УДК 576:579.22:616-092

СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛІЧНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ НАТИВНИХ КОНЦЕНТРАТІВ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ SAL. CHOLERAESUIS і E. COLI ТА ЇХ СУБКЛІТИННИХ ФРАКЦІЙ

М. Є. Романько[1], *А. М. Головко*[2], *В. О. Ушкалов*[3], *О. В. Кольчик*[3]

[1]ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» УААН, Харків
[2]Українська академія аграрних наук, Київ
[3]Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, Київ

Відпрацьовані регламенти виділення із нативних концентратів бакмаси штамів Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308 субклітинних фракцій — цитозолю та клітинного детриту. Визначені електрофоретична рухливість білків, показники ліпідного та жирнокислотного складу, інтенсивності перекисного окиснення ліпідів та його регуляції у нативних зразках препаратів штамів, після їх дезінтеграції та ультрацентрифугування. Встановлено корелятивний зв'язок між кількісною часткою насичених/ненасичених жирних кислот та характером інтенсивності процесів ПОЛ в досліджуваних бакклітинах. Доведено, що за обраним набором методик можливо виконувати як контролювання ступеню руйнування побудови бак клітин, так й прогнозувати їх біологічний потенціал за умов будь-якого стресу.

Ключові слова: БІЛКИ, ДЕЗІНТЕГРАЦІЯ, ЖИРНІ КИСЛОТИ, КЛІТИННИЙ ДЕТРИТ, ЛІПІДИ, НАТИВНА БАКТЕРІАЛЬНА МАСА, ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ, УЛЬТРАЦЕНТРИФУГУВАННЯ, ЦИТОЗОЛЬ БАКТЕРІАЛЬНОЇ МАСИ, ШТАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ.

Мікроорганізми у природі рідко знаходяться в оптимальних умовах, найчастіше життєдіяльність мікробів протікає при незбалансованості елементів харчування та при несприятливих фізико-хімічних умовах: сухість, нестача або залишок кисню, окремих елементів харчування, підвищення або зниження температури, УФ-опромінення, неоптимальне значення pH, які є для мікроорганізмів стресорами.

Під впливом несприятливих факторів у популяціях мікроорганізмів відбуваються зміни, що приводять до стану стресу [1–4]. Культури мікроорганізмів в такому стані характеризуються змінами енергетичного метаболізму та також синтезом додаткових речовин, які відіграють роль протекторів. Стрес, перш за все, виражається в уповільненні росту популяції, а синтез полімерів клітинної стінки при цьому навіть підсилюється. У цей час в цьому напрямку вивчають зміни в ліпідному складі мембран, синтез протекторних сполучень (вуглеводів, амінокислот), утворення спеціальних білків. Дія несприятливих факторів на мікробні клітини приводить до синтезу значної кількості вищевказаних сполучень [5–7].

Сучасні дослідження показують, що продукти вторинного обміну можуть як опосередковано, так і безпосередньо впливати на первинний обмін і на структурно-функціональні характеристики клітини, тому вивчення накопичення продуктів обміну і його взаємозв'язок зі структурно-функціональним станом клітини становить інтерес для розуміння регуляції метаболізму в процесі онтогенезу, розвитку патології та адаптації до неї мікроорганізму [8].

Зберігання життєздатності та стабілізації основних властивостей мікроорганізмів — найважливіші задачі прикладної мікробіології та біотехнології, метою нашої роботи було визначення структурно-метаболічних показників ліпідного та жирнокислотного складу, електрофоретичної рухливості білків та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів у нативних концентратах, фракціях клітинних стінок та цитозолю бактеріальних клітин виробничих штамів *Sal. choleraesuis № 9* і *E. coli* № 1308 з певними біологічними властивостями, концентрацією та повнотою інактивації.

Матеріали і методи

Як експериментальні моделі для виконання роботи використовували виробничі штами *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308*, які були культивовані за умов виробництва Державної Сумської біофабрики.

Структурно-метаболічні показники вивчали на відмитій цільній бактеріальній масі та після руйнування мікробних клітин шляхом дезінтеграції ультразвуком на УЗДН-А (у потужності 22 кГц протягом 5 хв) з подальшим ультрацентрифугуванням. Надалі з руйнованих клітин осаджували клітинні стінки ультрацентрифугуванням на MSE-65 (США) при 76 000 g протягом 1,5 год за температури (5,0±0,5) ° С, одержували ліпідні екстракти мембран та розчинених фракцій ліпідів методом хлороформ-метанолової екстракції з подальшим центрифугуванням та диспергуванням на хлороформну та водно-метанолову фракції.

З структурних показників визначали: загальну кількість протеїнів за методом Лоурі в модифікації Miller G. L. (1959) [9], електрофоретичну рухливість білків, одержаних препаратів бактеріальних клітин та їх субклітинних фракцій електрофоретичним методом у градієнті ПААГ 4,0...22,5 % з додаванням SDS-Na [10].

В одержаних клітинних препаратах визначали кількість загальних ліпідів (ЗЛ) спектрофотометрично за визначенням комплексу продуктів розпаду ненасичених ліпідів з фосфорнованіліновим реактивом [11] та їх структурних фракцій — загального холестерину (ЗХ) за методом Ілька [12], тригліцеридів (ТГ) за методом Флетчера (1977) [13] та жирнокислотний (ЖК) склад екстрактів ліпідів методом рідинної хроматографії (РХ) згідно з ГОСТ 30418 [14]. Вміст сирого жиру в експериментальних зразках визначали згідно з ДСТУ ISO 6492:2003 [15].

Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали в одержаних клітинних препаратах при дослідженні концентрації дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) у гептан-ізопропанольних екстрактах з використанням модифікованої нами методики В. Б. Гаврилової і М. І. Мішкорудної (1985) [16].

Стан антиоксидантної системи (АОС) досліджували за визначенням активності ферменту каталази з використанням H_2O_2 спектрофотометрично (λ=410 нм) [17]. Антиокислювальну активність (АОА) ліпідів, екстрагованих із субклітинних фракцій бактерій, визначали, як описано в роботі Г. І. Клебанова (1988) [18].

Як контроль, при дослідженні біохімічних показників мікроорганізмів використовували відповідні живильні середовища.

Для одержання статистично вірогідних результатів визначення зазначених параметрів проводили у 10-кратній повторності з 3 паралельними пробами зразків. Математичну обробку одержаних даних виконували за допомогою методів варіаційної статистики, як описано в роботі Лакіна Г. Ф. (1980) [19].

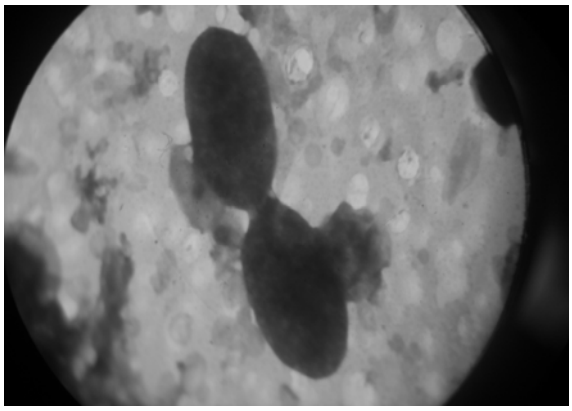
Результати й обговорення

Одержані нативні концентрати бактеріальних клітин штамів *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308* мали концентрацію мікробних клітин (20–30) млрд./мл. Інактивацію концентратів бактеріальних клітин проводили додаванням формаліну в остаточній концентрації 0,1 % від об'єму з витриманням 48 год суспензії за температури (37±1) °С.

З метою одержання субклітинних фракцій бактерій експериментальний матеріал піддавали руйнуванню дезінтеграцією ультразвуком на УЗДН-А з додаванням детергенту твіну-80 в остаточній концентрації 0,5 % від об'єму, за регламентом: напруженість — 400 Вт; сила току — 100 А; частота — 22 кГц протягом 20 хв на льоду. Одержані суспензії нативних концентратів бактеріальної маси піддавали центрифугуванню при (8000–10000) g протягом 20 хв з подальшим видаленням супернатанту та 3-разовим відмиванням клітинного детриту 1 М розчином NaCl шляхом центрифугування при (8000–10000) g протягом (10–15) хв. Контролювання ступеню вірогідності одержаних субклітинних фракцій проводили шляхом електронної мікроскопії ПЕМ–125 К (м. Суми) за методом негативного контрастування з додаванням 1 % фосфорновольфрамової кислоти у препараті протягом (2–3) хв, що досліджували [20]. Електронномікроскопічне збільшення для препаратів

Sal. choleraesuis і E. coli складало — 12 і (20–24) тис. разів відповідно. Аналіз отриманих негативів препаратів *Sal. choleraesuiss і E. coli*, які збільшували фотографічно у 2 і 4 рази відповідно, вказав, що дезінтеграція за обраним регламентом не достатньо впливала на руйнування клітин. З рисунку 1 виявляється, що за даними електронної мікроскопії більша

А



Б

Рис. 1 (А, Б) — Електронна мікроскопія нативного концентрату Sal. choleraesuis (штам № 9) після дезінтеграції з додаванням детергенту твіну–80
(Збільшення 20 000 –24 000).

кількість клітин залишалася цільною, а питома вага «тіней» клітин у своїй структурі містила фрагменти клітинних стінок, особливо це стосувалося препаратів штаму Salmonella.

Тому, в подальшому супернатанти бактеріальних клітин піддавали ультрацентрифугуванню на MSE–65 (США) при 76 000 g протягом 1,5 год за температури (5,0±0,5) | С на подушці з 30 % розчином сахарози у трис-сольовому буфері (pH 7,6).

Одержані супернатанти можна вважати [21, 22] як фракцію цитозолю або «цільної цитоплазми», а клітинний детрит, ресуспендований триразово трис-сольовим буфером (pH 7,6), — як фракцію клітинних стінок з включеннями фрагментів мембран клітин відповідно. Отримані дані узгоджуються з твердженням про те, що препарати клітинних стінок, що належать грамнегативним мікробам, до яких належать *Sal. choleraesuis* та *E. coli* у більшому ступені містять мембранні структури, очевидно, цитоплазматичні мембрани тісно зв’язані з клітинною стінкою. Даний факт ілюстрували результати електронної мікроскопії препаратів субклітинних фракцій досліджуваних штамів. Одержані препарати субклітинних фракцій досліджуваних бактеріальних клітин стабілізували додаванням мертіоляту з розрахунку 1:100.

У подальшому проводили роботу в напрямку відпрацьовування методів дослідження біохімічних показників у зразках нативних концентратів, цитозолю та клітинних стінок бактеріальних клітин. Так, аналіз результатів електрофоретичної рухливості білків зразків штамів в градієнті щільності 4,0...22,5 % акриламіду з додаванням SDS-Na свідчить, що їх білковий склад за М. т. субодиниць розподілявся таким чином:

1) для нативних концентратів штамів
Sal. choleraesuis — 25 000; 39 000 Да;

E. coli — 17 000; 25 000; 39 000; 44 000; 67 000; 80 000 Да;

2) для фракції клітинних стінок штамів
Sal. choleraesuis — 17 000; 25 000; 39 000 Да;
E. coli — 17 000; 25 000; 44 000 Да;

3) для фракції цитозолю штамів
Sal. choleraesuis — 25 000; 39 000 Да;
E. coli - 26 000; 32 000; 63 000 Да, що виявляється з електрофореграми.

Відпрацьовано методи визначення в зразках нативних концентратів та цитозолі штамів *Sal. choleraesuis і E. coli* концентрації загальних ліпідів, тригліцеридів та загального холестерину. З даних таблиці 1 видно, що найбільшими показниками концентрації загальних

Таблиця 1

Концентрація загальних ліпідів, тригліцеридів та загального холестерину у нативних зразках, після дезінтеграції та ультрацентрифугування у препаратах штамів Sal. choleraesuis і E. coli (M±m; n=10)

Показник	Препарати штамів		
	Sal. choleraesuis № 9	*E. coli* № 1308	Контроль
	Нативні концентрати бактеріальної маси		
ЗЛ, г/л	0,796±0,013	1,003±0,040 *	0,050±0,001
ТГ, ммоль/л	20,70±3,00	28,20±1,80 *	3,45±0,02
ЗХ, ммоль/л	0,220±0,000	0,302±0,002 *	-
	Після дезінтеграції (клітинний детрит + цитозоль)		
ЗЛ, г/л	1,079±0,100	1,164±0,120	3,10±0,10
ТГ, ммоль/л	21,0±1,45	30,10±2,00 *	3,45±0,02
ЗХ, ммоль/л	0,250±0,002	0,310±0,003 *	-
	Після ультрацентрифугування (цитозоль)		
ЗЛ, г/л	0,762±0,050	1,122±0,040 *	0,050±0,001
ТГ, ммоль/л	17,40±1,00	29,90±0,85 *	3,45±0,02
ЗХ, ммоль/л	0,120±0,006	0,300±0,008 *	-

Примітка: * — різниця вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно рівня значень в іншому дослідному зразку.

ліпідів, загального холестерину та тригліцеридів характеризувалися за значенням нативні концентрати штаму *E. coli*, значення яких становило 1,003±0,140 г/л, 0,302±0,002 ммоль/л та 28,20±1,80 ммоль/л,; найменші значення даних показників було визначено в нативній бактеріальній масі штаму *Sal. choleraesuis*, що складали — 0,796±0,013 г/л, 0,220±0,00 ммоль/л та 20,70±3,00 ммоль/л відповідно.

Мікроорганізми є корисною моделлю для вивчення взаємовідносин між організмом і реактивних форм кисню (РФК) як стресорів середовищ. Аеробні та факультативно-аеробні бактерії використовують молекулярний кисень як кінцевий акцептор електронів. Як наслідок переходу електронів від кисню до води утворюється супероксид аніон (O^-_2) та перекис водню (H_2O_2) [23].

Оксидативні порушення ДНК, РНК, білків та клітинних мембран мають місце в таких випадках, коли концентрація РФК перевищує здатність клітин їх елімінувати. Аеробним прокаріотам і еукаріотам властиво підключати набір захисних систем, що знижують ушкоджуючий ефект РФК [24]. РФК утягується в оксидативні клітинні порушення в фізіологічних і патологічних процесах, наприклад, при старінні, апоптозі, нейродегенеративних хворобах та при дисбалансі метаболізму заліза.

Відомо, що адаптивна резистентність до оксидативного стрессору *S. typhimurium і E. coli* складається з двох регулонів — один для перекису водню, інший — для супероксиду. *S. typhimurium і E. coli* мають 2 ізомери каталази: Kat E і Kat G, які перетворюють перекис водню до кисню і води [25]. Глутатіон-редуктаза захищає проти оксидативного стресору шляхом підтримання пулу редукованого глутатіону, який в свою чергу утримує в редукованому стані клітинні білки.

Нами було визначено концентрацію продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) — за рівнем утворення його продуктів — дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА), рівень загальної антиокислювальної активності (АОА) та активності каталази в

зразках нативних та цитозолю штамів *Sal. choleraesuis і E. coli* після обробки ультразвуком і ультрацентрифугування, що представлено у таблиці 2.

Таблиця 2

Інтенсивність процесів ПОЛ у нативних зразках, після дезінтеграції та ультрацентрифугування у препаратах штамів Sal. choleraesuis і E. coli (M±m; n=10).

Показник	Препарати штамів		
	Sal. choleraesuis № 9	*E. coli* № 1308	Контроль
	Нативні концентрати бактеріальної маси		
ДК, мкмоль/л	138,30±5,00	163,2±4,30 *	0,500±0,001
МДА, Δ D	9,73±0,45	12,48±0,67 *	0,05±0,02
	Після дезінтеграції (клітинний детрит + цитозоль)		
ДК, мкмоль/л	138,90±1,47	125,4±0,95*, **	0,500±0,001
МДА, Δ D	8,15±0,48	7,47±0,16*, **	0,05±0,02
	Після ультрацентрифугування (цитозоль)		
ДК, мкмоль/л	216,8±1,43 **	214,4±2,70*, **	0,500±0,001
МДА, Δ D	15,90±0,43 **	15,80±0,43*, **	0,05±0,02

Примітки: * — різниця вірогідна при p≤0,05 відносно рівня значень в іншому дослідному зразку;
** — різниця вірогідна при p≤0,05 відносно рівня значень у відповідному дослідному зразку до обробки.

Результати досліджень вказують, що більшою інтенсивністю процесів ПОЛ за рівнем утворення його продуктів — ДК і МДА — відрізняється нативний концентрат штаму *E coli* № 1308. Таким чином, ступень інтенсивності процесів ПОЛ (за утворенням його продуктів) корелює за спрямованістю з динамікою значень ліпідів та їх фракцій в препаратах певних штамів (табл. 1 і 2). Так, дійсно визначається, що штам *E. coli* № 1308 відрізняється від *Sal. choleraesuis* № 9 як більшою кількістю у своєї побудові загальних ліпідів та їх фракцій, так й значною інтенсивністю процесів ПОЛ.

Після дезінтеграції їх значення вірогідно знижуються в зразках штаму *E. coli № 1308,* залишаючись на початковому рівні в штамі *Sal. choleraesuis № 9*. Але після проведення очистки шляхом ультрацентрифугування рівень ДК і МДА в препаратах цитозолю бактеріальної маси штамів *Sal. choleraesuis і E. coli* становить значно вищим за попередніми значеннями. Цей факт свідчить про те, що за обраним набором методів (дослідження інтенсивності процесів ПОЛ та його регуляції) передбачається можливим контролювати ступень руйнування бактеріальних клітин.

Також проводили визначення показників, що характеризують стан як ферментативної ланки, так й потенціал загального ендогенного для мікроорганізмів пулу антиоксидантної системи, яка регулює інтенсивність процесів ПОЛ. Так, дані про результати дослідження активності каталази та загальної АОА в досліджених препаратах бактерій наведені у таблиці 3.

Таблиця 3

Активність каталази та рівень загальної антиокислювальної активності (АОА) у нативних зразках, після дезінтеграції та ультрацентрифугування препаратів штамів Sal. choleraesuis і E. coli (M±m; n=10)

Показник	Препарати штамів		
	Sal. choleraesuis № 9	*E. coli* № 1308	Контроль
	Нативні концентрати бактеріальної маси		
Каталаза, ммоль H_2O_2/сек. мг білка	0,157±0,008	0,550±0,009 *	0,008±0,001
АОА,			

% інгібіції	7,02±0,35	8,24±0,73 *	1,20±0,08
	Після дезінтеграції (клітинний детрит + цитозоль)		
Каталаза, ммоль H_2O_2/сек. мг білка	0,078±0,002 **	0,200±0,004 *, **	0,008±0,001
АОА, % інгібіції	9,63±0,87	9,08±0,65	1,20±0,08
	Після ультрацентрифугування (цитозоль)		
Каталаза, ммоль H_2O_2/сек. мг білка	0,087±0,009 **	0,018±0,001*, **	0,008±0,001
АОА, % інгібіції	7,09±2,07	8,34±2,07	1,20±0,08

Примітки: * — різниця вірогідна при p≤0,05 відносно рівня значень в іншому дослідному зразку;
** — різниця вірогідна при p≤0,05 відносно рівня значень у відповідному дослідному зразку до обробки.

Встановлено, що після дезінтеграції бактеріальних клітин штамів *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308* активність каталази вірогідно знижується в 2,0 і 2,8 рази відповідно початкової активності. Але в цитозолі бактеріальної маси *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308* її активність залишається незміненою після ультрацентрифугування.

Показник загальної АОА у нативних зразках, після дезінтеграції та ультрацентрифугування препаратів обох штамів знаходився за значенням на однаковому рівні.

Відомо, що фаза експоненційного росту *E.coli* в аеробних умовах пов'язана з ризиком виникнення ендогенного оксидативного стресу в зв'язку з можливим 10-кратним зростанням швидкості утворення H_2O_2 [26]. Таким чином, можна зробить висновок про можливу регуляцію внутріклітинної концентрації H_2O_2 в аеробних *E. coli* та *Sal. choleraesuis* ферментативним шляхом. Обговорюється роль синтезу білків, який синтезується оксидативними агентами, в механізмі адаптації клітин [27].

Стан оксидантно-антиокиснювальних процесів у будь-якому біологічному об'єкті залежить не лише від регуляції інтенсивності перекисного окиснення ліпідів, а й від кількісного та якісного співвідношення основного субстрату — жирних кислот. Тому, було проведено дослідження жирно кислотного складу досліджуваних штамів, результати якого наведено у таблиці 4.

Таблиця 4

Жирнокислотний склад нативних концентратів бактеріальних клітин штамів Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308 з розрахунку на «сирий» жир, г/л (%) (M±m; n=10)

Жирна кислота	Препарати штамів	
	Sal. choleraesuis № 9, г/л (%)	*E. coli* № 1308, г/л (%)
Жир „сирий"	0,796	1,003
Деканова С 10:0	-	-
Монодеканова С 11:0	-	-
Лауринова С 12:0*	**5,0 (0,87 %)**	**20,0 (2,09 %)**
Тридеканова С 13:0	12,5	12,5
Міристинова С 14:0*	15,0 (2,6 %)	47,5 (5,0 %)
Міристолева С 14:1	-	-
Пентадеканова С 15:0	75,0	340,0
Пальмітинова С 16:0*	**100,0**	**225,0**
Пальмітоолеїнова С 16:1	17,5	65,0
Гептадеканова С 17:0	20,0	-

Гептадеканова С 17:1	-	-
Стеаринова С 18:0*	**32,5 (5,7 %)**	**95,0 (10,0 %)**
Олеїнова С 18:1	150,0 (26,2 %)	-
Лінолева С 18:2	75,0 (13,1 %)	150,0 (15,7 %)
Ліноленова С 18:3	70,0 (12,2 %)	-
Арахісова С 20:0*	**-**	**-**
Ейкозотриенова С 20:3	-	-
Арахідонова С 20:4	-	-
Сума насичених ЖК	**137,5 (24,0 %)**	**340,0 (35,6 %)**
Сума ненасичених ЖК	**435,0 (76,0 %)**	**615,0 (64,4 %)**
Загальна сума ЖК	**572,5 (100 %)**	**955,0 (100 %)**

Примітка: * — насичені жирні кислоти.

Одержані результати свідчать про те, що ліпіди нативних концентратів бактеріальної маси штамів *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308* у своєї структурі не вміщують таких жирних кислот: деканової, монодеканової, міристолевої, арахінової, ейкозотриенової та арахідонової. Ліпіди нативної бакмаси *E. coli* № 1308 разом з цим не утримують у своєї побудові гептадеканової, олеїнової та ліноленової жирних кислот. Жирні кислоти, що не визначалися у ліпідах досліджених штамів мікроорганізмів за класифікацією відносять до ненасичених жирних кислот. Таким чином, усі насичені жирні кислоти, за виключенням арахінової, визначаються в ліпідах концентратів нативної бактеріальної маси досліджених штамів. При чому, за абсолютним відсотком значення кількості насичених ЖК в ліпідах *E. coli № 1308* перевищує на 11,6 % їх значення в *Sal. choleraesuis № 9.*

Слід підкреслити, що в жирнокислотному складі ліпідів обох штамів мікроорганізмів виявляється збільшення частки лінолевої і ліноленової кислот та зменшення частки стеаринової кислоти, яка утворюється в процесі біогідрогенізації ненасичених ЖК. Але, лише в ліпідах *Sal. choleraesuis № 9* визначалася олеїнова та ліноленова кислоти, тобто можна припустити, що гідрогенізація поліненасичених ЖК у нативних клітинах *Sal. choleraesuis* відбувається без накопичення проміжних ізомерів олеїнової кислоти. Вміст міристинової та лауринової кислот за частковою абсолютною кількістю вище у ліпідах нативних клітин *E. coli № 1308* (5,0 % та 2,09 %), ніж у ліпідах *Sal. choleraesuis № 9* (2,6 % та 0,87 %) свідчить про те, що синтез жирних кислот de novo з ацетату в клітинах *Sal. choleraesuis № 9* проходить досить інтенсивно.

Таким чином, аналізуючи вищезгадане слід підкреслити, що жирнокислотний метаболізм ліпідів клітин обох штамів характеризується високою інтенсивністю процесів гідрогенізації наявних у них поліненасичених жирних кислот. Також виявляється, що у порівняльному аспекті в клітинах штаму *Sal. choleraesuis* синтез ЖК de novo з ацетату проходить інтенсивніше ніж у клітинах штаму *E. coli,* але якісно відрізняється від клітин другого штаму значно вищим відсотком частки ненасичених ЖК (76,0 % проти 64,4 %) (табл. 4). Враховуючи важливу роль поліненасичених ЖК у синтезі ліпідів клітинних мембран, а також простагландинів і лейкотриєнів, можна зробить висновок, що високий вміст ненасичених ЖК у мембранах клітин штаму *Sal. choleraesuis № 9* може забезпечити оптимальний ступень текучості її ліпідних компонентів, в результаті чого мембрана клітини у подальшому (за умов впливу будь-якого стресору) буде більш стійкою або резистентною до дії ушкоджуючого чинника. Це твердження узгоджується з тим, що нами визначено вірогідно меншу концентрацію продуктів ПОЛ, а саме — низку інтенсивність процесів ліпопероксидації, у нативних концентратах клітин штаму *Sal. choleraesuis № 9* ніж штаму *E. coli № 1308* відповідно.

Висновки

1. Відпрацьовані регламенти виділення із нативних концентратів бакмаси штамів *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308* субклітинних фракцій — цитозолю та клітинного детриту.

2. Визначено електрофоретичну рухливість, ліпідний склад, показники інтенсивності процесів ПОЛ та його регуляції в нативних зразках препаратів штамів *Sal. choleraesuis № 9 і E. coli № 1308*, після їх дезінтеграції та ультрацентрифугування.

3. Встановлено, що інтенсивність процесів ПОЛ у нативних концентратах клітин штаму *Sal. choleraesuis № 9* вірогідна менша (за рівнем утворення продуктів ПОЛ) ніж штаму *E. coli № 1308*, що корелює з вищим вмістом частки ненасичених ЖК у мембранах клітин першого штаму та вказує на їх потенційну високу резистентність щодо впливу будь-якого стресору.

4. Доведено, що за обраним набором методик з одного боку — можливо виконувати контролювання ступеня руйнування побудови даних бактеріальних клітин, а з іншого — прогнозувати їх біологічний потенціал за умов стресу.

M. E. Roman'ko, A. N. Golovko, V .O. Ushkalov, O. V. Koltchik

STRUCTURAL AND METABOLITIC COMPOSITION OF LIPIDS OF NATIVE CONCENTRALS OF PRODUCTIVE STRAINS OF SAL. CHOLERAESUIS AND E. COLI AND THEIR SUBCELL FRACTIONS

S u m m a r y

The reglamens of isolation subcell fraction-citozol and cell defrit from native concentrals of bacterial mass of Sal. choleraesuis 9 and E. coli 1308 strains are fulfilled. It was defined protein electroforetic mobility, parameters of lipid and fat acid composition, intensivity of lipid peroxidation and its regulation in native samples of strains, after their desintegration and ultracentrifugation. The correlative connection between quantitative part of saturated/ unsaturated fat acids and character of lipid peroxidation, intensivity in studied bacterial cells was established. It was shown that by chose techniques it is possible to control a degree of structure destruction of bacterial cells and predict their biological potential under the stress conditions.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov
Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kyev
The State scientific-control institute of biotechnology and microorganisms strains, Kiev.

1. *Баснакьян И. А., Боровкова В. М., Кузьмин С. Н.* Патология и физиология микробов // Журн. микробиол. — 1981. — № 9. — С. 14–19.

2. *Мельникова В. А., Баснакьян И. А*. Патология и физиология микробов. Сообщение 4. Экономический и метаболический коэффициенты в оценке функциональных состояний S. Typhi // Журн. микробиол. — 1984. — № 5. — С. 62–67.

3. *Работнова И. Л.* Пути управления биосинтезом у микроорганизмов. Обзор литературы // Управление биосинтезом микроорганизмов. — Красноярск, 1973. — С. 242–244.

4. *Работнова И. Л., Позмогова И. Н., Баснакьян И. А.* Хемостатное и периодическое культивирование при изучении физиологии микроорганизмов // Итоги науки и техники. Сер. «Микробиология». Т. 11. Культивирование микроорганизмов. — М.: ВИНИТИ,1981. — С. 3–54.

5. Патология и физиология микробов. Сообщение 3. Критерии оценки функциональных состояний. / Мельникова В. А., Баснакьян И. А., Ратникова Т. Н., Власенко А. П. // Журн. микробиол. — 1984. — № 1. — С. 42–46.

6. *Мельникова В. А., Баснакьян И. А*. Экономический коэффициент как показатель физиологического и патологического состояний микрорганизмов. // Журн. микробиол. — 1984. — № 11. — С. 9–11.

7. *Позмогова И. Н.* Культивирование микроорганизмов в переменных условиях. — М., 1983. — 201 с.

8. Стресс-индуцибельные бактериальные белки и вирулентность. / Баснакьян И. А., Бондаренко В. М., Мельникова В. А., Белявская В. А. //Журн. микробиол. — 2001. — № 5. — С. 101–108.

9. *Miller G. L.* Protein determination for large numbers of samples. // Anal. Chem. — 1959. — V. 31, N 5. — P. 964–966.

10. Horizontal SDS electrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins. / A. Gorg, W. Postel, J. Wester, H. W. Schiwara W. H. Boesken/ / Science Tools. — 1985. — V. 32, No. 1. — P. 5–9.

11. Клінічна біохімія (Порадник для лікарів-лаборантів). / Г. Колб, С. Камишников. — Мінськ, Бєларусь,2002. — Т. І. — С. 150–154.

12. *Розенцвейг К. И.* Определение общего холестерина. // Лабораторное дело. — 1962. — № 9. — С. 43–45.

13. *Chromy V., Homakova M., Breinek P., Vrublovsky P.*// Biochem. clin. bohomoslov. — 1977. — V. 6. — P. 167–168.

14. ГОСТ 30418–96 Метод определения жирнокислотного состава.

15. ДСТУ ISO 6492:2003 Корми для тварин. Визначення вмісту жиру.

16. *Гаврилова В. Б., Мишкорудная М. И.* Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. — 1985. — № 3. — С. 33–35.

17. Определение активности каталаз / М. А. Королюк // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.

18. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г. И. Клебанов И. В., Бабенкова Ю. О., Теселкин и др. // Лаб. дело. — 1988. — № 5. — С. 59–62.

19. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высшая школа, 1980. — 230 с.

20. Электронная микроскопия. / В. Я. Карупу. — Киев: Главное изд-во издательского обьединения «Вища школа», 1984. – 208 с.

21. Бактериальные структуры и их антигенность. / Е. С. Станиславский.— М.: Изд-во «Медицина», 1971. — 220 с.

22. Электронная микроскопия вирусов животных и некоторых условно-патогенных микроорганизмов. / А. П. Пономарев, В. А. Мищенко. — Владимир: «Фолиант», 2005. — 158 с.

23. *Rocha E. R., Salby T., Coleman J. P., Smith C. J.* Oxidative stress response in an anaerobe, Bacteroides fragilis: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide // J. Bact. — 1996. — Vol. 178. — P. 6895–6903.

24. *Tamarit J., Cabiscol E., Ros J.* Identification of the major osidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stress // J. Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273, N 5. — P. 3017–3032.

25. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — Vol. 227, N 5259. — P. 680–685.

26. *Gonzalesflecha B., Demple B.* Homeostatic regulation of intracellular hydrogen-peroxide concentration in aerobically growing Escherichia coli // J. Bact. — 1997. — Vol. 179. — Iss. 2. — P. 382–388.

27. *Lausova A., Ferianc P., Polek B.* The effect of different oxidative challenge on growth and stress protein induction in Escherichia coli // Bioligia (Bratislava). — 1999. — P. 649–660.