

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 4 рази на рік
Засновано у липні 2006 року

№ 4(40)
2017

Одеса
ОНУ
2017

Засновник
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво про державну реєстрацію: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В. О. Іваниця (Одеса, Україна)
ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т. О. Філіпова (Одеса, Україна)
ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т. В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ
А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р. А. Волков (Чернівці, Україна), Б. М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н. К. Коваленко (Київ, Україна), І. К. Курдиш (Київ, Україна), Б. П. Мацелюх (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), В. П. Патики (Київ, Україна), Петров С. А. (Одеса, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), А. А. Сибірний (Львів, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна), М. Я. Співак (Київ, Україна), І. А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф. І. Товкач (Київ, Україна), В. О. Федоренко (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія), С. В. Чеботар (Одеса, Україна)

Науковий редактор випуску В. О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Постановою Президії ВАК від 27.05.2009 № 1-05/2 журнал внесено до переліку наукових фахових видань України

Реферативна база даних Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.urau.ua), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Reseach Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

Завідувач редакцією Н. Г. Юргелайтіс
Редактори: Л. Б. Котлярова, І. В. Райко
Адреса редакції:
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2017

Establisher
by Odesa National Mechnykov University.
Registration of state certification: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), S. V. Chebotar (Odesa, Ukraine), V. O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland), P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B. P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), V. P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S. A. (Odesa, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), M. Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A. A. Sybirny (Lviv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine), I. A. Tykhonovych (St.-Peterburg, Russia), F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R. A. Volkov (Chernivtsi, Ukraine)

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

**The journal was included to the list of Ukrainian scientific editions by the
Presidium of High Attestation Commission (№ 1-05 /2 from 27.05.2009)**

**Bibliographic Database «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List,
Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals,
Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua), Ukrainian Scientific journals (usj.org.
ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google Scholar,
Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Reseach Bib, e-LIBRARY, IBI Factor**

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: L. B. Kotlyarova, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 723-28-39,

e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

<http://mbt.onu.edu.ua>

© Odesa National Mechnykov
University, 2017

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

І. А. Блайда, Т. В. Васильєва, К. І. Семенов ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ НА ПРОЦЕСИ БІОВИЛУГОВУВАННЯ МЕТАЛІВ І ДЕСУЛЬФУРИЗАЦІЇ ВУГІЛЛЯ	6
---	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

К. С. Науменко, А. В. Головань, Г. В. Баранова, Ю. Г. Шермолович, Н. В. Пікун, С. Д. Загородня АНАЛІЗ НОВИХ ПОЛІФТОРТІОАЦІЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ АМІНОКИСЛОТ МЕТОДАМИ <i>IN SILICO</i> ТА <i>IN VITRO</i>	21
---	----

Д. В. Крутило RFLP-АНАЛІЗ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ ВИДУ <i>BRADYRHIZOBIUM</i> <i>JAPONICUM</i> , ПОШИРЕНИХ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ	32
--	----

Д. Л. Кирик, Г. В. Філоненко, Н. О. Коваленко, О. С. Талалаєв, І. М. Скороход АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА БІОПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> , ЩО ВИДІЛЕНІ У ДІТЕЙ З ВРОДЖЕНИМИ ВАДАМИ СЕРЦЯ	45
--	----

М. А. Златогурська, Ф. І. Товкач СТРУКТУРА ВІРІОННИХ ДНК ПОМІРНИХ ЕРВІНІОФАГІВ 49 І 59	56
--	----

О. Г. Горшкова АНТАГОНІСТИЧНА І ДЕСТРУКТИВНА АКТИВНІСТЬ МОРСЬКИХ БАКТЕРІЙ	65
--	----

І. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. М. Василюк, Л. Т. Олещенко ПРОДУКЦІЯ ЕЗКОПОЛІСАХАРИДІВ ШТАМАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ	76
--	----

А. А. Бойко, Г. І. Жумінська, А. І. Кушкіна, В. О. Іваниця, Ф. І. Товкач ХАРАКТЕРИСТИЧНІ ОСОБЛИОСТІ KEY-ПОДІБНИХ БАКТЕРІОФАГІВ <i>ERWINIA AMYLOVORA</i>	85
--	----

В. О. Іваниця, М. Д. Штеніков, А. М. Остапчук ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНІ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ ГЛИБОКОВОДНИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ	94
---	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	104
---	-----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

I. A. Blayda, T. V. Vasyleva, K. I. Semenov IMPACT OF ULTRASOUND ON COAL DESULFURIZATION AND PROCESS OF BIOLEACHING OF METALS	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

K. S. Naumenko, A. V. Golovan, G. V. Baranova, Yu. G. Shermolovych, N. V. Pikun, S. D. Zagorodnya ANALYSIS OF NEW POLYFLUOROTHIOACYLATED AMINO ACIDS DERIVATIVES BY <i>IN SILICO</i> AND <i>IN VITRO</i> METHODS	21
---	----

D. V. Krutylo RFLP-ANALYSIS OF <i>BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM</i> NODULE BACTERIA, WIDESPREAD IN AGROCENOSIS OF UKRAINE	32
---	----

D. Kyryk , G. Filonenko, N. Kovalenko, O. Talalaiev, I. Skorohod ANTIBIOTIC RESISTANCE AND BIOFILM FORMATION CHARACTERISTICS OF THE STRAINS <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> ISOLATED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE	45
---	----

M. A. Zlatohurska, F. I. Tovkach VIRION DNAs STRUCTURE OF TEMPERATE ERWINIOPHAGES 49 AND 59	56
--	----

O. H. Horshkova ANTAGONISTIC AND DESTRUCTIVE ACTIVITY OF MARINE BACTERIA	65
---	----

I. L. Garmasheva, N. K. Kovalenko, O. M. Vasyluk, L. T. Oleschenko EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM FERMENED PRODUCTS	76
---	----

A. A. Boyko, G. I. Zhuminska, A. I. Kushkina, V. O. Ivanytsia, F. I. Tovkach CHARACTERISTIC FEATURES OF KEY-LIKE BACTERIOPHAGES OF <i>ERWINIA AMYLOVORA</i>	85
--	----

V. O. Ivanytsia, M. D. Shtenikov, A. M. Ostapchuk FACULTATIVELY-ANAEROBIC ENDOSPOREFORMING BACTERIA OF DEEP WATER BOTTOM SEDIMENTS OF BLACK SEA	94
--	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	104
------------------------------------	-----

И. А. Блайда, Т. В. Васильева, К. И. Семенов

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38(048) 746 61 02,
e-mail: iblayda@ukr.inet

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРОЦЕССЫ БИОВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ МЕТАЛЛОВ И ДЕСУЛЬФУРИЗАЦИИ УГЛЕЙ

В статье представлен краткий обзор современной научно-методической литературы, раскрывающей основные механизмы действия ультразвука на твердые субстраты, водные системы, микроорганизмы. Рассмотрены различные физико-химические и биологические эффекты, возникающие под действием ультразвуковых полей разной интенсивности и частоты, в частности, у микроорганизмов и в процессах с их участием. Приведены примеры использования ультразвуковой обработки для повышения технологических показателей процессов десульфуризации углей и биовыщелачивания металлов.

Ключевые слова: ультразвук, десульфуризация, выщелачивание, микроорганизмы.

Ультразвук (УЗ) представляет собой упругие колебания и волны в диапазоне частот 10^4 – 10^9 Гц. Помимо звуковых колебаний, представляющих собой распространение в среде продольных волн, к ультразвуку относятся колебания изгиба и сдвига, а также поперечные и поверхностные колебания [4]. Распространение ультразвука подчиняется общим закономерностям, характеризующим акустические или звуковые волны, причем в газообразных и жидких средах, в том числе в клетках и мягких тканях микроорганизмов, состоящих на 75% из воды, распространяются продольные волны, а в твердых телах – продольные и сдвиговые [1, 2, 16]. Скорость распространения ультразвука в среде определяется ее упругостью и плотностью [4]. При кавитации в жидкой среде происходит образование полостей (пузырьков), которые возникают под действием больших разрывающих напряжений и мгновенно всхлопывают. Это сопровождается физико-химическими процессами, в частности, большими давлениями и локальным нагревом среды. Импульсы давления, возникающие при смыкании кавитационных камер, способны разрушать не только твердые и жидкие тела, но и многие биообъекты, в частности микроорганизмы. Это нашло практическое применение в



процессах дегазации, эмульгирования, коагуляции, диспергирования, дезинтеграции клеток, стерилизации и т.д. Акустические потоки возникают при передаче части энергии ультразвуковой волны массе «озвучиваемого» вещества в виде механического импульса, что сопровождается усилением массообмена, улучшением перемешивания, в том числе и во внутриклеточных микроскопических структурах [1, 2, 16]. Появление указанных эффектов зависит как от физико-химических характеристик «озвучиваемой» среды или системы (плотность, вязкость, наличие дефектов и т.д.), так и от параметров ультразвукового воздействия (частота, интенсивность, мощность, периодичность и т.д.) [1, 4, 16].

Учитывая, что в ультразвуковом поле частицы совершают интенсивные колебательные движения с большими ускорениями, и это может приводить в облучаемой среде к разности давлений в несколько атмосфер, то вполне очевидно, что наложение ультразвуковых колебаний влияет на находящиеся в облучаемой среде живые организмы и клетки и может рассматриваться как один из внешних физических факторов воздействия на биологические объекты. Эффекты, достигаемые в результате такого воздействия, обычно обусловлены совместным действием многих факторов, и не всегда ясно, какой из них играет первостепенную роль. Тем не менее биологическое действие ультразвуковых волн связывают в большей степени с явлением кавитации [1]. В настоящее время УЗ с частотой в диапазоне 10^4 – 10^9 Гц широко применяют в медицине, экспериментальной биологии, а также в биотехнологии.

Использование УЗ в медицине (диагностике и лечении), обусловленное совместным действием упомянутых выше факторов, приводит к активизации обменных и репаративных процессов, ускорению рассасывания инфильтратов и кровоизлияний, улучшению проницаемости тканевых мембран [4, 8, 13]. Использование ультразвука в экспериментальной биологии обусловлено его способностью разрушать клеточные оболочки биологических объектов. УЗ используют при необходимости выделения из клетки биологически активных веществ, например, ферментов; разрушения митохондрий и хлоропластов для изучения взаимосвязи между их структурой и функциями. Применение УЗ в экспериментальной биологии также связано с его способностью повреждать молекулы ДНК, что вызывает возникновение мутаций [2, 18].

В промышленности применение ультразвука основано на возникновении под его влиянием упомянутых выше кавитационных и потоковых эффектов в жидких средах и на твердых поверхностях в сложных многофазных системах. В этом случае механизм ультразвукового воздействия приводит к интенсификации процессов массообмена, диспергирования, смешения, растворения и т.д. и нашло применение в процессах очистки сточных вод [12, 14], измельчения и обогащения минералов [7, 17, 29], десульфуризации топлива [19, 26, 44], выщелачивания металлов, в частности, микробного [20, 40, 42]. Внимание к применению ультразвуковой обработки в биотехнологии обусловлено как непосредственным воздействием на клетки бактерий, так и возможностью изменения физико-химических характеристик субстратов, к которым прикрепляются микроорганизмы. Это имеет особое значение для интенсификации биотехнологических процессов, направленных на извлече-



ние металлов из обедненных (некондиционных) природных руд и техногенных отходов.

Воздействие ультразвука на жидкие среды сопровождается различными явлениями: характерным шумом во всем диапазоне частот и сильным акустическим сигналом; ускорением одних химических реакций и иницированием других; интенсивными микропотоками и ударными волнами, способными перемешивать слои жидкости и разрушать поверхности граничащих с кавитирующей жидкостью твердых тел; ультразвуковым свечением, а также различными биологическими эффектами [1, 16]. Под действием кавитации молекулы воды образуют -OH^\cdot , H_2O_2 , озон, которые являются сильными окислителями с высоким потенциалом окисления (до +2,8 В) [19, 23]. Процесс сопровождается локальным повышением температуры и электрическими разрядами и служит основанием передовой быстро развивающейся технологии Advanced Oxidation Process (AOP) [19].

Влияние УЗ на твердые поверхности, в частности, природных минералов, обусловлено теми же эффектами, которые возникают в жидких системах. За счет кавитационной энергии эрозии и расклинивающего действия кавитационных пузырьков происходит разрушение минерального вещества и поверхностных пленок, приводящее к измельчению минералов и увеличению их дисперсности [7, 25, 37]. Мощный УЗ способствует перемешиванию пульпы, уменьшению толщины ламинарного слоя у границы с твердым телом и устранению диффузионных ограничений [17]. Этот процесс играет большую роль при ультразвуковой очистке поверхности рудных частиц от загрязнений минерального характера, в частности, при флотации.

Использование ультразвука при десульфуризации топлива

Ультразвуковые эффекты, возникающие в водной среде и на поверхности минералов, используются для повышения эффективности десульфуризации природного топлива [5, 24, 28]. Для обессеривания углей применяют различные физико-химические и микробиологические методы обработки, которые, несмотря на их достоинства, не обеспечивают достаточно высокого эффекта десульфуризации при сохранении тепловых качеств топлива [5, 15].

В настоящее время показана перспективность использования ультразвуковых технологий для обогащения ископаемых углей, нефти и дизельного топлива [33, 36, 38], а также перспективных водно-угольных суспензий (CWS от англ. *coal-water slurry*) [39]. Преимущество использования УЗ в процессах десульфуризации заключается в том, что эта технология является экологически чистой и с ее помощью можно одновременно удалить серу и снизить зольность [36]. В ультразвуковом поле разрушение угля происходит за счет диспергирования выступающих кромок и острых углов угольных частиц, обладающих небольшой твердостью, в результате чего частицы угля приобретают округлую форму со сглаженной поверхностью [35].

На сегодня доказана эффективность использования УЗ для десульфуризации как высоко-, так и низкосернистых углей [19, 35, 38] с удалением всех



форм серы, в частности, и наиболее труднодоступной органической [17, 34].

Так, Ambedkar В. с соавторами [19] проводили ультразвуковую водную десульфуризацию угля зольностью 18,9 %, содержащего (%) серы общей – 5,03; сульфатной – 2,45; пиритной и органической – 2,56; связанного углерода – 36,47. УЗО осуществляли в течение 60 минут с частотой 20, 25, 132, 430 кГц и мощностью 500 Вт. Такая обработка приводит к удалению серы на 62,0%. В работах Ghadyani Azam и Mesroghli Sh. с соавторами [26, 34] изучено влияние УЗО на эффективность десульфуризации иранского угля шахты «Табас» на разных стадиях технологического процесса. Ультразвуковая энергия с частотой 24 кГц и мощностью 400 Вт использована для обессеривания турецких углей (завод Афсин-Эльбистан, Турция) [44]. В работе Vinoy K. Saikia с соавторами [21] приведены данные об использовании УЗ для обессеривания бразильского угля одного из крупнейших энергетических комплексов Южной Америки. После УЗО содержание общей серы уменьшилось на 70,0 и 77,0%, органической – на 67,0 и 81,0%, пиритной – на 48,0 и 60,0% и сульфатной серы – на 91,0 и 96,0% соответственно в растворах окислителя – 0,2 М и 0,025 М H_2O_2 .

УЗО может быть эффективна в сочетании с современными перспективными биотехнологическими подходами к обессериванию отечественных углей, основанными на использовании активности микроорганизмов микробиоты руд [5, 6].

Влияние ультразвука на микроорганизмы

Биологическое действие УЗ на живые системы, в том числе на микроорганизмы, связано с изменением механических, электрических и иных свойств клеточных оболочек и мембран, нарушением внутреннего состава клеток и изменением концентраций веществ, растворенных в цитоплазме. Основным результатом ультразвукового облучения – разрыв клеточных мембран и нарушение механической целостности клеток. При повышении интенсивности ультразвука до значений, когда в среде возникают механические усилия, сравнимые с прочностью клеточных мембран, начинается процесс разрушения клеток. Разрушающее действие УЗ на микроорганизмы лежит в основе методов стерилизации и дезинфекции. Стерилизующее действие УЗ на микроорганизмы проявляется на частотах 20 кГц и выше при интенсивности более 0,5 Вт/см³ [9, 16, 18].

Достаточно хорошо изучено влияние УЗ на грамположительные и грамотрицательные бактерии [3, 11]. Так, при воздействии УЗ легко разрушаются клетки *Salmonella typhimurium*, *Lactobacterium casei*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*. Более устойчивы *Sarcin aurea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter suboxydans*. Среди патогенных форм наибольшую устойчивость к УЗ выявили *Mycobacterium tuberculosis* [9]. Выявлено, что под влиянием УЗ у микроорганизмов изменяется чувствительность к антибиотикам. Так, при воздействии УЗ частотой в 800 кГц в течении 10 мин у *Staphylococcus haemolyticus* чувствительность к пенициллину возрастает в 2–5 раз [18].

Важной с практической точки зрения особенностью, возникающей под



влиянием УЗО, является изменение способности микроорганизмов прикрепляться к различным субстратам [31]. Антушевой Т.И. с соавторами [3] показано, что облучение УЗ частотой 60 кГц в течение 7–10 часов приводило к уменьшению в 2,0–2,7 раза адгезивной активности музейных и циркулирующих штаммов *Corynebacterium diphtheriae* в зависимости от диапазона ультразвукового облучения. Авторы экспериментально доказали, что влияние УЗ приводило к снижению индекса адгезивной активности микроорганизмов, причем степень угнетения адгезивного потенциала прямо пропорционально зависела от времени воздействия УЗ на бактерии.

Известно, что извлечение металлов из минерального сырья происходит по прямому и непрямоу механизмам, в которых принимают участие свободные и прикрепленные клетки микроорганизмов [6, 10, 32]. Ключевым моментом прикрепления ацидофильных хемолитотрофных бактерий (АХБ) к поверхности субстратов является адгезия. Роль адгезинов у АХБ выполняют полисахариды и поверхностные белки клеточных стенок. Они образуют специфическую пленку, благодаря которой происходят процессы выщелачивания металлов.

В результате разрыва клеточных оболочек под воздействием УЗ высвобождаются биологически активные вещества и появляются ферменты, отсутствующие у «неозвученных» клеток. Так, например у *Saccharomyces globosus* после 30 мин воздействия УЗ с частотой 740 кГц появляется инвертаза, отсутствующая у интактных, «неозвученных» клеток [16]. Под влиянием низкочастотного (27 кГц) и высокочастотного (2,64 МГц) ультразвука у *Aspergillus niger* отмечена инактивация глюкозооксидазы [11].

Влияние ультразвука на процессы биовыщелачивания металлов

В последнее время повышенное внимание к ультразвуковым технологиям в биотехнологии обусловлено не только непосредственным воздействием на клетки микроорганизмов, но и возможностью применения УЗО для изменения физико-химических характеристик субстратов, к которым прикрепляются микроорганизмы [2]. Это в первую очередь относится к вопросам повышения эффективности бактериального выщелачивания металлов из природных некондиционных руд и техногенных отходов.

Бактериальное выщелачивание металлов – гетерогенный процесс, протекающий в системе «жидкость (выщелачивающий раствор, раствор окислителей) – твердое тело (природные минералы, сульфидные руды, техногенные отходы) – суспензия микроорганизмов». Основными механизмами ультразвукового воздействия на такую систему выступают описанные ранее акустические кавитация и потоковые эффекты [42, 45, 47].

В таблице приведены результаты по микробному выщелачиванию никеля из природных руд с использованием различных представителей микромикетов родов *Aspergillus*, *Penicillium* и бактерий родов *Pseudomonas*, *Sporosarcina*, *Bacillus* [22, 27, 41].



Таблица

Результаты по биовыщелачиванию никеля из природных руд с использованием
гетеротрофных микроорганизмов

Table

Results of bacterial bioleaching of nickel from natural ores using heterotrophic
microorganisms

Месторождение	Состав руды, %	Условия выщелачивания	Извлечение металлов, %	Ссылка
Латеритные отложения	Ni – 0,72 Fe – 36,85 Zn – 0,10	Аборигенный штамм <i>Aspergillus humicola</i> SKP102 температура 30 °C 30 дней 1. стационарный режим 2. перемешивание 120 об/мин	1. Ni – 17,78 2. Ni – 53,80	27
Гарниерит	Ni – 2,40 Fe – 6,70	Типовые штаммы <i>A. niger</i> ATCC 1015 <i>B. megaterium</i> ATCC 21916 <i>Pseudomonas sp.</i> ATCC 21025	Ni – 78,0	22
Латеритная руда	Ni – 1,27 Fe – 70,78	1. Аборигенные <i>Aspergillus sp.</i> 2. Химическое выщелачивание 1М щавелевой кислотой	1. Ni – 0,29 2. Ni – 6,66	41

В работе Ghosh S. и Paul A. [27] максимальное извлечение никеля, как в стационарном режиме (17,78%), так и при перемешивании (53,8%) достигали через 30 дней. В работе Castro I.M. с соавторами [22] приведен пример использования бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, грибов *Aspergillus* и *Penicillium* для выщелачивания никеля из гарниерита. Максимальное извлечение никеля (78,0%) было достигнуто при использовании типового штамма *Aspergillus niger* ATCC 1015, что, по мнению авторов, связано с синтезом этим штаммом лимонной кислоты. С другой стороны, авторы Sukla L.B. и Panchanadikar V. [41], изучая извлечение никеля из латеритной руды ассоциацией собственной микробиоты, в которой доминировали представители *Aspergillus sp.*, показали, что большее количество никеля можно экстрагировать с использованием химического выщелачивания 1М раствором щавелевой кислоты (6,66%), чем органическими метаболитами (0,29%).

Ультразвуковое воздействие значительно повышает эффективность извлечения никеля из латеритной руды, в частности, месторождений в Сукинде (Orissa, Индия) [30, 43]. Swamy K.M. с соавторами [43] для извлечения никеля из этой руды с содержанием железа и никеля 70,83% и 1,27% соответственно использовали аборигенный штамм *A. niger* и воздействие УЗ с частотой 720, 430 и 20 кГц и соответствующей мощностью 15, 120 и 375 Вт. Установлены оптимальные параметры выщелачивания: плотность пульпы 8,7%; частота ультразвука 20 кГц; интенсивность ультразвука 1,5 Вт/см²; время – 30 мин. Эти условия обеспечивали извлечение из руды никеля и железа, соответственно, на 95,0 и 0,16% за 14 дней. Без УЗ воздействия при тех же параме-



трах выщелачивание никеля и железа составило 24,9 и 5,0%, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о положительном влиянии УЗО на повышение селективности извлечения никеля по отношению к железу. Увеличение частоты УЗО приводило к снижению степени извлечения никеля, что связано с разрушением клеток штамма *A. niger*, и как следствие, снижением синтеза органических кислот, являющихся по сути выщелачивающими реагентами никеля из руды [43].

В работе Kar R.N. с соавторами [30] с использованием той же латеритной руды представлены результаты по влиянию на эффективность биовыщелачивания никеля различных факторов (концентрация биомассы аборигенного штамма *Aspergillus niger*, плотность пульпы, параметры УЗО). Как и в предыдущей работе, показано положительное влияние УЗО на извлечение никеля: максимальное (95,0%) извлечение регистрировали через 14 дней при концентрации суспензии *Aspergillus niger* 10^6 кл/мл, ежедневной УЗО в течение 30 мин ультразвуком с частотой 43 кГц и мощностью 1,5 Вт/см². При обычном выщелачивании за этот же период в раствор переходило лишь 24,9% никеля. Авторы также отмечают, что УЗО способствует селективности извлечения никеля по отношению к железу.

В работе Anjum F. с соавторами [20] установлено положительное влияния УЗ на процессы извлечения металлов из пакистанских черных сланцев аборигенным штаммом *Aspergillus niger*. Концентрация алюминия и железа в руде составляла 8,80% и 3,76% соответственно; Cu, Zn, Co и Ni присутствовали в незначительных количествах (~ 10–40 мг/кг). УЗО с частотой 40 кГц проводили ежедневно в течение 7 мин в период роста *Aspergillus niger* (15 дней) и период выщелачивания (24 или 36 дней). Установлено, что УЗО стимулирует образование *Aspergillus niger* органических кислот – лимонной (6,2%), яблочной (3,5%), щавелевой (2,4%) и винной (0,052%), в то время как их количество без УЗО составляло 0,44, 1,14, 0,20 и 0,02% соответственно. Таким образом, авторами подтверждено положительное влияние УЗ на продуцирование органических кислот микромицетами *A. niger*. Кроме этого, УЗО также способствовала увеличению количества биомассы *A. niger* до 30,0%, по сравнению с 13,0% в контрольном варианте (без УЗО). Аналогичные результаты получены в работе Swamy K.M. с соавторами [42].

В работе Yi Wai Chiang с соавторами [46] приведены результаты по влиянию УЗО на микробное выщелачивание никеля из олевина с применением коллекционных штаммов *Paenibacillus mucilaginosus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* и *Humicola grisea*. В работе использовано оливинное сырье (Нидерланды) состава, %: Si – 20,7; Fe – 3,7; Ni – 0,27; Cr – 0,24; Al – 0,17. УЗО при частоте 37 кГц, мощности 300 Вт и интенсивности 0,2 Вт/см² проводили в период фазы роста на протяжении 7 дней и фазы выщелачивания ежедневно в течение 15 мин. Использование УЗ в фазе роста способствовало повышению количества биомассы на 15,7–30,0%, что совпадало с результатами Swamy K.M. с соавторами [42]. Извлечение никеля через 17 дней под влиянием УЗО составило 15,7% по сравнению с 9,9% при отсутствии УЗО. Полученный эффект может быть связан с различными механизмами, в первую



очередь с увеличением количества биомассы и продуцированием биологически активных веществ, в том числе органических кислот [20, 42]. Как считает Yi Wai Chiang с соавторами [46], органические соединения, продуцируемые микроорганизмами, могут действовать как лиганды при образовании поверхностных или водных комплексов, что ослабляет химические связи в оливине и приводит к быстрейшему извлечению металлов. В результате ультразвуковых кавитации и микропотоков происходит измельчение минералов. Так, размер частиц оливина до УЗ обработки составлял 158,2 мкм, после – 79,2 мкм. УЗ помимо повышения степени извлечения никеля из оливина способствует увеличению селективности извлечения никеля по отношению к магнию и железу (коэффициент селективности составил 2,2). По результатам проведенных исследований авторы считают, что *Aspergillus niger* обладает большей выщелачивающей активностью по сравнению с *Paenibacillus mucilaginosus*, *Penicillium chrysogenum* и *Humicola grisea*. По-видимому, это обусловлено большим количеством синтезированных органических кислот, как результат, снижением рН до 2,3, что способствует ускорению растворения минерала.

Приведенные данные свидетельствуют об эффективном влиянии УЗО на процессы микробного выщелачивания металлов из природных минералов. Рядом авторов установлено, что влияние УЗ на микробиологические процессы носит разнонаправленный характер, связанный с различными физико-химическими эффектами [2, 8, 19]. УЗО разрушает частицы минералов, повышает гомогенизацию пульпы, увеличивая площадь поверхности. Низкочастотный УЗ способствует накоплению биомассы и увеличению синтеза биологически активных веществ, высокочастотный УЗ способствует полной или частичной гибели всех или определенных микроорганизмов [1, 9, 19]. Таким образом, ультразвук способен изменять состав и активность природных микробных сообществ, следовательно, может регулировать жизнеспособность, численность и активность микроорганизмов.

Анализ литературы показывает, что основное внимание ученых привлечено к изучению влияния ультразвука на бактериальное выщелачивание с использованием гетеротрофных микроорганизмов. Данных о влиянии ультразвука на биовыщелачивание металлов автотрофными и хемолитотрофными микроорганизмами практически нет.

Заключение

Результаты исследований дают основания предполагать, что ультразвуковая обработка может значительно интенсифицировать и сделать рентабельными процессы переработки обедненного некондиционного минерального сырья и техногенных отходов за счет воздействия ультразвука как на поверхность частиц субстратов, так и на клетки микроорганизмов их аборигенной микробиоты. Это позволит значительно ускорять процессы и сократить количество энергии и реагентов, необходимых для более полного перехода ценных металлов в раствор на фоне большого количества балластных веществ, составляющих основу некондиционных геогенных и техногенных субстратов.



І. А. Блайда, Т. В. Васильєва, К. І. Семенов
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38(048) 746 61 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ НА ПРОЦЕСИ БІОВИЛУГОВУВАННЯ МЕТАЛІВ І ДЕСУЛЬФУРИЗАЦІЇ ВУГІЛЛЯ

Реферат

У статті подано короткий огляд сучасної науково-методичної літератури, яка розкриває основні механізми дії ультразвуку на тверді субстрати, водні системи, мікроорганізми. Розглянуто різні фізико-хімічні та біологічні ефекти, що виникають під дією ультразвукових полів різної інтенсивності і частоти, зокрема, у мікроорганізмів і в процесах за їх участі. Наведені приклади використання ультразвукової обробки для підвищення технологічних показників процесів десульфуризації вугілля і біовилуговування металів.

Ключові слова: ультразвук, десульфуризація, вилуговування, мікроорганізми.

I. A. Blayda, T. V. Vasyleva, K. I. Semenov
Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 746 61 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

IMPACT OF ULTRASOUND ON COAL DESULFURIZATION AND PROCESS OF BIOLEACHING OF METALS

Summary

This paper briefly reviews a range of modern research and methodological literature that explores the impact of ultrasound on solid substrates, water systems and microorganisms. The authors examined various physical-chemical and biological effects occurring in particular in microorganisms as well as in processes, in which they are involved, under the exposure to ultrasound fields of different intensity and frequency. The examples of the use of ultrasound treatment aimed at increasing technological results of coal desulfurization as well as bioleaching of metals are provided.

Key words: ultrasound, desulfurization, leaching, microorganisms.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян В. Б. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. – М.: МГТУ им. Н. Э. Баумана, 2005. – 225 с.
2. Антушева Т. И. Некоторые особенности влияния ультразвука на микроорганизмы // Живые и биокосные системы. – 2013, № 4. – С. 11–15.



3. Антушева Т. И., Бабич Е. М., Кивва Ф. В., Калининко С. В., Рыжкова Т. А., Скляр Н. И., Коваленко О. И. Влияние ультразвука и электромагнитных волн миллиметрового диапазона на адгезивные свойства *C. diphtheriae* // Успехи современного естествознания. – 2014, № 3 – С. 48–52.

4. Бергман Л. Ультразвук и его применение в науке и технике. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1957. – 726 с.

5. Блайда И. А., Васильева Т. В. Бактериальная десульфуризация углей (обзор). Bacterial desulphurization of Coals (review) // Мікробіологія і Біотехнологія. Microbiology & Biotechnology. – 2017, №3. – С. 6–23. DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3\(39\).110877](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3(39).110877).

6. Блайда И. А., Васильева Т. В., Баранов В. И. Использование биогидрометаллургических технологий в решении проблем утилизации техногенных отходов с получением ценных металлов // Комплексное использование минерального сырья. – 2015, № 3. – С. 75–82.

7. Губин Г. Г., Ярош Т. П., Скляр Л. В. Обобщение и анализ возможности использования ультразвуковых колебаний при переработке полезных ископаемых // Спеціальні та комбіновані методи. Збагачення корисних копалин. – 2016. – Вып. 62 (103). – С. 78–87.

8. Демин И. Ю., Прончатов-Рубцов Н. В. Современные акустические методы исследований в биологии и медицине (учебно-методические материалы). – Нижний Новгород, 2007. – 118 с.

9. Исаенко Е. Ю. Применение ультразвука для дезинтеграции микробных клеток // Annals of Mechnicov Institute. – 2008, №1. – С. 5–9.

10. Каравайко Г. И., Дубинина Г. А., Кондратьева Т. Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. – 2006, № 5. – С. 593–629.

11. Карасёва Е. И., Тарун Е. И., Метелица Д. И. Ультразвуковая инактивация глюкозооксидазы *Aspergillus niger* в водных растворах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 1. – С. 14–22.

12. Келлер О. К. Ультразвуковая очистка. – Л.: Машиностроение, 1977. – 325 с.

13. Лучевая диагностика: Учебник Т. 1. / под ред. Г. Е. Труфанова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – С. 39–44.

14. Мамченко А. В., Кий Н. Н., Чернова Л. Г. Исследование влияния способов модификации природного доломита на деманганацию воды // Химия и технология воды. – 2008. – 30, Вып. 4. – С. 347–35.

15. Назимко Е. И. Исследования по проблеме удаления серы, содержащейся в углях // Вісті Донецького гірничного інституту. – 2014, № 2. – С. 60–65.

16. Физические основы применения ультразвука в медицине и экологии: учебно-методическое пособие / Под общ.ред. профессора С. П. Кундаса. – Минск: МГЭУ им. А. Д. Сахарова, 2009. – 110 с.

17. Черных С. И., Рыбакова О. И., Лебедев Н. М., Журнова Т. И. К вопросу изучения влияния ультразвука, магнитных полей и электрического тока на флотацию золота // Цветная металлургия. – 2003, № 6. – С. 15–21.



18. Шапхаев Э. Г., Цыренов В. Ж., Чебунина Е. И. Основы биотехнологии. 5. Дезинтеграция микробных клеток. – Улан-Уде: Издательство ВСГТУ, 2005. – С. 53–65.
19. *Ambedkar B., Nagarajan R., Jayanti S.* Ultrasonic coal-wash for desulfurization // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2011, N18. – P. 718–726.
20. *Anjum F., Bhatti H.N., Ghauri M.A.* Enhanced bioleaching of metals from black shale using ultrasonics // *Hydrometallurgy*. – 2010, N100. – P. 122–128.
21. *Binoy K. Saikia, Adilson C. Dalmora, Rahul Choudhury, Tonkeswar Das, Silvio R. Taffarel, Luis F.O. Silva.* Effective removal of sulfur components from Brazilian power-coals by ultrasonication (40 kHz) in presence of H₂O₂ // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2016, N 32. – P. 147–157.
22. *Castro I. M., Fietto J. L. R., Vieira R. X., Tropia M. J. M., Campos L.M.* Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures // *Hydrometallurgy*. – 2000, N 57. – P. 39–49.
23. *Christman C. L., Carmichael A. J., Mossoba M. M., Riesz P.* Evidence for free radicals produced in aqueous solutions by diagnostic ultrasound // *Ultrasonics*. – 1987, N 25. – P. 31–34.
24. *Duran J. E., Mahasay S. R., Stock L. M.* The occurrence of elemental sulfur in coals // *Fuel*. – 1986, N 65. – P. 1167–1168.
25. *Franco F., Pérez-Maqueda L. A., Pérez-Rodríguez J. L.* The effect of ultrasound on the particle size and structural disorder of a well-ordered kaolinite // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2004, N 274. – P. 107–117.
26. *Ghadyani Azam, Noaparast Mohammad, Ziaedin Sied.* A study on the effects of ultrasonic irradiation as pretreatment method on high ash coal flotation and kinetics // *International Journal of Coal Preparation and Utilization*. – 2017, N 36. – P. 1–18.
27. *Ghosh S. , Paul A. K.* Bioleaching of nickel by *Aspergillus humicola* SKP102 isolated from Indian lateritic overburden // *Journal of Sustainable Mining*. – 2016, N 15. – P. 108–114.
28. *Giovanni Rossi.* The Microbial Desulfurization of Coal // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2014, N 142. – P. 147–167.
29. *Gopi K. R., Nagarajan R.* Application of power ultrasound in cavitation erosion testing of nano-ceramic particle/polymer composites // *Solid State Phenomena*. – 2008, N 13. – P. 191–204.
30. *Kar R. N., Sukla L. B., Swamy K. M., Panchanadikar V. V., Narayana K.L.* Bioleaching of Lateritic Nickel Ore by Ultrasound // *Metallurgical and materials transactions*. – 1996, N 27. – P. 351–354.
31. *Klemm P., Schembri M. A.* Bacterial adhesions: Function and structure // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2001, N 293. – P. 34–39.
32. *Kondrateva T. F., Pivovarova T. A., Tsaplina I. A.* Diversity of communities of acidophilic chemolithotrophic microorganisms in natural and technogenic ecosystems // *Microbiology*. – 2012. – V. 81, N 1. – P. 3–27.
33. *Mello Paola de A., Duarte F. A., Matheus A. G., Mauro Korn Nunes, Valderi L. Deossler, Flores Erico M. M.* Ultrasound assisted oxidative process for sulfur removal from petroleum product feedstocks // *Ultrason. Sonochem.* – 2009, N 16. – P. 732–736.



34. Mesroghli Sh., Yperman J., Reggers G., Jorjani E., Carleer R. Impacts of sonication and post-desulfurization on organic sulfur species by reductive pyrolysis // *Fuel*. – 2016, N 183. – P. 258–291.

35. Nagarjan R. Use of ultrasonic cavitation in surface cleaning efficiency and surface erosion rate // *J. Inst. Environ. Sci.* – 2006, N 49. – P. 40–50.

36. Ozkan S. G. Effects of simultaneous ultrasonic treatment on flotation of hard coal slimes // *Fuel*. – 2012, N 93. – P. 576–580.

37. Perez-Rodrigue J. L., Pascual J., Franco F., Jimenez de Haro, Duran A. The influence of ultrasound on the thermal behaviour of clay minerals // *Journal of the European Ceramic Society*. – 2006, N 26. – P. 747–753.

38. Saikia B. K., Dutta A. M., Baruah B. P. Feasibility studies of desulfurization and de-ashing of low grade medium to high sulfur coals by low energy ultrasonication // *Fuel*. – 2014, N 123. – P. 12–18.

39. Shen Y., Sun T., Liub X., Jiaa J. Rapid desulfurisation of CWS via ultrasonic enhanced metal boron hydrides reduction under ambient conditions // *RSC Adv*. – 2012, N 2. – P. 4189–4197.

40. Sinisteria J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview // *Ultrasonics*. – 1992, N 30. – 180 p.

41. Sukla L. B., Panchanadikar V. Bioleaching of lateritic nickel ore using a heterotrophic micro-organism // *Hydrometallurgy*. – 1983, N 32. – P. 373–379.

42. Swamy K. M., Narayana K. L., Vibhuti N. Bioleaching with ultrasound // *Ultrason. Sonochem.* – 2005, N 12. – P. 301–306.

43. Swamy K. M., Sukla L. B., Narayana K. L., Kar R. N. Use of ultrasound in microbial leaching of nickel from laterites // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 1995. – V. 2, N 1. – P. 55–59.

44. Toraman O. Y., Delibalta M. S. Ultrasonic Desulfurization of Low Rank Turkish Coal Using Various Chemical Reagents // *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology (JMEST)*. – 2016. – P. 4621–4623.

45. Willscher S., Bosecker K. Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump // *Hydrometallurgy*. – 2003, N 71. – P. 257–264.

46. Yi Wai Chiang, Rafael M. Santos, Aldo Van Audenaerde, Annick Monballiu, Tom Van Gerven. Chemoorganotrophic Bioleaching of Olivine for Nickel Recovery // *Minerals*. – 2014, N 4. – P. 564–573.

47. Yusuf Chist. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity // *TRENDS in Biotechnology*. – 2003, N 21. – P. 89–93.

References

1. Akopjan VB. Fundamentals of interaction of ultrasound with biological objects. Moscow: MGTU Bauman. 2005. 225 p.

2. Antusheva TI. Some features of the influence of ultrasound on microorganisms. *Zhivye i biokosnye sistemy*. 2013; (4): 11-15.

3. Antusheva TI, Babich EM, Kivva FV, Kalinichenko SV, Ryzhkova TA, Skljjar NI, Kovalenko OI. The influence of ultrasound and electromagnetic waves in the millimeter range on the adhesive properties of *C. diphtheria*. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2014; (3): 48-52.



4. Bergman L. Ultrasound and its application in science and technology. M.: Izd-vo inostr. lit-ry. 1957. 726 p.
5. Blayda IA, Vasileva TV. Bacterial desulphurization of Coals (review). *Microbiology & Biotechnology*. 2017; (3): 6-23.
DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3\(39\).110877](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.3(39).110877).
6. layda IA, Vasileva TV, Baranov VI. The use of bio-hydrometallurgical technologies in solving problems utilization of manmade waste and receiving from them valuable metals. *Kompleksnoe ispolzovanie mineralnogo syr'ya*. 2015; (3): 75-82.
7. Gubin GG, Jarosh TP, Skljar LV. Generalization and analysis of the possibility of using ultrasonic vibrations during processing of minerals. *Special'ni ta kombinovani metodi. Zbagachennja korisnih kopolin*. 2016; 62 (103): 78-87.
8. Demin IJu, Pronchatov-Rubcov NV. Modern acoustic methods of research in biology and medicine (teaching and methodological materials). *Nizhnij Novgorod*. 2007. 118 p.
9. Isaenko E Ju. Application of ultrasound for the disintegration of microbial cells. *Annals of Mechnicov Institute*. 2008; (1): 5-9.
10. Karavajko GI, Dubinina GA, Kondrat'eva TF. Lithotrophic microorganisms of oxidation cycles of sulfur and iron. *Mikrobiologija*. 2006; (5): 593-629.
11. Karasjova EI, Tarun EI, Metelica DI. Ultrasonic inactivation of glucose oxidase *Aspergillus niger* in aqueous solutions. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*. 2009; 45 (1): 14-22.
12. Keller OK. Ultrasonic cleaning. L.: Mashinostroenie. 1977. 325 p.
13. Radiation diagnostics: Textbook V.1. Eds GE Trufanova. M.: GJeOTAR-Media. 2009: 39-44.
14. Mamchenko AV, Kij NN, Chernova LG. Investigation of the influence of methods of modification of natural dolomite on the demanganation of water. *Himija i tehnologija vody*. 2008; 30 (4): 347-35.
15. Nazimko EI. Studies on the problem of removing sulfur contained in coals. *Visti Donec'kogo girnichnogo institutu*. 2014; (2): 60-65.
16. Physical bases of ultrasound application in medicine and ecology: educational-methodical manual. Eds SP Kundasa. Minsk: MGJeU name AD Saharova, 2009. 110 p.
17. Chernyh S I, Rybakova OI, Lebedev NM, Zhirnova TI. To the study of the influence of ultrasound, magnetic fields and electric current on gold flotation. *Cvetnaja metallurgija*. 2003; (6): 15-21.
18. Shaphaev JeG, Cyrenov VZh, Chebunina EI. Disintegration of microbial cells. In: *Fundamentals of Biotechnology*. Ulan-Ude: Izdatel'stvo VSGTU, 2005: 53-65.
19. Ambedkar B, Nagarajan R, Jayanti S. Ultrasonic coal-wash for de-sulfurization. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011; (18): 718-726.
20. Anjum F, Bhatti HN, Ghauri MA. Enhanced bioleaching of metals from black shale using ultrasonics. *Hydrometallurgy*. 2010; (100): 122-128.
21. Binoy K Saikia, Adilson C Dalmora, Rahul Choudhury, Tonkeswar Das, Silvio R Taffarel, Luis FO Silva. Effective removal of sulfur components from Brazilian power-coals by ultrasonication (40 kHz) in presence of H₂O₂. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016; (32): 147-157.



22. Castro IM, Fietto JLR, Vieira RX, Tropa MJM, Campos LM. Bioleaching of zinc and nickel from silicates using *Aspergillus niger* cultures. *Hydrometallurgy*. 2000; (57): 39–49.
23. Christman CL, Carmichael AJ, Mossoba MM, Riesz P. Evidence for free radicals produced in aqueous solutions by diagnostic ultrasound. *Ultrasonics*. 1987; (25): 31–34.
24. Duran JE, Mahasay SR, Stock LM. The occurrence of elemental sulfur in coals. *Fuel*. 1986; (65): 1167–1168.
25. Franco F, Pérez-Maqueda LA, Pérez-Rodríguez JL. The effect of ultrasound on the particle size and structural disorder of a well-ordered kaolinite. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004; (274): 107–117.
26. Ghadyani Azam, Noaparast Mohammad, Ziaedin Sied. A study on the effects of ultrasonic irradiation as pretreatment method on high ash coal flotation and kinetics. *International Journal of Coal Preparation and Utilization*. 2017; (36): 1-18.
27. Ghosh S, Paul AK. Bioleaching of nickel by *Aspergillus humicola* SKP102 isolated from Indian lateritic overburden. *Journal of Sustainable Mining*. 2016; (15): 108-114.
28. Giovanni Rossi. The Microbial Desulfurization of Coal. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2014; (142): 147-167.
29. Gopi KR, Nagarajan R. Application of power ultrasound in cavitation erosion testing of nano-ceramic particle/polymer composites. *Solid State Phenomena*. 2008; (13): 191–204.
30. Kar RN, Sukla LB, Swamy KM, Panchanadikar VV, Narayana KL. Bioleaching of Lateritic Nickel Ore by Ultrasound. *Metallurgical and materials transactions*. 1996; (27): 351-354.
31. Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesions: Function and structure. *Int. J. Med. Microbiol*. 2001; (293): 34-39.
32. Kondrateva TF, Pivovarova TA, Tsaplina IA. Diversity of communities of acidophilic chemolithotrophic microorganisms in natural and technogenic ecosystems. *Microbiology*. 2012; 81 (1): 3–27.
33. Mello Paola de A, Duarte FA, Matheus AG, Mauro Korn Nunes, Valderi L Deossler, Flores Erico MM. Ultrasound assisted oxidative process for sulfur removal from petroleum product feedstocks. *Ultrason. Sonochem*. 2009; (16): 732–736.
34. Mesroghli Sh, Yperman J, Reggers G, Jorjani E, Carleer R. Impacts of sonication and post-desulfurization on organic sulfur species by reductive pyrolysis. *Fuel*. 2016; (183): 258 – 291.
35. Nagarjan R. Use of ultrasonic cavitation in surface cleaning efficiency and surface erosion rate. *J. Inst. Environ. Sci*. 2006; (49): 40–50.
36. Ozkan SG. Effects of simultaneous ultrasonic treatment on flotation of hard coal slimes. *Fuel*. 2012; (93): 576–580.
37. Perez-Rodrigue JL, Pascual J, Franco F, Jimenez de Haro, Duran A. The influence of ultrasound on the thermal behaviour of clay minerals. *Journal of the European Ceramic Society*. 2006; (26): 747–753.



38. Saikia BK, Dutta AM, Baruah BP. Feasibility studies of de-sulfurization and de-ashing of low grade medium to high sulfur coals by low energy ultrasonication. *Fuel*. 2014; (123): 12–18.
39. Shen Y, Sun T, Liub X, Jiaa J. Rapid desulfurisation of CWS via ultrasonic enhanced metal boron hydrides reduction under ambient conditions. *RSC Adv*. 2012; (2): 4189-4197.
40. Sinisteria JV. Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*. 1992; (30): 180 p.
41. Sukla LB, Panchanadikar V. Bioleaching of lateritic nickel ore using a heterotrophic micro-organism. *Hydrometallurgy*. 1983; (32): 373–379.
42. Swamy KM, Narayana KL, Vibhuti N. Bioleaching with ultrasound. *Ultrason. Sonochem*. 2005; (12): 301–306.
43. Swamy KM, Sukla LB, Narayana KL, Kar RN. Use of ultrasound in microbial leaching of nickel from laterites. *Ultrasonics Sonochemistry*. 1995; 2 (1): 55-59.
44. Toraman OY, Delibalta MS. Ultrasonic Desulfurization of Low Rank Turkish Coal Using Various Chemical Reagents. *Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology (JMEST)*. 2016: 4621-4623.
45. Willscher S, Bosecker K. Studies on the leaching behaviour of heterotrophic microorganisms isolated from an alkaline slag dump. *Hydrometallurgy*. 2003; (71): 257–264.
46. Yi Wai Chiang, Rafael M Santos, Aldo Van Audenaerde, Annick Monballiu, Tom Van Gerven. Chemoorganotrophic Bioleaching of Olivine for Nickel Recovery. *Minerals*. 2014; (4): 564-573.
47. Yusuf Chist. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *TRENDS in Biotechnology*. 2003; (21): 89-93.

Стаття надійшла до редакції 02.11.2017 р.



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.4\(40\).118939](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2017.4(40).118939)

UDK 578.825.: 578.222

**K. S. Naumenko¹, A. V. Golovan¹, G. V. Baranova¹,
Yu. G. Shermolovych², N. V. Pikun², S. D. Zagorodnya¹**

¹D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine, tel.: +38(044) 526 61 68, e-mail: krystyn.naumenko@gmail.com

²Institute of Organic Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, 5, Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine

ANALYSIS OF NEW POLYFLUOROTHIOACYLATED AMINO ACIDS DERIVATIVES BY *IN SILICO* AND *IN VITRO* METHODS

Aim. The purpose of this work was to analyze the potential biological activity and the target of action of esters of tetrafluoropropanethioacylated amino acids derivatives and to investigate the obtained results *in vitro*. **Materials and methods.** PASS software, web-server PharmMapper, PCR, MTT assay, trypan blue and neutral red assay were used. **Results.** According to PASS prediction, two compounds (10S20 and 10S21) may possess antiviral activity, Pa/ Pi was 0,294/0,005 and 0,214/0,084, respectively. Also, all compounds may possess a cytochrome c as the substrates that might play an important role in the induction of apoptosis. Several targets were identified by using molecular docking (PharmMapper). It was shown that a lot of possible targets are proteins, such as Gag-Pol protein (viral protein) and different kinds of protein kinases. Study *in vitro* showed that all compounds inhibited the replication of the Epstein-Barr virus. On the other hand, esters of fluorinated aminoacids have high levels of cytotoxicity in various lymphoblastoid cell lines, which may be due to the mechanism of action of the compounds. **Conclusions.** Our results let to relate the compound tert-butyl (2,2,3,3-tetrafluoropropanethioyl)alaninate to a perspective anti-EBV agent. Analyzed data showed, that polyfluoroalkanethioacylated amino acids derivatives (10S21 and 10S22) may possess apoptosis modulating properties.

Key words: Epstein-Barr virus, tetrafluoropropanethioacylated amino acid esters, *in silico*, *in vitro*.

Epstein-Barr virus (EBV) infection is the most common and persistent virus infection in humans, with approximately 95% of the world's population sustaining an asymptomatic life-long infection. EBV was the first detected human tumor virus. It is estimated that EBV causes more than 200,000 cases of cancer annually and 1.8% of all cancer deaths are due to EBV-induced malignancies [14, 6].

Computer-aided drug design approaches have emerged as attractive and



complementary approaches to traditional high throughput screening [5]. Virtual screening has been applied to the successful identifications of biologically active molecules.

Fluorine is often included to drug molecules as even a single atom can greatly change the chemical properties of the molecule in desirable ways. Of all commercialized pharmaceutical drugs, twenty percent contain fluorine, including important drugs from different pharmacological classes [11]. Adding of fluorine atom(s) into a compound result in increasing of hydrophilicity of the whole molecule and thus might help to penetrate through the cell membrane [8]. The use of fluorinated aminoacids to modulate peptide and protein structure has become more prevalent in recent years. The replacement of hydrophobic amino acid residues with polyfluorothioacylated amino acids has provided peptides with clear differences to the native peptide in terms of structure and activity.

The purpose of this work was to analyze the potential biological activity and the target of action of derivatives of esters of tetrafluoropropanethiyl amino acids by using *in silico* methods and examined received results by *in vitro* study. Therefore, in a first step, we used the PASS software and PharmMapper online tool by which we could identify potential biological activity and possible targets of polyfluoroalkanethioacylated amino acids esters. In a second step, we used *in vitro* methods for study cytotoxicity and antiviral potential study of the new compounds.

Materials and methods

Cell cultures. Raji cells are a human Burkitt's lymphoma-derived cell line, containing the latent form of EBV cycle. B95-8 cells are a lymphoblastic cell line, transformed by EBV and chronically producing virus. Raji and B95-8 cell lines were obtained from the Bank of Cell Cultures of the Institute of Virology of the RAMS (Russia). All cell lines were grown in the culture medium containing 90% of RPMI 1640 with L-glutamine ("Sigma", USA), 10% fetal bovine serum (FBS, "Sigma", USA) and gentamicin (100 µg/ml) ("Sigma", USA). Cultivation was performed at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. For detection of antiviral activity of studied compounds, Raji cells were infected with EBV.

Chemical substances. Amino acids derivatives: tert-butyl (2,2,3,3-tetra fluoropropanethiyl)alaninate (10S-20), methyl (2,2,3,3-tetrafluoropropanethiyl)phenylalaninate (10S-21) and methyl (2,2,3,3-tetrafluoropropanethiyl) tryptophanate (10S-22) were synthesized at the Institute of Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine [8]. The substances were dissolved in DMSO (dimethyl sulfoxide) and filtered through a filter with a pore diameter of 0.22 microns (Sarstedt, USA). Working solutions were prepared to the culture medium.

The neutral red uptake assay (NRU) method was used as previously described [3]. The absorbance of the plate was determined spectrophotometrically at 538 nm on a Multiskan FC universal microplate reader (Thermo Scientific, USA).

Trypan blue exclusion test of cell viability. The dye exclusion test is used to determine the number of viable cells present in a cell suspension. The trypan blue (0,4 %) exclusion test was used as previously described [10].

MTT assay. The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium



bromide) staining method as described by Mosmann [7] was used with minor modifications. The absorbance was determined at 538 nm on a Multiskan FC universal microplate reader (Thermo Scientific, USA) [12].

A real-time PCR (polymerase chain reaction). The assay was performed to assess the antiviral activity of various drugs against EBV [9]. DNA of virus from the samples was isolated using «innuPREP Virus DNA Kit» (Analytik Jena AC, Germany). DNA concentration was measured by Biophotometer ("Eppendorf", Germany). To detect DNA EBV in real time was using a set «Amplisens®EBV-FL» (FGYN CNIIE, Russia) according to manufacturer's recommendations (qTOWER 2.2., Germany).

PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) is a computer-based program used for the prediction of different types of biological activity for different substances. The proposed web server is freely available at <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>. PASS works on the basis of structural activity relationship (SAR) analysis [2, 4]. The PharmMapper online tool is a web server for potential drug target identification by reversed pharmacophore matching the query compound against an in-house pharmacophore model database. The proposed web server is freely available at <http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/> [13]. Statistical analysis was performed according to standard approaches of the calculation of the statistical error (standard deviation) using the computer program Microsoft Excel 2010 [1].

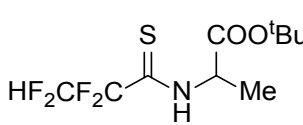
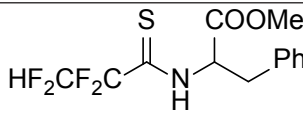
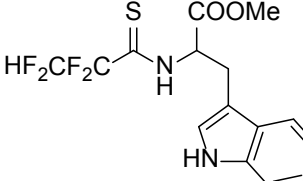
Result and discussion

With the view of finding the specific activity of these compounds, they were exploited for prediction of activity, using PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). The predicted activity spectrum of a compound is estimated as Pa (probably activity) and Pi (probable inactivity).

In the present study, PASS predicted that the antiviral activity was inherent in the compound 10s20 and 10s21, Pa/ Pi was 0,294/0,005 and 0,214/0,084, respectively (table 1).

Table 1

Predicted biological activity for compounds using PASS

	Substance	Pa	Pi	Biological activity
10S20		0,485	0,134	CYP2H substrate
		0,308	0,005	Histone deacetylase SIRT1 inhibitor
		0,294	0,005	Antiviral (<i>Picornaviruses</i>)
10S21		0,715	0,033	CYP2H substrate
		0,341	0,057	Atherosclerosis treatment
		0,214	0,084	Antiviral (<i>Hepadnaviruses</i>)
10S22		0,397	0,219	CYP2H substrate
		0,234	0,012	Histone deacetylase SIRT1 inhibitor



List of activity included antiviral activity against Picornaviruses and Hepadnaviruses (compound 10S20 and 10S21). The obtained results suggests, that studied compounds might inhibit RNA- or DNA-containing viruses, such as Epstein-Barr virus. According to PASS, all studied compounds may be a substrate for cytochrome c, which might play an important role in the induction of apoptosis. Also, all studied compounds may be a histone deacetylase inhibitors, that might effect on cell cycle.

Identification of biomolecular targets of molecules is essential for unraveling their underlying causes of effects at the molecular level. PharmMapper is a web server for identification of potential drug target based on the use of a pharmacophore mapping approach. It functions on the ligand-protein reverse docking strategy and reports potential target on the basis of normalized fit score. It was established, that the majority of the targets are enzymes, such as protein kinases and apoptotic proteins (table 2). It was shown, that compound 10S20 could interact with heat shock protein and other proteins. Both compounds, 10S21 and 10S22, might play an important role in the induction of apoptosis by interacting with a mitogen-activated protein kinase.

Table 2

Potential targets of esters of polyfluoroalkanethioacylated amino acids

Substance 10S20		Substance 10S21		Substance 10S22	
Target name	Fit score	Target name	Fit score	Target name	Fit score
Acetyltransferase	4.771	Gag-Pol polyprotein	3.963	Leukotriene hydrolase	4.533
Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	4.320	Cell division protein kinase 2	3.639	Gag-Pol polyprotein	4.468
Heat shock protein Hsp90- α	4.184	Serine/threonine-protein kinase	3.607	Purine nucleoside phosphorylase	4.288
Tyrosine-protein phosphatase	4.182	Mitogen-activating protein kinase 10	3.479	Protein-glutamine glutamyltransferase	4.078
Aspartate aminotransferase	3.904	Mitogen-activating protein kinase 14	3.291	Mitogen-activating protein kinase 1	3.910

The resulting list of prospective targets includes enzymes involved in the replication of viruses and cells. One of the features of the compounds studied is the amino acid in the structure. Thus, according to the pharmacophore mapping and the presence of amino acids, it can be assumed that these compounds can block the replication of viruses and affect various enzymes such as phosphatase, hydrolases, leading to a disturbance of their normal functioning.

Also, PharmMapper show pharmacophore model for each target from a list and helps to understand the interaction between the target and studied compound (fig. 1). Thus, hydrophobic (blue) interaction is essential for complex target and studied compounds. Also, there is less presented acceptor binding site (pink). This knowledge may help to understand the way of forming of the complex.



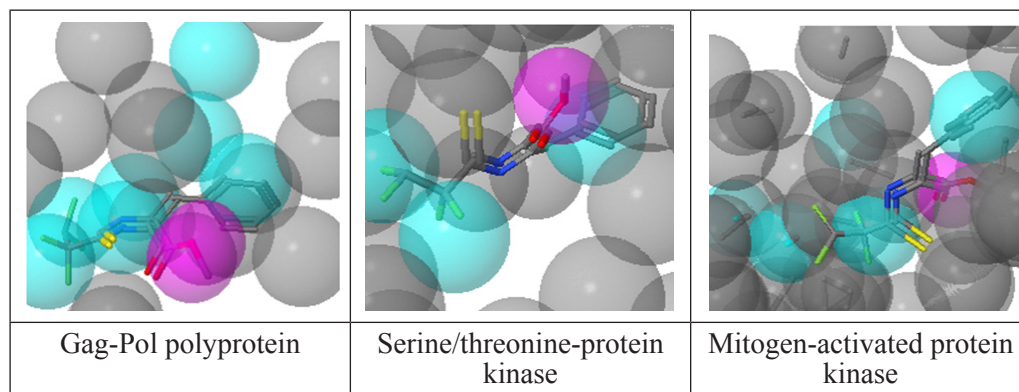
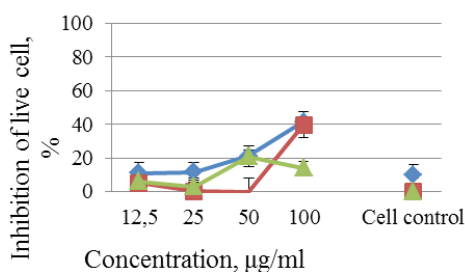


Fig. 1. The pharmacophore models of three targets for studied compounds

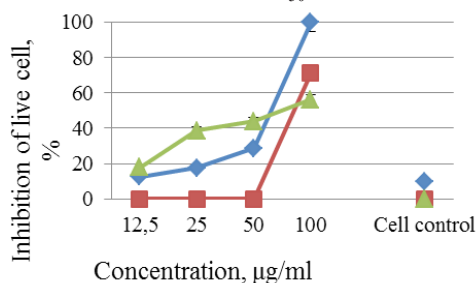
Identification of targets and prediction of possible biological activity allows to screen a large number of compounds and decided which methods to use. Any predicted property must be confirmed or disproved in the biological model. Accordingly, *in vitro* analysis of these compounds was carried out.

Determination of cytotoxicity of molecules is an integral component of any drug development process. The research was carried out by using MTT-assay, neutral red uptake assay (NRU) and trypan blue exclusion test of cell viability. Our results on Raji cell line model clearly show, that all polyfluoroalkanethioacylated amino acid esters are quite toxic (fig. 2) ($p < 0.05$).

Compound 10S20 CC_{50} – 114 $\mu\text{g/ml}$



Compound 10S21 CC_{50} – 85 $\mu\text{g/ml}$



Compound 10S22 CC_{50} – 85 $\mu\text{g/ml}$

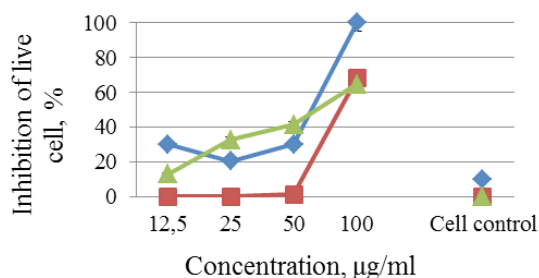


Fig. 2. The cytotoxicity of studied compounds on the model of Raji cells line (trypan blue (blue), MTT (red) and NRU (green) assay were used; $p < 0.05$)

A less toxic compound 10S20 at a high concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ showed a 40% percent inhibition of cells. Compounds 10S21 and 10S22 had shown a high level of cytotoxicity. The 50% cytotoxic concentration of studied compounds for Raji cell line was 114, 85 and 85 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The different assays showed activity on different compartments of the cell. Thus, the present work reports, that studied compounds inhibit all essential processes in Raji cells.

The cytotoxicity evaluation of studied compounds revealed a variety of cytotoxic level on the model of B95-8 cell line (fig. 3). The present study showed a high level of cytotoxicity for esters of tetrafluoropropanethiioyl amino acids on model of B95 cell line. All studied compounds inhibited living cells. The study of cytotoxicity showed inhibition of all essential processes of the cell. Thus, all compounds inhibit mitochondrial compartment of cell MTT assay.

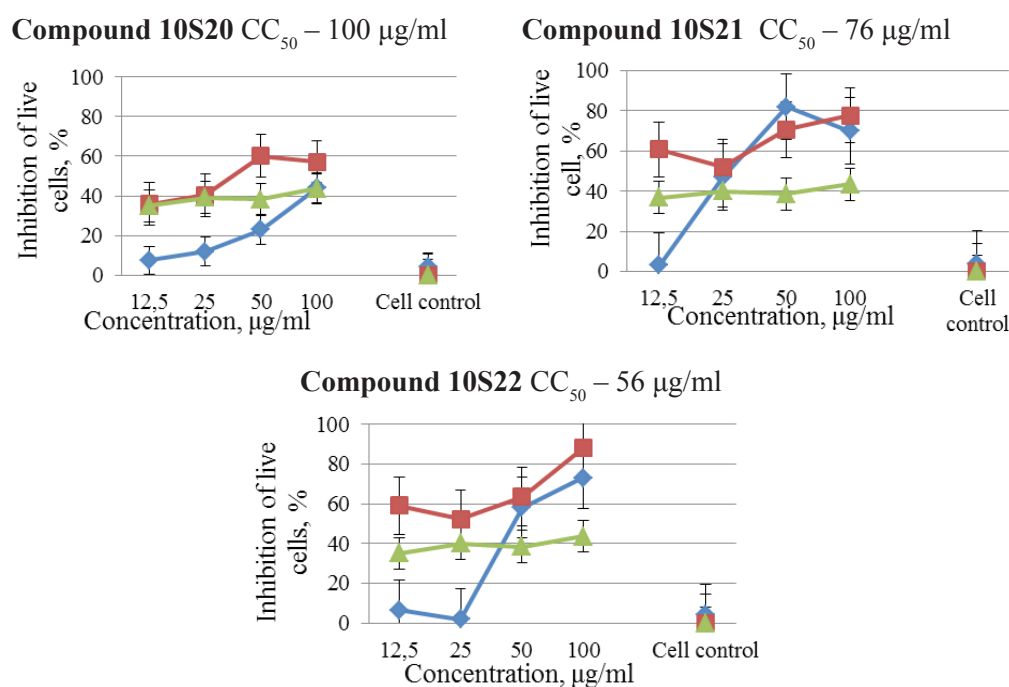


Fig. 3. The cytotoxicity of studied compounds on the model of B95 cell line (trypan blue (blue), MTT (red) and NRU (green) assay were used; $p < 0.05$)

Also, trypan blue exclusion test showed a significant alteration of the integrity of the cell membrane. The neutral red uptake assay detected increasing of activity of lysosomes. Thus, high level of cytotoxicity might affect on antiviral activity, by killing transformed cells.

Antiviral activity of the tested agents was assessed by the degree of inhibition of EBV reproduction by quantitative PCR (polymerase chain reaction) method at concentrations 1–100 $\mu\text{g/ml}$ for Raji cell culture (fig. 4). The samples for the analysis were taken after 48 h since this time interval was an optimum both for the growth dynamics of cells lines and for the EBV reproductive cycle. Study of an antiviral



action of 10S22 against EBV in infected Raji cells showed that this compound at a maximum concentration of 100 µg/ml could effectively inhibit the viral DNA accumulation by 50%. A slightly different response to increasing concentrations of the compound 10S20 was observed in the model Raji cell line. 50% inhibition of EBV replication was detected at a minimum concentration of 1 µg/ml.

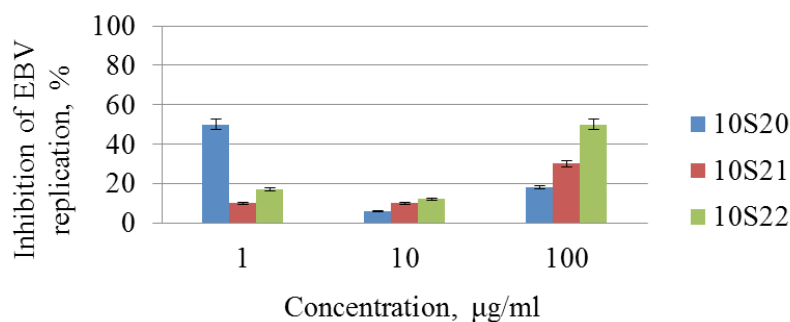


Fig. 4. Antiviral activity of esters of tetrafluoropropanethioyl amino acids derivatives on Raji cell line

It was shown, that all esters of polyfluoroalkanethioacylated amino acids derivatives have anti-EBV activity. The most perspective is the compound 10S20. Levels of antiviral activity of the compounds 10S21 and 10S22 were lower, EC₅₀ were 20 µg/ml and 100 µg/ml, respectively. Increased concentrations of the compounds may lead to an activation of protection systems of the cell, such as DNA repair, for example.

Selectivity index (SI) is used to estimate the therapeutic effect of a drug and to identify drug candidates for further studies. In terms of SI values, all investigated compounds can be sorted into two groups: inactive (SI<4) and active (SI≥4) (table 3).

Table 3

The effectiveness of the compounds relative to Epstein-Barr virus

Studied compounds	CC ₅₀ ^a	EC ₅₀ ^b	SI ^c
10S20	114	1	114
10S21	85	20	4
10S22	85	100	1

a) The 50% cytotoxic concentration of studied compound for Raji and B95-8 cells in µg/ml
 b) Concentration of compounds (µg/ml) producing 50% inhibition of EBV reproduction
 c) $SI = CC_{50} / EC_{50}$

Consequently, the compounds 10S20 and 10S21 can be considered as the active agents. The present study makes it possible to assign the compound 10S20 to a group of promising antiviral compounds, according to the high value of the selective index of 114. The compounds 10S21 and 10S22 showed anti-EBV activity and high level of cytotoxicity. EBV is associated with lymphoproliferative disorders

and one of the ways of medical treatment is the elimination of transformed cells. Thus, the compounds 10S21 and 10S22 may play an important role in treatment of lymphoproliferative disorders. Studied compounds may be substrates for cytochrome c and histone deacetylase inhibitor which might be potential inducers of apoptosis in transformed cells, too.

In the present study, the antiviral activity of esters of polyfluoroalkanethioacylated amino acids derivatives was evaluated *in silico* and *in vitro* to understand their potential spectrum as anti-EBV agents. According to PASS prediction and this study, it was shown, that derivative of esters of tetrafluoropropanethiyl amino acids 10S20 has a good selective index and may be a potential antiviral drug. The study demonstrates the ability of investigated compounds to inhibit the mechanism of virus replication. All compounds contain amino acids in their composition, in particular essential. Thus, the effect of these compounds, can be attributed to the change in the activity of the target of viral protein.

Obtained and analyzed data let to relate the compound 10S20 to a perspective anti-EBV agent, and the 10S21 and 10S22 derivatives to apoptosis-inducing compounds that can be used in further research on the antitumor action.

UDK 578.825.: 578.222

К. С. Науменко¹, А. В. Головань¹, Г. В. Баранова¹,
Ю. Г. Шермолович², Н. В. Пікун², С. Д. Загородня¹

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України, вул. акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна, тел.: +38(044)526 61 68, e-mail: krystyn.naumenko@gmail.com

²Інститут органічної хімії Національної академії наук України, вул. Мурманська, 5, Київ, 02660, Україна

АНАЛІЗ НОВИХ ПОЛІФТОРТІОАЦИЛЬОВАНИХ ПОХІДНИХ АМІНОКИСЛОТ МЕТОДАМИ *IN SILICO* ТА *IN VITRO*

Реферат

Мета роботи – проаналізувати потенційну біологічну активність та мішень дії похідних ефірів поліфтороалкантіоацильованих амінокислот за допомогою методів *in silico*, а також вивчити прогнозовані властивості *in vitro*. **Матеріали та методи.** Були використані: програмне забезпечення PASS, веб-сервер PharmMapper, ПЛР, МТТ-аналіз, забарвлення трипановим синім та метод нейтрального червоного. **Результати.** Згідно з прогнозом PASS, дві сполуки (10S20 та 10S21) можуть мати протівірусну активність, Pa/Pi становить 0,294/0,005 та 0,214/0,084, відповідно. Крім того, всі сполуки можуть бути субстратами цитохрому c, який відіграє важливу роль в індукції апоптозу. Кілька мішеней були визначені за допомогою молекулярного стикування (PharmMapper). Було показано, що більшість прогнозованих мішеней є білками, зокрема, вірусний білок Gag-Pol та різні види протеїнази. Дослідження *in vitro* показало, що всі сполуки інгібують ре-



плікацію вірусу Епітєйна-Барр. З іншого боку, похідні ефірів поліфторалкантіоацильованих амінокислот мали високий рівень цитотоксичності на різних лініях лимфобластоїдних клітин, що може бути зумовлено механізмом дії сполук. **Висновки.** Дослідження *in silico* є перспективним підходом до розробки нових антивірусних препаратів. Наші результати дозволяють віднести сполуку трет-бутил (2,2,3,3-тетрафторпропантіол)аланінат до перспективних анти-ВЕБ агентів. Отримані дані показали, що похідні ефірів поліфторалкантіоацильованих амінокислот (10S21 та 10S22) можуть мати апоптоз-модулюючий вплив, що є ключовим аспектом при розробці препаратів для онкологічних захворювань, індукованих вірусними інфекціями.

Ключові слова: вірус Епітєйна-Барра, ефіри тетрафторпропантіоацильованих амінокислот, *in silico*, *in vitro*.

**К. С. Науменко¹, А. В. Головань¹, Г. В. Баранова¹,
Ю. Г. Шермолович², Н. В. Пикун², С. Д. Загородня¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України, ул. акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна, тел.: +38(044)526 61 68, e-mail: krystyn.naumenko@gmail.com

²Інститут органічної хімії Національної академії наук України, ул. Мурманська, 5, Київ, 02660, Україна

АНАЛИЗ НОВЫХ ПОЛИФТОРТИОАЦИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДАМИ *IN SILICO* И *IN VITRO*

Реферат

Цель работы – проанализировать потенциальную биологическую активность и мишень действия производных эфиров полифторалкантиоацелированных аминокислот с помощью методов *in silico*, а также изучить прогнозируемые свойства исследуемых соединений *in vitro*. **Материалы и методы.** Были использованы: программное обеспечение PASS, веб-сервер PharmMapper, ПЦР, МТТ-анализ, окраска трипановым синим и метод нейтрального красного. **Результаты.** Согласно прогнозу PASS, два соединения (10S20 и 10S21) могут иметь антивирусную активность, Pa/Pi составляет 0,294/0,005 и 0,214/0,084, соответственно. Кроме того, эти соединения могут быть субстратами цитохрома с, который играет важную роль в индукции апоптоза. С помощью молекулярного докинга (PharmMapper) были определены потенциальные мишени. Было показано, что большинство из возможных мишеней являются белками, такими как белок Gag-Pol (вирусный белок) и различные виды протеинкиназ. Исследования *in vitro* показали, что все соединения ингибируют репликацию вируса Эпитейна-Барр. С другой стороны, производные эфиров полифторалкан-тиоацелированных аминокислот имели высокий уровень цитотоксичности на разных линиях лимфобластоидных клеток, что может быть обусловлено механизмом действия этих соединений. **Выводы.** Исследования *in silico* являются хорошим подходом для разработки новых антивирусных препаратов. Наши результаты позволяют отнести соединение трет-бутил (2,2,3,3-тетрафторпропан-тиол)аланінат к перспективным анти-ВЭБ агентам. Полученные данные показали, что производные эфиров полифторалкантиоацелированных ами-



нокислот (10S21 и 10S22) могут иметь апоптоз-модулирующие свойства, что является ключевым аспектом при разработке препаратов для онкологических заболеваний, индуцированных вирусными инфекциями.

Ключевые слова: вирус Эпштейна-Барр, эфиры полифторалкантиоацилированных аминокислот, *in silico*, *in vitro*.

References

1. Лапач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – Киев:Морион, 2002. – 407 с.
2. Balasundaram A., Ragupathy R., Sankar S., Thiyagarajan M., Ravi L., Karuppasamy R., Veerappapillai S. Investigation of Phytocompounds and Computational Approach for the Evaluation of Therapeutic Properties of Ethanolic Leaf Extract of *Callistemon citrinus* // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. – 2016. – **37**, № 1. – P. 110–116.
3. Borenfreund E., Puerner J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption // Toxicol Lett. – 1985. – **24**, № 2–3. – P. 119–124.
4. Filimonov D., Lagunin A., Glorizova T., Rudik A., Druzhilovskii D., Pogodin P., Poroikov V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource // Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2014. – **50**, № 3 – P. 444–457.
5. Li N., Thompson S., Jiang H., Lieberman P., Luo C. Development of the drugs for Epstein-Barr virus using high-throughput *in silico* virtual screening // Expert Opin Drug Discov. – 2010. – **5**, № 12. – P. 1189–1203.
6. Lin J. Antiviral therapy for Epstein-Barr virus-associated diseases // Tzu Chi Med J. – 2005. – **17**, № 1. – P. 1–10.
7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J Immunol Methods. – 1983. – **65**. № 1–2. – P. 55–63.
8. Pikun N., Mykhaylychenko S., Kulik I., Shermolovich Yu. Primary polyfluoroalkanethioamides as mild thioacylating reagents for alkyl amines and α -amino acid esters // J. Fluorine Chem. – 2016. – **185**. – P. 86–90.
9. Romain C., Balfour H., Vezina H., Holman C. A method for evaluating antiviral drug susceptibility of Epstein-Barr virus // Virus Adaptation and Treatment. – 2010. – **2**. – P. 1–7.
10. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability // Current Protocols in Immunology. – 2001. – Vol. 21. – P. A.3B.1–A.3B.2.
11. Swinson J. Fluorine – a vital element in the medicine chest // PharmaChem. – 2005. – **25**, № 1. – P. 26–30.
12. Tonder A., Joubert A., Cromarty D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays // BMC Research Notes. – 2015. – **8**, № 47. – P. 1–10.
13. Wang X., Shen Y., Wang S., Li S., Zhang W., Liu X., Lai L., Pei J., Li H. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification



with a comprehensive target pharmacophore database // *Nucleic Acids Res.* 2017. – **45**, № W1. – P. 356–360.

14. Young L, Yap L, Murray P. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises // *Nature Reviews Cancer* – 2016. – **16**. – P. 789–802.

References (2)

1. Lapach S.N., Chubenco A.V., Babich P.N. Statistical methods in medical and biological research using Excel.- Kyiv: MORION. – 2001. 408 [In Russian].

2. Balasundaram A., Ragupathy R., Sankar S., Thiyagarajan M., Ravi L., Karuppasamy R., Veerappapillai S. Investigation of Phytocompounds and Computational Approach for the Evaluation of Therapeutic Properties of Ethanolic Leaf Extract of *Callistemon citrinus*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2016; 37(1):110-116.

3. Borenfreund E. Puerner J. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985; 24(2–3):119–124.

4. Filimonov D, Lagunin A, Glorizova T, Rudik A, Druzhilovskii D, Pogodin P, Poroikov V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chemistry of Heterocyclic Compounds.* 2014; 50(3):444-457.

5. Li N, Thompson S, Jiang H, Lieberman P, Luo C. Development of the drug for Epstein-Barr virus using high-throughput *in silico* virtual screening. *Expert Opin Drug Discov.* 2010; 5(12):1189-1203.

6. Lin J. Antiviral therapy for Epstein-Barr virus-associated diseases. *Chi Med J.* 2005; 17(1):1-10.

7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55-63.

8. Pikun N, Mykhaylychenko S, Kulik I, Shermolovich Yu. Primary polyfluoroalkanethioamides as mild thioacylating reagents for alkyl amines and α -amino acid esters. *J. Fluorine Chem.* 2016; 185 :86–90.

9. Romain C, Balfour H, Vezina H, Holman C. A method for evaluating antiviral drug susceptibility of Epstein-Barr virus. *Virus Adaptation and Treatment.* 2010; 2:1-7.

10. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology.* 2001; 21:A.3B.1-A.3B.2.

11. Swinson J. Fluorine – a vital element in the medicine chest. *PharmaChem.* 2005; 25(1):26–30.

12. Tonder A, Joubert A, Cromarty D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes.* 2015; 8(47):1-10.

13. Wang X, Shen Y, Wang S, Li S, Zhang W, Liu X, Lai L, Pei J, Li H. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(W1):356-360.

14. Young L, Yap L, Murray P. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nature Reviews Cancer.* 2016; 16:789-802.

Стаття надійшла до редакції 13.11.2017 р.



Д. В. Крутило

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва
НААН, вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна,
тел.: +38(04622) 3 17 49, e-mail: krutylodv@gmail.com

RFLP-АНАЛІЗ БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ ВИДУ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*, ПОШИРЕНИХ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ

Мета. Дослідити генетичну різноманітність бульбочкових бактерій – мікросимбіонтів сої, поширених в агроценозах України. **Методи.** Бульбочкові бактерії виділяли з бульбочок сої, яку вирощували на зразках ґрунту, відібраних у різних регіонах України. Ампліфікацію міжгенного регіону 16S-23S рРНК (ITS-регіон) проводили з використанням праймерів FGPS1490-72 та FGPL132-38. Для рестрикції ПЛР-продуктів застосовували ендонуклеази рестрикції *MspI*, *HaeIII* та *NdeII*. **Результати.** За використання методу ПЛР-RFLP досліджено різноманітність штамів *Bradyrhizobium japonicum* з різною швидкістю росту. Аналіз 16S-23S рДНК за використання рестриктаз *MspI*, *HaeIII* та *NdeII* показав, що усі інтенсивнорослі штами мали однакові рестрикційні профілі, на основі чого вони об'єднані в одну генетичну групу. За рестрикції ITS-регіону повільнорослих штамів ферментом *MspI* їх віднесено до двох генетичних груп, *HaeIII* – до трьох, *NdeII* – до чотирьох геномогруп. **Висновки.** Виявлена висока гетерогенність штамів *B. japonicum*, вилучених із агроценозів сої. За структурою міжгенного регіону їх віднесено до різних ITS-типів. Повільнорослі штами виявилися більш різноманітними порівняно із штамами з інтенсивним ростом, які утворювали гомогенну геномогрупу.

Ключові слова: *Bradyrhizobium japonicum*, генетичний поліморфізм, ITS-регіон, RFLP-аналіз, соя.

Інтенсивне впровадження бобових культур на нових територіях сприяє збільшенню біологічної різноманітності їх мікросимбіонтів – бульбочкових бактерій (ризобій). Інформація щодо генетичних властивостей місцевих ризобій може бути корисною при вивченні популяційної генетики та екології цих мікроорганізмів [13].

Молекулярно-біологічні методи, що використовуються для оцінки різноманітності бульбочкових бактерій, включають аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (RFLP), аналіз поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів (AFLP), аналіз довільно ампліфікованої поліморфної ДНК (RAPD). Інші методи, такі як гібридизація ДНК-ДНК та аналіз мультилокусного секвенування (MLSA) також актуальні при вивченні ризобіальної таксономії та різноманіття [8, 13].

© Д. В. Крутило, 2017



Як філогенетичні маркери застосовують гени «домашнього господарства» (housekeeping genes), а також гени рибосомального кластеру. Проте слід наголосити, що рибосомні гени є консервативними і використовуються в основному для диференціації мікроорганізмів на родовому рівні. Більш варіабельними, ніж структурні рибосомні гени, є міжгенні спейсерні ділянки (спейсер – це нуклеотидна послідовність ДНК, яка розділяє гени). Використання їх для ідентифікації дозволяє розрізнити близько споріднені види і підвиди мікроорганізмів.

За використання сучасних молекулярно-генетичних методів встановлено, що у симбіотичні взаємовідносини з культурною соєю (*Glycine max* (L.) Merr.) можуть вступати бульбочкові бактерії різних родів: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) та *Mesorhizobium*. Вони представлені кількома видами бактерій з різною швидкістю росту: повільнорослі *Bradyrhizobium japonicum* [5], *B. elkanii* [7], *B. liaoningense* [15] і *B. yuanmingense* [16] та швидкорослі *Ensifer* (*Sinorhizobium*) *fredii*, *S. xinjiangensis* [10] і *M. tianshanense* [4]. Типовими мікросимбіонтами сої в ґрунтах України виступають лише повільнорослі бульбочкові бактерії виду *B. japonicum* [1].

При проведенні моніторингу місцевих ризобій сої нами встановлено, що в агроценозах України сформувалися і функціонують різні за щільністю локальні популяції цих мікроорганізмів. Незважаючи на одноманітність інтродукованих штамів-інокулянтів, ґрунтові популяції є досить гетерогенними. Серед їх представників виявлено штами, які характеризуються підвищеною швидкістю росту і умовно названі «штамами з інтенсивним ростом». Ці штами мають комплекс характерних ознак і істотно відрізняються від типових повільнорослих ризобій сої за морфолого-культуральними, фізіологічними, хемотаксономічними та серологічними властивостями [2, 6]. Проведення молекулярно-генетичного аналізу бульбочкових бактерій сої з різною швидкістю росту дозволить краще зрозуміти особливості формування популяцій мікросимбіонтів цієї культури в ґрунтах України та їх здатність адаптуватися до конкретних екологічних умов.

Метою нашої роботи було дослідити генетичну різноманітність бульбочкових бактерій – мікросимбіонтів сої, поширених в агроценозах України.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами *B. japonicum*, виділені з бульбочок сої, яку вирощували на зразках ґрунту з різних регіонів України: Вінницької, Сумської, Київської та Чернігівської областей. Також використовували типовий штам *Bradyrhizobium japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^T), штам *B. japonicum* 6346 та штам-реізолят *B. japonicum* OR – біоагент препарату Оптимайз.

Для типування штамів ризобій сої та виявлення їх ідентичності проводили RFLP-аналіз (*restriction fragments length polymorphism*) послідовностей між генами 16S рРНК та 23S рРНК (ITS-регіон).

ДНК виділяли з 5-ти добових культур за допомогою набору «ДНК-со-рб Б» (метод швидкого лізису). Ампліфікацію міжгенного спейсера 16S-23S рРНК здійснювали за допомогою праймерів: FGPS1490-72 та FGPL132-38 [9,



11]. Температурно-часовий профіль ампліфікації: денатурація при 94 °С – 30 с, відпал праймерів при 55 °С – 30 с, синтез комплементарного ланцюга при 72 °С – 1 хв (30 циклів).

Рестрикцію ПЛР-продуктів проводили за використання ендонуклеаз рестрикції *MspI*, *HaeIII*, *NdeII* ("Fermentas", США) згідно з інструкцією виробника. Оброблену рестриктазами ДНК аналізували за допомогою електрофорезу у 2,5% агарозному гелі. Розмір отриманих фрагментів ДНК визначали із застосуванням комп'ютерної програми Total Lab v. 2.01.

Результати та їх обговорення

У роботі досліджували одинадцять штамів *B. japonicum* з повільним та інтенсивним ростом (табл. 1). Усі інтенсивнорослі штами, вилучені з ґрунтів різних регіонів України, відносяться до однієї серогрупи – KB11. Повільнорослі ризобії належать до п'яти серологічних груп: 1967, 46, M8, 6346 та OR.

Таблиця 1

Характеристика штамів *B. japonicum* з різною швидкістю росту

Table 1

Characteristic of *B. japonicum* strains with different growth rates

Штами мікроорганізмів	Місце виділення	Характер росту на агаризованому середовищі	Серогрупа
<i>B. japonicum</i> KB1	Україна, Вінницька обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> KC20	Україна, Сумська обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> KC21	Україна, Сумська обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	Японія	Повільний	1967
<i>B. japonicum</i> 46	Україна, Вінницька обл.	Повільний	46
<i>B. japonicum</i> KC2	Україна, Сумська обл.	Повільний	M8
<i>B. japonicum</i> CH2	Україна, Чернігівська обл.	Повільний	46
<i>B. japonicum</i> 6346	Росія	Повільний	6346
<i>B. japonicum</i> OR	Україна, Вінницька обл.	Повільний	OR
<i>B. japonicum</i> SK4	Україна, Київська обл.	Інтенсивний	KB11
<i>B. japonicum</i> K32	Україна, Київська обл.	Інтенсивний	KB11



Для диференціації зазначених штамів на внутрішньовидовому рівні нами досліджено поліморфізм їх міжгенного спейсера 16S-23S рРНК (ITS-регіон). Як видно з рис. 1, за ампліфікації ITS-регіону в усіх штамів утворювався один фрагмент ДНК розміром ~1000 пар нуклеотидів (п.н.), який потім порізно розщеплювали трьома ферментами ендонуклеазами рестрикції: *MspI*, *HaeIII* та *NdeII*.

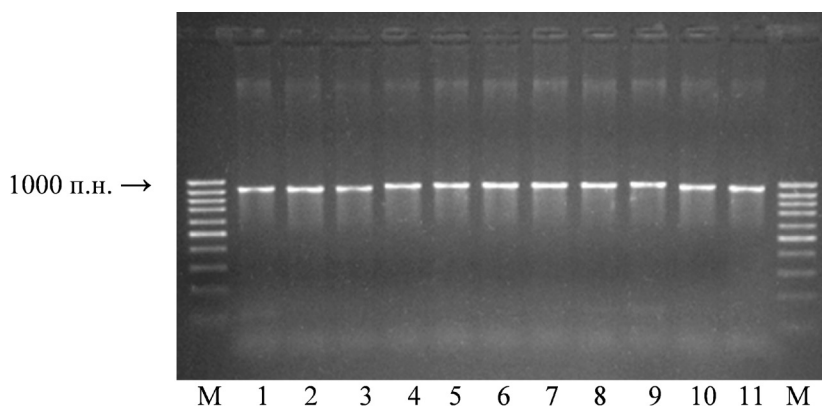


Рис. 1. Результати ПЛР-ампліфікації 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* з різною швидкістю росту:

М – маркер молекулярної маси; штамів *B. japonicum* з інтенсивним ростом:
1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – СК4, 11 – К32;
штамів *B. japonicum* з повільним ростом:
4 – типовий штам VKM В-1967 (USDA 6^Т),
5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 6346, 9 – OR.

Fig. 1. Results of PCR amplification of 16S-23S rDNA from *B. japonicum* strains with different growth rate:

М – marker of molecular weight M100; strains of *B. japonicum* with an intensive growth rate
(1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – СК4, 11 – К32);
strains of *B. japonicum* with slow growth rate
(4 – type strain *B. japonicum* VKM В-1967 (USDA 6^Т),
5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 6346, 9 – OR).

Використання ПЛР із наступним рестрикційним аналізом дозволило виявити варіабельність ITS-регіону у штамів *B. japonicum* різного еколого-географічного походження (рис. 2). Внаслідок незалежного розщеплення ампліфікатів міжгенного спейсера трьома рестриктазами утворювалося від 3 до 5 фрагментів ДНК. Порівняння отриманих патернів свідчить, що за використання кожної з рестриктаз формувався свій характерний набір фрагментів ДНК.

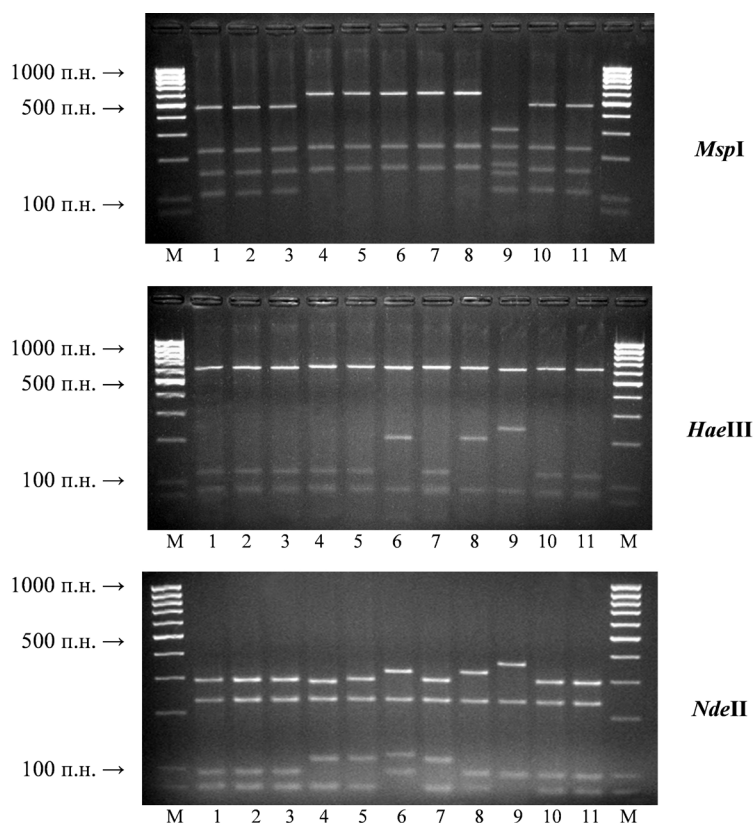


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* після обробки рестриктазами:

М – маркер молекулярної маси М100; штами *B. japonicum* з інтенсивним ростом (1 – КВ1, 2 – КС20, 3 – КС21, 10 – СК4, 11 – К32); штами *B. japonicum* з повільним ростом (4 – типовий штам *B. japonicum* VKM В-1967 (USDA 6^Т), 5 – 46, 6 – КС2, 7 – СН2, 8 – 634б, 9 – ОР).

Fig. 2. Electrophoretic analysis of restriction products 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains after processing by restrictases:

М – marker of molecular weight M100; strains of *B. japonicum* with intensive growth rate (1 – KB1, 2 – KC20, 3 – KC21, 10 – SK4, 11 – K32); strains of *B. japonicum* with slow growth rate (4 – type strain *B. japonicum* VKM В-1967 (USDA 6^T), 5 – 46, 6 – KC2, 7 – CH2, 8 – 634b, 9 – OR).

За структурою міжгенного регіону 16S-23S рРНК досліджувані штами розподілено на різні ITS-типи (табл. 2). Так, за схожістю рестрикційних патернів ДНК, отриманих при застосуванні рестриктази *MspI* (сайт зв'язування – C[^]CGG), різобії сої утворювали три ITS-типи (МІ–МІІІ). Слід наголосити, що всі інтенсивнорослі штами *B. japonicum* KB1, KC20, KC21, СК4 та К32 мали ідентичні профілі (фінгерпринти) ДНК та були віднесені до одного ITS-типу – МІ. Повільнорослі штами, які генерували різну кількість рестрикційних фрагментів ДНК, об'єднані нами у два ITS-типи. У фінгерпринтах штамів *B. japonicum* VKM В-1967 (USDA 6^T), 46, КС2, СН2 та 634б були на-



явні три фрагменти розміром 150, 220, 590 п.н., вони утворювали МІ ITS-тип. Унікальним патерном характеризувався штаб *B. japonicum* OR, який мав лише один спільний фрагмент (220 п.н.) із рештою повільнорослих штабів ризобій. Цей штаб віднесено до МІІІ ITS-типу.

Таблиця 2

ITS-типи, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК штабів *B. japonicum* за використання рестриктази *MspI*

Table 2

ITS-types obtained during PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains using the restrictase *MspI*

Штаби мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
<i>B. japonicum</i> KB1	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC20	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC21	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> 46	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> KC2	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> CH2	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> 6346	150, 220, 590	3	МІІ
<i>B. japonicum</i> OR	110, 140, 160, 220, 310	5	МІІІ
<i>B. japonicum</i> СК4	110, 150, 220, 460	4	МІ
<i>B. japonicum</i> K32	110, 150, 220, 460	4	МІ

Виявлений високий ступінь гетерогенності досліджуваних штабів бульбочкових бактерій сої за структурою ITS-регіону був підтверджений за використання для рестрикційного аналізу двох інших рестриктаз – *HaeIII* та *NdeII*, які впізнають відповідні сайти зв'язування – GG[^]CC та [^]GATC.

При розщепленні 16S-23S рДНК рестриктазою *HaeIII* у досліджуваних штабів, незалежно від швидкості їх росту, утворювалося три фрагменти ДНК (табл. 3). При цьому два фрагменти розміром 90 п.н. та 650 п.н. були виявлені в усіх штабів. Відрізнялися отримані патерни за розміром третього фрагменту, що дозволило віднести штаби до трьох ITS-типів. У штабів *B. japonicum* KB1, KC20, KC21, СК4, K32 (інтенсивнорослі) та VKM В-1967 (USDA 6^T) і 46 (повільнорослі) розмір цього фрагменту становив 120 п.н. – це МІ ITS-тип. Два штаби бульбочкових бактерій з повільним ростом – *B. japonicum* KC2 та 6346 об'єднані у МІІ ITS-тип. В їх рестрикційних профілях наявний фрагмент розміром 200 п.н. Лише штаб *B. japonicum* OR мав патерн із набором фрагментів: 90, 230, 650 п.н., і представляв МІІІ ITS-тип.



Таблиця 3
 ITS-типи, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* за використання рестриктази *HaeIII*

Table 3
 ITS-types obtained during PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains using the restrictase *HaeIII*

Штами мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
<i>B. japonicum</i> KB1	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> KC20	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> KC21	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> 46	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> KC2	90, 200, 650	3	НІІ
<i>B. japonicum</i> CH2	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> 6346	90, 200, 650	3	НІІ
<i>B. japonicum</i> OR	90, 230, 650	3	НІІІ
<i>B. japonicum</i> СК4	90, 120, 650	3	НІ
<i>B. japonicum</i> K32	90, 120, 650	3	НІ

Таблиця 4
 ITS-типи, отримані під час ПЛР-RFLP аналізу 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* за використання рестриктази *NdeII*

Table 4
 ITS-types obtained during PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA of *B. japonicum* strains using the restrictase *NdeII*

Штами мікроорганізмів	Розмір фрагментів (п.н.)	Кількість фрагментів	рДНК ITS-типи
<i>B. japonicum</i> KB1	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC20	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> KC21	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	80, 120, 230, 300	4	МІІ
<i>B. japonicum</i> 46	80, 120, 230, 300	4	МІІ
<i>B. japonicum</i> KC2	100, 130, 230, 330	4	МІІІ
<i>B. japonicum</i> CH2	80, 120, 230, 300	4	МІІ
<i>B. japonicum</i> 6346	80, 100, 230, 330	4	МІV
<i>B. japonicum</i> OR	100, 230, 370	3	МV
<i>B. japonicum</i> СК4	80, 100, 230, 300	4	МІ
<i>B. japonicum</i> K32	80, 100, 230, 300	4	МІ



За використання ендонуклеази рестрикції *Nde*II досліджувані штами ризобій сої об'єднані у п'ять ITS-типів (NI-NV) (табл. 4). При цьому, усі штами бульбочкових бактерій з інтенсивним ростом – *B. japonicum* KB1, KC20, KC21, SK4 та K32 виявилися подібними за рестрикційними профілями і утворювали один ITS-тип – NI. Повільнорослі штами *B. japonicum* VKM B-1967 (USDA 6^T), 46, KC2, CH2 та 6346 були більш гетерогенними, вони утворювали чотири ITS-типи. Спільним для всіх досліджених штамів виявився фрагмент розміром 230 п.н.

Слід наголосити, що отримані результати щодо гетерогенності досліджених штамів *B. japonicum* підтверджуються літературними даними. Значне різноманіття бульбочкових бактерій – мікросимбіонтів сої в ґрунтових популяціях показано іншими дослідниками. Так, S. Sikoга із співавторами, за використання методів геномного фінгерпринтингу, встановили, що в агроценозах Хорватії бактерії виду *B. japonicum* мають істотні відмінності і належать до трьох генетичних груп [12]. ПЛР-RFLP аналіз 16S-23S рДНК ризобій сої, поширених в ґрунтах Кенії, дозволив віднести їх до тринадцяти ITS-типів. При цьому переважальними мікросимбіонтами сої виявились представники лише п'яти ITS-типів [14]. Бульбочкові бактерії, ізольовані з бульбочок сої, яку вирощували в різних ґрунтово-кліматичних регіонах Індії, віднесені С. Аррипу із співавторами до трьох ITS-груп і ідентифіковані як *B. liaoningense*, *B. uyanmingens* та *B. japonicum* *bv. glycinearum* [3].

Показано, що штами *B. japonicum*, поширені в ґрунтах України, належать до різних генетичних груп (табл. 5). Найбільші генетичні відмінності у досліджуваних ризобій відмічено за використання рестриктази *Nde*II – одинадцять штамів *B. japonicum* віднесено до п'яти ITS-типів.

Аналізуючи серологічне різноманіття штамів *B. japonicum* та їх відмінності за структурою ITS-регіону слід наголосити, що усі інтенсивнорослі штами, які є представниками однієї серогрупи KB11, виявилися подібними і утворювали гомогенну генетичну групу. Тоді як серологічно відмінні повільнорослі штами, які належать до п'яти серогруп (1967, 46, M8, 6346 та OR) є більш різнорідними і на молекулярно-генетичному рівні – вони формують від двох до чотирьох геномогруп, залежно від рестриктази.

Таким чином, на основі рестрикційних профілів 16S-23S рДНК досліджувані штами бульбочкових бактерій, виділені з агроценозів сої, віднесені до різних ITS-типів. Високий рівень поліморфізму виявлено у штамів *B. japonicum* з повільним ростом. За рестрикції ITS-регіону ферментом *Msp*I їх віднесено до двох генетичних груп, *Hae*III – до трьох, *Nde*II – до чотирьох геномогруп. На відміну від повільнорослих штамів, ризобії сої з інтенсивним ростом мали однакові рестрикційні профілі за використання кожної із трьох рестриктаз, у результаті чого їх об'єднано в одну генетичну групу.

Фенотипова та генотипова характеристика штамів *B. japonicum*
з різною швидкістю росту

Phenotypic and genotypic characteristics of *B. japonicum* strains
with different growth rates

Штами мікроорганізмів	Ріст на агаризованому середовищі	Серогрупа	рДНК ITS-типи за використання рестриктази:		
			<i>MspI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>NdeII</i>
<i>B. japonicum</i> KB1	Інтенсивний	KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> KC20		KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> KC21		KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> СК4	Інтенсивний	KB11	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> K32		KB11	MI	HI	NI
<i>B. japonicum</i> 1967 (USDA 6T)	Повільний	1967	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> 46		46	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> CH2		46	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> KC2		M8	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> 6346		6346	MI	HI	MI
<i>B. japonicum</i> OR		OR	MI	HI	MI

Отримані дані щодо структури міжгенного регіону 16S-23S рДНК штамів *B. japonicum* важливі для розуміння формування різноманітності мікросимбіонтів сої в агроценозах цієї культури.

Д. В. Крутило

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного
производства НААН, ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027,
Украина, тел.: +38(04622) 3-17-49,
e-mail: krutylodv@gmail.com

**RFLP-АНАЛИЗ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ
ВИДА *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*,
РАСПРОСТРАНЕННЫХ В АГРОЦЕНОЗАХ
УКРАИНЫ**

Реферат

Цель. Исследовать генетическое разнообразие клубеньковых бактерий – микросимбионтов сои, распространенных в агроценозах Украины.
Методы. Клубеньковые бактерии выделяли из клубеньков сои, которую выращивали на образцах почвы, отобранных в различных регионах Украины.



Амплификацию межгенного региона 16S-23S рРНК (ITS-регион) проводили с использованием праймеров FGPS1490-72 и FGPL132-38. Для рестрикции ПЦР-продуктов применяли эндонуклеазы рестрикции *MspI*, *HaeIII* и *NdeII*. **Результаты.** С использованием метода ПЦР-RFLP исследовано разнообразие штаммов *Bradyrhizobium japonicum* с разной скоростью роста. Анализ 16S-23S рДНК с использованием рестриктаз *MspI*, *HaeIII* и *NdeII* показал, что все интенсивнорастущие штаммы имели одинаковые рестрикционные профили, на основании чего они объединены в одну генетическую группу. На основании рестрикции ITS-региона медленно растущих штаммов ферментом *MspI* они отнесены к двум генетическим группам, *HaeIII* – к трем, *NdeII* – к четырём геномогруппам. **Выводы.** Обнаружена высокая гетерогенность штаммов *B. japonicum*, выделенных из агроценозов сои. По структуре межгенного региона они отнесены к разным ITS-типам. Медленно растущие штаммы оказались более разнородными, по сравнению со штаммами с интенсивным ростом, которые образовывали гомогенную геномогруппу.

Ключевые слова: *Bradyrhizobium japonicum*, генетический полиморфизм, ITS-регион, RFLP-анализ, соя.

D. V. Krutylo

Institute of Agricultural Microbiology and Agro-industrial Manufacture, National Academy of Agrarian Sciences; 97 Shevchenko St., Chernihiv, 14027, Ukraine, tel.: +38(04622) 3-17-49, e-mail: krutylodv@gmail.com

RFLP-ANALYSIS OF *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* NODULE BACTERIA, WIDESPREAD IN AGROCENOSIS OF UKRAINE

Summary

Aim. To investigate the genetic diversity of soybean nodule bacteria, widespread in agroecosystems of Ukraine. **Methods.** Nodule bacteria were isolated from soybean nodules grown in soil samples selected in different regions of Ukraine. The amplification of the intergenic region 16S-23S rRNA (ITS-region) was conducted with the use of primers FGPS1490-72 and FGPL132-38. For PCR-products restriction there were applied restriction endonucleases *MspI*, *HaeIII* and *NdeII*. **Results.** The diversity of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different growth-rates was investigated using PCR-RFLP method. According to analysis of 16S-23S rDNA with enzymes *MspI*, *HaeIII* and *NdeII* it was obtained that all the intensive-growing strains had the same restriction profiles, so they were combined into a single genetic group. Based on ITS-region restriction the slow-growing strains were assigned into two genetic groups using *MspI* enzyme, three genetic groups using *HaeIII* and four genogroups using *NdeII* enzyme. **Conclusions.** High heterogeneity of *B. japonicum* strains allocated from soybean agroecosystems was found. They belong to different ITS-types according to the structure of intergenic region. Slow-growing strains used to be more heterogeneous, in comparison with more intensive-growth strains, which formed a homogeneous genogroup.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, genetic polymorphism, ITS-region, RFLP-analysis, soybean.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Патики В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот / за ред. В. П. Патики. К.: Світ, 2003. – 424 с.
2. Патики В. П., Крутило Д. В., Наджернична О. В., Ковалевська Т. М. та ін. Фенотипні та генотипні ознаки бульбочкових бактерій сої, поширених у ґрунтах України // Доповіді НАН України – 2010. – № 8. – С. 167–172.
3. Appunu C., N'Zoue A., Laguerre G. Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – 74 (19). P. 5991–5996.
4. Chen W. X., Wang E. T., Li Y. B., Chen X. Q., Li Y. Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. moderately and slowly growing nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – 45. – P. 153–159.
5. Jordan D. Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1982. – 32. – P. 136–139.
6. Krutylo D. V., Zotov V. S. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine // Russian Journal of Genetics: Applied Research – 2015. – Vol. 5, № 2. – P. 102–109.
7. Kuykendall L., Saxena B., Devine T., Udell S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. // Can. J. Microbiol. 1992. – 38. – P. 501–505.
8. Naamalaa J., Jaiswalb S. K., Dakora F. D. Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils // Systematic and Applied Microbiology – 2016. – 39. – P. 336–344.
9. Normand P., Ponsonnet C., Nesme X. et al. ITS analysis of prokaryotes // Mol. Microbial Ecology Manual – 1996. – Vol. 5, № 3.4. – P. 1–12.
10. Peng G. X., Tan Z. Y., Wang E. T., Reinhold-Hurek B., Chen W. F., Chen W.X. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2002. – 52. – P. 457–462.
11. Ponsonnet C., Nesme X. Identification of Agrobacterium strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions // Arch. Microbiol. – 1994. – Vol. 161. – P. 300–309.
12. Sikora S, Redzepović S. Genotypic characterization of soybean rhizobia // Food Technol. Biotechnol. – 2003. – 41. – P. 61–67.
13. Spaink H., Kondorosi A., Hooykaas P. / Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria / Рус. пер. И.А. Тихоновича и Н.А. Проворова. – С.-Петербург: Бионт, 2002. – 568 с.
14. Wasike V. W., Lesueur D., Wachira F. N., Mungai N. W. et al. Genetic diversity of indigenous Bradyrhizobium nodulating promiscuous soybean [*Glycine max* (L) Merr.] varieties in Kenya: impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites // Plant Soil. –2009. – Vol. 322. – P. 151–163.



15. Xu L.M., Ge C., Cui Z., Li J., Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans // *Int. J. Syst. Bact.* – 1995. – 45. – P. 706–711.

16. Yao Z.Y., Kan F.L., Wang E.T., Wei G.H., Chen W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – 52. – P. 2219–2230.

References

1. Patyka VP, Kots' SYa, Volkohon VV ta in. *Biologichnyy azot / za red. VP Patyky. K.: Svit, 2003. 424 p. (in Ukrainian).*

2. Patyka VP, Krutylo DV, Nadkernychna OV, Kovalevs'ka TM ta in. Fenotypni ta henotypni oznaky bul'bochkovykh bakteriy soyi, poshyrenykh u gruntakh Ukrayiny // *Dopovidi NAN Ukrayiny. 2010. (8): 167–172. (in Ukrainian).*

3. Appunu C, N'Zoue A, Laguerre G. Genetic diversity of native bradyrhizobia isolated from soybeans (*Glycine max* L.) in different agricultural-ecological-climatic regions of India. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74 (19): 5991–5996.

4. Chen WX, Wang ET, Li YB, Chen XQ, Li Y. Characterization of *Rhizobium tianshanense* sp. nov. moderately and slowly growing nodule bacterium isolated from an acid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1995; 45: 153–159.

5. Jordan D. Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1982; 32: 136–139.

6. Krutylo DV, Zotov VS. Genotypic analysis of nodule bacteria nodulating soybean in soils of Ukraine. *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* 2015; 5 (2): 102–109.

7. Kuykendall L, Saxena B, Devine T, Udell S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 1992; 38: 501–505.

8. Naamalaa J, Jaiswal SK, Dakora FD. Microsymbiont diversity and phylogeny of native bradyrhizobia associated with soybean (*Glycine max* L. Merr.) nodulation in South African soils. *Systematic and Applied Microbiology.* 2016; 39: 336–344.

9. Normand P, Ponsonnet C, Nesme X et al. ITS analysis of prokaryotes. *Mol. Microbial Ecology Manual.* 1996; 5 (3.4): 1–12.

10. Peng GX, Tan ZY, Wang ET, Reinhold-Hurek B, Chen WF, Chen WX. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 457–462.

11. Ponsonnet C, Nesme X. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch. Microbiol.* 1994; 161: 300–309.

12. Sikora S, Redzepović S. Genotypic characterization of soybean rhizobia. *Food Technol. Biotechnol.* 2003; 41: 61–67.



13. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas P. The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria. Translated in rus. by I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov. St.-Petersburg: Biont, 2002. 568 p. (in Russian).

14. Wasike VW, Lesueur D, Wachira FN, Mungai NW et al. Genetic diversity of indigenous *Bradyrhizobium* nodulating promiscuous soybean [*Glycine max* (L) Merr.] varieties in Kenya: impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites. *Plant Soil*. 2009; 322: 151–163.

15. Xu LM, Ge C, Cui Z, Li J, Fan H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bact.* 1995; 45: 706–711.

16. Yao ZY, Kan FL, Wang ET, Wei GH, Chen WX. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 2219–2230.

Стаття надійшла до редакції 09.10.2017 р.



Д. Л. Кирик¹, Г. В. Філоненко², Н. О. Коваленко²,
О. С. Талалаєв², І. М. Скороход²

¹ Кафедра мікробіології і епідеміології НМАПО імені П. Л. Шупика,
вул. Дорогожицька, 9, Київ, 04112, Україна,
тел.: +38(044)205 49 74, e-mail: kyryk@ukr.net

² ДУ «Науково-практичний медичний центр дитячої кардіології та кардіохірургії
МОЗ України» вул. Мельникова, 24, Київ, 04050,
Україна, тел.: +38(044)284 50 03, e-mail: baklabccc@ukr.net

АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА БІОПЛІВ- КОУТВОРЮВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ЩО ВИДІЛЕНІ У ДІТЕЙ З ВРОДЖЕНИМИ ВАДАМИ СЕРЦЯ

Klebsiella pneumoniae – один з основних збудників, який викликає від 2 до 20% всіх інфекційних ускладнень у стаціонарних відділеннях лікарень. На сьогодні зареєстровані штами *K. pneumoniae*, резистентні до карбапенемів. До механізмів, які зумовлюють резистентність до карбапенемів, віднесені як продукція бета-лактамаз різних молекулярних класів, так і комбінація БЛРС (бета-лактамаз розширеного спектру дії) зі зниженою пенетрацією клітинної мембрани. **Мета.** Визначити механізми резистентності та біоплівкоутворювальні властивості штамів *K. pneumoniae*, виділених у дітей з вродженими вадами серця (ВВС) на етапі госпіталізації у кардіохірургічний центр. **Методи.** Для ідентифікації і визначення чутливості до антибіотиків досліджуваних штамів *K. pneumoniae*, використовувався бактеріологічний аналізатор VITEC 2 COMPACT (bioMérieux). Визначення біоплівкоутворювальних властивостей здійснювали методом культуральних планшетів за методикою D. Christensen. Генотипування БЛРС – позитивних ізолятів проводили за допомогою мультиплексної ПЛР. Для фенотипового виявлення карбапенемаз класу А використовували Modified Hodge Test (МНТ), для виявлення продукції карбапенемаз класу В (МВЛ) – метод «подвійних дисків» з (ЕДТА). **Результати.** Встановлено наявність БЛРС у 37 (46,8%) досліджуваних штамів *K. pneumoniae*. Показано, що носіями генів bla_{TEM} були 29 (79,3%) штамів, ген bla_{SHV} зустрічався у 21 (56,5%), а ген bla_{CTX-M} – у 18 (47,8%) досліджуваних штамів. Найбільш поширеною комбінацією детермінант резистентності стало співвідношення гену bla_{TEM} з одним геном БЛРС bla_{SHV} у 18 (48,8%) та з двома генами БЛРС bla_{CTX-M} та bla_{SHV} , що виявлено у 6 (16,2%) досліджуваних ізолятів. Здатність формувати біоплівку виявлена у 47 (59,5%) штамів *K. pneumoniae*. **Висновки.** Досліджувані штами, здатні до утворення біоплівки, проявляли більш високий рівень резистентності до всіх тестованих антибіотиків, крім колістину.

Ключові слова: *Klebsiella pneumoniae*, механізми резистентності, вроджені вади серця, біоплівка.



Klebsiella pneumoniae – один з основних збудників, який викликає від 2 до 20% всіх інфекційних ускладнень при перебуванні пацієнтів у стаціонарних відділеннях лікарень [2]. За даними ВООЗ *K. pneumoniae* посідає третє місце по частоті інфікування пацієнтів [11]. Для ефективної антибіотикопрофілактики необхідно враховувати рівні природної резистентності та постійний ріст набутої резистентності умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ), особливо родини *Enterobacteriaceae*, що продукують бета-лактамази розширеного спектру – БЛРС (ESBL – *extended spectrum beta-lactamases*) [5, 6, 7]. Найбільшою активністю до дії БЛРС наділені карбапенеми, насамперед іміпенем та меропенем. На сьогодні зареєстровані штами *K. pneumoniae*, резистентні до карбапенемів [3, 9]. До механізмів, які зумовлюють резистентність до карбапенемів, віднесені як продукція бета-лактамаз різних молекулярних класів, так і комбінація БЛРС зі зниженою пенетрацією клітинної мембрани [7, 9].

Мета дослідження: виявлення механізмів резистентності та біоплівкоутворювальних властивостей штамів *K. pneumoniae*, виділених у дітей з вродженими вадами серця (ВВС) на етапі госпіталізації у кардіохірургічний центр.

Матеріали та методи

В дослідження включені пацієнти, які були колонізовані або мали інфекцію верхніх дихальних шляхів, зумовлену *K. pneumoniae*. Всього було вивчено 79 штамів, виділених у 79 пацієнтів. В аналіз включені штами *K. pneumoniae*, виділені із дихальних шляхів у дітей на етапі госпіталізації до кардіохірургічного стаціонару за період з січня по грудень 2016 року. Штами *K. pneumoniae*, що мали однакові спектри резистентності та були повторно виділені у одного пацієнта, з аналізу виключалися.

Більшість дітей були прооперовані у зв'язку із складними поєднаними пороками серця: серед них у 32 (40,5%) пацієнтів – дефект міжшлуночкової перетинки (VSD), у 10 (12,7%) – коакртація аорти (CoAo), у 6 (7,6%) – відкрита аортальна протока (PDA), транспозиція магістральних судин (TGA), тетрада Фалло (TOF) відповідно, 4 (5,1%) – порушення ритму серця, стеноз легеневої артерії (SP) відповідно, по 3 (3,8%) – аортальний стеноз (AoSt), тотальний аномальний дренаж легеневої вени (TAPVC), антріовентрикулярна комунікація (AVSD) відповідно та по 1 (1,3%) – вторинний дефект міжшлуночкової перетинки (ASD), корегована повна атріовентрикулярна комунікація (CAVSD).

Середній вік пацієнтів склав $77,5 \pm 4,4$ днів (від 1 доби до 11 міс.), середня вага – $4,1 \pm 1,6$ кг (від 1,5 кг до 10,0 кг). Розподіл за статтю: 43 (56,4%) пацієнти – чоловічої статі, 36 (45,6%) – жіночої. Середня тривалість перебування в стаціонарі – $20,1 \pm 14,4$ ліжок/днів (від 2 до 82 л/д).

Дослідження біологічного матеріалу та інтерпретацію отриманих результатів проводили згідно з Наказом МОЗ СРСР № 535 від 22.04.85 р. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили загальноприйнятими бактеріологічними методами, дотримуючись класифікації Бергі (1997). Для ідентифікації і визначення чутливості до антибіотиків досліджуваних штамів *K. pneumoniae*, використовувався бактеріологічний аналізатор VITEC 2 COMPACT (bioMerieux).

Визначення біоплівкоутворювальних властивостей виділених мікро-



організмів здійснювали методом культуральних планшетів за методикою *D. Christensen* [12]. Оптичну щільність сформованої біоплівки оцінювали за інтенсивністю забарвлення спирту на фотометрі (Multiskan Ascent V1. 24), за довжини хвилі 620 нм. Для нівелювання похибки, пов'язаної з оптичною щільністю (ОЩ) компонентів живильного середовища, адсорбованих на планшеті, значення ОЩ контрольної лунки (стерильне живильне середовище) віднімали від результатів, отриманих для досліджених проб. Кожен дослід повторювали три рази в паралельних дослідженнях двох експериментів.

Для фенотипового виявлення продукції БЛРС використовували два методи. Перший полягав у виявленні синергізму між дисками цефотаксиму (30 мкг), цефтазидиму (30 мкг) і диском, що містить комбінацію амоксицилін/клавуланова кислота (20/10 мкг). Другий метод – у збільшенні зони затримки росту навколо дисків, цефотаксим + клавуланат (30/10 мкг) та цефтазидим + клавуланат (30/10 мкг), у порівнянні з цефотаксимом (30 мкг) і цефтазидимом (30 мкг) на ≥ 5 мм [10].

Для фенотипового виявлення карбапенемаз використовували диски з меропенемом, іміпенемом та ертапенемом. Для виявлення карбапенемаз класу А використовували *Modified Hodge Test* (МНТ), для виявлення продукції карбапенемаз класу В (MBL) – метод «подвійних дисків» з етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА). Контроль визначення чутливості проводили відповідно до рекомендацій CLSI з використанням референтних штамів Американської колекції типових культур *E. coli* ATCC 25922 і *K. pneumoniae* ATCC 700603 [10].

Для молекулярно-генетичного дослідження генетичних детермінант резистентності використовували метод мультиплексної ПЛР (полімеразно-ланцюгової реакції). Виділення ДНК з бактеріальних культур проводили за допомогою комерційного набору реактивів QIAGEN DNeasy Blood and Tissue Kit (Catalog# 69504) та NucleoSpin® Blood QuickPure kit (Macherey Nagel, Німеччина). Якісна оцінка ДНК виконана за допомогою електрофорезу в 1% агарозному гелі з 0,5% ТВЕ (трис-боратний електродний буфер).

Генотипування БЛРС-позитивних ізолятів здійснювали за допомогою послідовностей пар праймерів і методики мультиплексної ПЛР, з деякими змінами, описаними у посиланні [5, 6].

Реакційні суміші містили 1×ПЛР-буфер, 200 мкМ dNTP, 0,5 одиниці Taq полімерази (Roche, Німеччина), 10 пмоль/мкл кожного ген-специфічного праймеру. Умови ПЛР ампліфікації були наступними: початкова денатурація при 95 °С протягом 15 хв; 30 циклів денатурації при 94 °С протягом 30 с, відпал при 60° С протягом 30 с, елонгація при 72 °С протягом 2хв. з подальшою кінцевою стадією елонгації при 72 °С протягом 10 хв. ПЛР-амплікони були розділені методом електрофорезу в 2% (w/w) агарозному гелі, що містив 0,5 мкг/мл етидіум броміду (Sigma Aldrich, USA) і 0,5% буфер ТВЕ. Візуалізацію результатів проводили з системою "DOC-Print VX2" (Vilber Lourmat).

Статистичне опрацювання даних проводили за допомогою програм WHONET 5,6 та STATISTICA 6,0. Статистичну значимість різниць показників тестували за допомогою критерія Фішера. Відмінності вважали статистично значущі при $p > 0,05$.



Результати дослідження та їх обговорення

У роботі досліджено 79 штамів *K. pneumoniae*, виділених від дітей з вродженими вадами серця. Аналіз даних чутливості показав, що резистентність до окремих груп β-лактамних антибіотиків відрізнялася. Із тестованих антибіотиків найменшу активність відносно штамів *K. pneumoniae* виявив ампіцилін, до якого нечутливими були 73 (92,5%) досліджуваних штами. Резистентність до цефалоспоринов І покоління (цефазолін) мали 61 штама (77,8%), цефалоспоринов ІІ покоління (цефуроксим) – 40 (50,8%), цефалоспоринов ІІІ покоління (цефтріаксон) – 41 (51,9%). Тоді як до цефалоспоринов ІV покоління (цефепім) резистентність мали 36 (45,7%) штамів. Карбапенеми серед β-лактамних антибіотиків відносно *K. pneumoniae* мали найбільшу активність. До іміпенему, меропенему та ертапенему нечутливими були 8 (9,9%) штамів. Препаратами, альтернативними бета-лактамам, є аміноглікозиди і фторхінолони, їх активність щодо *K. pneumoniae* також була різною. Аміноглікозиди відносно *K. pneumoniae* мали не високу активність. Нечутливими до нетилміцину виявлено у 16 (19,8%) клінічних штамів, амікацину – 15 (18,5%) та тобраміцину – 14 (17,7%) відповідно. Резистентність *K. pneumoniae* до фторхінолонів становила зокрема до офлоксацину – 10 (12,3%), левофлоксацину та ципрофлоксацину по 11 (13,6%) штамів відповідно (рис. 1).

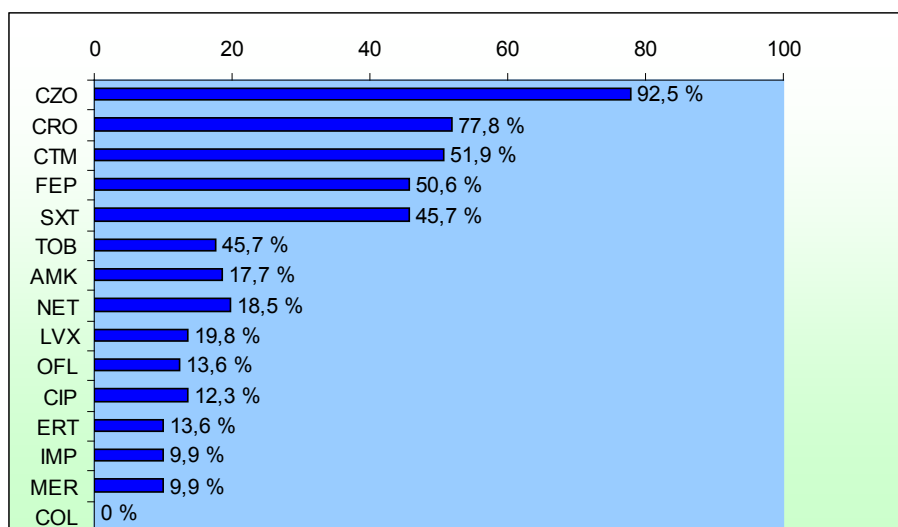


Рис. 1. Антибіотикорезистентність клінічних штамів *K. pneumoniae* (n=79)

Примітка: – AMP – ампіцилін, CZO – цефазолін, CRO – цефтріаксон, CTM-цефуроксим, FEP – цефепім, SXT – триметоприм-сульфаметаксазол, TOB – тобраміцин, AMK – амікацин, NET – нетилміцин, LVX – левофлоксацин, OFX – офлоксацин, CIP – ципрофлоксацин, ERT – ертапенем, IMP – іміпенем, MER – меропенем, COL – колістин.

Fig. 1. Antibiotic resistance of clinical strains *K. pneumoniae* (n=79)

Note: AMP – ampicillin, CZO – cefazoline, CRO – ceftriaxone, CTM- cefuroxime, FEP – cefepime, SXT – trimethoprim sulfamethoxazole, TOB – tobramycin, AMK – amikacin, NET – netilmicin, LVX – levofloxacin, OFX – ofloxacin, CIP – ciprofloxacin, ERT – ertapenem, IMP – imipenem, MER- meropenem, COL – colistin.



Слід зазначити, що поряд з резистентними штамми у пацієнтів виділялися штамми, чутливі до всіх тестованих антибіотиків: такі мікроорганізми виявлені у 6 пацієнтів, що склало 7,5%.

Вважається, що основу лікування інфекцій, викликаних представниками родини *Enterobacteriaceae*, складають бета-лактамі антибіотики, проте в стаціонарах різного профілю все частіше реєструються резистентні до них штамми. У нашому дослідженні серед виділених штамів *K. pneumoniae* лише незначна частина була чутлива до цефалоспоринів I–IV покоління – від 6,2 до 53,1%.

Фенотиповий тест на наявність БЛРС за допомогою методу подвійних дисків дав позитивний результат у 39 з 79 (49,3%) досліджуваних штамів *K. pneumoniae*. Для встановлення молекулярно-генетичної природи дані штамми були протестовані на наявність генів β -лактамаз TEM (походить від імені першого пацієнта Temoneira), SHV (сульфгідрильний реагент) та CTX-M (активний до цефтазидиму, вперше виділений в Мюнхені) методом мультиплексової ПЛР (рис. 2).

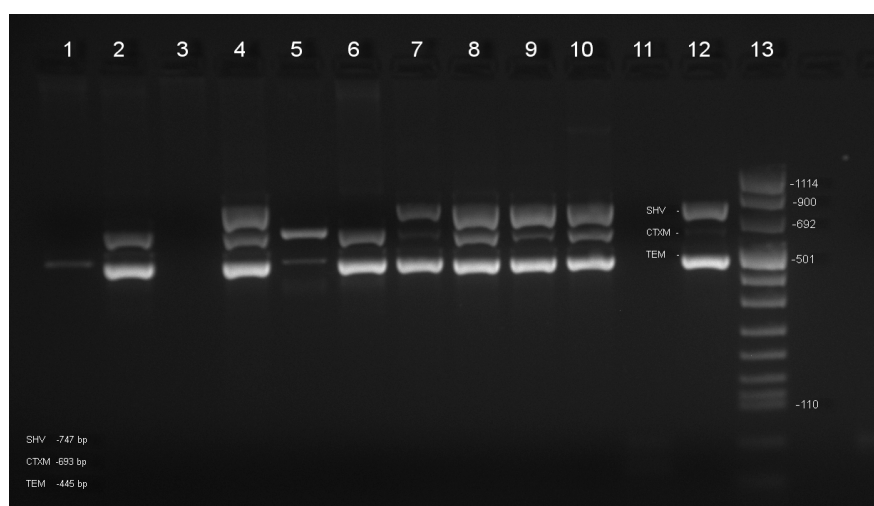


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації мультиплексової ПЛР ділянок генів резистентності штамів *K. pneumoniae*

Примітка: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – *Klebsiella pneumoniae*; 11 – бланк; 12 – контрольний штам *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 13 – молекулярний маркер.

Fig. 2. Electrophoregram analysis of multiplex PCR amplified products locus of resistance genera of strains *K. pneumoniae*

Note: 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – *Klebsiella pneumoniae*; 11 – blank; 12 – control strain *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, 13 – Molecular Weight Marker.

Так, носіями генів bla_{TEM} були 29 (79,3%) штамів, ген bla_{SHV} зустрічався у 21 (56,5%), а ген bla_{CTX-M} – у 18 (47,8%) досліджуваних штамів. Найбільш поширеною комбінацією детермінант резистентності стало співвідношення гену bla_{TEM} з одним геном БЛРС bla_{SHV} у 18 (48,8%) та з двома генами БЛРС bla_{CTX-M} та bla_{SHV} , що виявлено у 6 (16,2%) досліджуваних ізолятів (рис 3).

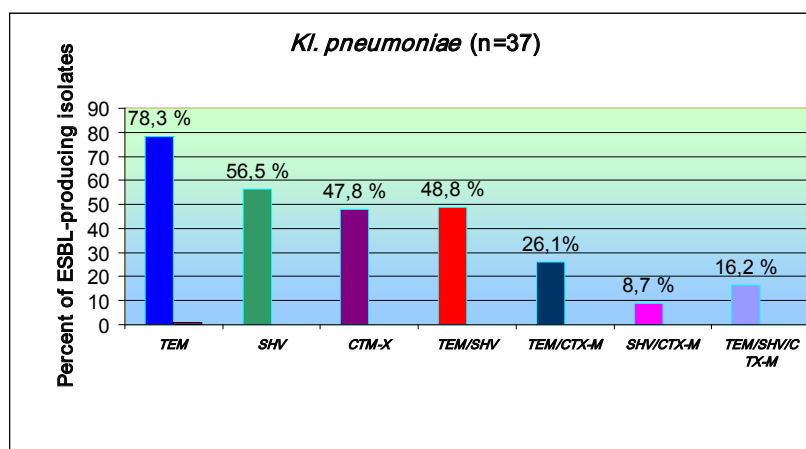


Рис. 3. Ідентифікація генів БЛРС у клінічних штамів *K. pneumoniae*
Примітка: TEM, SHV, CTX-M, TEM/SNV, TEM/CTX-M, TEM/SHV/CTX-M – гени β-лактамаз.

Fig. 3. Identification of ESBL genera in clinical strains *K. pneumoniae*
Note: TEM, SHV, CTX-M, TEM/SNV, TEM/CTX-M, TEM/SHV/CTX-M – genes of beta-lactamases.

Вивченням поширення бета-лактамаз, у тому числі БЛРС, активно займаються в багатьох країнах світу. Постійно зростає кількість публікацій, в яких наводяться дані щодо поширеності БЛРС в окремих лікувальних установах, регіонах та країнах. Дані, отримані в Європі, Північній і Південній Америці, Канаді, країнах Азіатського регіону, на Близькому Сході, свідчать про зростання стійкості збудників нозокоміальних, тобто внутрішньолікарняних, і позалікарняних інфекцій до бета-лактамних антибіотиків і значну поширеність саме БЛРС, що є серйозною проблемою для охорони здоров'я [5, 6, 7].

У нашому дослідженні у 8 (10,0%) штамів *K. pneumoniae* виявлено резистентність до карбапенемів. Всі карбапенемрезистентні штами *K. pneumoniae* були нечутливі до фторхінолонів. Чутливість до амікацину та триметоприм/сульфаметаксазолу спостерігали у 3 штамів. В нашому дослідженні колістин-резистентних карбапенемстійких ізолятів *K. pneumoniae* не було виявлено. Однак у 2009 році в Америці було зареєстровано 5 випадків виявлення таких штамів, трохи раніше в Греції також були виявлені подібні штами *K. pneumoniae*.

Таким чином, дані препарати були наділені найбільшою активністю до карбапенемрезистентних *K. pneumoniae* та можуть бути препаратами вибору для емпіричної терапії тяжких інфекцій, викликаних даним збудником.

Розподіл виділених штамів *K. pneumoniae* по регіонах був таким: 14 (17,7%) штамів з Київської області, 8 (10,1%) – Чернігівської області, по 6 (7,6%) – Вінницької, Житомирської, Миколаївської областей відповідно, по 5 (6,3%) – у Херсонській та виділених від іноземців, що знаходилися на лікуванні в кардіохірургічному центрі відповідно, 4 (5,1%) – Львівської, по 3 (3,8%) – Волинської, Запорізької, Івано-Франківської, Полтавської та Тернопільської



областей відповідно, по 2 (2,5%) – Дніпровської, Харківської та Кропивницької областей відповідно, по 1 (1,3%) – Рівненської, Сумської та Хмельницької областей відповідно.

Одним з активно досліджуваних факторів патогенності мікроорганізмів є їх здатність утворювати біоплівки. Біоплівка є структурно-функціональною «співдружністю» мікроорганізмів, які знаходяться в матриксі, що складається з екстрацелюлярного полімеру (глікокаліксу) та продуктів метаболізму мікроорганізмів. У складі біоплівки мікроорганізми захищені від пошкодження чинниками імунного захисту, антибіотиками та антисептиками. При цьому виживають субпопуляції мікроорганізмів із найбільш резистентним фенотипом, що формується в результаті тривалого впливу чинників. Більшість мікроорганізмів, що входять до складу біоплівки, мають знижений метаболізм і перебувають в стані спокою (не діляться), завдяки чому, незважаючи на вільне проникнення низки антимікробних препаратів у матрикс, різко підвищується стійкість мікроорганізмів до цих препаратів. За не зовсім зрозумілих на сьогоднішній день причин в окремих ділянках біоплівки періодично виникають вогнища проліферації з викидом у кровоток планктонних форм мікроорганізмів. Клінічна картина захворювання (від незначного періодичного субфебрилітету до сепсису) багато в чому визначається інтенсивністю утворення планктонних форм мікроорганізмів [1, 2].

Формування біоплівки в організмі хворого або на медичній діагностичній апаратурі часто спричинене збудниками внутрішньолікарняних інфекцій, у тому числі і мікроорганізмами роду *K. pneumoniae*. Саме формування біоплівки зумовлює виникнення проблем у лікуванні хронічних інфекційних хвороб, особливо при тривалому використанні апаратури (ендоскопів, катетерів, протезів тощо). Мікроорганізми в біоплівці захищені від дії хімічних агентів, антибіотиків і виявляють більшу стійкість до цих агентів. Ступінь стійкості мікроорганізмів до антибіотиків у біоплівках у 100–1000 разів вищий від планктонних форм. Для того, щоб створити у глибинних шарах біоплівки ефективну концентрацію антибіотика, потрібна в десятки і сотні разів вища доза [1, 2].

За даними фотометричного аналізу здатність формувати біоплівку на поверхні 96-лункового планшета у нашому дослідженні виявлена у 47 (59,5%) штамів *K. pneumoniae*, що колонізували верхні дихальні шляхи у дітей з вродженими вадами серця.

На відміну від нозокоміальних інфекцій, які, як правило, спричиняються мікроорганізмами з досить добре передбачуваним профілем резистентності до антимікробних препаратів, госпітальні інфекції в більшості випадків зумовлені полірезистентною мікробіотою, що створює серйозні проблеми при призначенні адекватної терапії. Головною причиною формування госпітальних штамів мікроорганізмів є широке і не завжди раціональне застосування антибіотиків, а поширення і персистенція даних штамів відбуваються внаслідок недостатньо ефективних заходів інфекційного контролю. При цьому пацієнт, потрапляючи в стаціонар, піддається різним медичним процедурам, і при цьому неминуче колонізується госпітальними мікроорганізмами, які за несприятливого збігу обставин спричиняють розвиток інфекційних усклад-



нень [2]. У низці випадків хворі на етапі госпіталізації вже є носіями резистентної мікрофлори, що пов'язано з перебуванням в інших стаціонарах, недавнім прийомом антибіотиків і ін.

Таким чином, у ході дослідження з верхніх дихальних шляхів у дітей з складними ВВС на етапі госпіталізації з різних регіонів виділено 79 штамів *K. pneumoniae*. Переважна більшість штамів виділена від пацієнтів з Києва та Київської області. У досліджуваних штамів найбільший рівень резистентності спостерігався до цефалоспоринові I–IV поколінь. У 37 штамів *K. pneumoniae* виявлена здатність до синтезу β-лактамаз. Показано, що носіями генів bla_{TEM} були 29 штамів. У 8 штамів виявлено резистентність до карбапенемів. Більше половини виділених штамів були здатні до утворення біоплівки та проявляли більш високий рівень резистентності до всіх тестованих антибіотиків, крім колістину.

Д. Л. Кирик¹, Г. В. Філоненко², Н. О. Коваленко²,
А. С. Талалаєв², І. Н. Скороход²

¹ Кафедра мікробіології та епідеміології НМАПО імені
П. Л. Шупика, ул. Дорогожицька, 9, Київ, 04112, Україна,
тел.: +38(044) 205 49 74, e-mail: kyryk@ukr.net

² ГУ «Научно-практический медицинский центр детской кардиологии
и кардиохирургии МОЗ Украины» ул. Мельникова, 24, Київ, 04050, Україна,
тел.: +38(044) 284 50 03, e-mail: baklabccc@ukr.net

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ И БИО- ПЛЁНКООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫЕ У ДЕТЕЙ С ВРОЖДЁННЫМИ ПОРОКАМИ СЕРДЦА

Реферат

Klebsiella pneumoniae – один из основных возбудителей, который вызывает от 2 до 20% всех инфекционных осложнений в стационарах. На сегодняшний день зарегистрированы штаммы *K. pneumoniae*, резистентные к карбапенемам. К механизмам, которые обуславливают резистентность к карбапенемам, отнесены как продукция бета-лактамаз различных молекулярных классов, так и комбинация БЛРС (бета-лактамаз расширенного спектра действия) со сниженной пенетрацией клеточной стенки. **Цель.** Изучить механизмы резистентности и биопленкообразующие свойства штаммов *K. pneumoniae*, выделенные у детей с врождёнными пороками сердца (ВПС) на этапе госпитализации в кардиохирургический центр. **Методы.** Для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам исследуемых штаммов *K. pneumoniae*, использовался бактериологический анализатор VITEC 2 COMPACT (bioMérieux). Определение биопленкообразующих свойств осуществляли методом культуральных планшетов по методике D. Christensen. Генотипирование БЛРС – положительных изолятов проводили с помощью мультиплексной ПЦР. Для фенотипического выявления карбапенемаз класса А использовали Modified Hodge Test (МНТ), для выявления продукции карбапенемаз класса В (MBL) – метод «двойных дисков» с (ЭДТА). **Результаты.** Установлено наличие БЛРС у 37 (46,8%) исследованных штаммов *K. pneumoniae*. Показано, что носителями генів bla_{TEM} были



29 (79,3%) штаммов, ген bla_{SHV} зустрічався у 21 (56,5%), а ген bla_{CTX-M} – у 18 (47,8%) досліджуваних штаммов. Самой розповсюдженією комбінацією детермінант резистентності стало співвідношення гена bla_{TEM} з одним геном БЛРС bla_{SHV} у 18 (48,8%) і з двома генами БЛРС bla_{CTX-M} і bla_{SHV} у 6 (16,2%) досліджуваних ізолятів. Здатність утворювати біоплівку виявлена у 47 (59,5%) штаммов *K. pneumoniae*. **Висновки.** Досліджені штамми, здатні до утворення біоплівки проявляли вищий рівень резистентності до всіх тестованих антибіотиків, крім колістину. **Ключові слова:** *Klebsiella pneumoniae*, механізми резистентності вроджені пороки серця, біоплівка

**D. Kyryk¹, G. Filonenko², N. Kovalenko¹,
O. Talalaiev², I. Skorohod²**

¹ Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education of Ukraine, 9, Dorogozhytskaya str., Kyiv, 04112, Ukraine, tel.: +38(044)205 49 74, e-mail: kyryk@ukr.net

² Ukrainian Children's Cardiac Center of Ukraine, 24, Melnykova str., Kyiv, 04050, Ukraine, tel.: +38(044)284 50 03, e-mail: baklabccc@ukr.net

ANTIBIOTIC RESISTANCE AND BIOFILM FORMATION CHARACTERISTICS OF THE STRAINS *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLATED IN CHILDREN WITH CONGENITAL HEART DISEASE

Summary

Klebsiella pneumoniae is one of the main pathogens that causes from 2 to 20% of all infectious complications. Nowadays, the strains of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems have been registered. The mechanisms that cause resistance to carbapenems are classified as production of different molecular classes beta-lactamases, as well as a combination of ESBL (extended spectrum beta-lactamases) with reduced penetration of the cell wall. **Aim.** To study the mechanisms of resistance and properties of *K. pneumoniae* biofilm-forming strains isolated in children with congenital heart disease (CHD) at the stage of hospitalization at the cardiosurgical center. **Methods.** The bacteriological analyzer VITEC 2 COMPACT (bioMérieux) was used to identify and detect antibiotic susceptibility to the investigated strains of *K. pneumoniae*. The determination of biofilm formation characteristics was carried out using culture plates using the D. Christensen method. The genotyping of the ESBL-positive isolates was performed using multiplex PCR. For phenotypic detection of class A carbapenemases, the Modified Hodge Test (MHT) was used to detect Class B carbapenemase products (MBL) – the "double disc" method with (EDTA). **Results.** Presence of ESBL was found in 37 (46.8%) of the investigated strains *K. pneumoniae*. The bla_{TEM} gene was found in 29 (79.3%), the bla_{SHV} gene in 21 (56.5%), and the bla_{CTX-M} gene in 18 (47.8%) studied strains. The most common combination of the resistance determinants was the ratio of the bla_{TEM} gene to one bla_{SHV} gene, in 18 (48.8%) and with two bla_{CTX-M} gene and bla_{SHV} in 6 (16.2%) of the studied isolates. The ability to form biofilms was found in 47 (59.5%) strains of *K. pneumoniae*. **Conclusions.** The studied strains capable of forming biofilms showed a higher level of resistance to all antibiotic testing, except for colistin. **Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, resistance mechanisms, congenital heart diseases, biofilm.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Hoiby N., Bjarsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms// Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – V. 35. – P. 322–332.
2. Rogers M.A., Blumberg N., Saint S., Langa K. M., Nallamothu B. K. Hospital variation in transfusion and infection after cardiac surgery: a cohort study// BMC Medicine. – 2009. – V.7. – №37. – doi:10.1186/1741-7015-7-37-
3. Braykov N. P., Eber M. R., Klein E. Y., Morgan D. J., Laxmirarayan R. Trends in resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999–2010// Infect Control Hosp Epidemiol. – 2013. – V. 34. – P. 259–268.
4. Zhang J., Yuan Y., Li P., Wang T., Gao J., Yao J et al. Postoperative nosocomial infections among children with congenital heart disease// Pak. J. Med. Sci. – 2014. – V. 30. – №3. – P. 554–557.
5. Monstein H. J., Ostholm-Balkhed A., Nilsson M. V. et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae* // APMIS. – 2007. – V. 115. – № 12. – P. 1400–1408.
6. D. Ojdana, P. Sacha, P. Wiczorek et al. The Occurrence of bla_{CTX-M}, bla_{SHV} and bla_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland // Internat. J. of Antibiotics. – 2014. – <http://dx.doi.org/10.1155/2014/935842>.
7. A. M. Al-Jassera. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem // Kuwait Medical Journal. – 2006. – V. 38. – № 3. – P. 171–185.
8. Bandeira M., Almeida Carvalho P., Duarte A., Jordao L. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections // Pathogens. – 2014. – V. 3. – № 3. – P. 720–731.
9. Pollett S., Miller S., Hindler J. Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System in Los Angeles, California, from 2011 to 2013 // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – V.52. – № 11. – P. 4003–4009.
10. «EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of Clinical and/or epidemiological importance» www.eucast.org/documents/consultations/#c18518/.
11. «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics» www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en.
12. Christensen G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. – 1985. – V. 22. – № 6. – P. 996–1006.

References

1. Hoiby N, Bjarsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35: 322–232.
2. Rogers MA, Blumberg N, Saint S, Langa KM, Nallamothu BK. Hospital variation in transfusion and infection after cardiac surgery: a cohort study. BMC Medicine. 2009; 7: 37: doi:10.1186/1741-7015-7-37



3. Braykov NP, Eber MR, Klein EY, Morgan DJ, Laxmirarayan R. Trends in resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999–2010, *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013; 34: 259-268.
4. Zhang J, Yuan Y, Li P, Wang T, Gao J, Yao J, et al. Postoperative nosocomial infections among children with congenital heart disease. *Pak J Med Sci.* 2014; 30(3): 554-557.
5. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS.* 2007; 115(12): 1400-1408.
6. D Ojdana, P Sacha, P Wiczorek, et al. The Occurrence of bla_{CTX-M}, bla_{SHV} and bla_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-positive strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *Internat. J. of Antibiotics* 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/935842>
7. AM Al-Jassera. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): a global problem. *Kuwait Medical Journal.* 2006; 38 (3): 171-185.
8. Bandeira M, Almeida Carvalho P, Duarte A, Jordao L. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens.* 2014; 3(3):720-731.
9. Pollett S, Miller S, Hindler J. Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in a Health Care System in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology.* 2014; 52(11): 4003– 4009.
10. «EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of Clinical and/or epidemiological importance» www.eucast.org/documents/consultations/#c18518/.
11. «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics» www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en.
12. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. clin. microbiol.* 1985; 22(6): 996-1006.

Стаття надійшла до редакції 17.11.2017 р.



М. А. Златогурская, Ф. И. Товкач

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
тел.: +38(044)526 61 57, e-mail: zlatohurska@gmail.com

СТРУКТУРА ВИРИОННЫХ ДНК УМЕРЕННЫХ ЭРВИНИОФАГОВ 49 И 59

Цель работы: сравнительное изучение структуры вирионных ДНК умеренных фагов 49 и 59 *Erwinia «horticola»*. **Методы.** Исследования свойств ДНК бактериофагов осуществлялось с применением стандартной рестрикции, а также биоинформатического анализа. **Результаты.** Геномы изучаемых эрвиниофагов содержат по 84 открытых рамки считывания. Количество генов, кодирующих гипотетические полипептиды с неизвестными функциями, составляет 57 и 52 для фага 49 и 59 соответственно. Поиск в базе данных NCBI показал, что фаг 49 не имеет вирусных гомологов среди референсных геномов вирусов прокариот. Для бактериофага 59 таковым является фаг ENT47670 бактерии *Cronobacter sakazakii*. Между собой эрвиниофаги демонстрируют 47% гомологии первичной последовательности нуклеотидов. Большинство обнаруженных идентичных открытых рамок считывания относится к структурной области генома, а также к модулю лизиса клеток бактерии-хозяина. Установлено, что геномы обоих фагов циклически пермутированы и упаковываются в соответствии с *headful*-механизмом. Пермутация ДНК фага 59 является непрерывной, в то время как у фага 49 она носит дискретный характер. Вирионная ДНК фага 49 имеет аномальный *SmaI*-сайт, который, в отличие от остальных сайтов для эндонуклеазы *SmaI*, не подвергается полному гидролизу. **Выводы.** Умеренные бактериофаги 49 и 59 *E. «horticola»* неидентичные другим известным вирусам прокариот и принадлежат к уникальным фагам семейства *Siphoviridae*.

Ключевые слова: умеренные бактериофаги 49 и 59, *headful*-механизм упаковки, циклическая и дискретная пермутация.

Благодаря стремительному развитию технологий секвенирования, анализ первичной последовательности геномов становится незаменимым для современной классификации вирусов прокариот, понимания их эволюции и молекулярных основ фаговой физиологии, а также характера их взаимодействия с бактериями-хозяевами [1]. Однако традиционные методы секвенирования не позволяют установить такие аспекты структурной организации молекулы ДНК бактериофага как природа концевых последовательностей, наличие и характер пермутации, метилирование нуклеотидов [2]. В связи с этим изучение вирионной ДНК требует комбинации различных подходов и методов исследования.

Автономные генетические элементы и особенно вирусы бактерий рода



Erwinia описуються рідко, а інформація про їхні властивості є надзвичайно обмеженою, незважаючи на величезну практичну значимість цих фітопатогенних бактерій.

Раніше були виявлені три ервініофаги – 49, 59 і E105. Два з них, 49 і 59, представляють собою помірні фаги, здатні лізувати та лізогенізувати клітини фітопатогенної бактерії *Erwinia «horticola»* [3]. Наступні дослідження показали, що їхні геноми характеризуються значущою ступенем гомології, що стосується в основному структурних поліпептидів капсиду та хвостового відрізка [4]. Для вірионної ДНК фага 59 було встановлено неперервний характер кільцевої перестановки нуклеотидів та кінцева надлишковість на 2,2%. Геном фага 49, ймовірно, є циклічно перемішаним, і його перемішання, швидше за все, має дискретний характер [4, 5]. При аналізі первинної послідовності ДНК нам не вдалося отримати підтвердження цим фактам. У зв'язі з цим метою даної роботи було вивчення структури вірионної ДНК, а також виконання попереднього порівняння геномів ервініофагів 49 і 59 на основі даних геноміки та рестрикційного аналізу.

Матеріали та методи

У роботі використовували ДНК помірних бактериофагів 49 і 59 *E. «horticola»*. Виділення ДНК та рестрикційний аналіз були виконані на основі схеми, наведеної в роботі [4]. Використовували наступні ендонуклеази рестрикції: *HpaI*, *EcoRI*, *SmaI*, *SalI*, *KpnI*, *XhoI*, *DraI* та *BglII*.

Первинна послідовність геному була встановлена за допомогою технології Illumina Solexa. Аналіз та візуалізація даних секвенування здійснювалися за допомогою наступних програм: аналіз ГЦ-складу нуклеотидних послідовностей – DNA/RNA GC Content Calculator, пошук відкритих рамок читання – GLIMMER, GeneMark.hmm 2.0, пошук сайтів рестрикції – APE plasmid, парне вирівнювання нуклеотидних послідовностей геномів – mVista, CG view, пошук тРНК – tRNAscan-SE, ARAGORN, дот-плот порівняння геномів – PipeAlign. Порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей відносно референсних геномів, генів та амінокислотних баз NCBI проводилося за допомогою інструментів BLASTn та BLASTp.

Результати та їх обговорення

Виходячи з попереднього біоінформатичного аналізу ДНК, фаг 49 має геном розміром 46,8 тисяч пар нуклеотидів, для фага 59 цей показник становить 48,1 тисяч пар нуклеотидів, що добре узгоджується з даними попередніх досліджень [4]. Вміст ГЦ-пар є приблизно однаковою для обох вірусів і становить близько 50% (таблиця). У геномах фагів також виявлено однакове число відкритих рамок читання (84). Кількість виявлених гіпотетичних поліпептидів становить 57 і 52 для фагів 49 і 59, відповідно.



Сравнение геномов фагов 49 и 59

Comparison of phages 49 and 59 genomes

Характеристика	Фаг	
	49	59
Размер генома, т.п.н.	46,8	48,1
ГЦ-состав, %	50,8	50,5
Открытые рамки считывания	84	84
Гипотетические полипептиды	57	52
тРНК	–	тРНК ^{arg}

Поиск гомологических нуклеотидных последовательностей в базе данных NCBI показал, что фаг 49 не имеет гомологов среди геномов референсных бактериофагов. В случае фага 59 наибольшей степенью гомологии характеризуется фаг ENT47670 микроорганизма *Cronobacter sakazakii* (NC_019927.1). 25% его генома выравняется относительно нуклеотидных последовательностей геномной ДНК фага 59 с показателем идентичности в 72%. Нуклеотидные последовательности с большей степенью гомологии к ДНК фагов 49 и 59 были найдены среди геномов бактерий *Escherichia coli* 09-00049 (NZ_CP015228.1), *C. sakazakii* CMCC 45402 (CP006731.1), ATCC BAA-894 (NC_009778.1), *Cronobacter universalis* NCTC 9529 (NZ_CAKX00000000.1), *Yersinia enterocolitica* FORC-002 (NZ_CP009456.1), *Pantoea* sp. PSNIH1 (NZ_CP010325.1), а также *Erwinia* sp. Leaf53 contig_9 (NZ_LMLK01000027.1). С помощью программы PHASTER (<http://phaster.ca/>) удалось установить, что данные бактериальные геномы имеют в своем составе ряд интактных и дефектных профаговых элементов.

Между собой эрвиниофаги демонстрируют 47% гомологии первичной последовательности нуклеотидов (рис. 1). Этот факт также согласуется с дан-

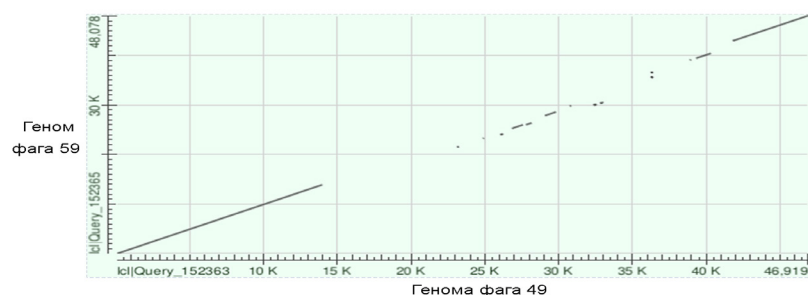


Рис. 1. Выравнивание последовательностей генома бактериофага 59 к геному фага 49

Fig. 1. Alignment of phages 49 and 59 genome sequences



ними предыдущих исследований, в которых при помощи блот-гибридизации установлено 50% гомологии ДНК фагов 49 и 59 [6]. Сравнение геномов эрвиниофагов обнаружило 30 идентичных генов, которые кодируют структурные белки головки, белки лизиса бактерии-хозяина, а также некоторые регуляторные полипептиды. У обоих фагов кодирующими являются как плюс, так и минус цепь. Кроме того, ДНК фага 59 несет ген тРНК, кодирующий аргинин.

Были подтверждены данные предыдущих исследований относительно циклической пермутации вирионной ДНК бактериофагов 49 и 59 [4, 5]. Наличие дополнительных фрагментов в гидролизной смеси было характерным для вирионных ДНК и отличало их от таковых, полученных *in silico* (рис. 2). Мы предположили, что гетерогенный фрагмент «а» и субмолярный фрагмент «b» при *SmaI*-гидролизе вирионной ДНК фага 59 происходит от гетерогенных концов молекул ДНК и рас-сайта (рис. 2, IA). Такой рестрикционный профиль указывает на непрерывный характер пермутации генома фага 59, а также упаковку вирионной ДНК по headful-механизму [4]. Эрвиниофаг 49, очевидно, упаковывает ДНК по схожей схеме, однако пермутация его генома имеет дискретный характер. Об этом свидетельствует как отсутствие гетерогенных концевых фрагментов, так и наличие двух субмолярных фрагментов «а» и «b» при *KpnI*-гидролизе (рис. 2, IIА).

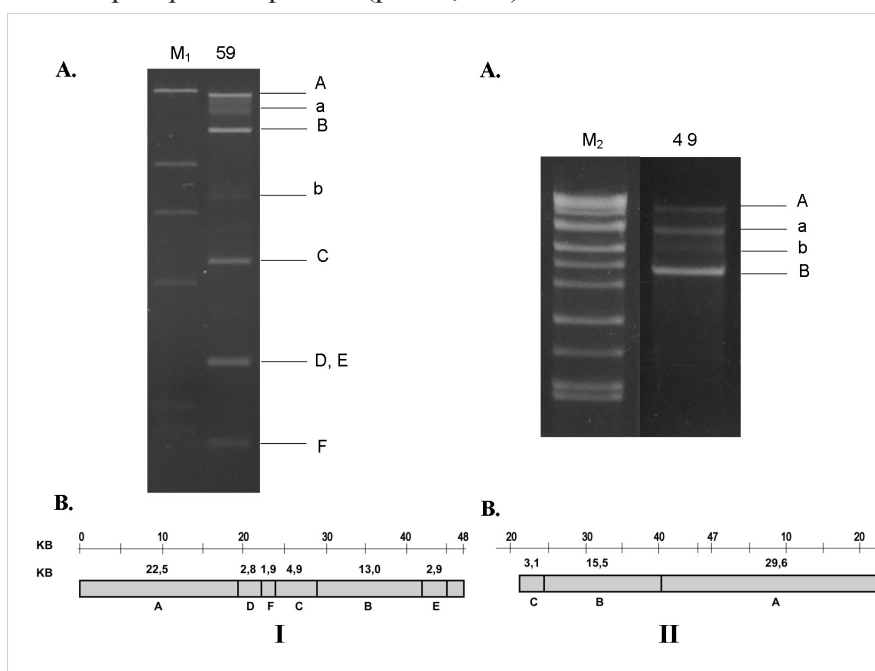


Рис. 2. I: А – *SmaI*-гидролиз вирионной ДНК фага 59. М₁ – *HindIII* фрагменты ДНК бактериофага λ; В – *SmaI*-сайты в геномной ДНК фага 59. II: А – *KpnI*-гидролиз вирионной ДНК фага 49. М₂ – λ Mix Marker, 19 (Fermentas, USA); В – *KpnI*-сайты в геномной ДНК фага 49. а, b – дополнительные фрагменты.

Fig. 2. I: А – *SmaI* digestion pattern of the phage 59 virion DNA. М₁ – *HindIII*-fragments of λ DNA; В – *SmaI* restriction map of the phage 59 genomic DNA. II: А – *KpnI* digestion pattern of the phage 49 virion DNA. М₂ – λ Mix Marker, 19 (Fermentas, USA); В – *KpnI* restriction map of the phage 49 genomic DNA. а, b – additional fragments.

Еще один «аномальный» фрагмент был обнаружен при электрофоретическом разделении продуктов двойного гидролиза ДНК фага 49 эндонуклеазами *KpnI* и *XhoI*. Так как данный субмолярный фрагмент размером 11 тысяч пар нуклеотидов не исчезал при увеличении концентрации рестриктаз, он, скорее всего, является рас-фрагментом, образованным при гидролизе генома ДНК-паказой и рестриктазой. Аналогично фагу 59, аномальные фрагменты также не обнаруживались при изучении первичной последовательности нуклеотидов геномной ДНК фага 49, полученной традиционным методом секвенирования.

В ДНК фага 49 был обнаружен необычный сайт, который в стандартных условиях не подвергался полному расщеплению рестриктазой *SmaI*, о чем может свидетельствовать дополнительный фрагмент «а» размером около 18 тысяч пар нуклеотидов (рис. 3 А, В).

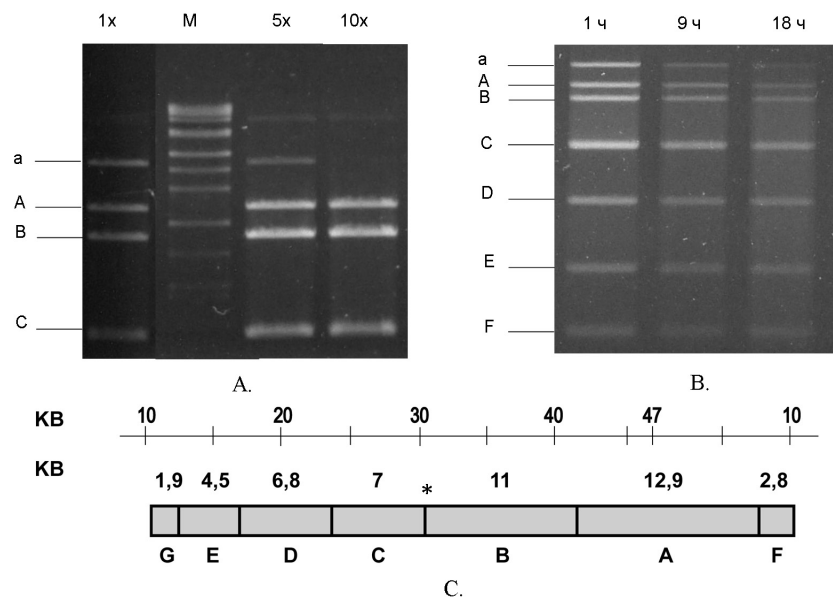


Рис. 3. Влияние концентрации фермента (А) и элонгации инкубации (В) на *SmaI*-рестрикционный паттерн вирионной ДНК фага 49
 а – «аномальный» фрагмент. С – *SmaI*-сайты рестрикции геномной ДНК фага 49;
 * – «аномальный» сайт.

Fig. 3. Effect of ferment concentration (A) and elongation of incubation time (B) on *SmaI* restriction pattern of the phage 49 virion DNA
 а – “abnormal fragment”. С – *SmaI* restriction map of the phage 49 genomic DNA;
 * – “abnormal site”.

Для установления происхождения этого «аномального» фрагмента применили две стратегии: удлинение времени реакции гидролиза ДНК и увеличение концентрации фермента. Как видно на рисунке 3А, по мере увеличения концентрации рестриктазы интенсивность свечения на электрофореграмме «аномального» фрагмента уменьшалась вплоть до полного исчезновения по-



лосы при десятикратной концентрации эндонуклеазы. В то же время пропорционально увеличивалась интенсивность фрагментов В и С размером 11 и 7 тысяч пар нуклеотидов, соответственно. Схожий эффект наблюдался при увеличении времени реакции, хотя полного гидролиза данного фрагмента после 24 часов инкубации реакционной смеси так и не удалось достичь.

В литературе подобные аномальные сайты связывают как с наличием частичного метилирования, так и со специфическим влиянием ближайшего нуклеотидного окружения [7, 9]. Последующий геномный анализ показал, что этот сайт находится между двумя прямыми повторами нуклеотидов размером 16 пар оснований, что по своей структуре напоминают промоторные участки фага λ [8]. Возможно, такое ближайшее окружение сайта физически влияет на его доступность действию рестриктазы. Кроме того, ряд необычных сайтов также был обнаружен при *DraI*-гидролизе ДНК фагов 49 и 59, объяснить природу которых пока не предоставляется возможным.

Таким образом, сравнительный анализ сайтов рестрикции с использованием традиционного и биоинформатического подходов достоверно показал, что геномы эрвиниофагов 49 и 59 являются циклически пермутированным. Обнаруженная пермутация имеет непрерывный характер в случае вирионной ДНК фага 59 и дискретный – для ДНК фага 49. Предварительные геномные исследования свидетельствуют о достаточно большой гомологии геномов, составляющей 47% и коррелирующей с ранее полученными данными. Наличие аномальных сайтов рестрикции указывают на существенное различие между реальной структурой вирионной ДНК и первичной нуклеотидной последовательностью геномов, полученной с использованием классических методов секвенирования. Умеренные бактериофаги 49 и 59 фитопатогенных энтеробактерий неидентичны другим известным вирусам и принадлежат к уникальным фагам семейства *Siphoviridae*.

Авторы выражают благодарность PhD Andrew Kroponski (University of Guelph, Канада) за помощь в сборке фаговых геномов.

М. А. Златогурська, Ф. І. Товкач

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38(044)526 61 57, e-mail: zlatohurska@gmail.com

СТРУКТУРА ВІРІОННИХ ДНК ПОМІРНИХ ЕРВІНІОФАГІВ 49 І 59

Реферат

Мета роботи: порівняльне вивчення структури вірионних ДНК помірних фагів 49 і 59 *Erwinia «horticola»*. **Методи.** Дослідження властивостей ДНК бактеріофагів здійснювалося за допомогою стандартної рестрикції, а також біоінформатичного аналізу. **Результати.** Геноми досліджуваних ервініофагів містять по 84 відкриті рамки зчитування. Кількість генів, що кодують гіпотетичні поліпептиди з невідомими функціями, складає 57 та 52 для фага 49 і 59 відповідно. Пошук в базах даних NCBI показав, що фаг



49 не має вірусних гомологів серед референсних геномів вірусів прокаріот. Для бактеріофага 59 таким є фаг ENT47670 бактерії *Cronobacter sakazakii*. Між собою ервініофаги демонструють 47% гомології первинної послідовності нуклеотидів. Більшість виявлених ідентичних відкритих рамок зчитування належить до структурної області генома, а також до модуля лізису клітин бактерії-хазяїна. Встановлено, що геноми обох фагів є циклічно пермутованими і упаковуються згідно з headful-механізмом. Пермутація ДНК фага 59 являється неперервною, в той час як у фага 49 вона має дискретний характер. Віріонна ДНК фага 49 має аномальний *SmaI*-сайт, котрий, на відміну від інших сайтів ендонуклеази *SmaI* не піддається повному гідролізу. **Висновки.** Помірні бактеріофаги 49 і 59 *E. «horticola»* являються неідентичними іншим відомим вірусам прокаріот і належать до унікальних фагів родини Siphoviridae.

Ключові слова: помірні бактеріофаги 49 і 59, headful-механізм упаковки, циклічна та дискретна пермутація.

M. A. Zlatohurska, F. I. Tovkach

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine, tel.: +38(044)526 61 57, e-mail: zlatohurska@gmail.com

VIRION DNAs STRUCTURE OF TEMPERATE ERWINIOPHAGES 49 AND 59

Summary

The aim was to conduct a comparative study of the phages 49 and 59 virion DNAs. **Methods.** Properties of phage DNA were studied using the standard restriction and bioinformatic analyses. **Results.** The genomes of erwiniaphages 49 and 59 encode 84 open reading frames. 57 and 52 hypothetical proteins with unknown function were identified within the genome of phage 49 and 59, respectively. The search through NCBI databases indicates that phage 49 has no viral homologs among genomes of prokaryotic viruses. In case of phage 59, it is *Cronobacter sakazakii* bacteriophage ENT47670. It was identified that the phages 49 and 59 share 47% homologies of nucleotide sequences. Most of identical open reading frames belong to the structural region of the genome and the host cell lysis module. It has been shown that the genomes of both bacteriophages are permuted and packaged according to the headful mechanism. Phage 59 is characterized by circular permutation of the genome, while phage 49 has discrete permutation. The virion DNA of phage 49 has an abnormal cleavage site for *SmaI* restriction enzyme that, unlike the rest *SmaI*-sites, is not completely hydrolyzed. **Conclusions.** Temperate bacteriophages 49 and 59 are not identical to the other known prokaryotic viruses and belong to unique phages of Siphoviridae family.

Key words: temperate bacteriophages 49 and 59, the headful packaging mechanism, circular and discrete permutation.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ackermann H. W., Kropinski A. M. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes // Res Microbiol. – 2007. – 158, № 7. – P. 555–566. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.006.
2. Sherwood R., Casjens S. R., Gilcrease E. B. Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions // Methods Mol Biol. – 2009. – 502. – P. 91–111. doi: 10.1007/978-1-60327-565-1_7.
3. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Кишко Я. Г. Сравнительная характеристика умеренных фагов *Erwinia caratovora* 268 // Мікробіол. журн. – 1985. – 47, № 1. – С. 59–64.
4. Товкач Ф. И., Шевченко Т. В., Горб Т. Е., Муквич Н. С., Романюк Л. В. Сравнительное изучение свойств умеренных эрвиниофагов 49 и 59 // Мікробіол. журн. – 2002. – 64, № 2. – P. 65–81.
5. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Данилейченко В. В., Кишко Я. Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia caratovora* // Мол Ген Микробиол Вирусол. – 1988. – 1. – P. 20–24.
6. Кишко Я. Г., Григорян Ю. А., Товкач Ф. И., Рубан В. И., Машиковский Н. Н. Изучение гомологии умеренных вирусов полилизогенной культуры *Erwinia caratovora* // Доклады академии наук СССР. – 1984. – 277, № 5. – P. 1250–1251.
7. McClelland M., Nelson M., Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases // Nucleic Acids Res. – 1994. – 22, № 17. – P. 3640–3659.
8. Ptashne M. A Genetic Switch: Phage Lambda. – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. – 155 p.
9. Armstrong K., Bauer W. R. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease *Pst*I. // Nucleic Acids Research. – 1982. – 10, № 3. – P. 993–1007.

References

1. Ackermann HW, Kropinski AM. Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes. Res Microbiol. 2007;158(7):555-566. doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.006.
2. Sherwood R, Casjens SR, Gilcrease EB. Determining DNA packaging strategy by analysis of the termini of the chromosomes in tailed-bacteriophage virions. Methods Mol Biol. 2009;502:91-111. doi: 10.1007/978-1-60327-565-1_7.
3. Tovkach FI, Grigoryan YuA, Ruban VI, Kishko YaG. The comparative characteristics of temperate *Erwinia caratovora* 268 phages. Microbiol Z. 1985;47(1):59-64 (in Russian).
4. Tovkach FI, Shevchenko TV, Gorb TE, Mukvich NS, Romanyuk LV. Comparative studies of temperate erwiniophage 49 and 59. Microbiol Z. 2002;64(2):65-81 (in Russian).
5. Tovkach FI, Grigoryan YuA, Ruban VI, Danileichenko VV, Kishko YaG. Restriction map of the permuted DNA of *Erwinia carotovora* temperature bacteriophage 59. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 1988;1:20–24 (in Russian).



6. Kishko YaG, Grigoryan YuA, Tovkach FI., Ruban VI, Mashkovsky NN. Study of homology of temperate viruses of polylysogenic culture of *Erwinia carotovora* 268. Reports of the National Academy of Sciences of USSR. 1984;277(5):1250-1251 (in Russian).

7. McClelland M, Nelson M, Raschke E. Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. Nucleic Acids Res. 1994;22(17):3640-3659.

8. Ptashne MA. Genetic Switch: Phage Lambda. – Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2004. – 155 p.

9. Armstrong K, Bauer WR. Preferential site-dependent cleavage by restriction endonuclease *Pst*I. Nucleic Acids Research. 1982;10(3):993-1007.

Стаття надійшла до редакції 11.12.2017 р.



О. Г. Горшкова

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38 068 278 02 05, e-mail: helen-good@ukr.net

АНТАГОНІСТИЧНА І ДЕСТРУКТИВНА АКТИВНІСТЬ МОРСЬКИХ БАКТЕРІЙ

Мета. Дослідити антагоністичну, нафто- і ПАР-деструктивну активність бактерій, ізольованих із прибережних зон Чорного моря. **Методи.** Для ізоляції бактерій – деструкторів з морської та порової води зони заплеску Одеської затоки, о. Зміїний використовували метод накопичувальних культур на рідкому синтетичному середовищі МКД з подальшим висівом на живильні середовища МПБ та М-9, що містили окремо нафту і додецилсульфат натрію у концентрації 1%. Дослідження антагоністичної активності, що оцінювали за величиною зон затримки росту тест-штамів, проводили за методом відстрочених посівів. **Результати.** Вивчено деструктивну і антагоністичну активність 58 штамів бактерій, ізольованих із прибережних зон Чорного моря. Деструктивну активність що до нафти і ПАР виявили 36 досліджуваних штамів. З найактивніших відібрано 3 штами-деструктори, які проявили найбільшу інгібуючу дію щодо тест-штамів умовно патогенних мікроорганізмів, у тому числі санітарно-показових. Найбільшу кількість штамов-антагоністів ізольовано з порової та морської води у районі скиду міських господарсько-фекальних вод на Дачі Ковалевського, що свідчить про хронічне хімічне та біологічне забруднення зони заплеску в цьому районі одеського узбережжя Чорного моря. **Висновок.** Поліфункціональні штами *M. barkeri* 5, *M. barkeri* 13, *P. fluorescens* 55, які виявили високий рівень антагоністичної активності щодо широкого спектра представників умовно-патогенної мікробіоти і мали високу здатність окислювати вуглеводні нафти і ПАР, можуть бути рекомендовані для подальшого використання в біотехнологіях ремедіації морських вод від біологічного і хімічного забруднення.

Ключові слова: морські бактерії-деструктори, нафта, поверхнево-активні речовини, антагоністична активність.

В останні роки погіршився екологічний та мікробіологічний стан морської води в прибережних районах Чорного моря України, що суттєво відображається на їх рекреаційній привабливості та умовах проживання місцевого населення. З прибережних населених пунктів, з річковим стоком в море разом з небезпечними мікроорганізмами надходить велика кількість біогенних елементів, що призводить до значної евтрофікації та погіршення рекреаційної якості берегової зони моря. Хімічні поллютанти, у тому числі йони важких металів, нафтопродукти, біорезистентні поверхнево-активні речовини (ПАР), негативно впливають на метаболічний та генетичний апарат гідробіонтів. Мі-



кробне забруднення моря також є небезпечним з епідеміологічних позицій: може безпосередньо впливати на здоров'я людей [3, 5].

Псамоконтур (кордон "море – піщаний берег", зона заплеску) грає важливу роль у процесах самоочищення моря. На піщані пляжі постійно впливає прибій, вода проникає в пори між піщинками – інтерстиціальні порожнини. При цьому в порові води надходить велика кількість поллютантів різної природи. Піски складаються з кварцевих зерен, алевритових і глинистих часточок, що відрізняються сорбційною здатністю щодо поллютантів [3]. У зоні заплеску морської води на берег в міжпіщинкових порожнинах (або інтерстиціях) живуть організми мікро- і мейобентосу – споживачі мінеральних і органічних поживних речовин, антагоністів патогенної мікробіоти [1]. Саме бактерії є потужним агентом трансформації і акумуляції практично всіх видів забруднюючих речовин. Тому важливим є активація природної морської мікробіоти, що відповідає за процеси самоочищення від хімічного та мікробного забруднення, створення нових біотехнологій ремедіації морських вод, які передбачають використання відібраних з природних біоценозів штамів бактерій-деструкторів, що володіють антагоністичними властивостями щодо патогенних, умовно-патогенних і санітарно-показових мікроорганізмів [7, 8].

Мета дослідження – дослідити антагоністичну, нафто- і ПАР- деструктивну активність бактерій, ізольованих із прибережних зон Чорного моря.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження були проби морської та порової води, відібрані у рекреаційних зонах узбережжя Чорного моря з різним рівнем антропогенного забруднення: Одеське узбережжя – у районі випуску міських стічних вод у море на Дачі Ковалевського; в умовно чистому районі узбережжя – на Гідробіологічній станції ОНУ; острів Зміїний – на пляжі «Дівочий». Також досліджували проби прибережного нафтозабрудненого ґрунту зони заплеску острову Зміїний.

Морську воду відбирали за стандартною методикою з поверхневого горизонту 50 см на відстані 15 м від урізу води. Порову воду зони псамоконтуру (заплеску) відбирали на відстані 2 м від урізу води з горизонту 50 см, нафтозабруднений ґрунт – з поверхневого горизонту.

Для ізоляції бактерій-деструкторів використовували метод накопичувальних культур з подальшим висівом на м'ясо-пептонний агар (МПА) та мінеральне середовище М-9, що містили окремо нафту і додецилсульфат натрію (ДДСН) у концентрації 1%. Культивування проводили за температури 30 °С впродовж місяця.

В експериментах використовували сиру нафту (густина 0,84 г/см³) Тюменського родовища. Деструктивну активність гетеротрофних сапрофітних бактерій, що використовують як єдине джерело карбону і енергії нафту, оцінювали візуально за трансформацією, зменшенню у розмірах, руйнуванню і зникненню нафтової плями з поверхні рідкого живильного середовища.

Для виділення мікроорганізмів – деструкторів ПАР використовували голодний агар, в який вносили ДДСН у концентрації 1%. Наявність росту на чашках Петрі та зон просвітлення середовища свідчила не тільки про стійкість



штамів до ПАР, але й були показниками деструктивної активності – здатності використовувати ПАР як єдине джерело карбону. Ступінь деструктивної активності бактерій до нафти та ПАР оцінювали за розміром площі нафтової плями.

Дослідження антагоністичної активності проводили за допомогою методу відстрочених посівів [6]. Антагоністичну властивість морських бактерій вивчали щодо 9 тест-штамів умовно патогенних бактерій: *Escherichia coli* ATCC 259222/ОНУ 447, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538/ОНУ 443, *Salmonella enteritidis* ОНУ 466, *Pseudomonas aeruginosa* ОНУ 211, *Pseudomonas aeruginosa* ОНУ 446, *Bacillus subtilis* ATCC 6633/ ОНУ 66, *Bacillus cereus* ATCC 11778/ОНУ 77, *Micrococcus luteus* УКМВ 645 Т/ОНУ 645, *Proteus vulgaris* SSU8, що зберігаються у колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова. Рівень антагоністичної активності мікроорганізмів оцінювали за зонами затримки росту штамів патогенних мікроорганізмів, який виражали у міліметрах.

Дослідження проводили у трьох повторах. Для оцінки достовірності експериментальних даних використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($X_{\text{сеп}}$), середню квадратичну похибку ($S_{X_{\text{сеп}}}$) за кількості повторів дослідів $n = 3$ та рівнях значимості 0,05. Результати оброблені за допомогою редактора MS Excel 2003.

Результати та їх обговорення

В результаті мікробіологічних досліджень морської, порової води зони заплеску узбережжя Чорного моря та прибережного нафтозабрудненого ґрунту острова Зміїний було ізольовано 58 штамів бактерій, з них 36 штамів виявили деструктивну активність до нафти і ПАР. За сукупністю морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних ознак та жирнокислотним складом 5 штамів бактерій-деструкторів були ідентифіковані як *Microbacterium barkeri* 5, *Microbacterium barkeri* 13, *Pseudomonas sp.* 47, *Pseudomonas fluorescens* 55, *Bacillus megaterium* 64. Результати деструктивної активності ізольованих бактерій представлені на рис. 1.

Первинний скринінг дозволив відібрати 5 штамів, що володіли максимальними показниками активності росту на середовищі, що містило нафту (у концентрації 1%): 4, 62, *Microbacterium barkeri* 5, *Microbacterium barkeri* 13, *Pseudomonas fluorescens* 55. Вже через 10 діб експозиції за дії штаму *Pseudomonas fluorescens* 55 і штаму 62, виділених з морської води на Гідробіологічній станції та Дачі Ковалевського, вміст нафти відносно контролю зменшився на 35% і 25%, відповідно. Показниками деструктивної активності були ознаки інтенсивного приросту біомаси бактерій у рідкому середовищі, поява бактеріальних біоплівки під нижнім шаром нафти, утворення пластівців у товщі середовища, зміна кольору нафтової плями від темного до рудуватого та її руйнування. Через 30 діб за дії морських штамів *Pseudomonas fluorescens* 55 і 62 відбулося зменшення у розмірах, руйнування і зникнення, відповідно до 70% і 55% нафтової плями. Виділені з прибережного нафтозабрудненого ґрунту зони заплеску о. Зміїний штами 4, *Microbacterium barkeri* 5, *Microbacterium barkeri* 13 викликали деструкцію 45% нафти.



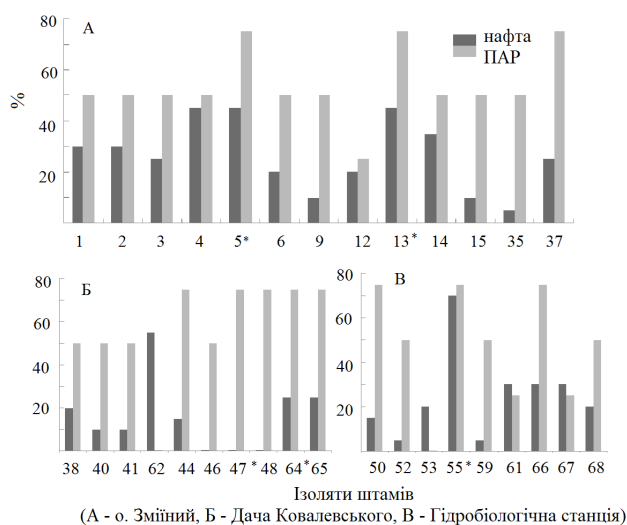


Рис. 1. Ступінь деструкції (%) нафти і ПАР штамми бактерій, ізольованими із морської води і прибережного нафтозабрудненого ґрунту:

A – о. Зміїний; Б – Дача Ковалевського; В – Гідробіологічна станція.

* Штами ідентифіковані: 5 – *Microbacterium barkeri* 5; 13 – *Microbacterium barkeri* 13; 47 – *Pseudomonas sp.* 47; 55 – *Pseudomonas fluorescens* 55, 64 – *Bacillus megaterium* 64.

Fig. 1. Degree of destruction (%) of oil and surfactants by bacterial strains isolated from sea water and coastal oil-contaminated soil:

A – the Zmiinyi island; B – the Kovalevsky's dacha; B – Hydrobiological station.

* Strains identified: 5 – *Microbacterium barkeri* 5; 13 – *Microbacterium barkeri* 13; 47 – *Pseudomonas sp.* 47; 55 – *Pseudomonas fluorescens* 55, 64 – *Bacillus megaterium* 64.

Середній рівень нафтодеструктивної активності (від 25 до 35%) був зареєстрований у штамів, виділених з порової води Одеського узбережжя (61, 65, 66, 67, *Bacillus megaterium* 64) та о. Зміїний (1, 2, 3, 14) [4].

Дослідження дозволили виділити з морської та порової води мікроорганізми, резистентні до токсичної дії ПАР та здатні до їх біодеградації. Відібрані біохімічно-активні бактерії-деструктори ПАР були виділені з порової води та прибережного нафтозабрудненого ґрунту зони заплеску о. Зміїний – 37, *Microbacterium barkeri* 5, *Microbacterium barkeri* 13; з порової води на Дачі Ковалевського – 44, 48, 65, *Pseudomonas sp.* 47, *Bacillus megaterium* 64; з морської та порової води на Гідробіологічній станції – 50, 66, *Pseudomonas fluorescens* 55. Вказані штами давали рясний ріст та зони просвітлення на голлодному агарі з додаванням ДДСН. Ступінь деструкції ПАР сягала 75%.

Порівняльний аналіз показав високу частоту виділення біохімічно активних бактерій – деструкторів ПАР з порової води зони заплеску Одеського узбережжя у районі випуску міських стічних вод у море на Дачі Ковалевського – з 8 досліджених штамів 5 виявляли максимальну ПАР-деструктивну активність. Це свідчить про велике значення мікроорганізмів псамоконтуру у процесах самоочищення моря від біорезистентних поверхнево-активних речовин (ПАР).

При вивченні антагоністичних властивостей морських бактерій встановлено різний ступінь пригнічувальної дії щодо умовно патогенних бактерій (таблиця 1).



Таблиця 1
 Антагоністична активність бактерій, ізольованих з зони заплеску прибережної частини Чорного моря
 Table 1
 Antagonistic activity of bacteria isolated from the splash zone of the coastal part of the Black Sea

Станція відбору	Штам	Зона застримки росту тест-штамів, мм									
		<i>E. coli</i> ATCC 25922/ОНУ 447	<i>S. aureus</i> ATCC 6538/ОНУ 443	<i>S. enteritidis</i> ОНУ 466	<i>P. aeruginosa</i> ОНУ 211	<i>P. aeruginosa</i> ОНУ 446	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633/ОНУ 66	<i>B. cereus</i> ATCC 11778/ОНУ 77	<i>M. luteus</i> УКМБ 645Т/ОНУ645	<i>P. vulgaris</i> SSU8	
0. Зміцни прибережний нафтозабруднений ґрунт	1	5,3 ± 0,23	5,24 ± 0,72	8,76 ± 2,07	5,33 ± 1,23	4,12 ± 0,91	3,63 ± 0,06	6,11 ± 0,21	6,14 ± 1,01	0	
	2	3,69 ± 0,06	2,59 ± 0,05	2,6 ± 0,55	3,67 ± 0,23	3,03 ± 0,33	4,05 ± 1,61	3,22 ± 0,02	4,25 ± 0,23	0	
	3	6,75 ± 0,47	4,84 ± 0,08	5,23 ± 0,02	3,71 ± 0,47	4,14 ± 1,01	3,44 ± 1,04	5,25 ± 0,53	6,32 ± 0,32	0	
	4	4,93 ± 0,09	3,52 ± 0,50	4,71 ± 0,11	2,44 ± 0,44	2,41 ± 0,04	2,75 ± 0,67	3,02 ± 0,02	3,44 ± 0,14	0	
	M. barkeri 5	12,42 ± 2,04	8,4 ± 2,05	7,6 ± 0,06	6,1 ± 0,51	4,07 ± 1,07	4,55 ± 0,05	6,33 ± 0,13	7,10 ± 1,02	0	
	6	4,07 ± 0,97	3,8 ± 0,48	3,85 ± 0,97	2,49 ± 0,54	2,23 ± 0,12	2,45 ± 0,04	4,63 ± 0,66	4,12 ± 0,12	0	
	7	6,68 ± 0,86	5,9 ± 1,09	7,69 ± 0,26	4,18 ± 0,51	3,06 ± 0,16	4,01 ± 0,54	5,43 ± 0,33	5,52 ± 0,5	0	
	8	3,55 ± 0,35	1,37 ± 0,93	2,53 ± 0,15	2,45 ± 0,24	2,02 ± 0,02	1,02 ± 0,05	2,41 ± 0,12	2,36 ± 0,36	0	
	9	4,36 ± 0,63	4,16 ± 1,01	5,63 ± 1,06	3,97 ± 0,59	4,74 ± 1,07	3,81 ± 0,98	11,66 ± 2,06	7,23 ± 1,25	0	
	11	4,21 ± 0,42	2,59 ± 0,05	2,06 ± 0,36	3,71 ± 0,37	3,43 ± 0,44	2,34 ± 0,73	4,08 ± 0,98	24,64 ± 2,62	0	
	12	4,22 ± 0,52	3,49 ± 0,04	5,29 ± 0,62	4,05 ± 0,95	3,2 ± 0,02	4,9 ± 0,29	5,32 ± 0,03	5,47 ± 0,44	0	
	M. barkeri 13	8,41 ± 0,04	2,4 ± 0,14	3,33 ± 0,03	5,55 ± 0,50	4,31 ± 0,23	1,1 ± 0,01	4,53 ± 0,65	4,22 ± 0,02	0	
	14	5,56 ± 1,05	3,46 ± 0,8	7,29 ± 0,15	3,41 ± 0,04	2,75 ± 0,37	2,36 ± 0,13	0,5 ± 0,1	6,51 ± 0,41	0	
	15	4,03 ± 0,73	2,68 ± 0,16	3,02 ± 0,02	1,79 ± 0,17	2,64 ± 0,56	2,63 ± 0,01	3,98 ± 0,09	0	0	
	16	5,76 ± 0,95	3,06 ± 0,47	5,98 ± 0,69	5,1 ± 1,11	3,88 ± 0,48	5,41 ± 0,04	4,22 ± 0,1	5,26 ± 0,24	0	
	17	5,31 ± 0,03	3,41 ± 0,94	3,95 ± 0,09	2,82 ± 0,28	2,69 ± 0,05	2,61 ± 0,16	0,50 ± 0,01	2,13 ± 0,12	0	

Продовження таблиці 1

о. Зміїний	порова	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,35 ± 0,31	0
		34	0	25,57 ± 3,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25,56 ± 3,52
		35	0	25,98 ± 2,34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		36	0	0	0	0	0	0	20,79 ± 3,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35,11 ± 1,05	0
		37	8,98 ± 1,09	6,09 ± 1,02	0	0	0	0	5,39 ± 1,53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5,47 ± 0,45	0
	морська	38	0	0	15,44 ± 1,93	0	0	0	0	0	0	20,25 ± 3,72	3,54 ± 1,52	0	0	0	0	0	20,71 ± 2,41	0
		39	0	0	0	8,15 ± 1,02	0	0	0	0	0	18,11 ± 1,04	0	0	0	0	0	0	16,25 ± 0,22	0
		40	0	15,31 ± 1,03	10,27 ± 0,71	0	0	0	20,67 ± 2,22	1,51 ± 0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	16,52 ± 0,51	0
		41	20,55 ± 2,16	28,36 ± 4,13	10,66 ± 0,62	0	0	0	31,68 ± 5,06	2,36 ± 0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	15,35 ± 0,25	0
		42	0	15,85 ± 2,28	15,17 ± 0,04	0	0	0	0	25,69 ± 2,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		43	0	0	10,58 ± 0,43	0	0	0	0	18,42 ± 2,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Дача Ковалев ського	62	10,39 ± 1,53	11,79 ± 1,07	29,29 ± 1,15	8,43 ± 1,24	0	0	0	4,22 ± 0,02	4,63 ± 0,34	0	0	0	0	0	0	0	0	7,17 ± 1,07
		44	10,55 ± 2,55	15,11 ± 3,91	0	0	0	0	24,1 ± 4,01	16,23 ± 0,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	порова	45	0	30,51 ± 4,15	0	0	0	0	14,57 ± 0,05	4,53 ± 0,47	20,46 ± 0,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		46	0	0	0	10,33 ± 0,33	0	0	20,99 ± 0,09	20,26 ± 2,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25,65 ± 0,41
	<i>Pseudomonas</i> sp. 47	15,27 ± 2,11	40,5 ± 5,55	10,72 ± 0,63	0	0	0	28,98 ± 5,09	19,14 ± 0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,21 ± 0,12	0
	49	0	0	5,53 ± 0,25	0	0	0	0	0	1,55 ± 0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>V. megaterium</i> 64	15,75 ± 3,27	15,31 ± 2,03	10,1 ± 0,05	5,78 ± 1,27	12,43 ± 2,34	6,93 ± 0,99	4,41 ± 0,19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,28 ± 2,14



Продовження таблиці 1

Гідробіологічна станція		51	52	54	<i>P. fluorescens</i> 55	56	57	58	59	61	66	67	68
морська		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	5,74 ± 0,97	0	5,74 ± 0,97	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	8,43 ± 0,21	8,43 ± 0,21	0	0	0	0	0	0	0	0
		10,52 ± 1,05	20,58 ± 3,05	0	12,28 ± 3,12	10,7 ± 2,07	3,57 ± 0,26	10,49 ± 0,14	0	0	0	0	0
		0	0	10,25 ± 4,12	0	0	20,42 ± 5,22	0	0	0	0	0	0
		0	0	12,56 ± 2,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	22,98 ± 3,99	0	0	15,63 ± 2,56	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	2,1 ± 0,05	25,47 ± 4,31	0	0	0	0	0
		0	0	7,32 ± 0,14	0	0	16,41 ± 0,19	10,16 ± 0,06	0	0	0	0	0
		20,41 ± 3,44	20,12 ± 3,01	0	10,77 ± 1,07	10,3 ± 2,23	4,58 ± 0,26	0	3,25 ± 0,13	0	0	0	0
		5,47 ± 1,27	10,6 ± 0,06	0	10,22 ± 1,22	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	5,89 ± 0,98	0	0	5,65 ± 0,33	4,22 ± 1,05	9,36 ± 0,14	3,46 ± 0,23	0	0	0	0
	порова												

З 58 досліджуваних штамів 11 не пригнічували ріст жодного з тест-штамів, 11 штамів пригнічували ріст лише 1–2 тест-штамів.

Виражену антагоністичну активність щодо широкого спектру умовно-патогенних бактерій, у тому числі санітарно-показових, виявили штами 40, 41, 44, 62, 66, *Pseudomonas sp.* 47, *B. megaterium* 64, *P. fluorescens* 55, виділені з морської та порової води на Дачі Ковалевського та Гідробіологічній станції (зони затримки росту тест-мікроорганізмів становили від $9,45 \pm 0,23$ до $40,5 \pm 5,55$ мм.). Середню антагоністичну активність виявили бактерії, виділені на о. Зміїний, у тому числі 1, 3, 7, 9, 37, *M. barkeri* 5, *M. barkeri* 13 (зони затримки росту тест-мікроорганізмів становили від $3,63 \pm 0,06$ до $8,4 \pm 2,05$ мм) [2].

Найбільш біохімічно активні штами бактерій-деструкторів органічних сполук: 66, *M. barkeri* 5, *M. barkeri* 13, *Pseudomonas sp.* 47, *B. megaterium* 64, *P. fluorescens* 55 виявляли високу здатність до пригнічення росту *E. coli* ATCC 259222/ОНУ 447, *S. aureus* ATCC 6538/ ОНУ 443, *S. enteritidis* ОНУ 466, *P. aeruginosa* ОНУ 446. Стосовно *P. vulgaris* SSU8 виражену антагоністичну активність визначено у культур 62 і *B. megaterium* 64 (зони затримки росту тест-штамів становили відповідно $7,17 \pm 1,07$ і $10,28 \pm 2,14$ мм).

Виявлення у морській та поровій воді в районі Дачі Ковалевського максимальної кількості бактерій з поліфункціональною активністю (деструкторів органічних сполук та антагоністів умовно патогенної мікробіоти) зумовлено скиданням у море каналізаційних вод станцією біологічної очистки “Південна”. Гідробіологічна станція віддалена від цих основних джерел забруднення, хоча залежно від згонно-нагонної циркуляції водних мас і направлення уздовж смугових течій, може певною мірою зазнавати їхнього впливу (крім того, поблизу цього району знаходиться скид колектору дренажних вод). Процес самоочищення в цьому районі відбувається нормально через наявність аборигенної мікробіоти з високим деструктивним та антагоністичним потенціалом.

На підставі наших досліджень можна зробити висновок про те, що досліджувані райони узбережжя Чорного моря знаходяться під великим впливом антропогенного навантаження – ізоляція великої кількості штамів бактерій-антагоністів, з високою деструктивною здатністю щодо органічних сполук (ПАР, нафта), свідчить про хронічне хімічне та біологічне забруднення зони заплеску в районі Дачі Ковалевського та о. Зміїний. Три поліфункціональних штама *M. barkeri* 5, *M. barkeri* 13, *P. fluorescens* 55, які виявили високий рівень антагоністичної активності щодо широкого спектру представників умовно-патогенної мікробіоти і виявили високу здатність окиснювати вуглеводні нафти і ПАР можуть бути рекомендовані для подальшого використання в біотехнологіях ремедіації морських вод від біологічного і хімічного забруднення.



Е. Г. Горшкова

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 068 278 02 05, e-mail: helen-good@ukr.net

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ И ДЕСТРУКТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Цель. Исследовать антагонистическую, нефте- и ПАВ- деструктивную активность бактерий, изолированных из прибрежных зон Черного моря. **Методы.** Для изоляции бактерий-деструкторов из морской и поровой воды зоны заплеска Одесской затоки, о. Змеиный использовали метод накопительных культур на жидкой синтетической среде МКД с дальнейшим высевом на питательную среду МПБ и М-9, которые содержали отдельно нефть и додецилсульфат натрия в концентрации 1%. Исследование антагонистической активности, которую оценивали по величине зон задержки роста тест-штаммов, проводили методом отсроченных посевов. **Результаты.** Изучено деструктивную и антагонистическую активность 58 штаммов бактерий, изолированных из прибрежных зон Черного моря. Деструктивную активность в отношении нефти и ПАВ проявили 36 исследованных штаммов. Из наиболее активных отобрано 3 штамма-деструктора, которые проявили наибольшее ингибирующее действие в отношении тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов, в том числе санитарно-показательных. Наибольшее количество штаммов-антагонистов изолировано из поровой и морской воды в районе сброса городских хозяйственно-фекальных вод на Даче Ковалевского, что свидетельствует о хроническом химическом и биологическом загрязнении зоны заплеска в этом районе одесского побережья Черного моря. **Выводы.** Полифункциональные штаммы *M. barkeri* 5, *M. barkeri* 13 *P. fluorescens* 55, которые проявили высокий уровень антагонистической активности в отношении широкого спектра представителей условно-патогенной микробиоты и обладали высокой способностью окислять углеводороды нефти и ПАВ, могут быть рекомендованы для дальнейшего использования в биотехнологиях ремедиации морских вод от биологического и химического загрязнения.

Ключевые слова: морские бактерии-деструкторы, нефть, поверхностно-активные вещества, антагонистическая активность.

О. Н. Horshkova

I. I. Mechnykov Odesa National University, Odesa,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 068 278 02 05, e-mail: helen-good@ukr.net

ANTAGONISTIC AND DESTRUCTIVE ACTIVITY OF MARINE BACTERIA

Summary

Aim. To investigate antagonistic, oil and surfactant-destructive activity of bacteria isolated from the coastal zones of the Black Sea. **Methods.** For isolation



of bacteria-destructors from the sea and pore waters of the zone of splashes of the Odesa bay, the Zmiiny island there were used the method of accumulative crops on liquid synthetic medium MKD with further sowing on the nutrient medium MPB and M-9, contained separately oil sodium dodecyl sulfate in concentration of 1%. Researches of antagonistic activity, estimated according to the size of the growth inhibition zones of the test strains, were conducted by means of the method of the delayed crops. **Results.** The destructive and antagonistic activity of 58 strains of bacteria isolated from the coastal zones of the Black Sea was studied. The destructive activity in relation to oil and surfactants showed 36 strains studied. Of the most active, 3 strain-destructors were selected, which showed the greatest inhibitory effect on test strains of conditionally pathogenic microorganisms, including sanitary-indicative. The largest number of antagonistic strains is isolated from porous and sea water in the area of discharging urban residential sewage in the Dacha Kovalevsky, indicating the chronic chemical and biological contamination of the zone of splash in the area of the Odesa border of the Black Sea. **Conclusions.** Polyfunctional strains *M. barkeri* 5, *M. barkeri* 13, *P. fluorescens* 55, which showed a high level of antagonistic activity with respect to a wide spectrum of conditionally pathogenic microbiota representatives and had a high ability to oxidize hydrocarbon oil and surfactant, they can be recommended for further use in the biotechnology of remediation of marine waters from biological and chemical contamination.

Key words: marine bacteria-destructors, oil, surfactants, antagonistic activity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробьева Л. В. Мейобентос украинского шельфа Черного и Азовского морей. – К.: Наукова думка, 1999. – 300 с.
2. Горшкова О. Г. Антагоністична активність бактерій, виділених із проб води Куяльника та ґрунту о. Зміїний // Актуальні питання розвитку біології та екології. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції (3-7 жовтня 2016 р., м. Вінниця, Україна), м. Вінниця, ТОВ «Нілан-ЛТД». – 2016. – С. 222–224.
3. Зайцев Ю. П. Экологическое состояние шельфовой зоны Черного моря у побережья Украины (обзор) // Гидробиол. журн. – 1992. – Т. 4, № 28 – С. 3–18.
4. Іваниця В. О., Горшкова О. Г., Кортаєва Н. В., Волювач О. В., Гудзенко Т. В., Остапчук А. М. Склад жирних кислот ліпідів штаму *Bacillus* spp. ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4 (32). – С. 28–36.
5. Кузнецов А. В. Санитарная охрана моря от загрязнения судами в системе эпидемиологического надзора за карантинными инфекциями: Автореф. дис. ...доктора мед. наук. Одесса, 2004 –16 с.
6. *Практикум по микробиологии*: Учеб. пособие для студ. высших учеб. заведений / А. И. Нетрусова, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Изд. Центр «Академия». – 2005. – 608 с.



7. Suneby Emma G., Herndon Leslie R., Schneider Tanya L. *Pseudomonas aeruginosa* LasR. DNA Binding Is Directly Inhibited by Quorum Sensing Antagonists // ACS Infection diseases. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 183–189.

8. De la Fuente Mery, Vidal Jose M., Miranda, Claudio D. Inhibition of *Flavobacterium psychrophilum* biofilm formation using a biofilm of the antagonist *Pseudomonas fluorescens* FF48 // SpringerPlus. – 2013. – Vol. 2, № 176. – P. 1–9.

References

1. Vorob'eva LV. Mejobentos ukrainskogo shel'fa Chernogo i Azovskogo morej. K.: Naukova dumka, 1999: 300.

2. Horshkova OH. Antagonistic activity of the bacteria isolated from water samples of a kuyal'nyk and soil of the Zmiiny island. Materials of the international scientific and practical conference. V.: TOV "Nilan-LTD", 2016: 222-224.

3. Zaytsev YuP. Ecological condition of a shelf zone of the Black Sea at the coast of Ukraine (review). Hydrobiology. 1992; 4(28): 3–18.

4. Ivanytsya VO, Horshkova OH, Korotayeva NV, Volyuvach OV, Gudzenko TV, Ostapchuk AM. Composition of fatty acids of lipids of the strain of *Bacillus* spp. OZ-5 isolated from the oil-polluted soil of the Zmiiny island. Microbiology&Biotechnology. 2015; 4(32): 28-36.

5. Kuznetsov AV. Sanitary protection of the sea from pollution by ships in the system of epidemiological surveillance of quarantine infections. Odesa. 2004: 16.

6. Workshop on microbiology: Manual for students of higher educational institutions. AY. Netrusova, MA. Ehorova, LM. Zakharchuk and other. M.: Publishing Center «Academy», 2005: 608.

7. Suneby Emma G, Herndon Leslie R, Schneider Tanya L. *Pseudomonas aeruginosa* LasR. DNA Binding Is Directly Inhibited by Quorum Sensing Antagonists. ACS Infection diseases. 2017; 3(3): 183-189.

8. De la Fuente Mery, Vidal Jose M., Miranda, Claudio D. Inhibition of *Flavobacterium psychrophilum* biofilm formation using a biofilm of the antagonist *Pseudomonas fluorescens* FF48. SpringerPlus. 2013. 2(176): 1-9.

Стаття надійшла до редакції 20.11.2017 р.



УДК 579. 222. 3

**І. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. М. Василюк,
Л. Т. Олещенко**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ-143, Україна, 03143,
e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

ПРОДУКЦІЯ ЕЗКОПОЛІСАХАРИДІВ ШТАМАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ

Мета. Провести пошук штамів молочнокислих бактерій (МКБ), що продукують екзополісахариди, серед ізолятів з традиційних кисломолочних продуктів, ферментованих фруктів та овочів. **Методи.** Ідентифікацію ізольованих культур проводили за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями. Здатність до синтезу та кількість екзополісахаридів визначали на середовищах MRS з 5% вуглеводу (сахароза, глюкоза, фруктоза чи лактоза). **Результати.** При рості на агаризованих середовищах з різними джерелами вуглеводів здатність до утворення ЕПС виявили 25% штамів МКБ. На середовищі MRS з сахарозою ЕПС синтезували всі штами *Leuconostoc* spp. (у кількості 0,40–18,00 г/л) і 93% штамів *Pediococcus* spp. (0,35–9,40 г/л), тоді як серед *Lactobacillus* spp. – тільки 37,5% штамів (0,15–2,75 г/л). В той же час штами *Lactobacillus* spp. продукували ЕПС при рості на середовищах MRS з глюкозою, фруктозою чи лактозою у кількості 0,15–0,90 г/л. **Висновки.** Здатність до продукції ЕПС штамми МКБ залежала від родової належності і наявного в середовищі вуглеводу. Відібрано штами МКБ, які є перспективними для подальших досліджень біологічної активності та структури їх екзополісахаридів.

Ключові слова: екзополісахариди, молочнокислі бактерії, ферментовані продукти.

Продукція екзополісахаридів (ЕПС) молочнокислими бактеріями (МКБ) інтенсивно вивчається і на сьогоднішній день накопичено багато даних щодо їх складу, структури та властивостей. Штами продуценти ЕПС виявлені серед представників родів *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* та *Weissella* [9]. Екзополісахариди МКБ мають унікальні фізичні та реологічні властивості, які зумовлюють їх використання у харчовій промисловості як в'язучих, стабілізувальних, гелеутворювальних агентів, особливо при виробництві кисломолочних продуктів [6]. У останні роки все більше уваги приділяється вивченню біологічної активності ЕПС. Зокрема показано, що вони володіють імуностимулювальною, протипухлинною та антиоксидантною активностями [7, 13, 14]. Оскільки біологічна активність ЕПС є штамоспецифічною, пошук нових штамів-продуцентів серед МКБ – представників природної мікробіоти ферментованих продуктів є актуаль-

© І. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. М. Василюк, Л. Т. Олещенко, 2017



ним. Штами, що продукують ЕПС, особливо у великій кількості, є цікавими з точки зору їх використання як для покращення реологічних властивостей продукту, так і для можливого оздоровчого впливу на організм людини.

Метою роботи було провести пошук штамів МКБ, що продукують екзополісахариди, серед ізолятів з традиційних кисломолочних продуктів, ферментованих фруктів та овочів.

Матеріали і методи

Як джерело виділення молочнокислих бактерій були використані ферментовані овочі та фрукти, виготовлені традиційними методами в домашніх умовах, а саме квашені капуста, яблука, баклажани та селера, сквашений томатний сік. Молочнокислі бактерії виділяли на середовищі MRS при культивуванні за температури 30 °C протягом 48–72 год. В роботі також використано штами родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* та *Pediococcus*, що були ізольовані нами раніше з традиційних кисломолочних продуктів і ферментованих овочів [1, 5].

Ідентифікацію виділених культур на рівні роду проводили з використанням традиційних мікробіологічних методів за низкою фізіолого-біохімічних і морфолого-культуральних ознак, як описано раніше [5].

Здатність до синтезу екзополісахаридів досліджували на агаризованих середовищах MRS, що містили сахарозу, лактозу, глюкозу чи фруктозу у концентрації 5%. Чашки з посівами інкубували при температурі 30 °C протягом 24–72 год і візуально відмічали здатність до синтезу екзополісахариду за утворенням слизових чи в'язких колоній [10]. Кількісне визначення продукції екзополісахаридів проводили шляхом вирощування на рідкому середовищі MRS з відповідним вуглеводом протягом 24 годин. Екзополісахариди виділяли з культуральної рідини [6] та кількісно визначали вуглеводи фенол-сірчанокислотним методом [3]. Статистичне опрацювання даних проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програми Statistika 7.0.

Результати досліджень та їх обговорення

Із зразків ферментованих овочів та фруктів було ізольовано 194 штами молочнокислих бактерій. Облігатно гомоферментативні коки з сферичною формою клітин, згруповані у мазках в кластери чи тетради, стійкі до ванкоміцину було віднесено до роду *Pediococcus* (18 штамів). Гетероферментативні кокобацили з характерною морфологією клітин, що не зброджують аргінін та стійкі до ванкоміцину були віднесені до роду *Leuconostoc* (56 штамів). Факультативно гетероферментативні та гетероферментативні паличкоподібні бактерії було віднесено до роду *Lactobacillus* (120 штамів). Слід відзначити, що спектр представників різних родів молочнокислих бактерій різнився залежно від ферментованого продукту (рис. 1). Так, із зразків квашеної селери були ізольовані тільки лактобацили, які також склали переважну більшість ізолятів з квашених баклажанів, тоді як в квашеній капусті переважали лейконостоки, а в квашеному томатному соці – педіококи.



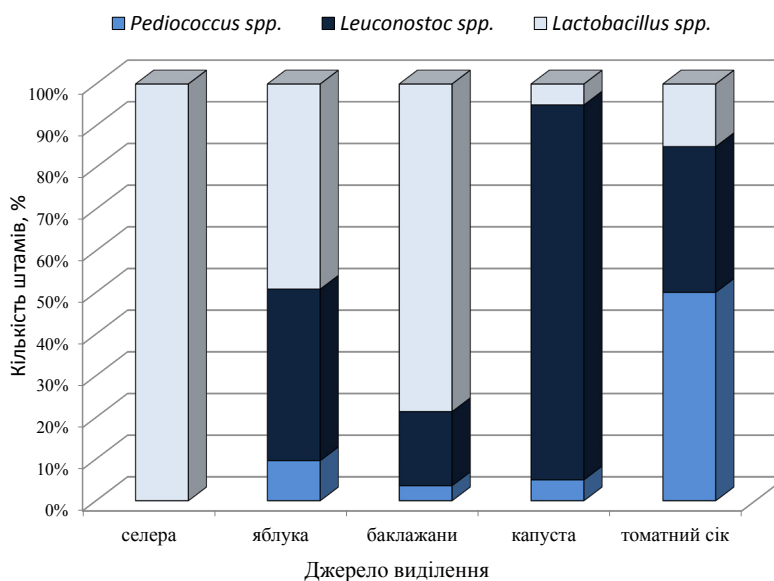


Рис. 1. Частота виділення штамів МКБ різних родів з зразків ферментованих овочів та фруктів.

Fig 1. Frequency of LAB strains isolation of different genera from samples of fermented vegetables and fruits

В літературі описано декілька методів скринінгу штамів МКБ, що продукують екзополісахариди. Найбільш простим є метод візуальної оцінки колоній бактерій на поверхні агаризованого середовища, даний підхід є найбільш придатним для первинного скринінгу великої кількості штамів [10].

При рості на поверхні агаризованих середовищ з різними джерелами вуглеводів здатність до утворення ЕПС виявили 25% (88 з 351) досліджених в роботі штамів молочнокислих бактерій, утворюючи слизові чи в'язкі колонії. На середовищі MRS з сахарозою ЕПС продукували 81,8% штамів, на середовищі з глюкозою – 21,5% штамів, на середовищах з фруктозою і лактозою – 7,9% і 1,13%, відповідно. Отримані нами дані щодо частоти виділення ЕПС-продуцентів співпадають з даними інших авторів [4, 11]. Крім того, за даними літератури молочнокислі бактерії різних родів продукують ЕПС при рості на середовищах з сахарозою, як єдиним джерелом вуглеводів, частіше, порівняно з іншими цукрами, такими як глюкоза, фруктоза, мальтоза, рафіноза, галактоза, лактоза [12].

На рис. 2 наведено дані щодо частоти виділення продуцентів ЕПС залежно від джерела виділення. Найбільша кількість штамів, що продукують ЕПС, виявлено серед ізолятів з квашених яблук (71,6% штамів), причому ЕПС продукувалися при вирощуванні на всіх використаних в роботі середовищах з різними вуглеводами. Найменша кількість ЕПС-продуцентів виявлена серед ізолятів з квашеної селери (2,8% штамів).

Продукція ЕПС на середовищі з певним вуглеводом залежала від родової належності. На середовищі MRS з сахарозою ЕПС синтезували всі шта-

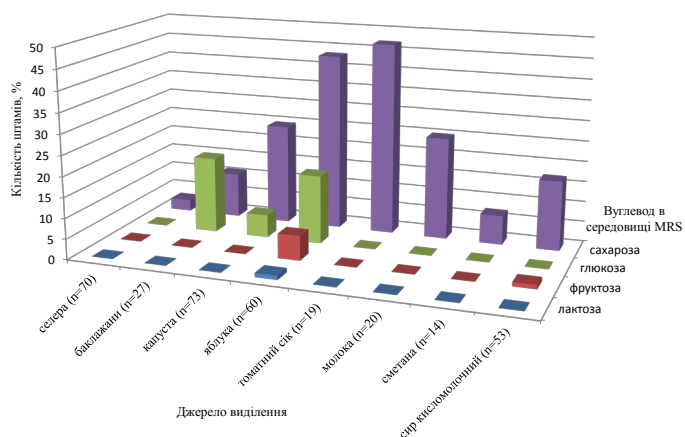


Рис. 2. Частота виділення штамів МКБ, що продукують екзополісахариди, залежно від джерела виділення.

Fig. 2. Frequency of isolation of exopolysaccharide-producing LAB strains depending on the source of isolation

ми лейконостоків і 93% штамів педіококів, тоді як серед лактобацил – тільки 37,5% штамів. В той же час штами *Lactobacillus* spp. продукували ЕПС при рості на середовищах MRS з глюкозою, фруктозою чи лактозою. Деякі штами МКБ продукували ЕПС при рості на декількох середовищах з різними цукрами і серед цих ізолятів переважали лактобацили (рис. 3). Так, штам *Lactobacillus* sp. 19я, ізольований з квасених яблук, продукував ЕПС на середовищах з сахарозою, глюкозою і лактозою. Найчастіше штами лактобацил продукували ЕПС як на MRS з глюкозою, так і на MRS з фруктозою.

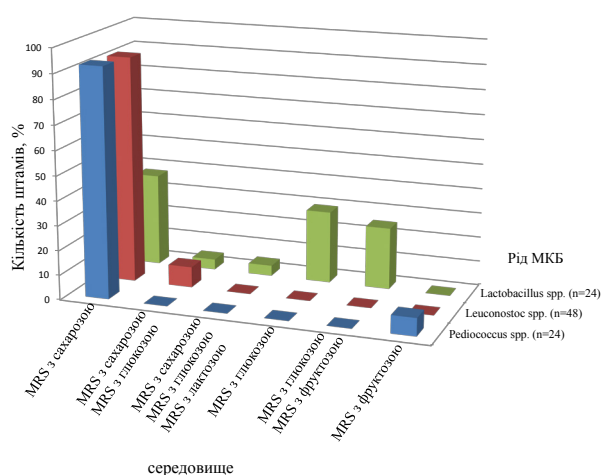


Рис. 3. Продукція екзополісахаридів штамами родів *Lactobacillus*, *Leuconostoc* і *Pediococcus* на середовищах MRS з різними вуглеводами

Fig. 3. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* strains on MRS media with different carbohydrates



Кількість екзополісахаридів, що продукувалася штамами МКБ, варіювала в широких межах і також залежала як від родової належності, так і від джерела вуглеводу. На середовищі з сахарозою найбільшу кількість ЕПС продукували штами *Leuconostoc* spp. (0,40–18,00 г/л), тоді як представники *Lactobacillus* spp. і *Pediococcus* spp. – 0,35–9,40 і 0,15–2,75 г/л, відповідно (рис. 4).

На середовищах з глюкозою і фруктозою кількість ЕПС, що продукували в основному штами *Lactobacillus* spp. була в середньому на порядок нижчою, в порівнянні з середовищем з сахарозою, і складала 0,15–0,55 г/л і 0,15–0,90 г/л, відповідно.

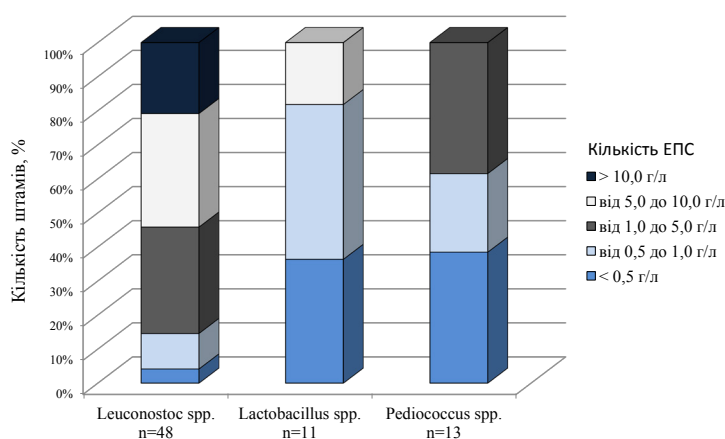


Рис. 4. Розподіл штамів МКБ за кількістю екзополісахаридів, що продукуються на середовищі MRS з сахарозою

Fig. 4. Distribution of LAB strains depending on amount of exopolysaccharides produced on MRS medium with sucrose

Кількість екзополісахаридів, що продукувалися одним штамом при рості на середовищах з різними джерелами вуглеводів, у більшості випадків була співставною у штамів *Lactobacillus* spp. В той же час штами *Leuconostoc* spp. на середовищі з сахарозою продукували ЕПС у кількості 3,7–6,3 г/л, а на середовищі з глюкозою – 0,5 г/л. За даними літератури, кількість ЕПС, що продукують штами МКБ, коливається в широких межах і може залежати як від умов культивування, так і від мономерного складу ЕПС, а саме: для гомополісахаридів це зазвичай високі концентрації – до 20 г/л, а для гетерополісахаридів – низькі, до 1 г/л [2, 11, 12].

Отже, в результаті проведеної роботи було визначено родову належність штамів МКБ, що були ізольовані з традиційних ферментованих фруктів та овочів. Частота виділення штамів-продуцентів ЕПС залежала як від джерела виділення так і роду МКБ. Переважна більшість бактерій продукували ЕПС при рості на середовищі з сахарозою у кількостях 1–18 г/л. Для подальших досліджень з метою встановлення біологічної активності та структури ЕПС нами було відібрано 86 штамів, а саме: 48 штамів *Leuconostoc* spp., 24 штами *Lactobacillus* spp. і 14 штамів *Pediococcus* spp., які є перспективними для практичного використання.



UDK 579. 222. 3

**I. L. Garmasheva, N. K. Kovalenko, O. M. Vasyluk,
L. T. Oleschenko**

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine
154, Zabolotny str, Kyiv-143, Ukraine, 03143,
e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM FERNMENTED PRODUCTS

Summary

Aim. To search for lactic acid bacteria (LAB) strains that produce exopolysaccharides among the isolates from traditional dairy products, fermented fruits and vegetables. **Methods.** Identification of the isolates were carried out according to morphological-cultural and physiology-biochemical properties. The ability to produce and amount of exopolysaccharides were determined on MRS media with 5% carbohydrate (sucrose, glucose, fructose or lactose). **Results.** 25% LAB strains were able to produce EPS on solid media with different carbon sources. All *Leuconostoc* spp. produced EPS on media with sucrose (in amount 0,40–18,00 g/l) and 93% of *Pediococcus* spp. strains (0,35–9,40 g/l), whereas among *Lactobacillus* spp. strains – only 37,5% of strains (0,15–2,75 g/l). At the same time, *Lactobacillus* spp. strains produced EPS on media with glucose, fructose or lactose in amount 0,15–0,90 g/l. **Conclusions.** The ability of LAB strains to produce EPS depended on genus affiliation and available carbohydrate in the medium. The LAB strains promising for further studies of biological activity and the structure of their exopolysaccharides have been selected.

Key words: exopolysaccharides, lactic acid bacteria, fermented products.

УДК 579. 222. 3

**И. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко, О. Н. Василюк,
Л. Т. Олещенко**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев-143, Украина 03143,
e-mail: inna.garmasheva@gmail.com

ПРОДУКЦІЯ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ ШТАММАМИ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛІРОВАННИХ ІЗ ФЕРМЕНТИРОВАННИХ ПРОДУКТІВ

Реферат

Цель. Провести поиск штаммов молочнокислых бактерий (МКБ), которые продуцируют экзополисахариды (ЭПС), среди изолятов из традиционных кисломолочных продуктов, ферментированных фруктов и овощей. **Методы.** Идентификацию изолированных культур проводили по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим свойствам. Способность к синтезу



и количество экзополисахаридов определяли на средах MRS с 5% углевода (сахароза, глюкоза, фруктоза или лактоза). **Результаты.** При росте на агаризованных средах с разными источниками углеводов способность к образованию ЭПС проявили 25% штаммов МКБ. На среде MRS с сахарозой ЭПС синтезировали все штаммы *Leuconostoc spp.* (в количестве 0,40–18,00 г/л) и 93% штаммов *Pediococcus spp.* (0,35–9,40 г/л), тогда как среди *Lactobacillus spp.* – только 37,5% штаммов (0,15–2,75 г/л). В то же время штаммы *Lactobacillus spp.* продуцировали ЭПС при росте на средах MRS с глюкозой, фруктозой или лактозой в количестве 0,15–0,90 г/л. **Выводы.** Способность к продукции ЭПС штаммами МКБ зависела от родовой принадлежности и присутствующего в среде углевода. Отобраны штаммы МКБ, которые являются перспективными для дальнейших исследований биологической активности и структуры их экзополисахаридов.

Ключевые слова: экзополисахариды, молочнокислые бактерии, ферментированные продукты.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Василюк О. М., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л., Олещенко Л. Т. Виділення та ідентифікація бактерій роду *Lactobacillus* з ферментованих продуктів різних регіонів України // Мікробіол. журн. – 2014. – Т. 76, № 2. – С. 3–9.
2. De Vuyst L., De Vin F., Vaningelgem F. and Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria // Int. Dairy J. – 2001. – 11(9). – P. 687–707.
3. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance // Anal. Chem. – 1956. – 28(3). – P. 350–356.
4. Garai-Ibabe G., Areizaga J., Aznar R., Elizaquivel P., Prieto A., Irastorza A., and M.T. Dueñas. Screening and selection of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization // J. Agric. Food Chem. – 2010. – 58(10). – P. 6149–6156.
5. Garmasheva I. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Ukrainian traditional dairy products // AIMS Microbiol. – 2016. – 2(3). – P. 372–387.
6. Feng M., Chen X., Li C., Nurgul R., and Dong M. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide // J. Food Sci. – 2012. – 77(6). – P. T111–T117.
7. Liu C., Tseng K., Chiang S., Lee B., Hsu W. and Pana T. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus exopolysaccharides* // J. Sci. Food Agric. – 2011. – 91(12). – P. 2284–2291.
8. Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J. and Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria // Int Dairy J. – 2002. – 12(2-3). – P. 163–171.
9. Ryan P.M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Caplice N.M., Stanton C. Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications // Food Func. – 2015. – 6(3). – P. 679–693.



10. Smitinont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M., Cescutti P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization // *Int. J. Food Microbiology*. – 1999. – 51(2-3). – P. 105–111.

11. Tiekling M., Korakli M., Ehrmann M.A., Gänzle M.G. and Vogel R.F. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – 69(2). – P. 945–952.

12. van Geel-Schutten G.H., Flesch F., Brink ten B., Smith M.R., Dijkhuizen L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1998. – 50(6). – P. 697–703.

13. Wang K., Li W., Rui X., Chen X., Jiang M., Dong M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810 // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – 63. – P. 133–139.

14. Zhang L., Liu C., Li D., Zhao Y., Zhang X., Zeng X., Yang Z., Li S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88 // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – 54. – P. 270–275.

References

1. Vasyliuk OM, Kovalenko NK, Harmasheva IL, Oleshchenko LT. Isolation and identification of bacteria of *Lactobacillus* genus from fermented products in different regions of Ukraine. *Mikrobiol Z.* 2014;76(2):2-9.

2. De Vuyst L, De Vin F, Vaningelgem F and Degeest B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 2001;11(9):687–707.

3. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* 1956;28(3):350–356.

4. Garai-Ibabe G, Areizaga J, Aznar R, Elizaquivel P, Prieto A, Irastorza A and Dueñas MT. Screening and selection of 2-branched (1,3)- β -D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *J. Agric. Food Chem.* 2010;58(10):6149–6156.

5. Garmasheva I. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Ukrainian traditional dairy products. *AIMS Microbiol.* 2016;2(3):372-387.

6. Feng M, Chen X, Li C, Nurgul R and Dong M. Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide. *J. Food Sci.* 2012;77(6):T111-T117.

7. Liu C, Tseng K, Chiang S, Lee B, Hsu W and Pana T. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 2011;91(12):2284–2291.

8. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J and Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 2002;12(2-3):163–171.



9. Ryan PM, Ross RP, Fitzgerald GF, Caplice NM, Stanton C. Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food Func.* 2015;6(3):679-693.
10. Smitinont T, Tansakul C, Tanasupawat S, Keeratipibul S, Navarini L, Bosco M, Cescutti P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* 1999;51(2-3):105–111.
11. Tiekling M, Korakli M, Ehrmann MA, Gänzle MG and Vogel RF. In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(2):945–952.
12. van Geel-Schutten GH, Flesch F, Brink ten B., Smith MR, Dijkhuizen L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998;50(6):697-703.
13. Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int. J. Biol. Macromol.* 2014;63:133– 139.
14. Zhang L, Liu C, Li D, Zhao Y, Zhang X, Zeng X, Yang Z, Li S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013;54:270– 275.

Стаття надійшла до редакції 20.11.2017 р.



А. А. Бойко¹, А. И. Жуминская², А. И. Кушкина¹,
В. А. Иваныця², Ф. И. Товкач¹

¹ Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,

² Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, e-mail: boets2008@ukr.net

ХАРАКТЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ KEY-ПОДОБНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA AMYLOVORA*

Цель. Изучить гетерогенность фагового изолята, полученного из груш, пораженных *Erwinia amylovora*. **Методы.** Гетерогенность фаговых изолятов изучали с использованием ионообменной хроматографии низкого давления (LPLC), электронно-микроскопического анализа вирионов и рестрикционного анализа ДНК. В работе использовали бактериофаги KEY, KEY/7 и KEY/25. **Результаты.** Показано, что изолят содержит двухкомпонентную популяцию KEY-подобных фагов, частицы которых различаются по сродству к DEAE-целлюлозе. Фаги обеих субпопуляций представлены вирионами В1-морфотипа (семейство Siphoviridae) с правильными икосаэдрическими капсидами диаметром около 77 нм и длиной хвостовых отростков, близкой к 172 нм. Эти фаговые частицы по морфологии и размеру близки к таковым прототипного фага KEY. По данным рестрикционного анализа геномы фагов чистых линий KEY/7 и KEY/25 близки между собой и имеют размеры около 72 кб, что на 25–27% меньше, чем размер генома фага KEY. Предполагается, что фаги KEY/7 и KEY/25 представляют собой делеционные варианты фага KEY. **Вывод.** Гетерогенность фаговых изолятов, полученных из пораженных растений, имеет две ключевые характеристики: изменение сродства частиц к DEAE-целлюлозе и генетической структуры их генома. Дальнейшие исследования как фаговых изолятов так и фаговых популяций важны для изучения экологии и возможности использования бактериофагов для биоконтроля опасных патогенов древесных растений.

Ключевые слова: гетерогенность фаговой популяции, KEY-подобные бактериофаги, *Erwinia amylovora*.

Традиционная схема изолирования бактериофагов из различных источников основана на обогащении активных частиц и получении чистой вирусной линии [1]. Однако такая лабораторная практика не предлагает исследований, направленных на комплексное изучение популяций бактериальных вирусов.

Показано, что для понимания экологии фагов на уровне их популяционного разнообразия важно использовать широкий набор индикаторных культур, и только таким образом могут быть получены чистые вирусные линии [2].



Целью работы было изучить гетерогенность фагового изолята, полученного из груш, пораженных *Erwinia amylovora*.

Материалы и методы

Препаративное количество фаговых частиц было получено методом слитного лизиса без предварительного клонирования на двух штаммах *Pantoea agglomerans* g157 и 9/7-2. Для изучения круга хозяев и эффективности посева фагов, кроме вышеуказанных, были использованы штаммы *P. agglomerans* 157/RI и g150, *E. amylovora* K8 и *E. horticola* 60-2n, 450, 450(59) и 450 (P1).

В работе были изучены фаги из грушевого изолята и бактериофаг KEУ из айвового изолята.

Разделение фаговых частиц осуществляли методом жидкостной хроматографии низкого давления (ЖХНД) на волокнистой DEAE-целлюлозе 23SS (“Serva”) на хроматографе Biologic LP BIORAD в системе натрий-фосфатного буфера (0,01M NaP, pH 7). Предварительный анализ фаговых лизатов проводили на аналитической колонке BIORAD Macro-Prep DEAE Cartridge Bio-S; объем образцов составлял 1 мл. Для дальнейшего анализа вирусных препаратов использовали стандартную препаративную колонку общим объемом 65 мл. Объем носителя составлял 25–30 мл, объем анализируемого образца – 150–200 мл. Время нанесения образца достигало 2 ч, общее время элюции – 75 мин.

После нанесения фаголизата на колонку, фаговые частицы элюировали раствором NaCl с линейно возрастающей концентрацией от 0,1 до 0,7 M в NaP-буфере. Содержимое фракций проверяли на наличие вирионов по поглощению при 280 нм, биологическому титру и с помощью электронной микроскопии. Пиковые фракции объединяли и центрифугировали с использованием ротора Beckman SW28, 24 тыс. об/мин, 3 ч, 10 °C. Осадки растворяли в 400 мкл ТМ буфера (10 mM трис-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂). После этого фаговые частицы очищали в ступенчатом градиенте CsCl (1,4–1,6 г/см³) и диализовали против ТМ-буфера. За эффективность посева (ЭП) принимали отношение титра фага на тестируемой культуре к титру на культуре на которой данный фаг проявлял максимальную активность.

Вирионную ДНК для рестрикционного анализа выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Указанные методы детально описаны в работе [4]. Электронно-микроскопические образцы были получены с помощью трансмиссивного электронного микроскопа JEOL JEM 1400, образцы адсорбировали 20–50 мин на сетке-подложке, покрытой нитроцеллюлозой, отмывали в деионизированной воде 10–15 мин и окрашивали 2% уранилацетатом в течение 40–90 с.

Результаты исследований и их обсуждение

На рис. 1, а представлена хроматограмма суммарного фагового препарата, полученного на индикаторном штамме *P. agglomerans* g157. Несмотря на то, что эта хроматограмма свидетельствует о гетерогенности исследуемого образца, негативные фаговые колонии были морфологически однотипными (см. рис. 1, б).



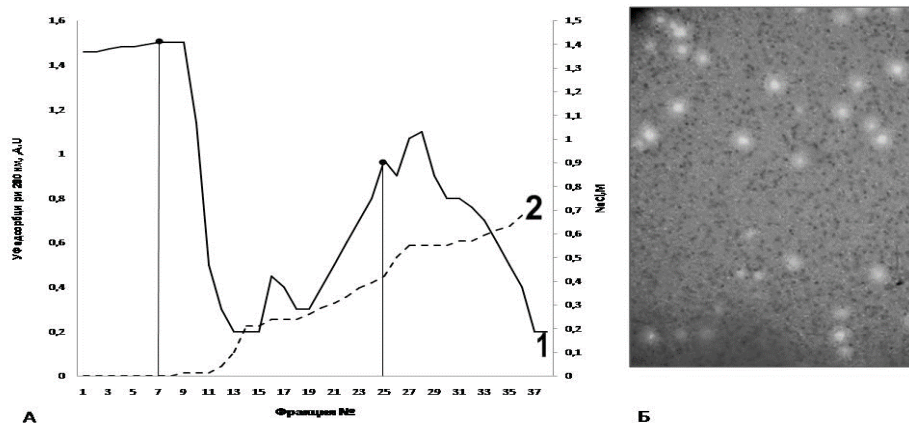


Рис. 1. ЖХНД-профиль суммарного фагового препарата, полученного на *P. agglomerans* g157 (А) и морфология негативных фаговых колоний (Б).
Примечание: 1 – кривая поглощения, 2 – градиент концентрации NaCl; пиковые фракции обозначены вертикальными линиями.

Fig. 1. LPLC- profile of the total phage preparation obtained on *P. agglomerans* g157 (А) and morphology of negative phage colonies (Б).
Note: 1 – absorption curve, 2 – gradient of NaCl concentration; peak fractions are indicated by the vertical lines.

При разделении частиц на DEAE-колонке обнаружены две основные области элюции. Первая область отражает выход фаговых частиц без добавления NaCl (фракции № 1–17). Вторая область (фракции № 18–35) формируется при элюции образца в линейном градиенте NaCl 0,5–0,7 М с максимумом концентрации при 280 нм в зоне 0,5 М NaCl. После определения титра каждой из фракций было обнаружено, что максимальная биологическая активность соответствовала фракции № 7 из первой области и фракции № 25 из второй (рис. 1, а). Полученные данные свидетельствуют о хроматографической гетерогенности частиц фагового препарата.

Из фракций № 7 и 25 на штамме *P. agglomerans* g157 были отобраны одиночные фаговые бляшки, 7-кратно клонированы и получены в препаративных количествах для того, чтобы установить, изменяется ли характеристика изолята в последующих пассажах. Затем каждый из этих препаратов был повторно проанализирован с помощью ЖХНД. Для двух исследуемых фаговых препаратов получены идентичные хроматограммы чистых линий фагов, названных КЕУ/7 и КЕУ/25, соответственно.

На рис. 2 представлены результаты повторного ЖХНД-исследования для фага КЕУ/25.

Таким образом, гетерогенность фаговой популяции из айвового изолята характеризуется содержанием частиц двух типов, которые имеют разное сродство к DEAE-целлюлозе. Частицы I типа смываются чистым NaP-буфером, а частицы II типа элюируются буфером, содержащим NaCl.

После хроматографии фаги чистых линий КЕУ/7 и КЕУ/25 были очищены в градиенте CsCl. Плавающая плотность образцов была приблизительно

одинаковой и составляла 1,53 и 1,52 г/см³ для фагов KEY/7 и KEY/25, соответственно. CsCl-препараты фагов характеризовались наличием одной гомогенной полосы в градиенте.

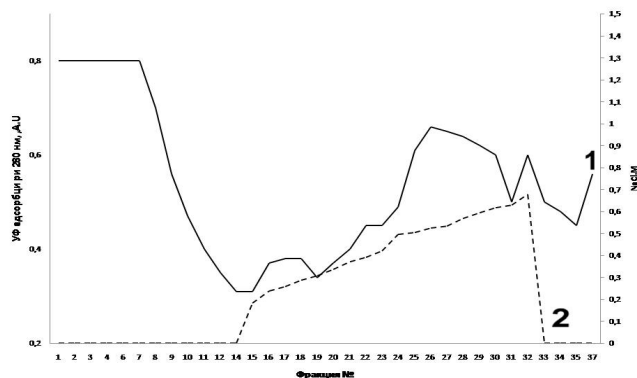


Рис. 2. ЖХНД-профиль фага KEY/25.
Пояснения см. рис. 1.

Fig. 2. LPLC-profile of KEY/25 phage.
Explanations see Fig. 1

Электронно-микроскопические исследования чистых линий фагов показали наличие частиц В1-морфотипа (сем. *Siphoviridae*), которые имеют икосаэдрический капсид размером 72,1 и 76,7 нм, и несокращающийся хвостовой отросток размером 176,5 и 171,1 нм для фагов KEY/7 и KEY/25, соответственно, (рис. 3).

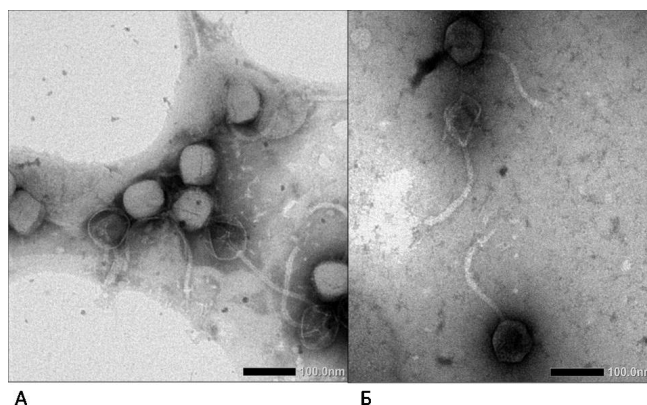


Рис. 3. Электронные микрофотографии фагов KEY/7 (А) и KEY/25 (Б) контрастированные 2%-й фосфовольфрамовой кислотой.
Масштабные линии соответствуют 100 нм.

Fig. 3. Electron microphotographs of the KEY/7 (A) and KEY/25 (B) phages contrasted with 2% phosphotungstic acid.
Scale bar corresponds to 100 nm.

Эти параметры указывают на то, что фаговый изолят содержит бактериофаги, которые как по размерам, так и по морфологии идентичны описанному ранее фагу KEY [6]. Поэтому в последующих экспериментах бактериофаг KEY был использован как стандарт для сравнения.

В табл. 1 приведены показатели эффективности посева (ЭП) и круг хозяев трех фагов среди штаммов *P. agglomerans*, *E. amylovora* и *E. horticola*.

Таблица 1

Эффективность посева фагов KEY, KEY/7 и KEY/25 на штаммах *P. agglomerans*, *E. amylovora* и *E. Horticola*

Table 1

Efficiency of KEY, KEY/7 and KEY/25 phages planting on *P. agglomerans*, *E. amylovora* and *E. horticola* strains

Штамм		Бактериофаг		
		KEY	KEY/7	KEY/25
<i>P. agglomerans</i>	g157/RI	1,0	1,0	1,0
	g157	0,2	0,48	0,62
	9/7-2	0,6	0,19	0,15
	g150	0,13	0,05	0,31
<i>E. amylovora</i>	K8	0,47	0,15	0,05
<i>E. horticola</i>	450	0,1	1,0	1,0
	450(59)	1,0	-	0,11
	450(P1)	-	-	0,66
	60- 2n	-	0,006	-

Примечание . «-» – эффективность посева не определена.

Note: «-» – plating efficiency is not defined.

Как видно из табл. 1, почти все KEY-фаги способны репродуцироваться в клетках штаммов патогенных бактерий *E. amylovora* и *E. horticola*. Наибольшие показатели ЭП получены для штаммов которые *P. agglomerans*, фитопатогенами не являются, но ассоциированы с животными (g157) или растениями (9/7-2 и g150) (Ю.К. Фомичев, личное сообщение). Этот факт наряду с данными литературы [5] позволяет утверждать, что *P. agglomerans* является универсальным индикатором для обнаружения и идентификации бактериофагов, персистирующих в растительном материале. Максимально возможные значения ЭП для фагов KEY/7 и KEY/25 получены в случае *P. agglomerans* g157/RI — штамма, устойчивого к фагу из изолята выделенного из айвы (обозначенного I) [2], а также на штамме *E. horticola* 450.

Наличие профагов P1 и 59 в клетках штамма *E. horticola* 450 незначительно ограничивает развитие фага KEY/25, что, скорее всего, связано с abortивными инфекциями в этих лизогенных клетках [7]. Оба KEY-подобных фага имеют близкие значения ЭП на газонах *P. agglomerans* g157, 9/7-2 и *E. horticola* 450, однако отличаются от контрольного фага KEY. Обнаружи-



вається також різниця в ЕП між KEY/7 і KEY/25 при їх порівняльному дослідженні на клітках *P. agglomerans* g150, *E. amylovora* K8 і *E. horticola* 60–2п, що поряд з LPLC-аналізом підтверджує популяційну гетерогенність досліджуваного фагового ізоляту.

С допомогою ендонуклеаз *Bgl*I і *Kpn*I був проведений порівняльний рестрикційний аналіз ДНК фагів KEY, KEY/7 (не представлено) і KEY/25. Як видно з рис. 4, загальні узори рестрикції вірионних ДНК фагів KEY і KEY/25 збігаються. Однак для обох рестриктаз встановлено, що фагові геноми суттєво відрізняються за розміром (табл. 2). Так, в разі *Bgl*I геном фага KEY становить 99,2 кб, тоді як геном KEY/25 зменшений до 72 кб.

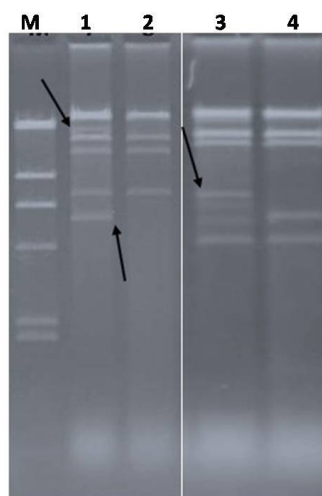


Рис. 4. Рестрикційний аналіз ДНК фагів KEY і KEY/25.
1, 2 – *Bgl*I-гідроліз вірионної ДНК фагів KEY і KEY/25, 3, 4 – *Kpn*I-гідроліз вірионної ДНК фагів KEY і KEY/25 відповідно. М – *Hind*III фрагменти ДНК бактеріофага λ. Стрілками вказано додаткові фрагменти.

Fig.4. Restriction analysis of KEY and KEY/25 phages DNA.
1, 2 – *Bgl*I- hydrolysis of virion DNA of KEY and KEY/25 phages, 3, 4 – *Kpn*I- hydrolysis of virion DNA of KEY and KEY/25 phages respectively. М – *Hind*III- DNA fragments of λ bacteriophage. The arrows indicate the additional fragments.

Таблиця 2

Размеры ДНК фагов KEY и KEY/25

Table 2

KEY and KEY/25 phages DNA size

Показатель	<i>Bgl</i> I			<i>Kpn</i> I		
	KEY*	KEY	KEY/25	KEY*	KEY	KEY/25
Количество фрагментов	5	6	4	8	8	5
Размер (kb)	108,1	99,2	72,0	108,1	98,0	71,4

Примечание: * – количество фрагментов на кольцевой карте фага KEY, полученной из данных полного сиквенса вирионной ДНК *in silico*.

Note: * – number of fragments on the ring map of KEY phage obtained from the data of the full sequence of virion DNA *in silico*.



При гидролизе ДНК КЕУ эндонуклеазой *Bgl*I образуется два дополнительных фрагмента размером 22,7 и 6,0 кб, тогда как гидролиз его ДНК *Kpn*I приводит к появлению трех дополнительных фрагментов – 12,6; 6,9 и 6,7 кб относительно КЕУ-подобных фагов.

Из приведенных данных следует, что размер дополнительного участка в геноме КЕУ может достигать 25–27%.

Таким образом, разница в размерах геномов фагов КЕУ/25 (грушовый изолят) и КЕУ (айвовый изолят) связана с существенной генетической мутацией делеционно-вставочного типа. При этом мутация, скорее всего, существенно не отражается на размерах фаговых капсидов. Рестрикционный анализ показал также отсутствие существенных различий между ДНК фагов КЕУ/25 и КЕУ/7, что подтверждает их тесное генетическое родство. Фаги КЕУ/25 и КЕУ/7, отличающиеся от фага КЕУ по узору рестрикции, скорее всего, представляют собой его делеционные варианты.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что КЕУ-подобные бактериофаги одного экологического региона персистируют как в пораженных ожоговой болезнью айве, так и в груше. Гетерогенность фаговых изолятов, полученных из пораженных растений, имеет две ключевые характеристики: изменение сродства частиц к DEAE-целлюлозе и генетической структуры их генома. Дальнейшие исследования как фаговых изолятов так и фаговых популяций важны для изучения экологии и возможности использования бактериофагов для биоконтроля опасных древесных патогенов.

А. А. Бойко¹, Г. І. Жумінська², А. І. Кушкіна¹,
В. О. Іваниця², Ф. І. Товкач¹

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ,
²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, e-mail: boets2008@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИЧНІ ОСОБЛИОСТІ КЕУ-ПОДІБНИХ БАКТЕРІОФАГІВ *ERWINIA AMYLOVORA*

Реферат

Мета. Вивчити гетерогенність фагового ізоляту, що був одержаний з гілок та листя груші, уражених *Erwinia amylovora*. **Методи.** Гетерогенність фагових ізолятів вивчали з використанням системи, котра включала себе йонообмінну хроматографію низького тиску (LPLC), електронно-мікроскопічний аналіз віріонів і рестрикційний аналіз ДНК. В роботі були використані бактериофаги КЕУ, КЕУ/7 і КЕУ/25. **Результати.** Ізолят містить двокомпонентну популяцію КЕУ-подібних фагів, частки яких розрізняються за спорідненістю до DEAE-целюлози. Фаги обох субпопуляцій представлені віріонами *V1* морфотипу (родина *Siphoviridae*) із правильними ікосаедричними капсидами діаметром близько 77 нм та довжиною хвостових відростків, близькою до 172 нм. Ці фагові частки за морфологією та розміром подібні до таких прототипного фага КЕУ. За даними рестрикційного аналізу геному фагів чистих ліній КЕУ/7 та КЕУ/25 подібні та мають розмір близько 72 кб, що на 25–27% менше, ніж розмір геному фага КЕУ. Припускається, що фаги КЕУ/7 та КЕУ/25 являють собою делеційні варіанти фага КЕУ.



Висновок. Гетерогенність фагових ізолятів, отриманих з уражених рослин, має дві ключові характеристики: змінення спорідненості часток до DEAE-целюлози і генетичної структури їх геному. Подальші дослідження як фагових ізолятів так і фагових популяцій важливі для вивчення екології та можливості використання бактеріофагів для біоконтролю небезпечних патогенів деревних рослин.

Ключові слова: гетерогенність фагової популяції, KEY-подібні бактеріофаги, *Erwinia amylovora*.

**A. A. Boyko¹, G. I. Zhuminska², A. I. Kushkina¹,
V. O. Ivanytsia², F. I. Tovkach¹**

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, 154, Acad. Zabolotny str., 03680, Kyiv, Ukraine

²Odesa I. I. Mechnykov National University, 2, Shampansky lane, 65058, Odesa, Ukraine, e-mail: boets2008@ukr.net

CHARACTERISTIC FEATURES OF KEY-LIKE BACTERIOPHAGES OF *ERWINIA AMYLOVORA*

Summary

Aim. To study the heterogeneity of phage isolates obtained from twigs and leaves of pear affected with *Erwinia amylovora*. **Methods.** The heterogeneity of phage isolates was studied using the system included low pressure liquid chromatography (LPLC), electron-microscopy analysis of virions and DNA restriction analysis. In this work, the bacteriophages KEY, KEY/7 and KEY/25 were used. **Results.** the isolate contains a two-component population of KEY-like phage particles, which differ in affinity for DEAE-cellulose. Phages of both subpopulations are represented by virions of B1 morphotype (Siphoviridae family) with regular icosahedral capsids with the diameter of about 77 nm and the length of the caudal appendages close to 172 nm. These phage particles are similar to those of the prototype KEY phage in morphology and size. According to the restriction analysis data, the genomes of the pure line phages KEY/7 and KEY/25 are similar to each other and have the size of about 72 kb, which is 25–27% less than the size of the genome of KEY phage. It is assumed that the phages KEY/7 and KEY/25 represent deletion variants of KEY phage. **Conclusions.** The heterogeneity of phage isolates get from damaged plants have two main characteristics: the changes of affinity of particles to DEAE-cellulose and the changes of genetic structure of its genome. Further research both phage isolates and phage population are important for study of ecology and opportunity of phage using for biocontrol of dangerous woody plants pathogens.

Key words: phage population heterogeneity, KEY-like bacteriophages, *Erwinia amylovora*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carlson K. Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. Bacteriophages: biology and applications. In Kutter E., Sulakvelidze A. (eds.). Boca Raton: CRC Press., 2005. – 428–485p.



2. Товкач Ф. И., Мороз С. Н., Король Н. А., Файдюк Ю. В., Кушкіна А. И. Поливалентность бактериофагов, изолированных из плодовых деревьев, пораженных бактериальным ожогом // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, № 2. – С. 80–88.

3. Товкач Ф. И., Файдюк Ю. В., Король Н. А., Кушкіна А. И., Мороз С. Н., Мучник Ф. В. Электронная микроскопия и рестрикционный анализ бактериофагов, изолированных из айвы и груши с симптомами бактериального ожога // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, № 5. – С. 67–75.

4. Товкач Ф. И., Григорян Ю. А., Рубан В. И., Данилейченко В. В., Кишко Я. Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* // Мол. генетика, микробиология и вирусология. – 1988. – № 1. – С. 20–24.

5. Adrianssens E.M., Ceeysens P.-J., Dunon V., Ackermann H.-W., Van Vaerenbergh J., Maes M., De Proft M., Lavigne R. Bacteriophages LIMelight and LIMeZero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the “phiKMVLike Viruses” // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – 77, № 10. – P. 3443–3450.

6. Faiduk Y. V., Boyko A. A., Muchnyk F. V., Tovkach F. I. Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages TT10-27 and KEY // Мікробіол. журн. – 2015. – 77, № 3. – С. 36–46.

7. Faidiuk I. V., Tovkach F. I. Exclusion of polyvalent T7-like phages by prophage elements // Мікробіол. журн. – 2014. – 76, № 5. – P. 42–50.

References

1. Carlson K. Appendix: Working with Bacteriophages: Common Techniques and Methodological Approaches. In Kutter E., Sulakvelidze A. (Eds.). Bacteriophages: biology and applications. Boca Raton: CRC Press, 2005; 428–485p.

2. Tovkach FI, Moroz SN, Korol NA, Faiduk YV, Kushkina AI. Polyvalence of bacteriophages isolated from fruit trees, affected by bacterial fire blight. Mikrobiol Zh. 2013; 75 (2): 80-88. (in Russian)

3. Tovkach FI, Faiduk YV, Korol NA, Kushkina AI, Moroz SN, Muchnyk FV Electron microscopy and restriction analysis of bacteriophages isolated from quince and pear with symptoms of fire blight. Mikrobiol Zh. 2013; 75 (5): 67-75 (in Russian).

4. Tovkach FI, Grizorian IuA, Ruban VI, Danileichenko VV, Kishko IaG. Restriction map of permuted DNA of *Erwinia carotovora* temperate bacteriophage 59. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 1988; (1): 20-24 (in Russian).

5. Adrianssens EM, Ceeysens P-J, Dunon V, Ackermann HW, Van Vaerenbergh J, Maes M, De Proft M, Lavigne R. Bacteriophages LIMelight and LIMeZero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the «phiKMV-Like Viruses». Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77 (10): 3443-3450.

6. Faiduk YV, Boyko AA, Muchnyk FV, Tovkach FI Virion morphology and structural organization of polyvalent bacteriophages TT10-27 and KEY. Mirrobiol Zh. 2015; 77(3): 36-46.

7. Faidiuk IV, Tovkach FI Exclusion of polyvalent T7-like phages by prophage elements. Mikrobiol Zh. 2014; 76 (5): 42-50.

Стаття надійшла до редакції 12.12.2017 р.



В. О. Іваниця, М. Д. Штеніков, А. М. Остапчук

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: v_ivanit@ukr.net

ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЕРОБНІ СПОРОУТВОРЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ ГЛИБОКОВОДНИХ ВІДКЛАДЕНЬ ЧОРНОГО МОРЯ

Мета. Виявити в глибоководних осадах сірководневої батіалі Чорного моря факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії (ФАСБ), здатні рости за аеробних умов, та визначити їх таксономічну різноманітність. **Методи.** Для роботи були використані проби донних відкладень з різних горизонтів (0–50 см) з глибини 888–2080 м Чорного моря, відібрані в ході експедиції М84/2 Бременського університету на судні Meteor. Ідентифікацію виділених штамів проводили шляхом визначення спектру жирних кислот на газовому хроматографі «BioRad» з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). **Результати.** У ході досліджень у глибоководних осадах сірководневої батіалі Чорного моря на горизонтах до 50 см виявлено факультативно-анаеробні бактерії, здатні рости за аеробних умов. Було отримано 202 ізоляти грамположитивних бактерій, які утворюють ендоспори. За спектром жирних кислот з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDISherlock встановлено, що отримані ізоляти належать до 18 видів 4-х родів ФАСБ: *Vacillus*, *Raenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*. Не ідентифіковані ізоляти (25) потребують додаткових досліджень і можуть відноситися до нових ще не відомих для науки таксонів бактерій. **Висновки.** Вперше в донних відкладеннях на горизонтах до 50 см анаеробної сірководневої та метанової батіалі Чорного моря на глибинах 888–2080 м виявлено факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії, визначено їх таксономічну різноманітність, та зроблено припущення про їх алохтонне походження.

Ключові слова: *Vacillus*, *Raenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, склад жирних кислот, Чорне море, донні відкладення.

Глибоководні райони батіалі Чорного моря насичені сірководнем і метаном і характеризуються повною відсутністю кисню. Тому в них можуть мешкати лише облигатні анаероби, такі як сульфатредукувальні і метанутворювальні бактерії. Важко передбачити, що такі екстремальні умови в цій зоні можуть бути сприятливими для життєдіяльності аеробних організмів, які отримують енергію за рахунок процесів дихання.

Ю.П. Зайцев передбачив, що відсутність у сірководневій зоні умов для життя оксидантів, не заперечує можливість попадання аеробних організмів на



дно батіалі Чорного моря, де вони можуть довгий термін зберігатися. Проведені Ю.П. Зайцевим з колегами дослідження виявили в сірководневій зоні представників оксидантів – спори грибів та цисти діатомових водоростей [1]. Результати цих досліджень і послугували авторам цієї роботи поштовою для пошуку аеробних бактерій у донних відкладеннях сірководневої зони Чорного моря.

Про виявлення спороутворювальних анаеробів у океанічних відкладеннях повідомлялось в декількох роботах. А. Johannsen [5] вважає, що спори *Clostridium botulinum* вимивалися в Балтійське море з сусідньої суші. С. Е. Dolman і Н. Ixda [4] припустили, що спори цього організму були перенесені на великі відстані в північній частині Тихого океану та півночі Атлантичного океану, а G. J. Vonde [3] зроблено висновок, що спори *Clostridium perfringens* винесені в море каналізацією та могли транспортуватися на відстань 100 км.

Бактеріальне населення глибоководних донних осадів Чорного моря вивчене мало. Мікробіологічне дослідження осадів L. Smith і E. Sato, отриманих з глибини 150 м Чорного моря, виявили, що більше 1000 бактерій на грам є життєздатними у верхньому шарі осадів, більше 600 кл/г – на 5 см нижче поверхні, більше 700 кл/г у шарі 10 см, 700 кл/г на рівні 20 см [7]. Багато з ізолятів належали до відомих клостридіальних видів. Виявлений переважальний організм був аеротолерантною клостридією *Clostridium durum*, sp. nov.. На поверхні осадів виявлено також поодинокі *Lactobacillus brevis*, *Bacillus pasteurii*.

Взагалі відносно небагато відомо про прив'язку певних видів факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій (ФАСБ) до анаеробних біотопів морського середовища. Традиційно вважається, що вони попадають в морське середовище із ґрунту, але є штами адаптовані до самих різних умов, в тому числі і до морських. Так, *Bacillus megaterium* традиційно вважається за мезофільний ґрунтовий організм з максимальною температурою росту близько 50 °С, але відомий штам з термального джерела, що росте за 68 °С [2, 6].

Метою роботи було виявити в глибоководних осадах сірководневої батіалі Чорного моря факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії, здатні рости за аеробних умов, та визначити їх таксономічну різноманітність.

Матеріали та методи

Для роботи були використані проби донних відкладень Чорного моря, відібрані в ході експедиції М84/2 Бременського університету на судні Meteor у березні 2011 року та передані ОНУ для мікробіологічних досліджень Ю.П. Зайцевим та Б.Г. Александровим (Інститут біології моря НАНУ). Проби були відібрані з 4 точок на глибинах від 888 до 2080 метрів (Табл. 1). Проби були відібрані з горизонтів циліндричних кернів з інтервалом 5 см, поміщені в стерильні, герметично упаковані пластикові пробірки та зберігалися при температурі 0 °С.

Для мікробіологічного дослідження зразок осаду стерильно зважували, суспендували в 0,2% розчині NaCl за допомогою vortex mixer, розводили до співвідношення 1:10 (w/w) і використовували для приготування розведень для подальшого посіву.



Таблиця 1

Координати та глибини станцій відбору проб

Table 1

Coordinates and depths of the sampling stations

Станція	Глибина (метр)	Координати	
		Широта	Довгота
233	1537	41°32.670'N	37°37.460'E
242	1499	41°31.162'N	37°37.337'E
258	888	44°37.243'N	35°42.286'E
269	2080	44°17.329'N	35°00.081'E

Для виявлення факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій (ФАСБ) підготовлену як описано вище суспензію донного осаду в 0,2% розчині NaCl прогрівали 10 хв за температури 90 °С, висівали на МПА, культивували за 25 °С впродовж двох діб. Кількість повторів при усіх посівах була не меншою за п'ять.

Бактерії із найбільш типових колоній, що виростили на середовищі МПА із пастеризованих суспензій, відсівали на МПА та отримували чисті культури. У результаті досліджень було отримано 202 ізоляти, які утворювали ендоспори і були грампозитивними. Очищені культури зберігали у пробірках на скошеному агарі за температури +5 °С.

Ідентифікацію виділених штамів проводили шляхом визначення спектру жирних кислот на газовому хроматографі «BioRad», за стандартною методикою [Raineu, Oren, 2011] з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США), колонка капілярна 25м×0,2мм×0,33мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носії водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв. Перед визначенням ЖК-спектру досліджувані бактерії двічі пересівали на щільному живильному середовищі TSA (TrypticSoyAgar) та вирощували впродовж 24 год при 28 °С. Послідовно проводили: омилення ліпідів клітинної стінки бактерій після додавання метанольного розчину NaOH, метилювання вивільнених солей жирних кислот в присутності кислого розчину метанолу, екстракцію органічним розчинником методом рідинно-рідинної екстракції та нейтралізацію проби з додаванням 0,1 М розчину NaOH. Отримані метилові ефіри аналізували на хроматографі фірми «BioRad».

Інтерпретацію даних системи MIDI Sherlock виконували за значенням найвищого індексу подібності (sim-індекс) з запропонованих системою для кожного штаму, за виключенням випадків, коли він був низьким (<0.500). У такому випадку штаму вважався за такий, вид якого не визначено.

Результати та їх обговорення

У процесі досліджень із різних горизонтів глибоководних відкладень сірководневої зони Чорного моря було виділено 202 ізоляти, які за морфологічними і фізіолого-біохімічними ознаками віднесені до широкої групи фа-



культативно-анаеробних спороутворювальних бактерій.

Ідентифікацію виділених ізолятів проводили шляхом визначення спектру жирних кислот на газовому хроматографі Agilent 7890 «BioRad» з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDISherlock.

Із станції 233, що знаходиться в південно-східній частині Чорного моря біля берегів Туреччини, досліджено проби з кернів, взятих з глибини 1537 м та отримано 59 ізолятів бактерій (31 – із горизонту 0–5 см, 15 – із горизонту 5–10 см, 2 – із 10–15 см, 6 – із 15–20 см, 2 – із 20–25 см, 2 – із 25–30 см та 1 – із 30–35 см).

В таблиці 2 наведено результати хемотаксономічної ідентифікації ізольованих бактерій за спектром жирних кислот. На всіх досліджених горизонтах виявлено представників 11 видів ФАСБ: *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Brevibacillus reuszeri*, *Bacillus viscosus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* GC subgroup B, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus luciferensis*, 9 ізолятів за використаною методикою не були ідентифіковані, оскільки індекси подібності їх жирнокислотних спектрів були нижчими 0.500, а у деяких випадках і близько 0.200.

Таблиця 2

Видова різноманітність ФАСБ ґрунту Чорного моря на станції 233

Table 2

Species diversity of the FASB in the bottom sediments of Black sea on station 233

Горизонт	Кількість штамів	Індекс подібності	Вид (кількість штамів)
0-5	31	від 0.500 до 0.933	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (6 шт) <i>Brevibacillus reuszeri</i> (6 шт) <i>Bacillus viscosus</i> (5 шт) <i>Bacillus licheniformis</i> (2 шт) <i>Bacillus subtilis</i> (1 шт) <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B (1 шт) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1 шт) <i>Bacillus luciferensis</i> (1 шт) Не визначено (6)
5-10	15	від 0.500 до 0.925	<i>Bacillus subtilis</i> (6 шт) <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (3 шт) <i>Bacillus viscosus</i> (2 шт) <i>Brevibacillus reuszeri</i> (2 шт) <i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A (1 шт) <i>Bacillus atrophaeus</i> (1 шт)
10-15	2	0.623	<i>Bacillus atrophaeus</i> (1 шт) Не визначено (1 шт)
15-20	6	від 0.500 до 0.837	<i>Bacillus licheniformis</i> (3 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A (1 шт) <i>Brevibacillus reuszeri</i> (1 шт) Не визначено (1 шт)
20-25	2	0.778 0.547	<i>Bacillus atrophaeus</i> (1 шт) <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (1 шт)
25-30	2	0.637	<i>Bacillus licheniformis</i> (1 шт) Не визначено (1 шт)
30-35	1	0.554	<i>Bacillus licheniformis</i> (1 шт)



Станція 242 розташована неподалік від 233 і представлена в нашій роботі 87 ізолятами ФАСБ. З них 65 виділено з горизонту 0–5 см, 2 – із горизонту 5–10 см, 4 – із горизонту 10–15 см, 3 – із горизонту 15–20 см та 13 із горизонту 25–30 см. Результати ідентифікації ізолятів наведено у таблиці 3. Серед ізолятів виявлено представників 13 видів: *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus agaradhaesren*, *Bacillus pumilus* GC subgroup A, *Bacillus subtilis*, *Brevibacillus reuszeri*, *Bacillus viscosus*, *Bacillus pumilus* GC subgroup B, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus oleronius*, *Bacillus atrophaeus*, *Paenibacillus macerans*, *Bacillus cereus* GC subgroup A.

Таблиця 3

Видова різноманітність ФАСБ ґрунту Чорного моря на станції 242

Table 3

Species diversity of the FASB in the bottom sediments of Black sea on station 242

Горизонт	Кількість штамів	Індекс подібності	Вид (кількість штамів)
0-5	65	від 0.500 до 0.949	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (11 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A (9 шт) <i>Bacillus subtilis</i> (9 шт) <i>Brevibacillus reuszeri</i> (8 шт) <i>Bacillus viscosus</i> (6 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B (4 шт) <i>Bacillus licheniformis</i> (3 шт) <i>Bacillus luciferensis</i> (2 шт) <i>Bacillus oleronius</i> (1 шт) <i>Bacillus atrophaeus</i> (1 шт) <i>Paenibacillus macerans</i> (1 шт) Не визначено (10 шт)
5-10	2	0.834	<i>Bacillus subtilis</i> (1 шт) Не визначено (1 шт)
10-15	4	від 0.500 до 0.871	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (1 шт) <i>Bacillus subtilis</i> (1 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A (1 шт) Не визначено (1 шт)
15-20	3	від 0.537 до 0.778	<i>Bacillus subtilis</i> (2 шт) <i>Bacillus licheniformis</i> (1 шт)
20-25	13	від 0.539 до 0.922	<i>Bacillus licheniformis</i> (5 шт) <i>Bacillus subtilis</i> (2 шт) <i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A (2 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B (2 шт) <i>Bacillus sp.</i> GC group 22 (1 шт) <i>Bacillus agaradhaesren</i> (1 шт)

Кількість не ідентифікованих ізолятів у поверхневому найбільш вивченому горизонті сягала 19% (10 штамів з 65), а для відповідного горизонту станції 233 цей показник дорівнював 15% (6 штамів з 31). З 5 ізолятів-лідерів за таксономічною представленістю в зібраній колекції на горизонті 0–5 станції 242 – чотири були схожі – це *Bacillus megaterium* GC subgroup A (11



шт), *Bacillus subtilis* (9 шт), *Brevibacillus reuszeri* (8 шт), та *Bacillus viscosus* (6 шт). *Bacillus pumilus* GC subgroup A (9 шт), який на станції 233 представлений лише одним штамом, на станції 242 виділений з проб трьох горизонтів (0–5, 10–15 та 25–30 см). На даній станції виявлено рідкі для цієї колекції штами видів *Bacillus agaradhaerens* та *Bacillus oleronius*, 12 ізолятів з 87 не були ідентифіковані.

Аналогічні тенденції виявляють ізоляти з проб станцій 258 та 269, що розташовані біля узбережжя Кримського півострову. Станція 258 (неподалік від південного узбережжя Криму) з глибиною 2080 м представлена в колекції 42 штамами та 12 видами (табл. 4): *Bacillus megaterium* GC subgroup A (8 шт), *Bacillus subtilis* (6 шт), *Bacillus megaterium* GC subgroup B (5 шт, які виділені з проб горизонту 0–5 см), *Bacillus viscosus* (4 шт) та *Bacillus sp.* GC group 22 (3 шт), *Bacillus licheniformis* (2 шт), *Bacillus pumilus* GC subgroup A (1 шт), *Bacillus pumilus* GC subgroup B (1 шт), *Bacillus cereus* GC subgroup A (1 шт), *Bacillus cereus* GC subgroup B (1 шт), *Paenibacillus larvae pulvifaciens* (1 шт), *Brevibacillus choshinensis* (1 шт).

Таблиця 4

Видова різноманітність ФАСБ ґрунту Чорного моря на станції 258

Table 4

Species diversity of the FASB in the bottom sediments of Black sea on station 258

Горизонт	Кількість штамів	Індекс подібності	Вид (кількість штамів)
0-5	23	від 0.500 до 0.830	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (6 шт) <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup B (5 шт) <i>Brevibacillus reuszeri</i> (2 шт) <i>Bacillus subtilis</i> (2 шт) <i>Bacillus sp.</i> GC group 22 (1 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A (1 шт) <i>Bacillus cereus</i> GC subgroup B (1 шт) <i>Bacillus cereus</i> GC subgroup A (1 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup B (1 шт) <i>Bacillus viscosus</i> (was <i>Arthrobacter</i>) (1 шт) Не визначено (2 шт)
5-10	7	від 0.500 до 0.776	<i>Bacillus subtilis</i> (2 шт) <i>Bacillus viscosus</i> (2 шт) <i>Paenibacillus larvae pulvifaciens</i> (1 шт) Не визначено (2 шт)
10-15	3	від 0.606 до 0.819	<i>Bacillus subtilis</i> (2 шт) <i>Bacillus atrophaeus</i> (1 шт)
15-20	3	0.864 0.726	<i>Bacillus licheniformis</i> (1 шт) <i>Brevibacillus choshinensis</i> (1 шт) Не визначено (1 шт)
20-25	1	0.561	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (1 шт)
25-30	1	0.647	<i>Bacillus licheniformis</i> (1 шт)
30-35	4	від 0.622 до 0.749	<i>Bacillus sp.</i> GC group 22 (2 шт) <i>Bacillus viscosus</i> (1 шт) <i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (1 шт)



З проб розташованої біля Керченської протоки станції 269 виділено 14 штамів ФАСБ (табл.5), серед яких виявлено зокрема *Bacillus megaterium* GC subgroup A (7 шт), *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* GC subgroup A (1 шт), *Bacillus subtilis* (1 шт), *Brevibacillus parabrevis* (1 шт), *Bacillus amyloliquefaciens* (1 шт), *Bacillus viscosus* (1 шт) та *Lysinibacillus sphaericus* GC subgroup B (1 шт).

Таблиця 5

Видова різноманітність ФАСБ ґрунту Чорного моря на станції 269

Table 5

**Species diversity of the FASB in the bottom sediments of Black sea
on station 269**

Горизонт	Кількість штамів	Індекс подібності	Вид (кількість штамів)
0-5	6	від 0.500 до 0.846	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (4 шт) <i>Lysinibacillus sphaericus</i> GC subgroup B (1 шт) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (1 шт)
5-10	1	0.745	<i>Bacillus viscosus</i> (1 шт)
45-50	7	від 0.500 до 0.891	<i>Bacillus megaterium</i> GC subgroup A (3шт) <i>Bacillus licheniformis</i> (1 шт) <i>Bacillus pumilus</i> GC subgroup A (1 шт) <i>Bacillus subtilis</i> (1 шт) <i>Brevibacillus parabrevis</i> (1 шт)

Проведений аналіз показав, що більшість ізольованих представників (177) ФАСБ, виділених з глибоководних донних відкладень Чорного моря, належать до відомих видів (*Bacillus cereus* GC subgroup A, *Bacillus cereus* GC subgroup B, *Bacillus megaterium* GC subgroup A, *Bacillus megaterium* GC subgroup B, *Bacillus pumilus* GC subgroup A, *Bacillus pumilus* GC subgroup B, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus luciferensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.* GC group 22, *Bacillus oleronius*, *Bacillus viscosus*, *Brevibacillus parabrevis*, *Brevibacillus reuszeri*, *Brevibacillus choshinensis*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus larvae pulvifaciens*, *Lysinibacillus sphaericus* GC subgroup B), що мешкають у ґрунті чи мають космополітичне поширення. Отримані результати потребують подальшого підтвердження та уточнення молекулярно-біологічними методами. Значна частина ізолятів (25) не була ідентифікована за спектром жирних кислот з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock. Ці ізоляти представляють особливий інтерес для подальшого дослідження та ідентифікації молекулярно-біологічними методами шляхом порівняння послідовностей нуклеотидів ДНК, оскільки серед них цілком можуть бути представники ще невідомих для науки видів ФАСБ.

Цілком природно постає питання про мікробіологічну чистоту дослідження. Чи не могли виявлені мікроорганізми бути занесені в проби при відборі кернів, зразків та їх транспортуванні? В цілому виключити таке неможливо,



хоча під час досліджень були дотримані усі необхідні заходи, що мінімізують можливі ризики, які піддаються контролю. Проби зберігалися при температурі близькій до 0 °С, яка є несприятливою для росту ФАСБ, навіть якщо вони і попали в зразки під час відбору чи транспортування. Те, що вони виявлялися в значній кількості (від десятків до мільйонів спор на грам відкладень), може слугувати непрямим підтвердженням чистоти мікробіологічного дослідження і об'єктивності отриманих результатів.

Цікавим є питання про автохтонне чи алохтонне походження виявлених ФАСБ у глибоководних донних відкладеннях Чорного моря, що знаходяться у зоні насиченій сірководнем і метаном. Представники цієї групи прокариот мають широкий спектр енергетичних шляхів, що дає їм можливість достатньо ефективно здійснювати метаболізм, і за відсутності кисню можуть дихати використовуючи інші акцептори електронів. Але основним способом отримання енергії у них є дихання з використанням кисню. Попри те, що ФАСБ здатні до анаеробного дихання за відсутності кисню наявність високих концентрацій сірководню та метану у воді та донних відкладеннях не дають нам підстав вважати, що такі стаціонарні суворі анаеробні умови можуть бути сприятливими для нормального функціонування представників видів бактерій, що традиційно мешкають і виявляються в великій кількості в природних для них біотопах в ґрунті на суходолі.

Цілком ймовірно, що притаманні для суші бактерії змиваються в море річковими, талими і стічними водами та переносяться в морі на великі відстані [1, 3]. В верхніх шарах Чорного моря за присутності кисню вони цілком можуть брати участь у процесах утилізації відмерлих органічних решток. Бактерії повільно осідають разом з детритом, формуючи так званий "морський сніг", із верхніх шарів води на дно, де накопичуються і природно консервуються завдяки наявності ендоспор, які довгий час зберігають здатність проростати за появи сприятливих умов. Вивчення характеру алохтонної мікробіоти донних відкладень, її просторового розподілу та часової динаміки може дати цікаві дані щодо кліматичних та біоценотичних змін у водоймах у хронологічному вимірі часу, за умови наявності точних даних щодо швидкості седиментації. Як визначили L. Smith і E. Cato [7] швидкість накопичення таких донних осадів в Чорному морі може оцінюватися в 0,5 мм за рік. То ж, бактерії, що ізольовані нами із осадів могли зберігатися природно законсервованими, не розмножувалися і таким чином зберегли свій генетичний апарат без змін впродовж тисяч років. У зв'язку з цим такі мікроорганізми особливо цікаві як матеріал для наукових досліджень, так і цінні як невичерпне джерело для пошуку продуцентів і біотехнологічних розробок.

Таким чином, в донних відкладеннях на горизонтах до 50 см анаеробної сірководневої батіалі Чорного моря на глибинах 888–2080 м вперше виявлено факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії, визначено їх таксономічну різноманітність та зроблено припущення про їх алохтонне походження.

Вдячність: *Автори висловлюють вдячність Ю. П. Зайцеву та Б. Г. Александрову за передачу проб кернів ґрунту з Чорного моря, які були відібрані під час експедиції М84/2 Бременського університету на судні Meteor.*



V. O. Ivanytsia, M. D. Shtenikov, A. M. Ostapchuk

Odessa National University after I. I. Mechnikov

Dvorianska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: v_ivanit@ukr.net

FACULTATIVELY-ANAEROBIC ENDOSPOREFORMING BACTERIA OF DEEP WATER BOTTOM SEDIMENTS OF BLACK SEA

Summary

Aim of the work was to detect in deep-sea sediments of the hydrogen sulfide bathyal zone of the Black Sea the facultative-anaerobic spore-forming bacteria (FASB) capable of grow under aerobic conditions, and to determine their taxonomic diversity. **Methods.** For the work were used samples of bottom sediments from different horizons (0-50 cm) from the depth of 888-2080 m of the Black Sea, collected during the expedition of the M84/2 of the University of Bremen to the Meteor ship. Identification of isolated strains was carried out by determining the spectra of fatty acids on a BioRad gas chromatograph using an automatic microorganism identification system MIDI Sherlock based on a gas chromatograph with Agilent 7890 flame ionization detector (Agilent Technologies, USA). **Results.** In the course of research in deep-sea sediments of the hydrogen sulfide bathyal zone of the Black Sea on horizons up to 50 cm were found facultative anaerobic bacteria, capable of grow under aerobic conditions. Were obtained 202 isolates of endosporeforming gram-positive bacteria. According to the spectra of fatty acids using the automatic identification system for microorganisms, MIDI Sherlock found that the resulting isolates belong to 18 Species of 4 genera (FAEB): *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*. About 20 unidentified isolates require additional research and can refer to new bacteria that are not known for science yet. **Conclusions.** For the first time in the bottom sediments on the horizons up to 50 cm of anaerobic hydrogen sulfide and methane bathyal zone of the Black Sea at depths 888-2080 m, were identified the facultative anaerobic spore-forming bacteria, their taxonomic diversity was determined, and were made assumptions about their alochtonous origin.

Key words: Black sea, bottom sediments, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, fatty acids content.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зайцев Ю. П., Поликарпов Г. Г., Егоров В. Н., Александров Б. Г., Гаркуша О. П., Копытина Н. И., Курилов А. В., Нестерова Д. А., Нидзвецкая Л.М., Никонова С. Е., Поликарпов И. Г., Поповичев В. Н., Руснак Е. М., Стокозов Н. А., Теплинская Н. Г., Теренько Л. М. Средоточие останков оксибионтов и банк живых спор высших грибов и диатомовых в донных отложениях сероводородной батииали Черного моря. // Доповіді НАН України. – 2007. – N 7. – С. 159–164.
2. Ammini P., Kiran K., Jiya J., Neetha J., Santha N. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. // Braz. J. Microbiol. – 2009. – 40, №2. – P. 269–275.



3. Bonde G. J. Studies on the dispersion and disappearance phenomena of enteric bacteria in the marine environment. // Rev. Int. Oceanogr. Med. – 1968. – 9. – P. 17–44.

4. Dolman C. E., Ixda H. Type E botulism: its epidemiology, prevention and specific treatment. // Can. J. Public Health. – 1963. – 54, № 7. – P. 293–308.

5. Johannsen A. *Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters. // J. Appl. Bacteriol. – 1963. – 26, № 1. – P. 43–47.

6. Logan N.A., De Vos P. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Ed Whitman WB. John Wiley & Sons, Inc, 2015 Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00530/abstract>

7. Smith L.D.S., Cato E. *Clostridium durum*, sp. nov., the predominant organism in a sediment core from the Black Sea. // Canadian Journal of Microbiology. – 1974. – 20, № 10. – P. 1393–1397.

References

1. Zaitsev Yu.P., Polikarpov G.G., Egorov V.N., Aleksandrov B.G., Garkusha O.P., Kopytina N.I., Kurilov A.V., Nesterova D.A., Nidzvetskaya L.M., Nikonova S.E., Polikarpov I.G., Popovichev V.N., Rusnak E.M., Stokozov N.A., Teplinskaya N.G., Teren'ko L.M. Sredotochie ostankov oksibiontov i bank zhivykh spor vysshikh gribov i diatomovykh v donnykh otlozheniyakh serovodorodnoi batiali Chernogo morya. // Dopovidi NAN Ukrainy. – 2007. – N 7. – C. 159–164.

2. Ammini P., Kiran K., Jiya J., Neetha J., Santha N. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. // Braz. J. Microbiol. – 2009. – 40, №2. – P. 269–275.

3. Bonde G. J. Studies on the dispersion and disappearance phenomena of enteric bacteria in the marine environment. // Rev. Int. Oceanogr. Med. – 1968. – 9. – P. 17–44.

4. Dolman C. E., IIDA H. Type E botulism: its epidemiology, prevention and speciiic treatment. // Can. J. Public Health. – 1963. – 54, № 7. – P. 293–308.

5. Johannsen A. *Clostridium botulinum* in Sweden and the adjacent waters. // J. Appl. Bacteriol. – 1963. – 26, № 1. – P. 43–47.

6. Logan N.A., De Vos P. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria Ed Whitman WB. John Wiley & Sons, Inc, 2015 Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118960608.gbm00530/abstract>

7. Smith L.D.S., Cato E. *Clostridium durum*, sp. nov., the predominant organism in a sediment core from the Black Sea. // Canadian Journal of Microbiology. – 1974. – 20, № 10. – P. 1393–1397.

Стаття надійшла до редакції 12.12.2017 р.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

Науковий журнал “Мікробіологія і біотехнологія” запрошує Вас до співпраці з питань висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології і біотехнології.

Програмні цілі видання: висвітлення результатів наукових досліджень у галузі мікробіології та біотехнології, об'єктами яких є прокаріотні (бактерії, архебактерії), еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми та віруси.

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, діагностикуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

Мова (мови) видання: українська, російська, англійська.

Рубрики журналу: “Оглядові та теоретичні статті”, “Експериментальні праці”, “Дискусії”, “Короткі повідомлення”, “Хроніка наукового життя”, “Сторінки історії”, “Ювілеї і дати”, “Рецензії”, “Книжкова полиця”.

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють автори.

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-5/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання мети статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом не більше 15 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);



- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200- 250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

- назва статті великими літерами;
- прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200 - 250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; список використаної літератури мовою оригіналу цитованої статті, список використаної літератури (Referens) англійською мовою (за вимоги міжнародних наукометричних баз).

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (українською/російською) та англійською мовою.

Враховуючи, що реферат відображає основний зміст статті і використовується в інформаційних, в тому числі автоматизованих системах для пошуку документів та інформації, необхідно дотримуватися певних вимог при його написанні:

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англійськомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
- компактним (200-250 слів);
- ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

У кінці тексту статті указати прізвища, імена та по-батькові усіх авторів, поштову адресу, телефон, факс, e-mail (для кореспонденції).

Стаття має бути підписана автором (усіма авторами) з зазначенням дати на останній сторінці.



Автори несуть повну відповідальність за бездоганне мовне оформлення тексту, особливо за правильну наукову термінологію (її слід звіряти з фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то аббревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

Посилання на літературу подаються у тексті статті, цифрами у квадратних дужках, згідно з порядковим номером у списку літератури.

Розділ “Матеріали і методи”:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) - Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммольх/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі Word, TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті.

Підписи, а також пояснення, примітки до таблиць та рисунків подаються мовою оригіналу та англійською мовою.

Розділ “Результати досліджень та їх обговорення” має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.



Список використаної літератури

1. Список використаної літератури в оригіналі цитованої статті складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця). Якщо перший автор у декількох працях один і той самий, то праці розміщуються у хронологічному порядку. Список посилань треба пронумерувати, а у тексті посилатися на відповідний номер джерела літератури (у квадратних дужках).

У посиланні пишуть прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел.

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

2. Список використаної літератури англійською мовою (Referens), за вимогами міжнародних наукометричних баз.

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

Прізвища, імена та по-батькові авторів, назву цитованого видання (журнал, монографія, збірник тощо) наводять послуговуючись безкоштовними сайтами (<http://www.easybib.com/>, <http://www.bibme.org/>, <http://www.sourceaid.com/>, <https://www.citethisforme.com/>), що дозволяють здійснити переклад з використанням однієї з міжнародних систем транслітерації.

Назви статей наводять англійською мовою.

Порядок подання посилань Referens (список 2) має повністю співпадати зі списком використаної літератури (список 1).

Зразки посилання літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англомовні джерела)

На книги

Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.

Патика В.П., Тихонович І.А. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.; Т. 2. – 470 с.; – Т. 3. – 263 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

Rogers H., Perkins H., Ward I. Microbial cell walls and membranes. – London; New York: Fcfd. Press, 1980. – 364 p.

На журнальні статті

Подгорский В.С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *Мікробіол. журн.* – 1998. – 60, № 5. – С. 27-42.

Андреюк Е.И., Козлова И.А., Рожанская А.М. Микробиологическая коррозия строительных материалов // *Биоповреждения в строительстве*. – М.: Стройиздат, 1984. – С. 209 – 221.



Глоба Л.І., Подорван Н.І. Біотехнологія очищення забрудненої природної води // Вісник ОНУ. – 2001. – т. 6, в. 4. – С. 65 – 67.

Eaton R.W., Ribbons D.V. Utilization of phtalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. – 1982. – 132, № 2. – P. 185 – 188.

На тези доповідей

Мацелюх Б.П. Розробка біотехнології одержання ландоміцину Е // Міжнародна наук. конф. „Мікробні біотехнології” (Одеса, вересень, 2006 р.): тез. доп. – О.: „Астропринт”, 2006. – С. 17.

На депоновані наукові роботи

1. Лопатина Н.В., Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У. Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. “Микробиол. журн.” – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-В92.

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амилолитической активности. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 17 с.

На автореферати дисертацій

Онищенко О.М. Таксономія і антибіотична активність *Alteromonas*-подібних бактерій Чорного моря: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2003. – 21 с.

Зразки посилань літератури в романській абетці

References

Стиль шрифту для англомовного варіанту списку джерел – NLM (National Library of Medicine), зразок:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53.

Статті в журналах:

DeLong EF, Karl DM. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 2015;(437):336–342.

Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

Best RJ. Tomato spotted wilt virus. In: Advances Virus Res Eds Smith KM, Lauffer MA. Academic Press, New York, 1968:65–146.

Speissel B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O. TNM atlas: illustrated guide to the TNM. pTNM classification of malignant tumours. Berlin New York: Springer-Verlag. 1989. 12.

Sastry SK. Seed-borne plant virus diseases. India: Springer, 2013. 327 p.

Матеріали з'їздів, конференцій:

Dikova B, Djourmanski A, Lambev H. Establishment of economically important viruses on *Echinacea purpurea* and their influence on the yield. In: Proceedings of the conference «Innovative aspects to coneflower study». Ed. Pospelov S. Poltava: Dyvosvit, 2013:36–45.



Yin R, Francis F, Bragard C, Liu Y, Chen J. Study on transmission efficiency of CMV transmitted by *Myzus persicae* from different places. In: Proceedings of 9th International Symposium on Aphids, Beijing, China. 2013:49–50.

Диссертационные работы:

Koreneva AA. Biological properties of medicinal plants viruses. PhD thesis, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2009: 22.

Сборники:

Dunich A, Mishchenko L. Heavy metals content in virus infected purple coneflower plants. Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol. 2013; 65(3):22–26.

Rose PI. Gelatin. In: Encyclopedia of polymer science and engineering Eds: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI New York: Wiley; 1987;7, 2nd ed. 488–513.

Shrago MI, Guchok MM, Kalugin YuV. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants. In: Current Problems of Cryobiology. Eds. Pushkar NS and Belous AM. Kiev: Naukova Dumka, 1981:157–201.

Патенти, заявки:

A.s. 4411066/14 SSSR, MBI G 01 N 33/50. A method of determining bile acids in biological fluids. Veselskiy SP, Lyashchenko PS, Лукьяненко IA. (SSSR). – N 1624322; zayavl. 25.01.1988; opubl. 30.01.1991, Byul. N 4.

Статті з електронних журналів:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53, available at: www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/

За наявності в статті DOI (Digital Object Identifier), яка є міжнародним ISO стандартом (<http://www.doi.org/>), в списку літератури бажано вказати її ідентифікатор, наприклад:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53. Cited 2 times. doi: 10.1134/S1023193508080077

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов перший варіант тексту статті.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

У разі затримки редакція, додержуючись графіка, залишає за собою право здати коректуру до друкарні (у виробництво) без авторських правок.

Підпис автора у кінці статті означає, що автор передає права на видання своєї статті редакції. Автор гарантує, що стаття оригінальна; ні стаття, ні ризунки до неї не були опубліковані в інших виданнях.



Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів,
що надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія»,
можливі лише за умови посилання на джерело інформації
та з дозволу редакційної колегії.
Усі права захищені згідно законодавства України.

Верстка С. О. Остапенко
Підписано до друку 21.12.2017 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 8,78. Тираж 100 пр.
Зам. № 1706

Видавець та виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38 (048) 723 28 39