походження слід визначити неметаболичні енхансери - ізохінолін та імідазол (1,3-діазол) із групи алостеричних активаторів циклічного аденозинмонофосфату, які здатні, як свідчать літературні джерела, підвищувати як відсоток виходу біотехнологічних білкових продуктів, так і нарощування мікробної маси поза рамками фізіологічної норми (інколи в 10 та більше разів). Так, активатор аденозиндеамінази класу хінозолінів здатен в 10 разів збільшити рівень ц-АМФ в клітині, а спільно з активатором фосфокінази шляхом фосфорилування ферментів збільшити їх активність до 100 разів. Однією з мішеней для фосфорилування через ц-АМФ є ДНК-гідраза та ДНК-полімераза. Обидва ці ферменти приймають активну участь у поділенні клітин [12]. Таким чином, є теоретична можливість значно прискорити як швидкість напрацювання мікробної маси, так і швидкість синтезу мікроорганізмами білкових продуктів біотехнології.

Розвиток робіт по пошуку та вивченню сполук всередині ряду похідних ізохіноліну і імідазолу, які впливають на ланки внутріклітинного метаболізму, має мету знайти менш токсичні і більш активні та зручні для практичного використання сполуки, які будуть сприяти більш ефективним процесам ферментації мікроорганізмів. Дослідження впливу похідних ізохіноліну (2-бензилбензімідазол гідро хлорид) та імідазолу (6,7-діметокси-1 (3,4-діметоксибензил)-ізохінолін) на процеси росту та секрецію білково-полісахарідних комплексів штаму умовно-патогенного мікроорганізму *Pseudomonas aeruginosa* дасть можливість дослідити ферментативні процеси клітин цих бактерій, а головне, провести виділення, очистку та стандартизацію білково-полісахарідних комплексів, використання яких може значно поліпшити стан промислової та медичної біотехнології.

Виходячи з вищенаведеного, метою нашої наукової праці стало дослідити здатність алостеричних активаторів аденозінамінази та фосфокінази впливати на кінетику росту, біохімічну активність мікроорганізмів, прискорювати колоніє утворення, а також розробити оптимальні співвідношення ізохіноліну та імідазолу та їх комбінованої дії для прискорення накопичення мікробної маси *Pseudomonas aeruginosa*.

Викладені міркування дозволяють значно збільшити як відсоток виходу біотехнологічних білкових продуктів, так і нарощування мікробної маси поза рамками фізіологічної норми, що дає можливість вважати обрані співвідношення вивчаємих енхансерів потенційно перспективні для поглибленого

вивчення і подальшого використання в біотехнологічній та медичній практиці.

Досягнення перевіркою позитивного ефекту при цьому буде сприяти значному накопиченню біомаси клітин мікроорганізмів-продуцентів корисних речовин.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були культури тест-штамів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 66-16, отримані з музею живих культур мікроорганізмів Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України.

Вирощування бактерій проводили на поживному агарі. В якості підвищення швидкості приросту мікробної маси та збільшення відсотку виходу кінцевого продукту використовувались стимулятори росту мікроорганізмів хімічного походження - похідні ізохіноліну та імідазолу.

Дослідження впливу енхансерів на швидкість появи колоній мікроорганізмів, їх розміри, форми, біохімічні властивості мікроорганізмів проводили в концентраціях 0,1%, 0,01%, 0,001% та їх комбінаціях, як окремо, так і при сумісному використанні.

Критеріями оцінки впливу фізичних та хімічних чинників були: кількість клітин на початку стаціонарної фази росту, кінетика росту псевдомонад за приростом біомаси за визначену кількість часу, розмір та форми колоній, їх колір, стан, окраска по Граму.

Під час культивування спостерігали за динамікою росту культури за допомогою мікроскопічного дослідження. Концентрацію білка-токсину визначали спектрофотометрично. Контролем служили не оброблені хімічними індукторами тест-системи, засіяні в бульйонний субстрат. Усі види експериментальних

Таблиця 1. – Вплив енхансерів на кінетику росту *P. aeruginosa*

ЧАС ПОЯВИ КОЛОНІЙ, ГОДИНИ	ПОКАЗНИКИ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЕНХАНСЕРІВ, %	СЕРЕДНІ ПОКАЗНИКИ (M±) КОНЦЕНТРАЦІЇ МІКРОБНИХ КЛІТИН, МЛРД./МЛ (×10 ⁹), (P<0,05)		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 66-16
10	0,1A	4,2±0,1	5,1±0,4	4,9±0,4
10	0,1B	4,3±0,3	4,6±0,5	4,4±0,3
8	0,01A	5,8±0,7	5,5±0,4	5,7±0,5
8	0,01B	5,2±0,3	5,3±0,2	5,4±0,3
7	0,001A	7,9±0,7	7,7±0,6	7,3±0,4
7	0,001B	5,8±0,4	5,6±0,5	5,6±0,5
16	Контрольне середовище	3,2±0,2	3,4±0,1	3,5±0,3

Результати експериментів свідчать про те, що при засіві у10⁹ мікробні клітини досить швидко реагують на стимулюючий вплив активаторів і біомаса їх збільшується у порівнянні з контролем. Темпи приросту мікробних клітин найбільш високими були у дослідних зразках поживного середовища, до яких додавався активатор А в концентрації 0,001%,

зразків, разом з контролем вирощували при 37⁰С. Концентрацію мікробних клітин визначали через 18 та 24 години культивування.

Визначення кількості життєздатних мікроорганізмів проводили шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) у відповідній кількості посівного матеріалу.

Статистичну обробку одержаних результатів мікробіологічних експериментів проводили згідно статистичних методів при бактеріологічних дослідженнях.

Результати та обговорення

Виходячи з даних літератури відносно того, що одним із перспективних засобів підвищення як відсотку виходу біологічних білкових продуктів, так і нарощування мікробної маси інколи в 100 та більше разів, є використання активаторів алостеричних ферментів класу фосфокіназ та індукторів синтезу циклічних мононуклеотидів [12], здатних значно прискорювати швидкість напрацювання мікробної маси і синтез мікроорганізмами білкових продуктів біотехнології, в роботі проведено вивчення впливу стимуляторів росту мікроорганізмів групою алостеричних активаторів циклічного аденозинмонофосфату - 2-бензилбензімідазол гідрохлоридом (А) та 6,7-діметокси-1-(3,4-діметоксибензил)-ізохіноліном (В).

Дослідження вказують, що на кінетику росту тест-штамів синьогнійної палички впливало додавання енхансерів А і В в концентраціях 0,1%, 0,01%, 0,001 % до поживного середовища. Зміни інтенсивності росту патогенних псевдомонад відбувалися в сторону збільшення їх у порівнянні з контролем, про що свідчать дані, наведені в таблиці 1.

що свідчить про значне посилення біологічної активності вивчаємих тест-клітин мікроорганізмів.

Таким чином, похідні ізохіноліну та імідазолу, які додавалися до складу поживного середовища в наноконцентраціях, як стимулятори енергетичного та конструктивного метаболізму *P. aeruginosa*, прискорювали інтенсивність приросту мікробної маси. Найбільш виражений індукційний ефект щодо акти-

вності синьогнійної палички виявився у 2-бензилбензімідазолу гідро хлориду.

Дослідження впливу похідних імідазолу та ізохіноліну у вищенаведених концентраціях на колонієутворюючу здатність синьогнійної палички свідчить, що при концентрації енхансерів 0,01% кіль-

кість колоній збільшувалась. Найбільша ступінь росту досягалась при додаванні в поживне середовище енхансера А в концентрації 0,01%, де кількість колоній *P. aeruginosa* складала 7,6-7,8 за десятичним логарифмом. Дані наведені в таблиці 2.

Таблиця 2. – Вплив енхансерів на колонієутворюючу здатність синьогнійної палички

ЧАС ПОЯВИ КОЛОНІЙ, ГОДИНИ.	ПОКАЗНИКИ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЕНХАНСЕРІВ, %	СЕРЕДНІ ПОКАЗНИКИ ЖИТТЄЗДАТНИХ БАКТЕРІЙ, КУО/МЛ, (M±), P<0,05		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 66-16
10	0,1A	5,6±0,4	5,4±0,2	5,3±0,3
10	0,1B	4,7±0,2	4,8±0,3	4,6±0,4
8	0,01A	7,8±0,8	7,7±0,6	7,6±0,7
8	0,01B	5,9±0,5	5,8±0,2	5,9±0,6
7	0,001A	6,5±0,4	6,5±0,5	6,7±0,7
7	0,001B	6,9±0,6	6,8±0,6	6,7±0,7
16	Контрольне середовище	5,1±0,3	4,8±0,3	4,5±0,3

Слід також відзначити, що під впливом енхансерів спостерігалось посилення пігментації колоній, збільшення їх розмірів. Застосування активаторів впливало на час появи перших колоній. При концентрації 0,1% А та В перші колонії синьогнійної палички з'явилися після 10 годин інкубації. Концентрація 0,01% зменшила термін культивування і поява перших колоній мікроорганізмів реєструвалась після 8 годин. Внесення 0,001% розчину стимуляторів в середовище сприяло появи колоній через 7 годин.

Таким чином, із результатів досліджень, наведених в таблиці 2, встановлено, що додавання в поживне середовище енхансерів А та В позитивно впливає як на накопичення біомаси, так і на токсиноутворення та колонієутворюючу здатність псевдомонад.

За літературними джерелами енхансери можуть збільшувати колонієутворення та нарощування біомаси клітин в десять-двадцять разів, тоді як в наших дослідженнях цей показник був невеликим. Тому подальші дослідження були направлені на розробку комбінацій різноманітних енхансерів та їх концентрацій для вибору оптимального співвідношення.

На підставі результатів дослідження по впливу комбінованої дії енхансерів на ріст *P. aeruginosa* нами було підібрано комплекс, що складався з енхансерів 2-бензилбензімідазол гідрохлоридом (А) та 6,7-діметокси-1-(3,4-діметоксибензил)-ізохіноліном (В) в концентрації 0,001%.

Ефект від впливу даної комбінації енхансерів визначали по відношенню до контрольного середовища (вихідне середовище без енхансерів). Результати досліджень наведені в таблиці 3.

Таблиця 3. – Вплив комбінованої дії енхансерів на кінетику росту токсиноутворюючих псевдомонад

КОНЦЕНТРАЦІЯ ЕНХАНСЕРІВ, %	СЕРЕДНІ ПОКАЗНИКИ КІЛЬКОСТІ МІКРОБНИХ КЛІТИН ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ, МЛРД/МЛ, (×10 ⁹) (M±), P<0,05		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 66-16
0,01A 0,01B	9,2±0,6	9,1±0,8	10,2±0,7
0,001A 0,001B	11,2±0,8	11,3±0,9	10,4±0,8
Контрольне середовище	3,2±0,6	3,1±0,8	2,8±0,7

Одержані результати свідчать, що комбінація ехансерів А і В в концентраціях 0,001% значно збільшує кількість мікробних клітин у порівнянні з контролем. Експериментальні докази свідчать, що розроблене співвідношення стимуляторів росту бактерій позитивно впливає на збільшення та накопичення біомаси в декілька разів, активізує токсинуотворення, колонієутворення, а також приводять до активізації деяких біохімічних процесів.

Таблиця 4. – Вплив комбінованої дії ехансерів на концентрацію білку штаму *Pseudomonas aeruginosa* 66-16

КОНЦЕНТРАЦІЯ ЕХАНСЕРІВ, %	СЕРЕДНІ ПОКАЗНИКИ КОНЦЕНТРАЦІЇ БІЛКУ ШТАМУ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> 66-16 МГ/МЛ, (М±), P<0,05	
	За біуретовою реакцією	Спектрофотометричний метод
0,01% А,В	3,2±0,6	4,1±0,7
0,001% А,В	3,9±0,8	4,8±0,9
Контрольне середовище	2,1±0,5	2,4±0,6

На основі виконаних досліджень можна зробити висновок, що додавання в поживне середовище розробленого оптимального співвідношення алостеричних активаторів аденозиндеамінази та фосфокінази - ехансерів 2-бензилбензімідазолу гідрохлориду (А) та 6,7-діметокси-1-(3,4-діметоксибензил)-ізохіноліну (В) в концентрації 0,001% обумовлюють зміни біологічних властивостей вивчаємих мікроорганізмів, що визивало підвищення та прискорення виходу біомаси *Pseudomonas aeruginosa*, колонієутворення, сприяло накопиченню білку. При цьому біологічні властивості штамів мікроорганізмів, незважаючи на вплив стимуляторів росту бактерій, не змінювались.

Таким чином, експериментально доведено виражений стимулюючий вплив за рахунок комбінованої дії в наноконцентраціях похідних ізохіноліну та імідазолу на біологічні властивості клітин синьогнійної палички. Показана позитивна зміна показників кінетики росту, колонієутворення, накопичення білку та прискорювання приросту *Pseudomonas aeruginosa*.

Результати, отримані в лабораторних дослідах, можуть бути використані подальше для розробки та удосконалення способу вирощування *Pseudomonas aeruginosa* в разі необхідності накопичення мікробної маси та одержання окремих продуктів метаболізму.

Список літератури

1. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Бецкий О.В., Гуляев Ю.В. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы. – Монография. – М.: Радиотехника, 2003. – 175 с.
2. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Лукьянов А.А. Применение активных частот электромагнитного излучения миллиметрового и сантиметрового диапазона в микробиологии.// Наукоемкие технологии. - 2002- №1. – С.26-33
3. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. – Монография. – М.: Радио и связь, 1991. – 186 с.

Посилення біологічної активності мікроорганізмів під впливом ехансерів сприяє накопиченню не тільки загальної маси, але й збільшує кількість білка в клітині. Комбінація ехансерів А та В при концентрації 0,01% та 0,001% в два рази збільшує кількість білка штаму *Pseudomonas aeruginosa* 66-16 про що свідчать дані, наведені в таблиці 4.

4. Калініченко С.В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсинуотворюючих корінобактерій: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харків, Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова, 2006. – 24 с.

5. Шигаева М.Х. Стимуляция жизнедеятельности микроорганизмов и вирусов. Изд-во «Наука», Алма-Ата, 1986. – 184 с.

6. Шаймарданова Г.С., Камбург Р.А., Евстигнеева Р.П. и др. Имидазол и его производные как биологически активные вещества// Химико-фармацевтич. журнал. – 1992. - №3. – С.31-38

7. Ирадян М.А., Айвазян А.Х., Мирзоян В.С. и др. Производные имидазола. Синтез и биологическая активность производных 4-нитро-5-тиоимидазола// Хим.- фарм. журн.. – 1987. – т.21. - №6. – С. 667-672

8. Дрегваль О.А., Черватюк Н.В., Черевач Н.В. та інш. Вплив джерел мінерального живлення на ріст і токсинуотворення ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis*// Мікроб. журн. – 2003. – т. 65. - №3. – С.14-20

9. Адлова Г.П., Денисова С.В., Имиджев А.К. и др. Разработка стимуляторов роста бактерий из растений//ЖМЭИ. – 1998. - №1. – С13-17

10. Глик Б. Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М.: Мир, 2002. – 115 с.

11. Складков Д.А. Что может биотехнология. – М.: Знание, 1990. - №12. –

12. Балашов А.М., Панченко Л.Ф., Аллостерическая регуляция рецепторных систем.1. Кооперативное взаимодействие и функциональная регуляция. – Биохимическая химия, 2003, т. 49. - №6. – С. 517-541

- 13.Калініченко С.В. Вплив електромагнітних полів на мікроорганізми (огляд літератури) // Аналі Мечниківського Інституту. – 2005. - №1. – С.108-119 (www.imiamn.org/journal.htm)

УДК 579.61

ВПЛИВ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ СТИМУЛЯТОРІВ ХІМІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ШВИДКІСТЬ ПРИРОСТУ МІКРОБНОЇ МАСИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

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

Вивчено вплив комбінованої дії стимуляторів росту хімічного походження на швидкість приросту мікробної маси *Pseudomonas aeruginosa*. Експериментально доведено виражений стимулюючий вплив за рахунок комбінованої дії в наноконцентраціях похідних ізохіноліну та імідазолу на біологічні властивості клітин полички синього гною

Ключові слова: поживне середовище, стимулятори росту, *Pseudomonas aeruginosa*

УДК 579.61

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ СТИМУЛЯТОРОВ ХИМИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА СКОРОСТЬ ПРИРОСТА МИКРОБНОЙ МАССЫ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Мартинов А.В., Чупринова С.И, Осолодченко Т.П., Батрак О.А., Завада Н.П., Рябова И.С, Штикер Л.Г.

Изучено влияние комбинированного действия стимуляторов роста химического происхождения на скорость прироста микробной массы *Pseudomonas aeruginosa*. Экспериментально доказано выраженное стимулирующее влияние за счет комбинированного действия в наноконцентрациях производных изохинолина и имидазола на биологические свойства клеток синегнойной палочки.

Ключевые слова: питательная среда, стимуляторы роста, *Pseudomonas aeruginosa*

UDK 579.61

INFLUENCE OF THE CHEMICAL ENHANCERS COMBINED ACTION ON GROWTH OF MICROBAL MASS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Martynov A.V., Chuprinova S.I., Osolodchenko TP., Batrak E.A., Zavada N.P., Ryabova I.S, Shtiker I.G.

The chemical growth factors (enhancers) joint influence is studied on speed of microbial mass growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Experimentally well-proven the expressed stimulant influence due to the combined action of isochinolin's and imidasol's derivatives on biological properties of *P. aeruginosa*

Keywords: nourishing environment, growth factors, *Pseudomonas aeruginosa*