

*Досліджено антимікробну активність експериментальних форм препаратів-антисептиків щодо поширених збудників інфекційних захворювань. Показана комплексна дія рідкого антисептика з *Streptomyces albus* UN 44, обумовлена активністю бактериолізинів та антибіотику штаму, що визначає широкий спектр антимікробної дії.*

Запропоновані готові форми препаратів (розчину, екстракту, сухої біомаси) для застосування у ветеринарії, медицині, процесах консервування

*Ключові слова: *Streptomyces albus*, бактериолізини, антибіотик, готові форми, антимікробна активність, антисептики*

*Исследована антимикробная активность экспериментальных форм препаратов-антисептиков относительно распространенных возбудителей инфекционных заболеваний. Показано комплексное действие жидкого антисептика из *Streptomyces albus* UN 44, обусловленное активностью бактериолизинов и антибиотика штамма, определяющее широкий спектр антимикробного действия.*

Предложены готовые формы препаратов (раствор, экстракт, сухая биомасса) для использования в ветеринарии, медицине, процессах консервирования

*Ключевые слова: *Streptomyces albus*, бактериолизини, антибиотик, готовые формы, антимикробная активность, антисептики*

УДК 577.15: 615.454.1 : 615.281
DOI: 10.15587/1729-4061.2015.47730

АНАЛІЗ СПЕЦИФІЧНОСТІ ГОТОВИХ ФОРМ АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ З STREPTOMYCES ALBUS

Т. С. Тодосійчук

Кандидат технічних наук, доцент
Кафедра промислової біотехнології
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»
пр. Перемоги, 37, Київ, Україна, 03056
E-mail: todosiychuk@bigmir.net

О. В. Покас

Кандидат медичних наук,
старший науковий співробітник, завідувач лабораторії
Лабораторія медичної мікробіології з музеєм
патогенних для людини мікроорганізмів
ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л. В. Громашевського НАМН України»
вул. М. Амосова, 5, м. Київ, Україна, 03038
E-mail: lenapokas@gmail.com

1. Вступ

Стрептоміцети є одною з найпоширеніших груп промислових продуцентів біологічно активних речовин, в тому числі антимікробних. Значне місце серед метаболітів стрептоміцетів належить антибіотикам і ферментам, що мають важливе практичне значення в медицині, ветеринарії, сільському господарстві та промисловості [1–4].

Серед важливих переваг біотехнологічного способу отримання антимікробних препаратів – можливість впливати на спрямованість біосинтезу та отримувати потрібний продукт, спектр цільових продуктів або їх готових форм. Останнє також можливе за рахунок вибору способів виділення продукту біосинтезу та отримання його у вигляді (готовій формі), що є оптимальною для обраної сфери використання. Готова форма препарату передбачає можливість отримання продукту різного ступеню очистки у вигляді порошку, рідини (концентрату) або пасти, а також може містити допоміжні речовини для підвищення стабільності основної речовини. Так, антисептик на основі бактериолітичних ферментів «Баліз» (ООО «Баліз Фарм», Росія) для різних способів застосування випускається як у вигляді розчину у флаконах, так і у вигляді супо-

зиторіїв. Антибіотики найчастіше випускають у вигляді порошку, а їх лікарські готові форми – у вигляді таблеток або мазі.

Проблема набуття антибіотикорезистентності збудників інфекційних процесів залишає актуальним розробку нових антисептиків [5, 6]. Одним з напрямків таких розробок є створення комбінованих препаратів на основі двох-трьох антимікробних субстанцій різної природи та механізму дії на мікробні патогени. В сучасних розробках найчастіше поєднують антибіотики та ферменти або речовини хімічного походження, що визначає широкий спектр антимікробної дії та ефективність препаратів.

2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

Створення комбінованих антисептиків відбувається переважно в рамках розробки готових лікарських форм з використанням окремих діючих субстанцій різного походження [7, 8]. Серед таких препаратів «Іруксол» та «Іруксол-моно» (Smith+Nephew, Німеччина), «Протогентин» (Росія) та інші.

Такі розробки впроваджуються на фармацевтичних підприємствах, які при виробництві використовую-

ють як вихідну сировину (діючі субстанції) продукцію біотехнологічної або хімічної галузі. Таким чином, у собівартість готової форми лікарського препарату включається вартість субстанцій кінцевих продуктів цих виробництв. У більшості випадків альтернативи такому способу виготовлення антисептичних препаратів у промисловості немає.

У разі ж отримання готової форми антисептику, як кінцевого продукту біотехнологічного виробництва, можливо оптимізувати технологічний процес та зменшити вартість препарату. Так, рідка форма згаданого ферментного препарату «Баліз» отримується біотехнологічним способом і виключає непотрібну в даному разі стадію сушки. Нечисельні приклади таких технологій передбачають, тим не менш, переважно отримання препаратів на основі однієї антимікробної сполуки, що обмежує спектр їх активності.

Поєднати можливості біотехнологічних виробництв та задачі створення комбінованих антисептиків можливо шляхом пошуку мікробних продуцентів, що здатні синтезувати одночасно антимікробні метаболіти різної природи. Розробка технологій з використанням таких продуцентів передбачає дослідження специфічності антимікробних речовин та визначення оптимальних готових форм препаратів [9].

Однією з культур, що відома та досліджувана як продуцент бактеріолітичних ферментів є *Streptomyces albus* (первісно *recifensis* var. *lyticus*).

Дослідження культури впродовж останніх десяти років дозволили вивчити біологічні властивості селекціонованих штамів та визначені можливі напрямки застосування препаратів на його основі [10, 11]. Однак проведена робота переважно стосувалася вивчення самих субстанцій, біосинтезу цільових продуктів, а не готових кінцевих форм та технологій їх отримання [11, 12]. Окремі дослідження або цикли робіт стосувалися розробки готових форм препаратів на основі ферменту (Стерилази) та подібних речовин, синтезованого культурою, але вже як окремого кінцевого продукту біотехнологічного виробництва [13, 14]. Тому для отримання такої готової форми препаратів потрібно було спочатку отримати біотехнологічну субстанцію, а потім в ході іншого виробництва створювати готову форму, що негативно впливає на вартість продукту.

В ході селекції культури отримані високоактивні штами та розроблена технологія ряду готових форм гідролітичного ферментного препарату Циторецифен [15, 16]. За результатами останніх досліджень авторами була встановлена здатність культури синтезувати також антибіотики з переважаючою фунгістатичною дією [17]. Таке поєднання у спектрі продуктів культури антибактеріальних ферментів та фунгістатичного антибіотику відкриває перспективи отримання комбінованих антисептиків широкої специфічності безпосередньо в ході біотехнологічного виробництва.

3. Мета та задачі дослідження

Метою дослідження було встановлення антимікробної специфічності експериментальних готових форм антисептиків з *Streptomyces albus* UN 44 для подальшого удосконалення технології виробництва індивідуальних та комбінованих препаратів.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні задачі:

- отримання експериментальних зразків готових форм індивідуальних та комбінованих антисептиків з використанням *Str.albus* UN 44;
- встановлення спектру антимікробної дії експериментальних зразків препаратів;
- визначення напрямків оптимізації біотехнології та сфер застосування досліджених готових форм препаратів.

4. Матеріали та методи дослідження спектру антимікробної активності готових форм бактеріолітичного ферменту та антибіотику

В роботі використовували штам *Streptomyces albus* UN 44 з музею кафедри промислової біотехнології НТУУ «КПІ». Штам є продуцентом бактеріолітичного ферментного комплексу широкого спектру дії, а також синтезує антимікробні речовини різної природи [15].

Для дослідження антимікробного спектру метаболітів культури використовували наступні тест-культури: музейні *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Candida albicans* ATCC 10231 та клінічні штами *Candida albicans* 17, *Proteus rettgeri* 115, *Klebsiella pneumoniae* 539, *Salmonella typhi* 27, *Shigella sonnei* 8/2, *Escherichia coli* 74, *Pseudomonas aeruginosa* 213, *Corynebacterium gravis* 96, *Bacillus cereus* 22, *Streptococcus thermophilus* 592, *Staphylococcus aureus* 209 з музею ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України».

Тест-культури вирощували на стандартних для відповідної групи мікроорганізмів поживних середовищах: м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), Колумбійський та хлорамфеніколовий агар Сабуро.

Штам *Str.albus* UN 44 підтримували на середовищі Гаузе, вирощування посівного матеріалу та біосинтез проводили на середовищі наступного складу (г/дм³): глюкоза – 6,0; соєве борошно дезодороване – 8,0; NaCl – 14,0; K₂HPO₄×3H₂O – 2,0; MgSO₄×7H₂O – 5,8; MnCl₂×4H₂O – 0,04; вода водопровідна до 1 дм³; рН 7,8–8,2.

Метод отримання готових форм антимікробних препаратів. Посівний матеріал вирощували при частоті обертання 200 хв⁻¹, протягом 48 годин при температурі 28±1 °С у колбах на 250 см³ з 50 см³ середовища. Біосинтез проводили у колбах на 750 см³ з 150 см³ середовища в тих же умовах протягом 96 годин. Після завершення біосинтезу культуральну рідину розділяли центрифугуванням (6 тис. хв⁻¹, 15 хв), відділяючи біомасу продуценту. Фугат очищали, стерилізували та концентрували баромембранними методами і використовували для визначення спектру активності ферментів (літична активність) за рівнем (%) деградації тест-культур. Для отримання сухого експериментального зразку відділену центрифугуванням біомасу висушували контактним способом.

Метод виділення антибіотичних речовин. Для екстракції антибіотику у культуральну рідину або окремо у біомасу додавали еквівалентну кількість етило-

вого спирту (96 %). Після годинної витримки біомасу відділяли центрифугуванням при частоті обертання 5 000 хв⁻¹ протягом 15 хв, екстракт використовували для аналізу або висушування та отримання сухого зразку.

Метод визначення бактеріостатичної та фунгістатичної активності дослідних зразків препаратів біомаси та екстракту антибіотику. В пробірки вносили по 2 см³ МПБ та 2000 клітин тест-культури. Дослідні зразки вносили у пробірки по 0,1 см³ (екстракт, розчин) або 10 мг (зразок біомаси). Після 60-хвилинної інкубації при 37 °С з усіх пробірок робили висіви напівкількісним методом по Голду: по 0,05 см³/чашку на МПА, а *C. albicans* на хлорамфеніколовий агар Сабуро. Інкубували чашки при 37 °С 1 добу, а чашки з *C. albicans* – 2 доби. Після інкубації підраховували кількість колоній у контрольних та дослідних чашках.

Визначення літичної активності (ЛА). Літичну активність ферментного комплексу у складі комплексного рідкого антисептику визначали турбідиметричним методом за здатністю до лізису суспензії тест-культури та виражали у відсотках деградації тест-культур [16]. Визначення літичної активності проводили у наступній модифікації: до 4 мл суспензії тест-культури (ОД 0,7) додавали 0,2 мл зразку та інкубували на водній бані при температурі 37 °С впродовж 30 хв. За різницею оптичної густини суспензії до та після інкубації визначали відсоток зменшення густини клітин та відповідно % деградації. Оптичну густину визначали на спектрофотометрі при λ=540 нм у кюветі 5мм на фоні дистильованої води.

5. Результати досліджень антимікробної специфічності готових форм антисептиків

За результатами попередньої роботи з продуцентом та отриманими даними [15–17] було заплановано виділити та дослідити наступні готові форми антимікробних метаболітів штаму *Str.albus* UN 44: комплексний рідкий препарат, що містить ферментний комплекс та потенційно антибіотик; екстракти антибіотику з біомаси та з культуральної рідини; висушену біомасу, що потенційно містить антибіотик.

Для вирішення першого завдання проводили біосинтез продуктів та віділяли вказані зразки описаними методами за поданою на рис. 1 принциповою схемою.

Отримані експериментальні зразки аналізувалися щодо їх антимікробної активності відповідно до природи діючої речовини та механізму її вияву. Зразок комплексного рідкого препарату, що містить в першу чергу бактеріолітичні ферменти, використовували для визначення рівня деградації модельного спектру умовно-патогенних тест-культур.

Результати проведеного експерименту (рис. 2) дозволяють встановити антимікробну специфічність дії комплексного препарату та вплив досліджуваних факторів на процес деградації клітин.

Незважаючи на вміст у фугаті окрім бактеріолізинів також і антибіотику, лізис тест-культур визначає саме ферментний комплекс, оскільки антибіотики переважно мають бактеріостатичну дію. Однак, механізм дії виділеного антибіотику ще не вивчений, тому не був виключений й його бактеріцидний ефект (як у частині відомих сполук). Чіткої закономірності немає, що вірогідно пов'язано із особливостями будови клітинної стінки використаних тест-культур.

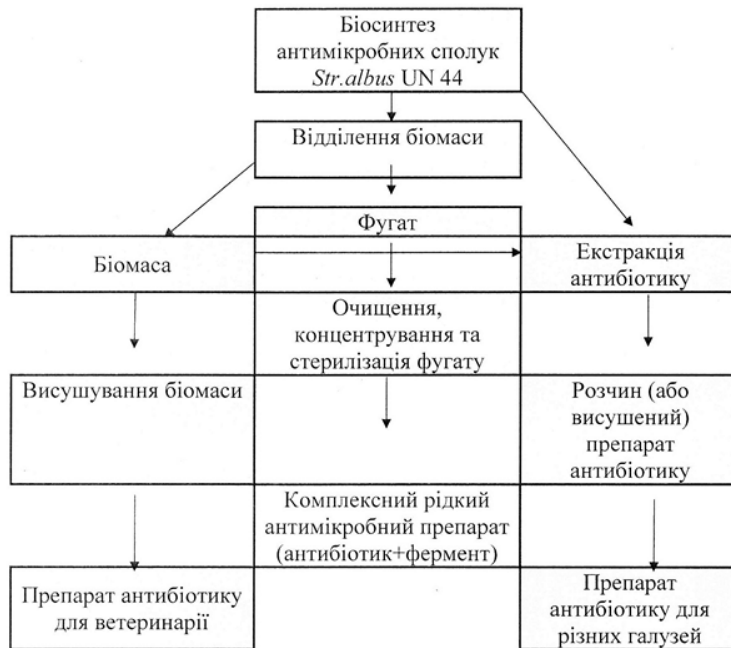


Рис. 1. Принципова схема виділення готових форм антимікробних препаратів *Str.albus* UN 44 різного призначення

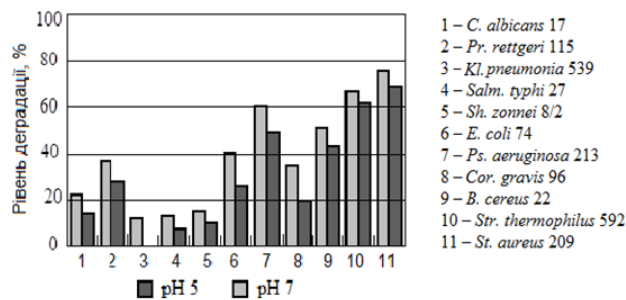


Рис. 2. Антимікробний спектр комплексного рідкого антисептику з *Str.albus* UN 44 (p < 0,05)

Комбіновану антимікробну дію зразку комплексного рідкого антисептику та екстракту біомаси продуценту визначали також модифікованим методом, що поєднує літичну дію ферментів та бактеріо-фунгістатичну дію антибіотику. Після інкубації суспензії тест-культур зі зразками впродовж 60 хв при 37 °С їх висівали на чашки Петрі, пророщували впродовж 24 год та підраховували кількість колоній. В контроль не вносили зразки та інкубували, висівали та пророщували тест-культури у тих же умовах. Таким чином визначалася й здатність ферментів на першому етапі лізувати частину клітин й здатність антибіотику пригнічувати розмноження культур при наступному вирощуванні.

Отримані дані (табл. 1) показали, що активність метаболітів зразку рідкого комплексного препарату призводить до руйнування всіх груп тест-культур (грампозитивних та грамнегативних бактерій, грибів) та найвище виявляється щодо *C. albicans*. Очевидний вияв комплексної дії бактеріолітичних ферментів та антибіотичної речовини, провідна антагоністична активність якої виявляється саме по відношенню до грибних культур [15]. У разі додаткового концентрування зразку можна отримати підвищення антимікробної дії, що повинно бути застосовано при розробці технології даної форми.

випаровували або вносили у такій же кількості. В останньому випадку було встановлено відсутність впливу власне спирту на ріст тест-культури.

6. Обговорення результатів досліджень антимікробної активності запропонованих готових форм антисептиків, що можуть бути отримані безпосередньо в ході біотехнологічного виробництва

Таблиця 1

Протимікробна активність зразків готових форм комплексного рідкого препарату та екстракту біомаси *Str. albus* UN 44

<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>St. aureus</i> ATCC 6538		<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
Концентрація тест-культури, кл/см ³							
Рідкий препарат	Контроль	Рідкий препарат	Контроль	Рідкий препарат	Контроль	Рідкий препарат	Контроль
3900±100	4700±110	2400±60	4650±85	4250±105	4900±120	2460±55	4480±88
Екстракт біомаси	Контроль	Екстракт біомаси	Контроль	Екстракт біомаси	Контроль	Екстракт біомаси	Контроль
120±5	120±3	130±5	125±3	130±5	130±3	0	120±5

Аналіз протимікробної дії препарату на основі екстракту біомаси показав суттєву відмінність у спектрі активності та дозволив довести також ендogenous локалізацію антибіотичної речовини культури. Екстракт біомаси штаму виявляє лише фунгістатичну активність, тому такий препарат має вузьку спрямованість, однак, зважаючи на складність лікування кандидозів, є перспективним для розробки та впровадження у ветеринарії та (при додатковому очищенні) у медицині.

Результати дослідження по бактеріо- та фунгістатичній дії готових форм антибіотику (екстракту культуральної рідини) та сухої біомаси (що потенційно може містити антибіотик) подані в табл. 2. Отримані результати свідчать про високу фунгістатичну активність обох дослідних препаратів. Але бактеріостатична активність антибіотику виявляється лише у концентрованому спиртовому екстракті антибіотику. Очевидно, у складі нативної біомаси антибіотик лишається частково зв'язаним та неактивним або секретується екзогенно.

Представлені результати дозволяють встановити специфічність дії експериментальних зразків готових форм антисептиків, що можуть бути отримані в результаті реалізації біотехнології на основі продукту *Str. albus* UN 44.

Рідка готова форма препарату отримується після виробничого біосинтезу шляхом відділення біомаси та наступного концентрування і стерилізації продукту баромембранними методами. Найвища активність препарату (90 % деградації) відмічена по відношенню до клітин стафілококу, внаслідок селекції продукту саме за стафілолітичною здатністю. Визначення бактеріолітичної активності проводили при рН 5,0 та 7,0, що моделює діапазон кислотності середовища при запальному процесі поверхневої локалізації.

Загальне зниження активності препарату щодо грамнегативних бактерій пояснюється особливістю будови їх клітинних стінок та наявністю додаткової зовнішньої мембрани на поверхні, до складу якої входять фосфоліпіди, та полісахариди, що не гідролізують ферменти комплексу. Специфічність клітинної стінки дріжджоподібних грибів (*C. albicans*) і відсутність активних дріжджолізинів у складі ферментного комплексу також значно ускладнює процес деградації (14–22 %). Очевидно, що у цьому випадку загальний ефект деградації дріжджових клітин визначається в першу чергу дією антибіотику, що активний саме щодо *C. albicans*.

Слід відмітити, що тест-культури, які найменше піддавалися руйнуванню (*Proteus rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella zonnei*), відносяться до збудників специфічних захворювань (сальмонельозу, черевного тифу, дизентерії), що потребують застосування препаратів індивідуального спрямування. Разом з тим, протікання будь-якого інфекційного процесу, що викликається цими мікроорганізмами, як правило супроводжується ураженням ослабленого макроорганізму широкорозповсюдженими умовно-патогенними збудниками запалень (стафілококу, стрептококів та інш). Тому встановлена ефективність досліджуваного препарату дозволяє розглядати його як індивідуальний антисептик по відношенню до більш поширених збудників та як препарат супроводжувальної терапії при лікуванні специфічних захворювань.

Таблиця 2

Бактеріо- та фунгістатична активність препаратів екстракту культуральної рідини та сухої біомаси *Str. albus* UN 44

<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>St. aureus</i> ATCC 6538		<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027		<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
Концентрація тест-культури, кл/см ³							
Біомаса	Контроль	Біомаса	Контроль	Біомаса	Контроль	Біомаса	Контроль
10 ⁹ *	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	0	10 ⁹
Екстракт	Контроль	Екстракт	Контроль	Екстракт	Контроль	Екстракт	Контроль
10 ⁶	10 ⁹	10 ⁶	10 ⁹	10 ³	10 ⁹	0	10 ⁹

Примітка: подані результати при $p < 0,05$

Слід зазначити, що у досліді в якості контролю використовували вирощування на МПБ без зразків, а при внесенні спиртового екстракту спирт попередньо

Готова форма у вигляді висушеної біомаси продуценту, що виявляє фунгістатичну дію, може бути отримана як супутній антисептичний продукт при отриманні рідкого препарату. Отже, це дозволяє в ході одного виробничого циклу отримати два цільових продукти, що позитивно вплине на вартість обох препаратів. Це ж саме стосується і можливості одночасно отримати рідкий комплексний препарат та екстракт антибіотику з біомаси, що може бути отриманий і у висушеному вигляді.

7. Висновки

Отримані експериментальні зразки готових форм антисептичних препаратів з *Streptomyces albus* UN 44 на основі бактеріолізину та антибіотику (комплексний), а також індивідуальних препаратів антибіотику – очищеного (у вигляді екстракту) та кормового (біомаси, для ветеринарії).

Важливим є показаний результат комбінованої дії комплексного рідкого препарату, що дозволяє при застосуванні не лише зруйнувати до 40–60 % поширених збудників, а й пригнічувати подальше розмноження клітин, що залишилися. Перший ефект обумовлений дією ферментів у складі препарату, а другий – присутністю антибіотику з бактеріо- та фунгістатичною активністю.

Встановлено здатність продуценту накопичувати антибіотик як в середині клітини, так і частково секретувати його екзогенно, що підтверджується антибіотичною активністю і комплексного рідкого препарату (на основі фугату) і препаратів з біомаси продуценту.

Запропоновані готові форми препаратів-антисептиків можуть бути використані у ветеринарії, а при додаткових дослідженнях – у медицині та харчових технологіях (консервування тощо). Отримані результати є основою для визначення напрямків оптимізації технологічних режимів виділення антибіотику (екстрагування, сушки), концентрування та очищення препаратів для різних галузей.

Література

1. Ягафарова, Г. Г. Микроорганизмы – продуценты биологически активных веществ [Текст] / Г. Г. Ягафарова. – М.: Химия, 2002. – 231 с.
2. Van Wezel, G. P. Applying the genetics of secondary metabolism in model Actinomycetes to the discovery of new antibiotics [Text] / G. P. van Wezel, N. L. McKenzie, J. R. Nodwell // Methods in Enzymol. – 2009. – Vol. 458. – P. 117–141. doi: 10.1016/s0076-6879(09)04805-8
3. Emelda, E. J. Antimicrobial Activity of Antibiotic Producing Streptomyces macrospores [Text] / E. J. Emelda, N. Vijayalakshmi, T. Santhanakrishnan // IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. – 2012. – Vol. 2, Issue 3. – P. 20–23. doi: 10.9790/3008-0232023
4. Postolachi, O. Selection of Streptomyces with antimicrobial activity to the pathogens of bee's diseases [Text] / O. Postolachi, S. Burteva, V. Derjanschi // USAMV-CN. – 2007. – Vol. 64, Issue 1-2. – P. 256–259.
5. Свіжак, В. К. Антибіотикорезистентність: багатогранність проблеми [Текст] / В. К. Свіжак, С. Є. Дейнека // Клін. та експер. патологія. – 2014. – Т. 13, № 2 (48). – С. 222–224.
6. Bassetti, M. Development of novel antibacterial drugs to combat multiple resistant organisms [Text] / M. Bassetti, E. Righi // Langenbeck's Archives of Surgery. – 2015. – Vol. 400, Issue 2. – P. 153–165. doi: 10.1007/s00423-015-1280-4
7. Projan, S. J. Stimulating Antibacterial Research and Development: Sense and Sensibility? [Text] / S. J. Projan // Antibiotic Discovery and Development. – 2012. – P. 1103–1105. doi: 10.1007/978-1-4614-1400-1_37
8. Ziemska, J. New perspectives on antibacterial drug research [Text] / J. Ziemska, A. Rajnisz, J. Solecka // Centr. Eur. J. of Biol. – 2013. – Vol. 8, Issue 10. – P. 943–957.
9. Coates, A. R. M. New Strategies for Antibacterial Drug Design [Text] / A. R. M. Coates, Y. Hu // Drugs in R & D. – 2006. – Vol. 7, Issue 3. – P. 133–151. doi: 10.2165/00126839-200607030-00001
10. Sokolova, I. E. A Biosynthesis activity of Streptomyces recifensis var. lyticus [Text] / I. E. Sokolova, T. P. Kylochek, A. I. Vinnikov // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 10–17.
11. Алексєєнко, О. М. Вивчення впливу екзометаболітів Streptomyces recifensis var. lyticus на ріст гриба Pleurotus ostreatus [Текст] / О. М. Алексєєнко, І. В. Жерносекова, А. І. Вінніков // Мікробіол. і біотехн. – 2011. – № 2 (14). – С. 41–47.
12. Жерносекова, І. В. Оптимізація ферментаційного середовища для рифампіциностійких мутантів Streptomyces recifensis var. lyticus за допомогою методу математичного планування експериментів [Текст] / І. В. Жерносекова, А. І. Вінніков // Вісн. Дніпроп. ун-ту. Біол., екол. – 2006. – Т. 1, № 14. – С. 67–72.
13. Романовська, І. І. Біотехнологічні аспекти створення іммобілізованих на полімерних носіях біологічно активних білкових речовин [Текст]: автореф. дис. ... д-ра біол. наук / І. І. Романовська. – Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, 2011. – 39 с.
14. Романовська, І. І. Іммобілізація протеази С у біогель ламідан [Текст] / І. І. Романовська, С. С. Декіна, Н. Б. Мартинюк // Досягн. біол. та мед. – 2009. – № 2 (14). – С. 25–28.
15. Todosiichuk, T. S. Multistage selection of soil actinomycete Streptomyces albus as a producer of antimicrobial substances [Text] / T. S. Todosiichuk, L. V. Zelena, V. V. Klochko // Emirates Journal of Food and Agriculture. – 2015. – Vol. 27, Issue 3. – P. 250–257. doi: 10.9755/ejfa.v27i3.18267
16. Тодосійчук, Т. С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату Циторецифен [Текст]: автореф. дис. ... канд. техн. наук / Т. С. Тодосійчук. – НУХТ, 2000. – 25 с.
17. Todosiichuk, T. S. Taxonomic analysis Streptomyces sp. 2435 strain, a producer of antimicrobial substances [Text] / T. S. Todosiichuk, V. V. Klochko, L. V. Zelena // Мікробіол. Журн. – 2014. – Т. 76, № 1. – С. 3–8.