

**ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ
LACTOBACILLUS PLANTARUM, ОТРИМАНИХ ЗА РІЗНИХ УМОВ
ГАЗОВОГО СКЛАДУ АТМОСФЕРИ КУЛЬТИВУВАННЯ
ТА ВПЛИВУ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ**

**Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України» (м. Харків)**

***Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України (м. Харків)**

kalinichenko_sv@ukr.net

Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи лабораторії профілактики краплинних інфекцій ДУ «ІМІ НАМН» «Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль», № держ. реєстрації 0113U001517.

Вступ. Відомо, що бактерії роду *Lactobacillus* є невід'ємною складовою нормальної мікробіоти організму людини, яка відіграє значну роль у створенні високої колонізаційної резистентності слизових оболонок до патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, підтримує на оптимальному рівні метаболічні процеси і імунологічну реактивність макроорганізму, сприяє регенерації епітелію слизової оболонки, тощо [6, 13, 19, 23, 24]. Позитивний вплив лактобактерій на організм людини обумовлений не тільки їх високою здатністю до цитоадгезії та колонізації, а й високими антагоністичними властивостями у біоценозі завдяки продукції антимікробних сполук білкового походження (бактеріоцинів), які отримали назву «плантарицини» завдяки *L. plantarum* [17, 21]. Плантарицини – це катіонні термостабільні пептиди з молекулярною вагою менш 10 кДа (найчастіше в межах 2-6 кДа) [17]. Активність та рівень їх продукції залежить від умов, в яких знаходяться лактобактерії, і контролюється трикомпонентною системою регулювання. до складу зазначеної системи входять сигнальний пептид (феромон), сенсорна гістідінкіназа й білок-регулятор, що активує транскрипцію. Стійкість продуцента до дії власного бактеріоцину забезпечується, так званим, «білком імунітету» [12]. Відомі наступні етапи ушкоджуючої дії плантарицинів: взаємодія ефекторних пептидів з мембраною чутливої клітини, позиціонування пептиду в області з'єднання з білковим рецептором, занурення в серцевину мембран спіральної структури з утворенням пори і виснаження пулу АТФ [12, 17]. Антимікробні пептиди (АМП) лактобацил здатні впливати на септоутворення у грибів, синтез пептидоглікану і білку клітин бактерій, цитоплазматичну мембрану конкурентів, викликаючи її дестабілізацію шляхом пороутворення, яке призводить до нерегульованого виходу із клітини важливих речовин і, таким чином, сприяє загибелі клітини-мішені [12, 17, 21].

Умови в біологічних нішах людського організму можуть суттєво відрізнятися від створених *in vitro* за багатьма параметрами, у тому числі і за газовим складом атмосфери інкубації. Таке допущення базується на даних літератури відносно біологічних властивостей окремих представників умовно-патогенних бактерій, що персистують у мікроаерофільних нішах ротової порожнини, шлунково-кишкового й урогенітального трактів, гранульоматозних та некротичних ділянках легень [20]. Під впливом низьких концентрацій кисню асоціанти набувають стану нереплікаційної персистенції (NRP) (*Mycobacterium tuberculosis*), чи значно посилюють антагоністичні властивості (штами *Aerococcus viridans* та *Lactobacillus* spp.), інвазивність (*Salmonella typhimurium* та *Mycobacterium avium*), здатність до формування біоплівки (*Streptococcus mutans*), або меншою мірою проявляють деякі біологічні ознаки порівняно з бактеріями за аеробних умов культивування [16]. Більшість штамів лактобактерій являються аеротолерантними, але оптимальними для їх існування є мікроаерофільні умови [10, 12].

Вивчення біологічних ефектів та механізмів дії електромагнітних випромінювань (ЕМВ) представляє інтерес для багатьох дослідників, оскільки надає можливість керування фізіологічними процесами біооб'єктів, а також розширює арсенал засобів боротьби з інфекційними хворобами в медицині та мікробіології [1, 2, 8, 18].

У доступній нам літературі ми не знайшли даних щодо вивчення продукування лактобактеріями АМП за умов впливу фізичних чинників та різних умов газового складу атмосфери культивування.

Виходячи з вищезазначеного нами була поставлена наступна **мета**: провести хроматографічний аналіз екзометаболітів, отриманих за умов впливу фізичних чинників на *L. plantarum* та різних умов газового складу атмосфери культивування штаму-продуцента.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження були екзометаболіти *L. plantarum*. Для отримання і вивчення фракцій пептидів відібрано штам *L. plantarum*, вилучений з кишечника бджіл, який мав найвищу антагоністичну властивість відносно більшості тест-культур [4].

Суспензію мікроорганізмів готували відповідно до оптичного стандарту каламутності 1,0 одиниць по шкалі McFarland за допомогою електронного приладу Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм) згідно з інструкцією до приладу та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ [22]. Синхронізацію культур проводили за допомогою дії низької температури [2, 3].

Мікроаерофільні умови культивування створювали у мікроанаеростатах за допомогою газогенеруючих пакетів Generator GENbox microaer (bioMerieux, Франція).

Обладнання для опромінення електромагнітними хвилями та ультразвуком біооб'єкту було надано Інститутом радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України (свідоцтво про атестацію № 100-3919/2014, чинне до 27.01.2017 р., видане 28.01.2014 р. ДП «Харківський регіональний науково-виробничий центр стандартизації, метрології та сертифікації») згідно з договором про науково-практичне співробітництво від 01.09.2009 р.

Для опромінення мікроорганізмів електромагнітним полем у вузьких смугах частот (квазігармонійний сигнал) НЗВЧ-діапазону використані генератори сигналів Г4-141 ($f_1=37,5-53,57$) ГГц і Г4-142 ($f_2=53,57-78,33$) ГГц. Пробірки з культурами при кімнатній температурі, без перемішування, розташовували поблизу від розкриття прямокутного рупору з перерізом 6,0x5,0 см (для генератора Г4-141) та 8,5x6,5 см (для генератора Г4-142). Під час опромінення електромагнітним полем об'єкти знаходилися на відстані $L \approx 5-7$ см від площини апертури, тобто в ближній зоні антени. У місці їх розташування щільність потоку потужності (ЩПП) досягала величин $\sim 0,1$ мВт/см² при нерівномірності опромінення в місці розташування об'єктів не більше 3 дБ, що пов'язано зі специфікою ближньої зони, кінцевими розмірами апертури та опромінюваних об'єктів, а також низьким імпедансом навантаження.

Джерелом ультразвукового випромінювання служив низькочастотний генератор сигналів ГЗ-109, навантажений на кільцевий пьезокерамічний перетворювач-випромінювач типу ЦТС та ультразвуковий генератор ГЗ-Ф. Пробірки з бактеріальною суспензією розташовувалися в ближній зоні випромінювача. Опромінення проведено в водному середовищі.

Хроматографічні дослідження проводили методом гель-фільтраційної (ексклюзивної або гель-проникаючої або ситової) хроматографії [14]. Дослідження проведені спільно з Інститутом проблем кріобіології і кріомедицини НАН України згідно з договором про науково-практичне співробітництво.

Статистична обробка даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової й альтернативної варіаційної статистики, як викладено у посібниках [5, 7, 11, 15]. Для вибірок оцінювалась відповідність емпіричних розподілів нормальному закону (розподілення Гауса) за критеріями Колмогорова-Смірнова, Шапіро-Уїлка та Ліллієфорса. Якщо розподіл досліджуваних вибірок відрізнявся від нормального, для обробки даних використовували непараметричні

критерії: Манна-Уїтні, Краскала-Уолліса, Вілкоксона, критерій знаків. Достовірність розбіжностей нормально розподілених величин визначали за допомогою критерію t – Ст'юдента, з обчисленням середньої величини M , середньоквадратичного відхилення S , середньої похибки величини m , значення достовірності p . Для аналізу одержаного матеріалу проводили його групування за атрибутивними та варіаційними ознаками [5, 7, 11, 15]. У результаті зведення матеріалу при підрахунках одиниць спостережень були отримані абсолютні числа, які виражали описові і кількісні ознаки.

Результати досліджень та їх обговорення.

Першим етапом дослідження стало вивчення фракційного складу екзометаболітів *L. plantarum* за різних умов газового складу атмосфери культивування (аеробні та мікроаерофільні). Це пов'язане з тим, що атмосфера зниженого парціального тиску кисню та підвищеного вмісту вуглекислого газу певною мірою відтворює умови перебування лактобактерій *in vivo*.

При аналізі результатів гель-фільтраційної хроматографії було встановлено наявність множини однозарядних компонентів білкової низькомолекулярної матриці (маса/заряд 300-900), що входили до складу поживного середовища MRS. У всіх досліджених екзометаболітах *L. plantarum*, крім низькомолекулярних пептидів, були виявлені пептиди з відносно високою молекулярною вагою (м.в.): 1195-7670 Да. Оскільки, за даними літератури, молекулярна вага плантарицинів знаходиться в межах 2-6 кДа, пептиди з м.в. 12 кДа та більше не відбирались.

З екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих за аеробних умов культивування, було виділено 9 фракцій мікробних пептидів з молекулярною вагою від 546 до 5667 Да. Питома вага фракцій з м.в. до 1 кДа становила 10,7%, від 1 до 2 кДа – 13,1%, від 2 до 6 кДа – 71%, 12 кДа та більше – 5,2% від загальної кількості мікробних пептидів (табл. 1).

Таблиця 1

Питома вага пептидних фракцій за різних умов газового складу атмосфери культивування *L. plantarum*

Фракція	Молекулярна вага, Да ($M \pm m$)	Умови культивування	
		Аеробні	Мікро-аерофільні
0	≥ 12000	5,2%	4,7%
Aa	7300 ± 370	-	-
A	5580 ± 87	51,3%	58,8%
B	3710 ± 125	8,8%	7,3%
C	3030 ± 29	10,9%	7,9%
D	2330 ± 63	-	2,8%
E	1780 ± 36	3,4%	2,7%
F	1460 ± 16	5,5%	4,7%
G	1220 ± 25	4,2%	3,2%
H	870 ± 20	6,5%	4,4%
I	550 ± 4	4,2%	3,5%

З екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих при культивуванні за умов атмосфери зниженого парціального тиску кисню та підвищеного вмісту вуглекислого газу, було виділено 10 фракцій мікробних пептидів. Питома вага пептидів з молекулярною вагою від 2 до 6 кДа становила 76,8%, з м.в. до 1 кДа – 7,9%, з м.в. Від 1 до 2 кДа – 10,6%, 12 кДа та більше – 4,7% від загальної кількості (табл.1).

Визначено, що за аеробних умов культивування *L. plantarum* фракція D (м.в. 2267-2393 Да) була відсутня, тоді як за мікроаерофільних – кількість пептидів із зазначеною м.в. становила 2,8% від загальної кількості мікробних пептидів.

Порівняльний аналіз показав, що питома вага пептидів з м.в. до 1 кДа за мікроаерофільних умов газового складу культивування була в 1,35 рази ($p < 0,01$), а з м.в. Від 1 до 2 кДа – 1,2 рази ($p < 0,05$) нижчою порівняно з аеробними умовами. Проте, питома вага пептидів з молекулярною вагою від 2 до 6 кДа за мікроаерофільних умов культивування була більшою у порівнянні з аеробними умовами (76,8% проти 71%). На наш погляд, це пов'язано з тим, що лактобактерії являються мікроаерофілами, тому більш сприятливими умовами для їх розвитку є атмосфера з підвищеним вмістом вуглекислого газу та зниженим парціальним тиском кисню.

Таким чином, експериментально визначено, що за умов атмосфери зниженого парціального тиску кисню у *L. plantarum* відбувалась стимуляція продукування пептидів з м.в. 2-6 кДа (можливі плантарицини) та знижувалась питома вага низькомолекулярних білків поживного середовища, що опосередковано вказує на краще усвоєння поживних речовин з середовища та збільшення антагоністичної активності штама-продуцента. Останнє підтверджено відповідними результатами [9].

Відомі дослідження впливу міліметрових і ультразвукових хвиль на умовно-патогенну та патогенну групу бактерій, але, у доступних публікаціях, ми не знайшли даних щодо мінливості представників нормофлори людини за впливу зазначених фізичних чинників та різних умов газового складу атмосфери культивування [1, 8, 16].

Наступним етапом стало вивчення фракційного скла-

ду екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих за різних умов газового складу атмосфери культивування та впливу фізичних чинників.

З екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих за аеробних умов культивування після обробки штаму-продуценту міліметровими хвилями в частотному діапазоні 61,0 ГГц (МХВ 61,0 ГГц) було виділено 10 фракцій мікробних пептидів з молекулярною вагою від 546 до 7670 Да (табл. 2).

Питома вага фракцій з м.в. до 1 кДа становила 23,7%, від 1 до 2 кДа – 21,9%, від 2 до 6 кДа – 24,2%, 12 кДа та більше – 2,9% від загальної кількості мікробних пептидів. Тільки за вищезазначених умов досліду з екзометаболітів *L. plantarum* виділялась фракція Аа

Таблиця 2

Питома вага пептидних фракцій за умов впливу фізичних чинників на штам-продуцент (аеробні умови культивування)

Фракція	Молекулярна вага, Да (M±m)	Контроль	Фізичні чинники			
			МХВ 61,0 ГГц	МХВ 42,2 ГГц	УЗ ГЗ-109	УЗ ГЗ-Ф
0	≥12000	5,2%	2,9%	7,7%	6,0%	5,3%
Аа	7300±370	-	27,3%	-	-	-
А	5580±87	51,3%	12,6%	51,5%	56,3%	51,2%
В	3710±125	8,8%	6,6%	8,4%	7,5%	8,3%
С	3020±29	10,9%	-	9,2%	9,0%	8,8%
Д	2330±63	-	5,0%	1,8%	2,2%	2,9%
Е	1780±36	3,4%	2,9%	2,7%	2,9%	3,2%
F	1460±16	5,5%	4,8%	5,1%	4,3%	5,6%
G	1220±25	4,2%	14,2%	3,2%	3,2%	4,2%
Н	870±20	6,5%	14,3%	4,9%	4,6%	6,2%
І	550±4	4,2%	9,4%	5,5%	4,0%	4,3%

Таблиця 3

Питома вага пептидних фракцій за умов впливу фізичних чинників на штам-продуцент (мікроаерофільні умови культивування)

Фракція	Молекулярна вага, Да (M±m)	Контроль	Фізичні чинники			
			МХВ 61,0 ГГц	МХВ 42,2 ГГц	УЗ ГЗ-109	УЗ ГЗ-Ф
0	≥12000	4,7%	5,2%	7,5%	4,9%	4,9%
Аа	7300±370	-	-	-	-	-
А	5580±87	58,8%	59,5%	59,4%	56,6%	60,3%
В	3710±125	7,3%	3,7%	6,2%	9,1%	7,1%
С	3020±29	7,9%	12,3%	8,4%	8,5%	8,4%
Д	2330±63	2,8%	-	-	1,8%	1,8%
Е	1780±36	2,7%	3,4%	2,6%	2,4%	2,5%
F	1460±16	4,7%	5,4%	5,0%	4,6%	4,5%
G	1220±25	3,2%	3,2%	3,1%	3,6%	3,2%
Н	870±20	4,4%	4,0%	4,3%	3,9%	4,6%
І	550±4	3,5%	3,3%	3,5%	4,6%	2,7%

(м.в. 6930-7670 Да) – 27,3% від загальної кількості мікробних пептидів та була відсутня фракція С (м.в. 2991-3049 Да).

Порівняльний аналіз результатів хроматографії екзометаболітів, отриманих після обробки штаму-продуценту міліметровими хвилями в частотному діапазоні 61,0 ГГц при культивуванні в аеробних умовах, встановив, що питома вага пептидів з м.в. до 1 кДа була в 2,2 рази ($p < 0,01$), а з м.в. Від 1 до 2 кДа – 1,6 рази ($p < 0,01$) вищою порівняно з контролем (екзометаболіти отримані від неопроміненої культури *L. plantarum* за аеробних умов культивування). Питома вага пептидів з молекулярною вагою від 2 до 6 кДа, навпроти, знижувалась, в середньому, в 2,9 разів ($p < 0,01$). Навіть з урахуванням нової фракції Аа, питома вага можливих плантарицинів все одно була низкою, порівняно з контролем, в 1,37 рази ($p < 0,05$).

З екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих за аеробних умов культивування після обробки штаму-продуценту міліметровими хвилями в частотному діапазоні 42,2 ГГц (МХВ 42,2 ГГц) було виділено 10 фракцій мікробних пептидів з молекулярною вагою від 546 до 5667 Да. За зазначених умов досліду виділялись мікробні пептиди з м.в. 2267-2393 Да (фракція D), які були відсутні в контролі.

При порівнянні результатів хроматографії екзометаболітів, отриманих за аеробних умов культивування після обробки *L. plantarum* ультразвуковими хвилями потужністю 5 Вт з частотою випромінювання 60 кГц (УЗ ГЗ-109), з екзометаболітами контролю з'ясовано, що питома вага пептидів з м.в. до 1 кДа та м.в. Від 1 до 2 кДа – була в 1,2-1,3 рази ($p < 0,05$) нижче, а питома вага пептидів з молекулярною вагою від 2 до 6 кДа збільшувалась (відповідно 75% проти 71%).

Обробка штаму-продуценту ультразвуковими хвилями потужністю 16 Вт з частотою випромінювання 18 кГц (УЗ ГЗ-Ф) не призводила до суттєвих змін у фракційному складі екзометаболітів *L. plantarum*.

Узагальнюючи результати дослідження зазначимо, що за аеробних умов культивування після впливу фізичних чинників відбувалась зміна фракційного складу екзометаболітів штаму-продуценту: в екзометаболітах вилучались мікробні пептиди з молекулярною вагою 2267-2393 Да (фракція D). Питома вага зазначеної фракції становила від 1,8% до 5,0% проти 0% в контролі. При дослідженні екзометаболітів після обробки *L. plantarum* міліметровими хвилями в частотному діапазоні 61,0 ГГц були відсутні мікробні пептиди з молекулярною вагою 2991-3049 Да (фракція С), тоді як у контролі питома вага цих пептидів становила 10,9%. При зазначеному режимі вилучались мікробні пептиди з м.в. 6930-7670 Да (фракція Аа), які були відсутні в інших досліджених пробах.

Наступною ланкою стало вивчення фракційного складу екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих за мікроаерофільних умов газового складу атмосфери культивування та впливу фізичних чинників (табл. 3).

З екзометаболітів *L. plantarum*, отриманих за мікроаерофільних умов культивування після обробки штаму-продуценту міліметровими хвилями в частотних діапазонах 61,0 і 42,2 ГГц було виділено по 9 фракцій мікробних пептидів з молекулярною вагою від 546 до 5667 Да. У порівнянні з контролем (екзометаболі-

ти отримані від неопроміненої культури *L. plantarum* за мікроаерофільних умов культивування), при цих режимах впливу, в екзометаболітах були відсутні мікробні пептиди з м.в. 2267-2393 Да (фракція D).

Опромінення *L. plantarum* міліметровими хвилями в частотному діапазоні 61,0 ГГц стимулювало утворення в мікроаерофільних умовах культивування пептидів з м.в. Від 1 до 2 кДа в 1,1-1,2 рази ($p < 0,05$), з м.в. 2991-3049 – в 1,55 разів ($p < 0,05$) та пригнічувало утворення пептидів з м.в. 3585-3835 в 1,97 разів ($p < 0,01$). Опромінення *L. plantarum* міліметровими хвилями в частотному діапазоні 42,2 ГГц не призводило до суттєвих змін порівняно з контролем фракційного складу екзометаболітів.

При обробці штаму-продуценту ультразвуковими хвилями в екзометаболітах (в обох випадках), у порівнянні з контролем, питома вага пептидів фракції D знижувалась в 1,55 разів ($p < 0,05$). Питома вага фракцій з м.в. до 1 кДа, від 1 до 2 кДа, від 2 до 6 кДа, від 12 кДа та більше була на рівні показників контролю.

Таким чином встановлено, що після опромінення *L. plantarum* ультразвуковими хвилями продукування штамом-продуцентом мікробних пептидів з молекулярною вагою 2267-2293 Да (фракція D) знижувалось в 1,55 разів, після обробки міліметровими хвилями в частотних діапазонах 42,2 і 61,0 ГГц зазначена фракція пептидів зовсім не вилучалась.

Висновки.

Визначено, що рівень продукції мікробних пептидів залежить від умов, в яких знаходиться штам-продуцент.

За умов атмосфери зниженого парціального тиску кисню у *L. plantarum* відбувалась стимуляція продукування пептидів з м.в. 2-6 кДа та знижувалась питома вага низькомолекулярних білків поживного середовища.

Обробка штаму-продуценту міліметровими хвилями в частотному діапазоні 61,0 ГГц з наступним культивуванням в аеробних умовах газового складу атмосфери призводила до зниження продукування штамом *L. plantarum* мікробних пептидів з молекулярною вагою від 2 до 6 кДа, в 2,9 рази.

Екзометаболіти, отримані за умов атмосфери зниженого парціального тиску кисню після опромінення *L. plantarum* міліметровими хвилями не містили пептидних білків з м.в. 2267-2293 Да, а після обробки УЗ хвилями – їх питома вага знижувалась в 1,55 рази порівняно з контролем.

Отримані результати щодо культивування *L. plantarum* за мікроаерофільних умов газового складу розкривають перспективність розробки технологій, спрямованих на підвищення ефективності одержання антибіотикоподібних речовин.

Перспективи подальших досліджень. Експериментальні результати щодо культивування тест-культур лактобактерій за умов зниженого парціального тиску кисню та підвищеного вмісту вуглекислого газу розкривають перспективність їх використання в біотехнологічних процесах, оскільки підвищують біологічні властивості *Lactobacillus* spp., а це, в свою чергу, сприятиме отриманню високоактивних метаболітичних речовин для створення синбіотичних препаратів, спрямованих проти патогенів.

Література

1. Антушева Т.І. Біологічні властивості штамів *Corynebacterium diphtheriae* та оцінка повноти детоксикації екзотоксину при застосуванні фізичних чинників [Текст] : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Антушева Тетяна Іванівна ; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. – Київ, 2014. – 24 с.
2. Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами [Текст] / И.А. Баснакьян. – М. : Медицина, 1992. – С. 29-59.
3. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий [Текст] / И.А. Баснакьян. – М. : Медицина, 2003. – 136 с.: ил. ISBN 5-225-04368-2
4. Біологічні основи розробки синбіотичних комплексів за умов застосування електромагнітних й ультразвукових хвиль [Текст] : звіт про НДР (проміжний) 20.01.13 / ДУ «ІМІ НАМН» ; керівн. Є. М. Бабич ; викон. : С. В. Калініченко [та ін.]. – Х., 2013. – 62 с. – Інв. № 0113U001517.
5. Боровиков В. П. Statistica. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows [Текст] / В. П. Боровиков, И. П. Боровиков. – М. : Филінь, 1998. – 592 с.
6. Войда Ю. В. Микробиология человека и роль пробиотических препаратов в терапии гнойно-воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии [Текст] / Ю. В. Войда, Н. Л. Солонина // Annals of Mechnikov Institute. – 2012. – № 2. – С. 27-37. [Електронний ресурс] Режим доступу : http://archive.nbuv.gov.ua/e-journals/AMI/2012_2/12vyvmcr.pdf.
7. Гельман В. Я. Медицинская информатика: практикум [Текст] / В. Я. Гельман. – [2-е изд.]. – СПб. : Питер, 2002. – 480 с.
8. Калініченко С. В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсиноутворюючих коринебактерій [Текст] : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Калініченко Світлана Вікторівна; Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України. – Харків, 2006. – 24 с.
9. Калиниченко С. В. Антагонистическая активность штаммов *Lactobacillus* spp. до и после воздействия миллиметровых волн в разных условиях газового состава атмосферы культивирования [Текст] / С. В. Калиниченко [и др.] // Вестник РГМУ (Материалы X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых, Москва, 19 марта 2015 г.). – 2015. – № 2. – С. 281.
10. Кур'ята Н. В. Адгезивні та імуномодельючі властивості бактерій роду *Lactobacillus* [Текст] : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Кур'ята Ніна Володимирівна; Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова. – Одеса, 2005. – 24 с.
11. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel [Текст] / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2000. – 320 с. – ISBN 966-7632-16-4.
12. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология [Текст] : [учебник для вузов] : под ред. акад. РАМН А.А. Воробьева. – М. : МИА, 2004. – 691 с.: ил. – 5000 экз. – ISBN 5-89481-209-7.
13. Мокрозуб В. В. Ефективність застосування штамів лакто- та біфідобактерій з препаратами цитокінів при експериментальній стафілококовій інфекції [Текст] : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Мокрозуб Вікторія Вікторівна; Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного Національної академії наук України. – К., 2014. – 22 с.
14. Препаративная жидкостная хроматография [Текст] : Пер. с англ. / Б. Бидлингмейер [и др.] / Под ред. Б. Бидлингмейера. – М. : Мир, 1990. – 360 с.
15. Прикладная медицинская статистика [Текст] / [под ред. В. М. Зайцева, В. Г. Лифляндского]. – СПб. : СПбГМА им. И. И. Мечникова, 2000. – 299 с.
16. Рыжкова Т. А. Мікробіологічна характеристика мікрофлори мигдаликів, *Corynebacterium diphtheriae* та особливості міжбактеріальних взаємовідносин за аеробних і мікроаерофільних умов [Текст] : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Рыжкова Тетяна Анатоліївна ; ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України». – Харків, 2009. – 24.
17. Рыбальченко, О. В. Антимикробные пептиды лактобацилл [Текст] / О. В. Рыбальченко, О. Г. Орлова, В. М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2013. – № 4. – С. 89-100.
18. Рыжкова Т. А. Влияние электромагнитных полей миллиметрового диапазона на антагонистическую активность лактобактерий [Текст] / Рыжкова Т.А. [и др.] // Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье : XVII Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей (с международным участием). – Санкт-Петербург, 2014. – С. 378-379.
19. Сизенцов А. Н. Эффективность совместного применения пробиотиков и антибиотиков в условиях *in vitro* [Текст] / А. Н. Сизенцов, Р. В. Ильясова // Весник ОГУ. – 2011. – № 12 (131). – С. 355-357.
20. Скляр Н. І. Взаємовідносини асоціантів мукозної мікрофлори шлунка та дванадцятипалої кишки у хворих на запально-виразкову патологію гастродуоденального тракту [Текст] : автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Скляр Надія Іванівна; Харківський НДІ мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова – Х., 2005. – 22 с.
21. Соболева А. В. Хромато-масс-спектрометрический анализ антимикробных пептидов из культуры *Lactobacillus plantarum* 8РА-3 [Електронний ресурс] / А. В. Соболева, А. А. Колобов, Т. В. Гришина // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 3. Режим доступу : <http://www.science-education.ru/pdf/2014/3/576.pdf>.
22. Стандартизація приготування мікробних суспензій [Текст] : Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 К. : (Укрмедпатентінформ), 2006. – 10 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
23. Янковский Д. С. Микрофлора и здоровье человека [Текст] / Д. С. Янковский, Г. С. Дымент. – К. : ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
24. Susanne Hempel. Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea: A Systematic Review and Meta-analysis Probiotics for Antibiotic-Associated Diarrhea [Text] / Susanne Hempel [et al.] // JAMA. – 2012. – Vol. 307 (18). – P. 1959-1969.

УДК 57.04:[537.868+534-8]:579.262

ХРОМАТОГРАФІЧНИЙ АНАЛІЗ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ОТРИМАНИХ ЗА РІЗНИХ УМОВ ГАЗОВОГО СКЛАДУ АТМОСФЕРИ КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ВПЛИВУ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ **Калініченко С.В., Коротких О.О., Бабич Є.М., Ківва Ф.В., Коваленко О.І.**

Резюме. У роботі наведено данні щодо вивчення фракційного складу екзометаболітів *L. plantarum*. Значений штам був вилучений з кишечника бджіл, мав найвищу антагоністичну активність відносно більшості тест-культур, тому і був використаний в якості штаму-кандидату для продукування біологічно активних сполук, які можна буде застосовувати для конструювання пробіотиків метаболітного ряду. Вперше вивчено фракційний склад екзометаболітів штаму-продуценту, отриманих за умов впливу фізичних чинників та різних умов газового складу атмосфери культивування. Встановлено, що рівень продукції мікробних пептидів залежить від умов, в яких знаходяться штам-продуцент. Так, за аеробних умов культивування *L. plantarum* мікробні пептиди з м.в. 2267-2393 Да були відсутні, тоді як за мікроаерофільних – кількість пептидів із зазначеною м.в. становила 2,8% від їх загальної кількості. З'ясовано, що електромагнітні хвилі та ультразвукові коливання здатні впливати на біологічні властивості *L. plantarum* та модулювати продукування біологічно активних речовин. Отримані дані можуть бути використані в біотехнологічних процесах.

Ключові слова: лактобактерії, продуценти, екзометаболіти, мікробні пептиди, пробіотики.

УДК 57.04:[537.868+534-8]:579.262

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ПОЛУЧЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ГАЗОВОГО СОСТАВА АТМОСФЕРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПРИ ВЛИЯНИИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ **Калиниченко С.В., Коротких Е.О., Бабич Е.М., Кивва Ф.В., Коваленко О.И.**

Резюме. В работе приведены данные по изучению фракционного состава экзометаболитов *L. plantarum*. Указанный штамм был выделен из кишечника пчел, имел самую высокую антагонистическую активность в отношении большинства тест-культур, поэтому и был использован в качестве штамма-кандидата для производства биологически активных соединений, которые можно будет применять в конструировании пробиотиков метаболитного типа. Впервые изучен фракционный состав экзометаболитов данного штамма-продуцента, полученных после воздействия физических факторов и культивирования в различных условиях газового состава атмосферы. Установлено, что уровень продукции микробных пептидов зависит от условий, в которых находился штамм-продуцент. Так, при аэробных условиях культивирования *L. plantarum* микробные пептиды с м.в. 2267-2393 Да отсутствовали, тогда как при культивировании в микроаэрофильных – количество пептидов с указанной м.в. составила 2,8% от их общего количества. Установлено, что электромагнитные и ультразвуковые волны способны влиять на биологические свойства *L. plantarum* и модулировать продуцирование биологически активных веществ. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологических процессах.

Ключевые слова: лактобактерии, продуценты, экзометаболиты, микробные пептиды, пробиотики.

UDC 57.04:[537.868+534-8]:579.262

Chromatographic Analysis of Exometabolites *Lactobacillus Plantarum*, Obtained in Different Conditions of the Gas Composition of the Atmosphere of Cultivation and after Influence of Physical Factors **Kalinichenko S.V., Korotkykh O.O., Babych E.M. Kivva F.V., Kovaneko O.I.**

Abstract. In recent years, new approaches to the treatment associated with the restoration of the natural ecology of the organism and based on the use of active biological products have proliferated. Normalization of the altered microbial landscape of the body by means of bacterial and biological products is one aspect of this approach.

Eubiotics constitute the most important group of bacterial preparations. Eubiotics – medicines containing as active ingredient certain strains of representatives of healthy microflora in human organism. It is known that bacteria normally colonizing mucous exert antagonistic action against pathogenic and conditionally microflora provide vitamin- and enzymatic functions.

Bacteria of the genus *Lactobacillus* are an integral part of the normal microbiota of the human body. They play a significant role in the creation of high colonization resistance to pathogenic and opportunistic pathogenic microorganisms in the mucous membranes. They also maintain an optimal level of metabolism and immunological reactivity of macroorganism. They promote regeneration of mucosal epithelium, etc. The positive effect of lactobacilli on the human body is determined by the high capacity to cytoadhesion and colonization. And highly antagonistic properties in the biocenosis because of production of antimicrobial protein origin compounds (bacteriocins), which are called "plantaricin" due to *L. plantarum*. Plantaricin – is thermostable cationic peptides with a molecular weight less than 10 kDa (usually within 2-6 kDa). The activity and the level of their products depends on the conditions in which lactobacilli are located.

At present the study of the biological effects and mechanisms of action of electromagnetic radiation (EMR) is of interest for many researchers. Due to the fact that it provides an opportunity to control the physiological processes of biological objects. It is also increases the arsenal of means of combating infectious diseases in medicine and microbiology.

The object of the study were exometabolites *L. plantarum*. *L. plantarum* strain was selected for the study of fractions and peptides. The strain was isolated from the intestine of bees and had the highest antagonistic activity against

most of test cultures. Microaerophilic culture conditions created in the microanatomic using gas-generating packages Generator GENbox microaer (bioMerieux, France). Chromatographic investigation conducted by gel filtration (gel permeation or sieve) chromatography.

The article presents data of the study of fractional composition exometabolites *L. plantarum*. This strain was isolated from the intestine of bees and had the highest antagonistic activity against most of test cultures. Therefore, it was used as candidate strains for the production of biologically active compounds that can be used in the design of metabolite type probiotics. The first time have studied the fractional composition of the exometabolites producer strain obtained in the after effects of physical factors and cultivation under various conditions of the gas composition of the atmosphere. It have been established, that the production level of microbial peptides depended on the conditions in which located producing strain. While, microbial peptides with a molecular weight of 2267-2393 Da absent under aerobic culture conditions *L. plantarum*. And the amount of the same peptide was 2.8% of the total under cultivation in microaerophilic culture conditions. It were established that electromagnetic and ultrasonic wave can affect the biological properties of *L. plantarum* and modulate the production of biologically active substances. The obtained data can be used in biotechnological processes.

Keywords: Lactobacillus, producents, exometabolites microbial peptides, probiotics.

Рецензент – д.мед.н Похил С.І.

Стаття надійшла 21.07.2015 р.