

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Засновано у липні 2006 року

Виходить 4 рази на рік

№ 2(22)
2013

Одеса
2013

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р.А. Волков (Чернівці, Україна), Ю.Л. Волянський (Харків, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П.І. Гвоздяк (Київ, Україна), С.П. Гудзь (Львів, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Ю.П. Зайцев (Одеса, Україна), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), О.А. Кіпріанова (Київ, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), І.П. Метеліцина (Чикаго, США), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немялтовський (Варшава, Польща), В.П. Патика (Київ, Україна), Петров С.А. (Одеса, Україна), В.С. Підгорський (Київ, Україна), В.К. Позур (Київ, Україна), В.П. Поліщук (Київ, Україна), А.А. Сибірний (Львів, Україна), Ю.М. Сиволап (Одеса, Україна), М.Я. Співак (Київ, Україна), І.А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф.І. Товкач (Київ, Україна), В.М. Тоцький (Одеса, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна)

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

Свідоцтво: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

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

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2013

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

V.O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B.M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland), P.I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), S.P. Gudz (Lviv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G.O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L.V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), O.A. Kiprianova (Kyiv, Ukraine), N.K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I.K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B.P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I.P. Metelitsyna (Chicago, USA), G.G. Minicheva (Odesa, Ukraine), M. Niemialtowsky (Warsaw, Poland), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S.A. (Odesa, Ukraine), V.S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), V.P. Polishuk (Kyiv, Ukraine), V.K. Pozur (Kyiv, Ukraine), M.Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A.A. Sybirny (Lviv, Ukraine), Yu.M. Sivolap (Odesa, Ukraine), I.A. Tykhonovych (S.-Peterburg, Russia), V.M. Totsky (Odesa, Ukraine), F.I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L.D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A.I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R.A. Volkov (Chernivtsi, Ukraine), Yu.L. Volyanskiy (Kharkiv, Ukraine), Yu.P. Zaytsev (Odesa, Ukraine)

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.

Registration certificate: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

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).**

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov
University, 2013

З М І С Т

Е К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н І П Р А Ц І

Н.В. Коротаєва, Т.В. Кондратюк, О.В. Басюл, К.Д. Крилова, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця, Н.В. Ліманська ВПЛИВ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ОНУ 87 У СУМІШІ З АВТОЛІЗАТОМ ЕРВІНІЙ НА УТВОРЕННЯ ПУХЛИН, СПРИЧИНЕНЕ <i>RHIZOBIUM RADIOBACTER</i> С58	6
Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПЕПТИДАЗИ 2 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> ІМВ В-7324	15
А.Ю. Фесенко, В.К. Позур, <u>В.І. Бондаренко</u> СТАН ВАКЦИНОПРОФІЛАКТИКИ ПРОТИ ПОЛІОМІЄЛІТУ В УКРАЇНІ.....	25
Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, А.С. Семенець, Т.О. Філіпова УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ І СИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>AERUGINOSA</i> АТСС 15692 ЗА ПРИСУТНОСТІ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ ТА ЙОГО СИНТЕТИЧНИХ АНАЛОГІВ	32
І.О. Скороход, А.О. Рой, О.І. Мелентьев, І.К. Курдиш ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ФОСФАТ- МІНЕРАЛІЗУЮЧИХ ШТАМІВ РОДУ <i>BACILLUS</i> НА НАСІННЯ РОСЛИН, ЯКЕ ЗАЗНАЛО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ	41
Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, М.М. Панченко, В.О. Іваниця МАТЕМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ШТАМУ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>PLANTARUM</i> ОНУ87	52
К.В. Шоляк, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ, СТІЙКІ ДО ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМУ .	66
І.М. Курченко, А.К. Павличенко, О.М. Юр'єва РОСТОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕНДОФІТНИХ ТА ФІТОПАТОГЕННИХ ШТАМІВ <i>ALTERNARIA ALTERNATA</i> І <i>CERATOCYSTIS</i> SP.	77
О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, Т.М. Полішко, А.І. Вінніков ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНИХ І НЕПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ <i>STARPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS</i>	86
А.І. Чуєнко, М.Я. Вортман, В.В. Шевченко ФУНГІЦИДНА АКТИВНІСТЬ ГУАНІДИНВІСНИХ ОЛІГОМЕРІВ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДО ЗАСТОСУВАННЯ В ГУМОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ	97
VIII ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»	107
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	109

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

- N.V. Korotaeva, T.V. Kondratiuk, O.V. Basiul, K.D. Krylova, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia, N.V. Limanska**
EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU87 IN MIXTURE WITH AUTOLYSATE OF ERWINIAS ON FORMATION OF TUMORS CAUSED BY *RHIZOBIUM RADIOBACTER* C58..... 6
- N.A. Nidialkova, O.V. Matseliukh, L.D. Varbanets**
SUBSTRATE SPECIFICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMV B-7324 PEPTIDASE 2 15
- A.Yu. Fesenko, V.K. Pozur, V.I. Bondarenko**
STATE OF VACCINEPROPHYLAXIS OF POLIOMYELITIS IN UKRAINE..... 25
- Muchlis Abedalabas, M.B. Galkin, A.S. Semenets, T.O. Filipova**
BIOFILM FORMATION AND RHAMNOLIPIDES BIOSYNTHESIS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 IN PRESENCE OF SIGNALING QUINOLONE AND ITS SYNTHETIC ANALOGS 32
- I.O. Skorochood, A.O. Roy, O.I. Melentiev, I.K. Kurdish**
INFLUENCE OF BIOACTIVE SUBSTANCES PHOSPHATE-MINERALIZING STRAINS GENUS *BACILLUS* ON PLANTS SEEDS EFFECTED BY OXIDATIVE STRESS 41
- N.Yu. Vasylieva, N.V. Korotaeva, M.N. Panchenko, V.O. Ivanytsia**
MATHEMATICAL ANALYSIS AND OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR STRAIN *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU87 52
- K.V. Sholiak, T.B. Peretiatko, S.P. Gudz**
SULFATE-REDUCING BACTERIA RESISTANT TO INCREASED LEVELS OF HEXAVALENT CHROMIUM..... 66
- I.N. Kurchenko, A.K. Pavlychenko, E.M. Yurieva**
GROWTH CHARACTERISTICS OF ENDOPHYTIC AND PLANT PATHOGENIC *ALTERNARIA ALTERNATA* AND *CERATOCYSTIS* SP. STRAINS 77
- O.I. Sidashenko, O.S. Voronkova, T.M. Polishko, A.I. Vinnikov**
BIOLOGICAL PROPERTIES OF FILM-FORMATION AND NON-FILM-FORMATION STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* STUDYING..... 86
- A.I. Chuienko, M.Y. Vortman, V.V. Shevchenko**
FUNGICIDAL ACTIVITY OF GUANIDINE-CONTAINING OLIGOMERS, PERSPECTIVE FOR USING IN RUBBER MANUFACTURING 97
- THE VIII SUMMER SCHOOL
“MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” 107
- INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 113

UDC 634.75.632.937

**N.V. Korotaeva, T.V. Kondratiuk, O.V. Basiul, K.D. Krylova,
G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia, N.V. Limanska**

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limanska@gmail.com

**EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU87
IN MIXTURE WITH AUTOLYSATE OF ERWINIAS
ON FORMATION OF TUMORS CAUSED
BY *RHIZOBIUM RADIOBACTER* C58**

The **aim** of the research was to investigate the effect of mixture of *Lactobacillus plantarum* ONU87 and autolysate of *Erwinia carotovora* ZM1 cells containing macromolecular bacteriocins and bacteriophages on the pathogenesis of the crown gall. **Materials and Methods.** As an infectious agent, a strain of *Rhizobium radiobacter* C58 characterized by its high virulence was chosen. As test-models, carrot roots (*Daucuscarota* subsp. *sativus* L.) and plants *Kalanchoe daigremontiana* Mill were used. **Results.** The effect of mixture of *L. plantarum* ONU87 and autolysate of *E. carotovora* ZM1 on survival of *R. radiobacter* C58 *in vitro* has been studied. Amount of viable cells of plant pathogenic bacteria decreased after 4 hours of culturing. Treatment with a mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias results in complete inhibition of crown gall pathogenesis on *Kalanchoe* plants. Treatment of carrot roots with an experimental mixture results in decrease of the amount of infected explants in 14.3%. The mentioned results enabled us to **conclude** that depending on the sensitivity of the test-objects, treatment with the mixture of *L. plantarum* ONU87 and autolysate of *E. carotovora* ZM1 results in complete inhibition of crown gall pathogenesis or decrease of its symptoms.

Key words: *Rhizobium radiobacter*, crown gall, *Lactobacillus plantarum*, autolysate of *Erwinia carotovora*.

Revealing active antagonists, including lactic acid bacteria, in phyllosphere [9], provides a possibility of using them to protect plants against pathogenic microorganisms.

Inhibition of phytopathogens and food spoilage bacteria by lactobacilli were described for *Aspergillus flavus* [13], *Colletotrichum gloeosporioides* [4],

© N.V. Korotaeva, T.V. Kondratiuk, O.V. Basiul, K.D. Krylova, G.V. Yamborko,
V.O. Ivanytsia, N.V. Limanska, 2013



Aspergillus ochraceus [5], *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* [3], *Verticillium*, *Thielaviopsis*, *Fusarium* [6], *Monilinia laxa*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* [10], *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas syringae* [11]. Growth of *X. campestris* and *E. carotovora* was inhibited by representatives of *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* genera [10].

Our previous investigations showed an inhibitory effect of enterococci on *Ralstonia solanacearum* [7].

As to *Lactobacillus plantarum*, the significant antagonistic effect of *L. plantarum* ONU87 in the mixture with *Erwinia carotovora* ZM1 containing bacteriophages and macromolecular bacteriocins were demonstrated against soft rot and blackleg [1].

The aim of the research was to investigate the effect of *Lactobacillus plantarum* ONU87 in the mixture with autolysate of *Erwinia carotovora* ZM1 cells on crown gall pathogenesis.

Materials and methods

In this research, the phytopathogenic strain of *Rhizobium radiobacter* C58 characterized by its high virulence, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 (*Ecc* ZM1) strain – producer of bacteriophages and macromolecular bacteriocins (strains were kindly provided by Tovkach F.I. from Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU), and antagonistic strain *Lactobacillus plantarum* ONU87 were used. To model the infectious process of crown gall, bacteria *R. radiobacter* C58 were cultivated in LB-broth at 28 °C for 24 h and used for further investigations in concentration of 10⁸ CFU/ml. Lactic acid bacteria *L. plantarum* ONU87 were cultivated in MRS broth for 24 h at 37 °C and used for further experiments in concentration of 10¹⁰ CFU/ml. Autolysate of *Erwinia carotovora* ZM1 was prepared as previously described [1]. The experimental mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias was prepared by mixing in ratio of 1:1.

To study the antagonistic effect of mixture of *L. plantarum* ONU87 and autolysate of *E. carotovora* ZM1 on growth of bacteria *R. radiobacter* C58 *in vitro*, the experimental suspension was mixed with the culture of phytopathogen and LB-broth in a ratio of 1:2:2 selected empirically in previous investigations. The control was the mixture of overnight culture of rhizobia and LB-broth in a ratio of 2:3 that simulated the phytopathogen concentration in the variants of experiment. The number of viable cells of rhizobia were measured by inoculating LB agar in certain time intervals, incubating overnight at 28 °C and counting the colonies. Three independent experiments were carried out in five replications each.

The effect of mixture of *Lactobacillus plantarum* ONU87 and autolysate of *Erwinia carotovora* ZM1 on crown gall pathogenesis was studied



in vitro on carrot roots (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.) and *in vivo* on plants *Kalanchoe daigremontiana* Mill.

For test-object treatments, overnight culture of rhizobia in LB-broth and experimental mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias were mixed in ratio of 1:1. Mixture of rhizobial overnight culture with sterile distilled water in ratio of 1:1 was used as positive control. The negative controls were sterile distilled water and the mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias.

Carrot roots were thoroughly washed in chlorine-containing detergent, rinsed in running water, dipped in ethanol and flamed, peeled from the external tissues, and then cut into discs with the thickness of 0.5 cm [8]. The disks were placed in sterile Petri dishes with watered filter paper. On the surface of fresh cut discs (cambial ring) 100 µl of rhizobial culture mixed with lactobacilli and autolysate of erwinias, or the equal volume of positive or negative controls were applied. 56 carrot discs were treated in each control or experimental variant.

Disks were placed at 25 °C for 21 days, and after the results were evaluated by the following scale: “++++” – 100% cambial ring covered with tumors, “+++” – 75% of cambial ring have tumors, “++” – 50% cambial ring covered with tumors, “+” – less than 25% of cambial ring covered with tumors, “-” – no tumors.

The overall amount of infected explants was calculated as percentage of discs with crown gall symptoms from the total quantity of all inoculated discs.

Kalanchoe plants were inoculated by syringe injection of 50 µl of pathogen culture and mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias (experimental variant) or culture of rhizobia and sterile water (positive control) or sterile distilled water, or the mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias (negative controls) into the surface leaf layer. 30 leaves were treated in control and experimental variants in each of the three independent experiments. After 60 days tumors formed on injection sites were cut and weighed.

The experimental data were evaluated statistically using Microsoft Word Excel. The obtained results were expressed as means and their confidential intervals. Probability differences of the results were assessed at significance level of at least 95%.

Results and discussion

The investigation of *L. plantarum* ONU87 and autolysate of *E. carotovora* ZM1 effect on *R. radiobacter* C58 *in vitro* in a liquid medium has shown that the amount of viable cells of pathogenic bacteria decreased already after 4 hours of cultivation (fig. 1).



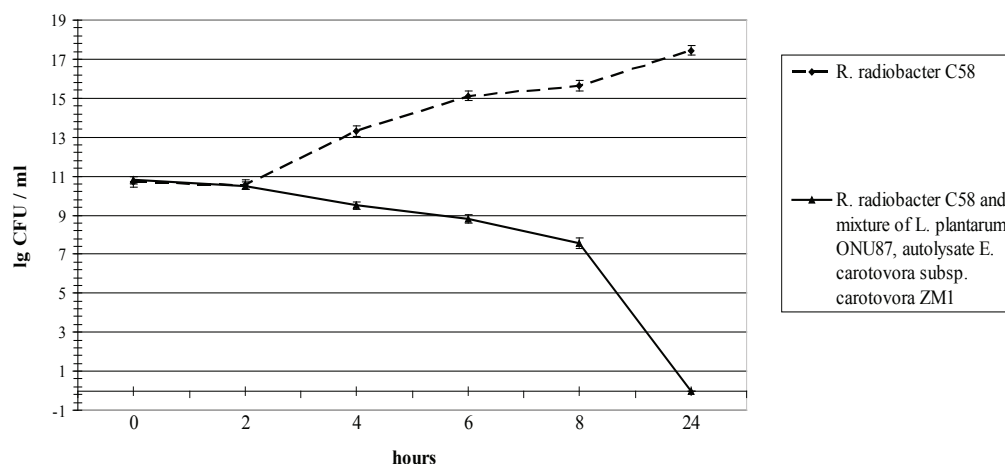


Fig. 1. Growth of phytopathogen *R. radiobacter* C58 in presence of *L. plantarum* ONU87 in mixture with autolysate of *E. carotovora* subsp. *carotovora* ZM1.

Probably, this effect was caused by antagonistic factors against phytopathogenic microorganisms produced by lactic acid bacteria such as hydrogen peroxide, bacteriocins and especially, organic acids [11]. After 24 h of incubation no viable cells of phytopathogens were recovered in contrast to positive control where *R. radiobacter* C58 continued to grow.

Investigations of *L. plantarum* ONU87 and autolysate of *E. carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 effect on crown gall infection *in vivo* has shown the high efficiency of using this mixture.

Thus, comparing of kalanchoe leaves in positive controls inoculated only with crown gall agents with leaves treated with the mixture of pathogens, lactobacilli and autolysate of erwinias has shown that all the leaves of control plants infected with *R. radiobacter* C58 manifested the formation of tumors of various sizes (fig. 2).

The average weight of tumors was 40 ± 2 mg in three independent experiments. On the leaves of plants inoculated simultaneously with the mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias and *R. radiobacter* C58 tumor formation was not observed. However, necroses of different levels were observed (fig. 2). On the leaves of kalanchoe in negative controls in which only lactobacilli and autolysate of erwinias were injected, necroses of tissues induced by defense reaction of the plants to damage the leaf blade and to interfere the introduction of foreign agent were also detected in some cases. Necrosis is a hypersensitivity reaction and an important part of plant immunity, thus presence of necrotic spots instead of tumors is the evidence of plant protection against the crown gall agent. In other case the plants may slowly die because of galls surrounding the trunks and interfering the normal water and nutrients supply [2].



Fig. 2. Leaves of kalanchoe inoculated with the phytopathogen *R. radiobacter* C58 and the mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias (a) or with the culture of *R. radiobacter* C58 (b).

Opposite, necroses are restricted and don't cause damage of wide areas of the plant surfaces, and moreover, they localize the pathogen and don't allow it to disseminate in plant, whereas pathogenic rhizobia are able to rapid spread in xylema vessels causing systemic infection as a result of which tumors can be formed on any part of the plant.

Treatment of carrot discs with the mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias simultaneously with their inoculation with crown gall agent resulted in 14.5% decrease in amount of infected explants. Absence of disease inhibition in 100% of cases as it was shown in investigations with kalanchoe, indicates the higher sensitivity of carrots to *R. radiobacter* C58 and allows to observe the effect of the studied mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias on high susceptible plants (fig. 3).

Thus, in case of carrot explants, clear decrease of infection massiveness is observed, that increases in amount of explants with smaller manifestation of disease symptoms than in positive control (fig. 4). The amount of carrot discs with the crown gall symptom manifestation in «++++» decreases from 8.9% to 1.8%, that is – almost in 5 times, quantity of discs with manifestation in «+++» decreases from 19.6% to 3.6%, that is – in 5.4 times.

In positive control the percentage of explants with tumor formation characterized as «++» was 14.3%, and in experimental samples –10.7%;

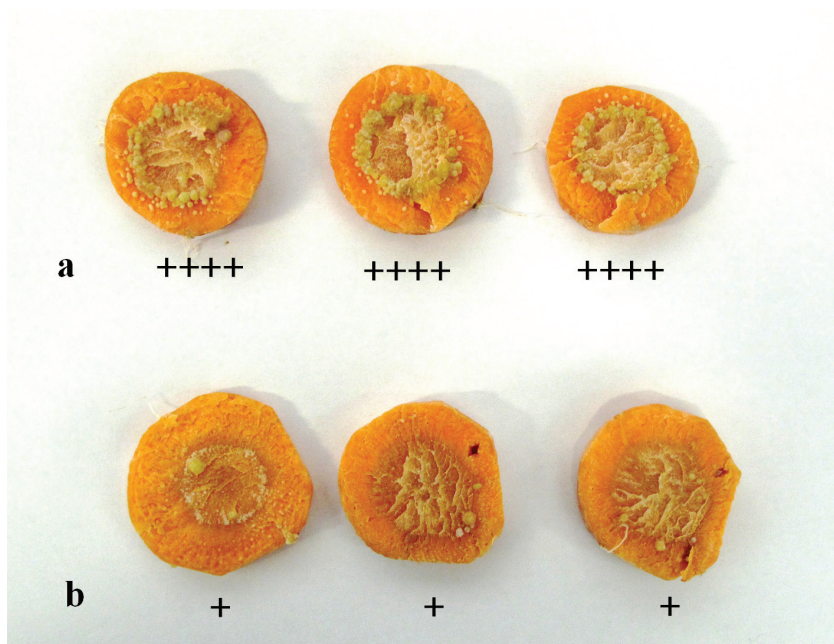


Fig. 3. Carrot discs with manifestation of crown gall symptoms: a – positive control – *R. radiobacter* C58; b – *R. radiobacter* C58 and the mixture of lactobacilli and autolysate of erwinias.

Thus, the shift of the levels of crown gall symptom manifestation to smaller tumor formation, and as a result, to smaller disease massiveness, is observed.

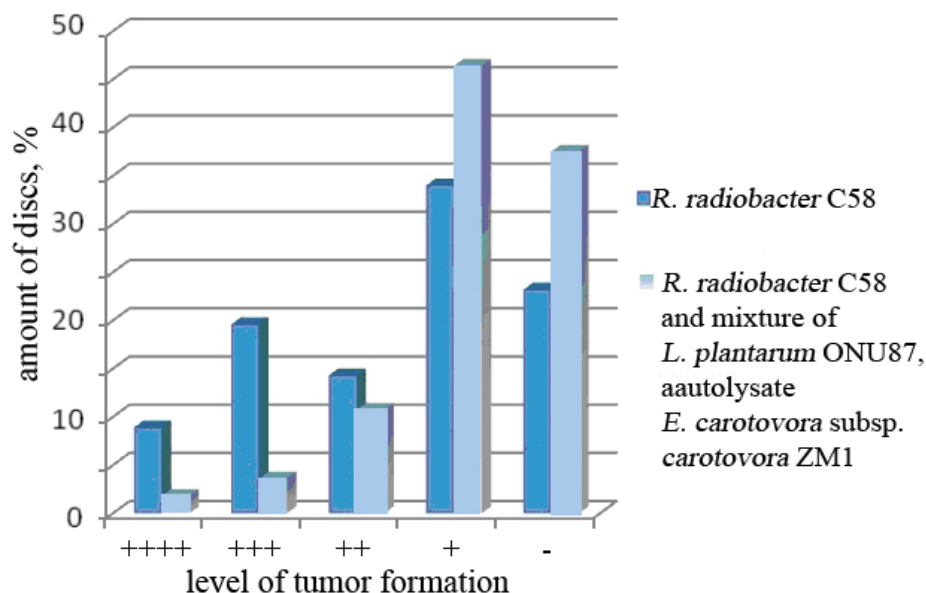


Fig. 4. Amount of carrot discs with different intensity of tumor formation.

the amount of discs with «+» manifestation in positive control was 34%, and in experiment with treatment with lactobacilli and autolysate of erwinias it increased to 46.4%. In negative controls no visible deformations in explant tissues were detected.

The obtained data can lead to the conclusion that depending on plant sensitivity, treatment with lactobacilli and autolysate of erwinias results in complete inhibition of crown gall pathogenesis or in decrease of symptom manifestations.

УДК 634.75.632.937

Н.В. Коротаєва, Т.В. Кондратюк, О.В. Басюл, К.Д. Крилова,
Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця, Н.В. Ліманська

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082,
Україна, e-mail: limanska@gmail.com

ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU 87 У СУМІШІ З АВТОЛІЗАТОМ ЕРВІНІЙ НА УТВОРЕННЯ ПУХЛИН, СПРИЧИНЕНЕ *RHIZOBIUM RADIOBACTER* C58

Реферат

Метою дослідження було вивчення впливу *Lactobacillus plantarum* ONU87 у суміші з автолізатом клітин *Erwinia carotovora* ZM1, що містить бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини, на розвиток інфекції бактеріального раку. **Методи.** Інфекційним агентом був штам *Rhizobium radiobacter* C58, який характеризується високою вірулентністю. Як тест-моделі використовували коренеплоди моркви (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.) і рослини каланхое (*Kalanchoe daigremontiana* Mill.). **Результати.** Вивчено вплив суспензії лактобацил і автолізату ервіній на виживання бактерій штаму *R. radiobacter* C58 *in vitro*. Показано, що кількість життєздатних клітин фітопатогенних бактерій зменшується вже через чотири години. Обробка сумішшю лактобацил і автолізату ервіній призводить до повного пригнічення патогенезу бактеріального раку на рослинах каланхое. На коренеплодах моркви обробка експериментальною сумішшю веде до зменшення кількості уражених експлантів на 14,3%. Зроблено **висновок**, що залежно від сприйнятливості рослини обробка сумішшю лактобацил і автолізату ервіній призводить або до повного пригнічення патогенезу бактеріального раку, або до зменшення проявів його симптомів.

Ключові слова: *Rhizobium radiobacter*, бактеріальний рак рослин, *Lactobacillus plantarum*, автолізат *Erwinia carotovora*.



УДК 634.75.632.937

Н.В. Коротаева, Т.В. Кондратюк, Е.В. Басюл, Е.Д. Крылова,
А.В. Ямборко, В.А. Иваница, Н.В. Лиманская

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2; Одесса,
65082, Украина, e-mail: limanska@gmail.com

ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ОНУ 87 В СМЕСИ С АВТОЛИЗАТОМ ЭРВИНИЙ НА ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, ВЫЗВАННОЕ *RHIZOBIUM RADIOBACTER* С58

Реферат

Целью исследования было изучение влияния *Lactobacillus plantarum* ОНУ 87 в смеси с автолизатом клеток *Erwinia carotovora* ZM1, содержащим бактериофаги и макромолекулярные бактериоцины, на развитие инфекции бактериального рака. **Методы.** Инфекционным агентом был штамм *Rhizobium radiobacter* С58, характеризующийся высокой вирулентностью. В качестве тест-моделей использовали корнеплоды моркови (*Daucus carota* subsp. *sativus* L.) и растения каланхоэ (*Kalanchoe daigremontiana* Mill.). **Результаты.** Изучено влияние суспензии лактобацилл и автолизата эрвиний на выживание бактерий штамма *R. radiobacter* С58 *in vitro*. Показано, что количество жизнеспособных клеток фитопатогенных бактерий уменьшается уже через четыре часа. Обработка смесью лактобацилл и автолизата эрвиний приводит к полному подавлению патогенеза бактериального рака на растениях каланхоэ. На корнеплодах моркови обработка экспериментальной смесью приводит к уменьшению количества пораженных эксплантов на 14,3%. Сделан **вывод** о том, что в зависимости от восприимчивости растения, обработка смесью лактобацилл и автолизата эрвиний ведет к полному подавлению патогенеза бактериального рака или к уменьшению проявления его симптомов.

Ключевые слова: *Rhizobium radiobacter*, бактериальный рак растений, *Lactobacillus plantarum*, автолизат *Erwinia carotovora*.

LITERATURE

1. Сергеева Ж.Ю., Крылова К.Д., Лиманська Н.В., Васильева Н.Ю., Товкач Ф.І., Іваниця В.О. Вплив *Lactobacillus plantarum* ОНУ 87 та автолизату бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі // Мікробіологія і біотехнологія. — 2012. — № 4. — С. 18–29.
2. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53–80.
3. Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids



produced by *Lactobacillus sanfrancisco* // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1998. — Vol. 50. — P. 253–256.

4. El-Mabrok A.S.W., Hassan Z., Mokhtar A.M., Aween M.M. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* C5 cells and their supernatant against *Colletotrichum gloeosporioides* on germination rate of chilli seeds // Res. J. Biol. Sci. — 2012. — Vol. 7. — P. 159–164.

5. El-Taher E.M., El-Ghany A.T.M., Alawlaqi M.M., Ashour M.S. Biosecurity for reducing ochratoxin A productivity and their impact on germination and ultrastructures of germinated wheat grains // J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. — 2012. — Vol. 2. — P. 135–151.

6. Higa T, Wididana G.N. Changes in the soil microflora induced by effective microorganisms // In: Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand. — Oct. 17–21. — 1989. — P. 120–122.

7. Limanska N., Ivanytsia T., Choiset Y., Korotaeva N., Sergeeva Zh., Chobert J.-M., Ivanytsia V., Haertle T. Effect of *Enterococcus durans* bacteriocin on bacterial wilt agent // Microbiology and Biotechnology. — 2012. — Vol. 2. — P. 30–40.

8. Ryder M.H., Tate M.E., Kerr A. Virulence properties of strains of *Agrobacterium* on the apical and basal surfaces of carrot root disks // Plant Physiol. — 1985. — Vol. 77. — P. 215–221.

9. *The Prokaryotes*. Third Ed. A Handbook on the biology of bacteria: firmicutes, cyanobacteria / Ed. By Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. — Vol. 4. — Springer, 2006. — P. 336–338.

10. Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // Intern. Microbiol. — 2008. — Vol. 11. — P. 231–236.

11. Visser R., Holzapfel W.H., Bezuidenhout J.J., Kotze J.M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria // Appl. Environm. Microbiol. — 1986. — Vol. 52. — P. 552–555.

12. Wang H., Yan Y., Wang J., Zhang H., Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* // IMAU10014. PloS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0029452. — 2012.

13. Xu J., Ran L., Yang B., Li Z. Inhibition of *Lactobacillus* species on the germination of *Aspergillus flavus* spore // Wei Sheng Yan Jiu. — 2002. — Vol. 31. — P. 47–49.

Стаття надійшла до редакції 10.05.2013 р.



Н.А. Нідялкова, О.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154,
Київ ДСП, Д03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 23 39,
e-mail: Nidialkova@gmail.com

СУБСТРАТНА СПЕЦИФІЧНІСТЬ ПЕПТИДАЗИ 2 *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324

Мета. Вивчення субстратної специфічності очищеної пептидази 2 *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324. **Методи.** Для вивчення субстратної специфічності пептидази 2 використовували білки: еластин, фібрин, фібриноген, колаген і казеїн. Визначення оптимальних співвідношень ензим-субстрат проводили за допомогою повного двофакторного дослідження. Спорідненість (константу Міхаеліса, K_m) до субстратів пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 визначали за методом подвійних обернених величин в координатах Лайнуївера-Берка ($1/v_0 - 1/[S]$). Для обчислення та графічного представлення результатів повного двофакторного експерименту використовували метод стрімкого сходження (метод Бокса-Уілсона) та комп'ютерну систему аналізу даних STATISTICA 8.0. **Результати.** Дослідження гідролізу нативних білкових субстратів пептидазою 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 показало, що ензим здатний розщеплювати фібрин, фібриноген, казеїн і колаген. Для ефективного гідролізу білків за результатами повного двофакторного дослідження було встановлено оптимальні співвідношення концентрацій ензиму і субстратів: 1 мг пептидази 2 здатен розщеплювати 54 мг фібрину, 67 мг фібриногену, 25 мг казеїну і 49 мг колагену. Показано, що досліджуваний ензим виявляє вищу спорідненість до фібрину і казеїну, для яких значення константи Міхаеліса K_m становить 1,1 і 1,2 мг, відповідно. **Висновки.** Пептидаза 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 характеризується вищою специфічністю щодо фібрину і фібриногену, ніж до казеїну і колагену, проте більшою спорідненістю до фібрину і казеїну.

Ключові слова: субстратна специфічність, пептидаза, константа Міхаеліса K_m .

Основною функцією мікробних позаклітинних пептидаз є розщеплення білків, які містяться в навколишньому середовищі, і перетворення їх у форму, яка здатна легко проникати в клітину. Вивчення пептидаз, що гідролізують такі важкорозчинні білкові субстрати як фібрин, еластин і колаген, є на сьогодні актуальною проблемою наукових досліджень, оскільки такі ензими можуть знайти застосування для видалення рубцевої тканини, у складі косметичних препаратів, у мийних засобах для



видалення білкових плям, у фармацевтичній промисловості як інгредієнти ліків, особливо тромболітичних, а також у шкіряній промисловості для зневоложування і зм'якшення шкіри, поліпшуючи її якість, зберігаючи товщину готової шкіри і використовуючи відщеплену щетину як вторинну сировину. Участь пептидаз в таких різних процесах зумовлена їх специфічністю, збереженням каталітичної активності в широких межах рН і температур. Раніше нами було показано [2, 3], що *Bacillus thuringiensis* ІМВ В-7324 у стаціонарній фазі на 48 год культивування синтезує метало-пептидазу (24 кДа) з фібринолітичною активністю, яка здатна зберігати активність в інтервалі значень рН від 6,0 до 11,0 і температури від 20 до 50 °С протягом 1 год. Тому метою даної роботи було вивчення субстратної специфічності очищеної пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була пептидаза 2, виділена з *B. thuringiensis* ІМВ В-7324. Культивування штаму, виділення і очистку досліджуваного ензиму проводили як описано в роботах [2, 3].

Субстратну специфічність пептидази 2 оцінювали, використовуючи різні субстрати: еластин, фібрин, фібриноген, колаген і казеїн.

Загальну казеїнолітичну (пептидазну) активність визначали за методом Ансона в модифікації Петрової [4], який базується на кількісному визначенні тирозину, що утворюються при гідролізі казеїну під дією досліджуваного ензиму. За одиницю активності приймали здатність ензиму перетворювати за 1 хв при температурі 37 °С казеїн в неосаджений ТХО стан в кількості, яка відповідає 1 мкмоль тирозину.

Визначення фібринолітичної активності проводили за методом Masada [12], використовуючи як субстрат фібрин, отриманий з плазми крові людини на станції переливання крові. Утворення продуктів розщеплення фібрину реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності приймали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв в умовах досліду.

Еластолітичну активність визначали колориметрично за інтенсивністю забарвлення розчину при ензиматичному гідролізі еластину, забарвленого конго червоним [15]. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 515 нм. За одиницю активності ензиму приймають здатність ферменту гідролізувати 1 мг еластину за даних умов (37 °С, 5 год).

Для визначення фібриногенолітичної активності в дослідну пробірку додавали фібриноген, 0,01 М Трис-НСІ буфера (рН 7,5) і досліджуваний препарат. Реакційну суміш інкубували на водяній бані при 37 °С протягом 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 10% ТХО. В контрольну пробірку ТХО додавали до початку інкубації. Зразки витримували при кімнатній температурі 20 хв, центрифугували при 10000g протягом 5 хв. В супернатанті вимірювали утворення продуктів розщеплення фібриногену на



спектрофотометрі СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібриногенолітичної активності брали таку кількість ензиму, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хв в умовах досліду.

Для визначення колагеназної активності використовували колаген (з бичачого сухожилля). Продукти розщеплення визначали на спектрофотометрі СФ-26 при довжині хвилі 600 нм. Одиниця колагеназної активності еквівалентна кількості мкмоль лейцину, знайдених зі стандартної кривої [11].

Питому активність досліджуваної пептидази по відношенню до кожного субстрату виражали числом одиниць ензиматичної активності на 1 мг білка. Кількість білка визначали за методом Lowry [10]. Інтенсивність забарвлення проб вимірювали при довжині хвилі 750 нм. Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін.

Для визначення оптимальних співвідношень ензим-субстрат для ефективного гідролізу останнього був проведений повний двофакторний дослід (ПФД). Спорідненість (константу Міхаеліса, K_m) до кожного субстрату пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 визначали за графіком, побудованим за методом подвійних обернених величин в координатах Лайнуївера-Берка ($1/v_0 - 1/[S]$).

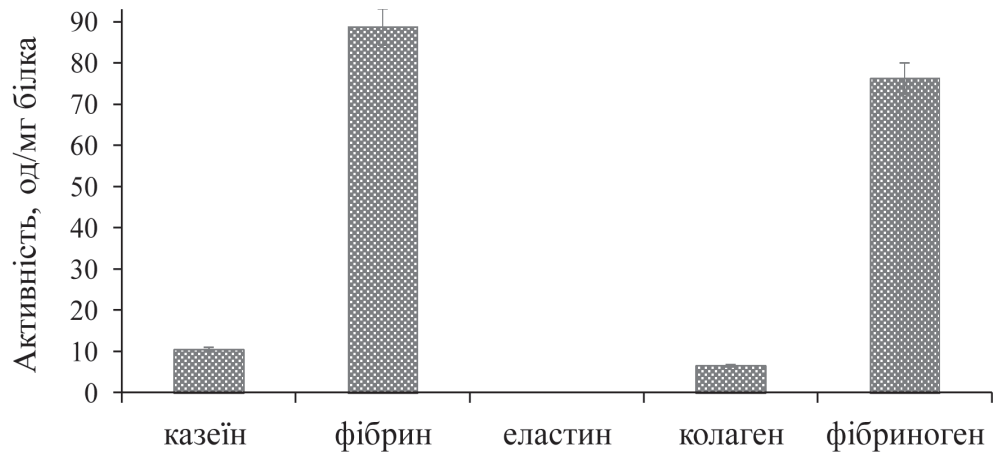
Обчислення та графічне представлення результатів повного двофакторного експерименту було проведено за методом стрімкого сходження (метод Бокса-Уілсона) за допомогою комп'ютерної системи аналізу даних STATISTICA 8.0. На рисунках наведено середні арифметичні значення за результатами п'яти повторностей, відхилення від середнього значення не перевищувало 5% [1].

Результати та їх обговорення

Початок дослідження субстратної специфічності пептидази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 щодо широкого спектру білкових субстратів показало (рис. 1), що ензим гідролізує фібрин, фібриноген, казеїн і колаген, але не здатен розщеплювати еластин. Найвища питома активність виявлена до фібрину і фібриногену (88,75 і 76,25 од/мг білка, відповідно).

Порівняння субстратної специфічності досліджуваного ензиму з пептидазами інших представників групи *B. cereus*, до якої відноситься *B. thuringiensis*, дало змогу виявити, що отримана нами металопептидаза подібна за субстратною специфічністю до металопептидаз, виділених з *B. cereus* і *B. anthracis*. Так, у одного зі штамів *B. anthracis* [6] виділено дві нейтральні металопептидази з молекулярними масами 36 і 46 кДа, які здатні розщеплювати різні нативні субстрати: казеїн, еластин і желатин. Отримана з *B. cereus* DSM 14729 нейтральна металопептидаза камелізін [7] проявляє специфічність щодо таких білкових субстратів, як колаген типу I, фібрин і фібриноген. Здатність розщеплювати ці субстрати зумовлює участь цього ензиму у взаємодії між хазяїном і патогеном.



Рис. 1. Гідроліз білкових субстратів пептидазою 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324Fig. 1. Hydrolysis of protein substrates by peptidase 2 *B. thuringiensis* IMV B-7324

Відомо [5, 14, 16], що мікробні пептидази здатні гідролізувати різні білкові субстрати, зокрема, і важкорозчинні. Так [16], пептидаза *B. subtilis* DC33 здатна розщеплювати фібрин, фібриноген і казеїн, але майже не розщеплює сироватковий альбумін. Інший ензим, виділений з *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075, проявляє високу активність щодо фібрину, азоказеїну і колагену [14]. Колагеназа *B. licheniformis* F11.4 з високою швидкістю гідролізує колаген і казеїн, але з меншою — фібрин і желатин [5].

Для застосування протеолітичних ензимів в різних галузях промисловості необхідно знати не тільки їх субстратну специфічність щодо різних білків, але й оптимальні співвідношення концентрацій ензиму і субстратів для ефективного гідролізу останніх. Тому нами був проведений пошук оптимальних співвідношень концентрацій пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 і білків-субстратів. На основі отриманих даних двофакторного дослідження було побудовано тривимірне зображення поверхні відгуку для визначення оптимального співвідношення концентрацій субстратів (фібрин, фібриноген, казеїн і колаген) і досліджуваної пептидази, при яких досягається максимальна ензиматична активність в реакційній суміші. Так, при дії ензиму було виявлено підвищення активності при збільшенні концентрацій субстрату і самого ензиму (рис. 2). За таких умов було визначено оптимальне співвідношення пептидази 2 і білкових субстратів.

Показано (табл. 1), що 1 мг пептидази 2 здатен розщеплювати більшу кількість молекул фібрину (67 мг) і фібриногену (54 мг), ніж колагену (49 мг) і казеїну (25 мг).

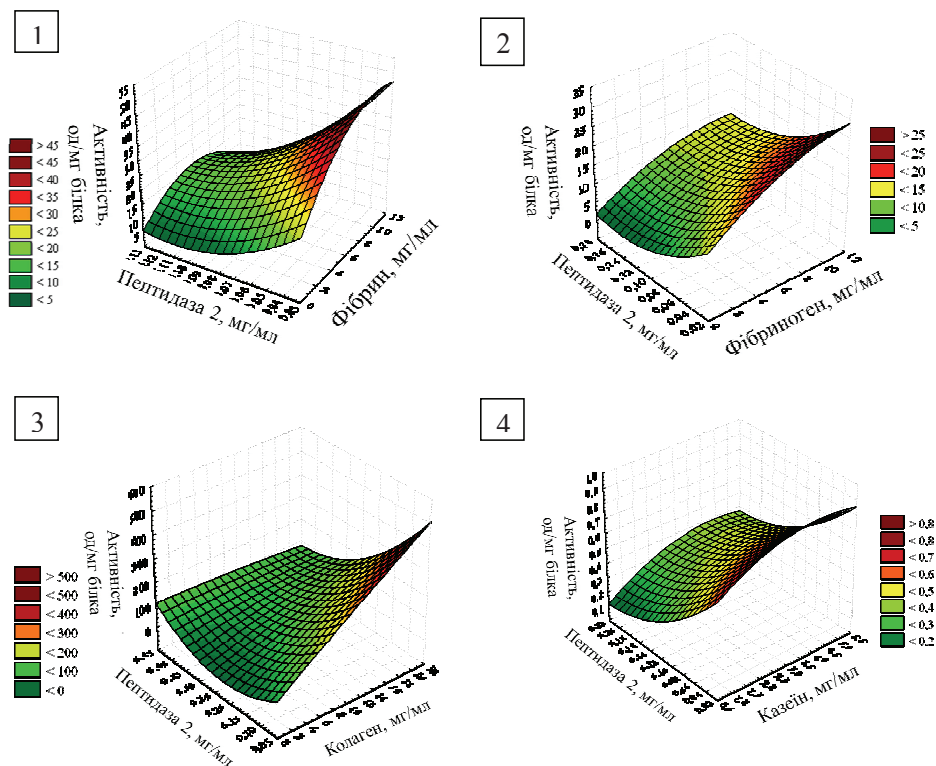


Рис. 2. Поверхня відгуку для визначення оптимальних концентрацій ензиму і субстратів

1 — фібрин, 2 — фібриноген, 3 — колаген, 4 — казеїн

Fig. 2. The response surface for determination of the optimal enzyme and substrate concentrations

1 — fibrin, 2 — fibrinogen, 3 — collagen, 4 — casein

Для практичного використання протеази 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і можливості порівняння з аналогами необхідно вивчити її кінетичні характеристики.

Таблиця 1

Оптимальне співвідношення ензим : субстрат (Е : S) для реакції гідролізу

Table 1

The optimal ratio of enzyme : substrate (E : S) for hydrolysis

Субстрати	Е : S, (мг : мг)
Еластин	-
Фібрин	1 : 54
Фібриноген	1 : 67
Казеїн	1 : 25
Колаген	1 : 49

Основним показником каталітичної активності ензимів є константа Міхаеліса (K_m), яка свідчить про міру спорідненості ензиму до субстрату. Тому наступним етапом було встановлення параметру K_m , який визначався для таких концентрацій субстратів, за яких швидкість гідролізу збільшувалася лінійно. Для цього використовували обернені координати Лайнуївера-Берка. Визначення константи Міхаеліса досліджуваної пептидази показало, що вона має найбільшу спорідненість до фібрину і казеїну, на що вказує найменше значення K_m , яке становить 1,1 та 1,2 мг, відповідно.

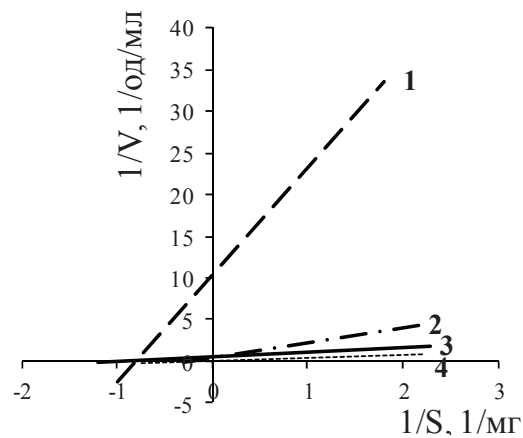


Рис. 3. Графік Лайнуївера-Берка для визначення константи Міхаеліса K_m при гідролізі пептидазою 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 субстратів
1 – казеїн, 2 – фібриноген, 3 – фібрин, 4 – колаген

Fig. 3. Lineweaver-Burk plots for *B. thuringiensis* IMV B-7324 peptidase 2 indicating the K_m values using various substrates
1 – casein, 2 – fibrinogen, 3 – fibrin, 4 – collagen

Порівняння K_m пептидаз різних мікроорганізмів щодо досліджуваних білків показало (табл. 2), що пептидаза 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 характеризувалася більшою спорідненістю по відношенню до фібрину, ніж пептидаза *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 (K_m 1,1 і 5,0, відповідно) [14].

Що стосується гідролізу казеїну, то K_m пептидази 2 *B. thuringiensis* IMB B-7324 значно менша, ніж для пептидаз *B. licheniformis* B18 і *Aspergillus tubingensis* NIISS 08155 (1,2; 3,1 і 45,0, відповідно) [8, 13]. Проте, при розщепленні колагену значення K_m досліджуваного ензиму більше, ніж для пептидаз, виділених з *B. cereus* MBL13 і *B. licheniformis* F11.4 [5, 9]. На жаль, в літературі відсутня інформація щодо K_m різних пептидаз відносно фібриногену, тому провести порівняльний аналіз нам не вдалося.

Таблиця 2

 K_m різних пептидаз мікробного походження

Table 2

 K_m of different microbial peptidases

Субстрат	Джерело пептидази	K_m , мг
Фібрин	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	1,1
	<i>Candida guilliermondii</i> NRRL Y-2075 [14]	5,0
Фібриноген	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	3,3
Колаген	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	11,1
	<i>B. cereus</i> MBL13 [9]	1,3
	<i>B. licheniformis</i> F11.4 [5]	0,3
Казеїн	<i>B. thuringiensis</i> ІМВ В-7324	1,2
	<i>B. licheniformis</i> B18 [8]	3,1
	<i>Aspergillus tubingensis</i> NIICC 08155 [13]	45,0

Таким чином, пептидаза 2 *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 характеризується більшою специфічністю щодо фібрину і фібриногену, ніж до казеїну і колагену, проте більшою спорідненістю щодо фібрину і казеїну.

Н.А. Нидялкова, Е.В. Мацелюх, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154,
Киев ГСП, Д03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 23 39,
e-mail: Nidialkova@gmail.com

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПЕПТИДАЗЫ 2 *BACILLUS THURINGIENSIS* ИМВ В-7324

Реферат

Цель. Исследование субстратной специфичности очищенной пептидазы 2 *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324. **Методы.** Для изучения субстратной специфичности пептидазы 2 использовали белки: эластин, фибрин, фибриноген, коллаген и казеин. Определение оптимальных соотношений фермент-субстрат проводили с помощью полного двухфакторного опыта (ПФО). Средство (константу Михаэлиса, K_m) к субстратам пептидазы 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 определяли по



методу двойных обратных величин в координатах Лайнуивера-Бэрка ($1/v_0 - 1/[S]$). Для вычисления и графического представления результатов полного двухфакторного опыта использовали метод стремительного восхождения (метод Бокса-Уилсона) и компьютерную систему анализа данных STATISTICA 8.0. **Результаты.** Исследование гидролиза нативных белковых субстратов пептидазой 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 показало, что фермент расщепляет фибрин, фибриноген, казеин и коллаген. Для эффективного гидролиза белков по результатам полного двухфакторного опыта (ПФО) были установлены оптимальные соотношения концентраций фермента и субстратов: 1 мг пептидазы 2 может расщепить 54 мг фибрина, 67 мг фибриногена, 25 мг казеина и 49 мг коллагена. Показано, что исследуемый фермент проявляет большее сродство к фибрину и казеину, для которых значения константы Михаэлиса K_m составляет 1,1 и 1,2 мг, соответственно. **Выводы.** Пептидаза 2 *B. thuringiensis* ИМВ В-7324 характеризуется более высокой специфичностью к фибрину и фибриногену, чем к казеину и коллагену, но большим сродством к фибрину и казеину. **Ключевые слова:** субстратная специфичность, пептидаза, константа Михаэлиса K_m .

N.A. Nidialkova, O.V. Matseliukh, L.D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, GSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: Nidialkova@gmail.com

SUBSTRATE SPECIFICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMV B-7324 PEPTIDASE 2

Summary

Aim. Investigation of substrate specificity of the purified peptidase 2 from *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324. **Methods.** To study the substrate specificity of the peptidase 2 we used protein: elastin, fibrin, fibrinogen, collagen and casein. Determination of the optimal ratio of the enzyme-substrate was carried out a two-level factorial design. Substrate affinity (Michaelis constant, K_m) of enzyme was established by the double reciprocal coordinates in the Lineweaver-Burk ($1/v_0 - 1/[S]$). For calculation and graphic presentation of the results obtained by two factorial experiments there were used Box-Wilson method and computer program STATISTICA 8.0. **Results.** The study of hydrolysis of native protein substrates by *B. thuringiensis* IMV B-7324 peptidase 2 showed that the enzyme is able to cleave the fibrin, fibrinogen, casein and collagen. For effective hydrolysis of proteins according to the results of full two-way experience (CFE) was determined the optimal correlation of enzyme concentration and substrates



concentration. So 1 mg of peptidase 2 is able to cleave 54 mg of fibrin, 67 mg of fibrinogen, 25 mg of casein and 49 mg of collagen. It was shown that the examine enzyme is more affinity to the fibrin and casein for that the Michaelis constant K_m is 1.1 and 1.2 mg, respectively. **Conclusions.** The peptidase 2 of *B. thuringiensis* IMV B-7324 is characterized by higher specificity to the fibrin and fibrinogen than to casein and collagen, but more affinity to fibrin and casein.

Key words: substrate specificity, peptidase, Michaelis constant K_m .

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Г. Ф. Лакин. — М.: Высш. Школа, 1990. — 352 с.
2. *Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д.* Виділення фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 // Мікробіол. журн. — 2012. — 74, № 5. — С. 9–15.
3. *Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д.* Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 // Біотехнологія. — 2012. — 5, № 4. — С. 74–81.
4. *Петрова И.С., Винцюнайте М.Н.* Определение протеолитической активности ферментных препаратов микробного происхождения // Прикл. биохимия и микробиология. — 1966. — 2, № 1. — С. 322–327.
5. *Baehaki A., Suhartono M.T., Sukarno, Syah D., Sitanggang A.B., Setyahadi S., Meinhardt F.* Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4 // Afr. J. Microbiol. Res. — 2012. — 6, N 10. — P. 2373–2379.
6. *Chung M.C., Popova T.G., Millis B.A., Mukherjee D.V., Zhou W., Liotta L.A., Petricoin E.F., Chandhoke V., Bailey C., Popov S.G.* Secreted Neutral Metalloproteases of *Bacillus anthracis* as Candidate Pathogenic Factors // J. Biol. Chem. — 2006. — 281, N 42. — P. 31408–31418.
7. *Grass G., Schierhorn A., Sorkau E., Mӧller H., Rӧcknagel P., Nies D.H., Fricke B.* Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus* // Infect. Immun. — 2004. — 72, N 1. — P. 219–228.
8. *Kumari B.L., Rani M.R.* Characterization studies on caseinolytic extracellular alkaline protease from a mutant *Bacillus licheniformis* // Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res. — 2013. — 2, № 1. — P. 284–289.
9. *Liu L., Ma M., Cai Z., Yang X., Wang W.* Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain // Food Technol. Biotechnol. — 2010. — 48, N 2. — P. 151–160.
10. *Lowry O.H., Rosebrough H.J., Faar A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, N 1. — P. 265–275.
11. *Mandl I.* Collagenase // Science. — 1970. — 169, N 3951. — P. 1234–1238.



12. *Masada M.* Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // *Food style*. — 2004. — 8, N 1. — P. 92–95.

13. *Morya V.K., Yadav D.* Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of *Aspergillus tubingensis* NIICC-08155 [Електронний ресурс] // *The Internet J. Microbiol.* — 2010. — 8, N 1. — Режим доступу до журн.: <http://www.ispub.com/journal/the-internet-journal-of-microbiology/volume-8-number-1/production-and-partial-characterization-of-neutral-protease-by-an-indigenously-isolated-strain-of-aspergillus-tubingensis-niicc-08155-2.html#sthash.EZ06gHeY.dpbs>.

14. *Rashad M.M., Mahmoud A.E., Al-Kashef A.S., Nooman M.U.* Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme by *Candida guilliermondii* Grown on Sunflower Oil Cake // *J. Appl. Sci. Res.* — 2012. — 8, N 2. — P. 635–645.

15. *Trombridg G.O.* Purification of human elastase / G.O. Trombridg, H.D. Moon // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* — 1972. — 141, 3. — P. 928–931.

16. *Wang C. T., Ji B. P., Li B., Nout R., Li P.L., Ji H., Chen L.F.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — 33, N 9. — P. 750–758.

Стаття надійшла до редакції 19.03.2013 р.



А.Ю. Фесенко¹, В.К. Позур², В.І. Бондаренко¹

¹ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського Національної академії медичних наук України”, вул. Амосова, 5, 03680, Київ, тел.: +38(044) 275 02 97, e-mail: ukrinfluenza@ukr.net

²ННЦ Інститут біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Академіка Глушкова, 2, 03022, Київ, Україна

СТАН ВАКЦИНОПРОФІЛАКТИКИ ПРОТИ ПОЛІОМІЄЛІТУ В УКРАЇНІ

Мета. Визначити рівні захисних антитіл у дітей та провести аналіз рівня охоплення вакцинацією дітей у регіонах України. **Методи.** В роботі використана культура клітин Нер-2 та серологічні, статистичні та епідеміологічні методи. **Результати.** За допомогою методу мікронейтралізації визначено рівні захисних антитіл до вакцинних штамів вірусу поліомієліту першого, другого, третього типів у 40 осіб віком 15–17 років. За даними обласних санітарно-епідеміологічних станцій України, проведено ретроспективний аналіз стану вакцинопрофілактики проти поліомієліту згідно з календарем щеплень в Україні за 2009–2012 рр. Дані ретроспективного аналізу свідчать про низький рівень проведення щеплень у 2012 р., коли охоплення вакцинопрофілактикою дітей до 1 року становила 45,9%. Ревакцинація дітей у віці 18 міс. у цьому році проведена лише у 41,7% осіб, у віці 6 років оральну поліомієлітну вакцину одержали 53,9% дітей, у віці 14 років – 56,9% дітей. За результатами досліджень встановлено, що до вірусів поліомієліту першого та другого типів 5% дітей не мали захисних антитіл, від вірусу поліомієліту третього типу незахищеними виявилися 10% досліджених осіб. Показники титрів антитіл до поліовірусів третього типу були нижчими за такі до вірусів поліомієліту першого та другого типів.

Ключові слова: поліомієліт, вакцинація в Україні, імунітет.

У 1988 році Всесвітня Асамблея Охорони Здоров'я доручила ВООЗ здійснити глобальну ліквідацію поліомієліту до 2000 року [6]. Але, не зважаючи на проведення широкомасштабних дій з вакцинопрофілактики проти поліомієліту у світі, досягти мети у 2000 році не вдалося. Наступною очікуваною датою ліквідації поліомієліту в світі намічений 2020 рік.

Циркуляція «диких» вірусів поліомієліту спостерігається в таких країнах, як Пакистан, Афганістан, Нігерія [5]. Періодично відбуваються спалахи поліомієліту, викликані «диким» поліовірусом у багатьох країнах, в яких тривалий період не реєстрували випадки паралітичного поліомієліту, або сертифікованих як території, вільні від циркуляції «дикого» поліовірусу [1, 9].



З 2002 року Європейський регіон ВООЗ, у тому числі Україна, був сертифікований як територія, на якій не реєструються випадки паралітичного поліомієліту, викликані «дикими» поліовірусами. З квітня 2010 року у цьому регіоні різко погіршився стан захворюваності на поліомієліт внаслідок виникнення у Таджикистані 712 випадків гострих в'ялих паралічів, з яких у 458 випадках підтверджено наявність «дикого» поліовірусу першого типу. З Таджикистану поліовірус поширився на Росію, Туркменістан та Казахстан. У вересні 2011 року «дикий» поліовірус був завезений у Китай [4, 7].

Враховуючи інтенсивність міграційних процесів в сучасних умовах, існує імовірність завезення «диких» вірусів поліомієліту з ендемічних країн на територію України [2]. Тому є необхідним контроль стану колективного імунітету проти поліомієліту у населення. Дослідження, проведені у 2009–2010 роках, показали збільшення відсотку осіб, серонегативних до поліовірусів, що призводить до збільшення прошарку населення, чутливого до інфекції [4]. На сьогоднішній день єдиним методом боротьби з поліомієлітом є вакцинопрофілактика. Вчасна та проведена в повному обсязі вакцинація проти поліомієліту є запорукою збереження здоров'я нації.

Метою роботи було визначення титрів захисних антитіл проти вірусів поліомієліту першого, другого, третього типів у дітей віком 15–17 років; ретроспективний аналіз стану вакцинопрофілактики згідно з календарем щеплень проти поліомієліту в Україні.

Матеріали та методи

За даними обласних санітарно-епідеміологічних станцій України проведено ретроспективний аналіз охоплення населення вакцинацією проти поліомієліту в різних регіонах України у 2009–2012 роках.

Було досліджено сироватки крові 40 осіб віком 15–17 років. Зразки крові отримані з приватної діагностичної лабораторії міста Києва. Забір крові здійснювали в асептичних умовах у стерильні пробірки без додавання антикоагулянтів чи антибіотиків. Мінімальний необхідний об'єм сироватки складав 0,2 мл. Проби залишали при кімнатній температурі на 2 години, після чого ставили зразки у холодильник (4–8 °С) на 24 години. Після цього відділяли згусток, що утворився, від сироватки, освітлювали одержану сироватку центрифугуванням протягом 5 хвилин при 3000 об/хв, переносили освітлену сироватку у стерильні промарковані кріовіали та зберігали при температурі –20 °С у морозильній камері.

В роботі використана культура клітин Нер-2 (Cincinatti). Пасаж культури клітин здійснювали таким чином: видаляли ростове середовище з культурального матрацу з культурою клітин, вносили у матрац 1 мл 0,25% розчин трипсину та обережно ополіскували моношар клітин та



зливали трипсин. Далі у матрац з культурою клітин вносили 2 мл 0,25% трипсину та витримували при температурі 37 °С до повного відшарування клітин від ростової поверхні. Одержану суспензію клітин розводили певним об'ємом середовища росту для отримання концентрації $1-2 \times 10^4$ клітин в 0,1 мл.

Для реакції мікронейтралізації використовували вакцинні штами вірусів поліомієліту першого, другого, третього типів, надані музеєм інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського.

Реакцію мікронейтралізації проводили за загальноприйнятою методикою [3].

Титр вірусу визначали за цитотоксичним ефектом та обчислювали за формулою Кербера для реакції мікронейтралізації.

Результати досліджень

За результатами ретроспективного аналізу рівня охоплення вакцинацією проти поліомієліту дітей згідно з календарем щеплень у 2009–2012 роках на території України показано зниження відсотка вакцинованих осіб (рис. 1). Така тенденція спостерігається в усіх вікових групах дітей. Наприклад, у 2009 році 80,6% дітей одержали вакцину проти поліомієліту, а в 2012 році було вакциновано лише 45,9% дітей. У віці 18 місяців оральну поліомієлітну вакцину одержали 75,5% дітей у 2009 році і 41,7% у 2012 році. Остання вакцинація проти поліомієліту живою оральною вакциною проводиться у віці 14 років.

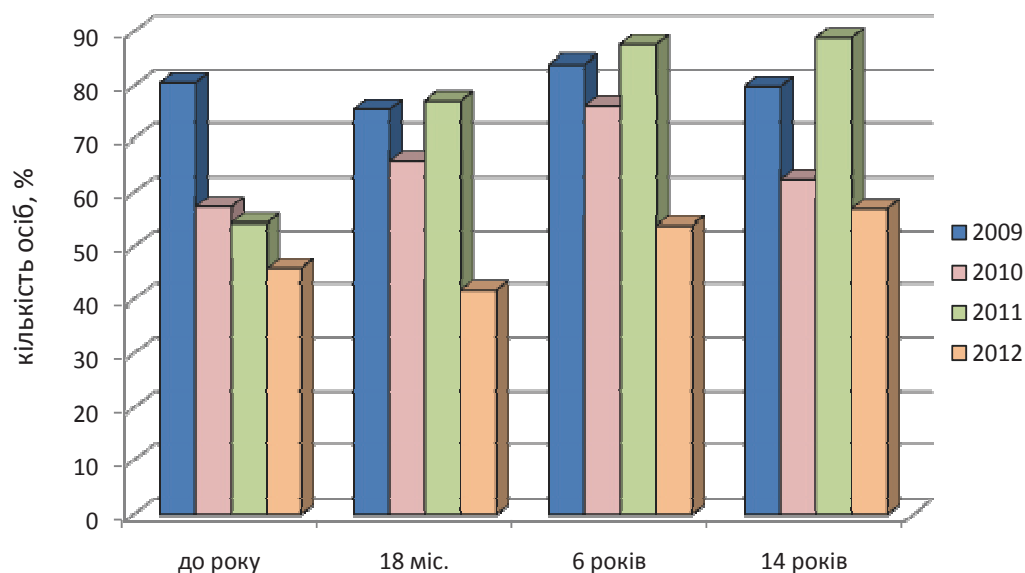


Рис. 1. Охоплення щепленням дітей різних вікових груп в Україні у 2009–2012 рр.

Fig. 1. Vaccination coverage of children of different age groups in Ukraine in 2009–2012

За результатами аналізу встановлено, що у 2012 році лише 56,9% дітей у віці 14 років були вакциновані проти поліомієліту, тоді як в 2009 році цей показник складав майже 80%.

Сукупні дані свідчать про зниження рівня проведення щеплень проти поліомієліту в Україні, що призводить до збільшення прошарку населення України, сприйнятливою до поліомієліту.

Наступний етап роботи полягав у дослідженні рівня захисних антитіл у дітей віком 15–17 років. Результати вивчення титрів антитіл у сироватці крові представлені на рис. 2.

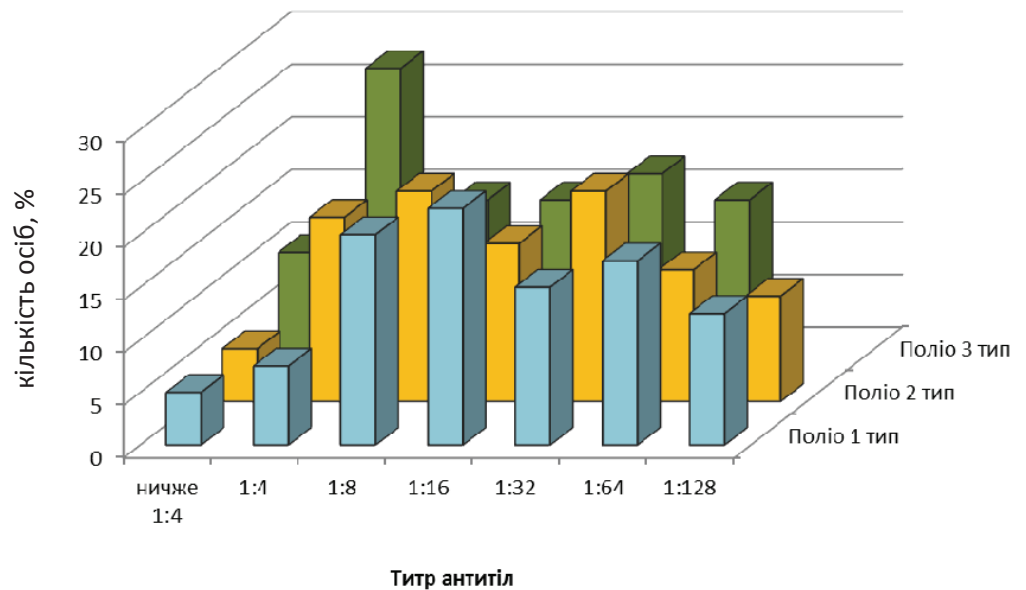


Рис. 2. Рівні захисних антитіл до поліовірусів першого, другого, третього типів у сироватці крові осіб віком 15–17 років.

Fig. 2. The levels of protective antibodies to three types of polioviruses in blood serum of persons aged 15–17 years.

Встановлено, що до поліовірусів першого та другого типів 5% дітей не мали захисних антитіл (титр антитіл нижче 1:4), тоді як від вірусів поліомієліту третього типу незахищеними виявилися 10% осіб. Показано недостатній рівень захисних антитіл (титр 1:4) у 7,5% осіб до вірусів поліомієліту першого типу, до поліовірусів другого типу аналогічні титри антитіл мали 17,5% осіб, до 3 типу – 27,5% осіб. Як видно з діаграми, найвищі титри захисних антитіл (1:128) до поліовірусів першого типу були виявлені у 12,5% осіб. Дещо менший відсоток осіб (10%) мали аналогічні титри до вірусу поліомієліту другого типу. Але серед досліджених зразків не було виявлено антитіл до поліовірусів третього типу в титрі 1:128.

До поліовірусів першого типу більшість досліджених зразків (22,5%) мала титр антитіл 1:16, до поліовірусу другого типу більшість зразків (20%) — титри антитіл 1:8 та 1:32, до поліовірусу третього типу 27,5% досліджених зразків — титри антитіл 1:4. Таким чином, до поліовірусу третього типу показано нижчий рівень захисних антитіл у сироватці крові, ніж до першого та другого типів поліовірусів. Одержані дані корелюють з результатами досліджень зарубіжних авторів [8].

Результати ретроспективного аналізу показали недостатній рівень охоплення вакцинацією проти поліомієліту дітей усіх вікових груп. Так, у 2009 році охоплення щепленням дітей до 1 року становило 80,6%, а у 2012 році — всього 45,9%, ревакцинація у 18 місяців в 2009 році проведена у 75,5% дітей, а у 2012 році — у 41,7%.

А.Ю. Фесенко¹, В.К. Позур², **В.И. Бондаренко**¹

¹ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского Национальной академии медицинских наук Украины», 03680, Киев, ул. Амосова, 5, тел.: +38(044) 275 02 97, e-mail: ukrinfluenza@ukr.net

²УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, 03022, Киев, ул. Академика Глушкова, 2

СОСТОЯНИЕ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА В УКРАИНЕ

Реферат

Цель. Определить уровни защитных антител у детей и провести анализ уровня охвата вакцинацией детей в регионах Украины. **Методы.** В работе использована культура клеток Нер-2, а также серологические, статистические и эпидемиологические методы. **Результаты.** С помощью метода микронейтрализации определены уровни защитных антител к вакцинным штаммам вируса полиомиелита первого, второго, третьего типов у 40 человек в возрасте 15–17 лет. По данным, предоставленным областными санитарно-эпидемиологическими станциями Украины, проведен ретроспективный анализ состояния вакцинопрофилактики против полиомиелита в 2009–2012 гг. согласно календарю прививок. Данные ретроспективного анализа свидетельствуют о низком уровне проведения прививок в 2012 г., когда охват вакцинопрофилактикой детей до 1 года составил 45,9%. Ревакцинация в возрасте 18 мес. в этом году проведена лишь в 41,7% случаев, в возрасте 6 лет оральную полиомиелитную вакцину получили 53,9% детей, в возрасте 14 лет — 56,9% детей. По результатам исследований установлено, что к вирусам полиомиелита первого и второго типов 5% детей не имели защитных антител, от вируса полиомиелита третьего типа незащищенными оказались 10% исследованных



лиц. Показатели титров антител к полиовирусам третьего типа были ниже таковых к вирусам полиомиелита первого и второго типов.

Ключевые слова: полиомиелит, вакцинация в Украине, иммунитет.

A.Yu. Fesenko¹, V.K. Pozur², V.I. Bondarenko¹

¹«L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine»,
5, Amosov Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.: +38 (044) 275 02 97,
e-mail: ukrinfluenza@ukr.net

²ESC “Institute of Biology” Taras Shevchenko National University of Kyiv,
2, Akademik Glushkov Str., Kyiv, Ukraine, 03022

STATE OF VACCINEPROPHYLAXIS OF POLIOMYELITIS IN UKRAINE

Summary

Aim. To determine the level of protective antibodies in children and to analyze the level of vaccination coverage of children in regions of Ukraine. **Methods.** It was used serological, statistical and epidemiological methods and cell culture Hep-2. **Results.** It was determined the levels of protective antibodies to 1, 2, 3 types of poliovirus vaccine strains of 40 people aged 15–17 years using the microneutralization method. According to data provided by the regional sanitary-epidemiological stations of Ukraine, it was conducted a retrospective analysis of vaccination status against polio in 2009–2012 in accordance with the calendar of vaccination in Ukraine. The retrospective analysis of the data showed a low level of vaccination in 2012, when vaccination coverage of children under 1 year was 45.9%. Revaccination at 18 months this year held only 41.7% of persons, in 6 years 53.9% of children received oral polio vaccine, 56.9% of children was vaccinated in 14 years. The research found that 5% of children had protective antibodies against the poliovirus types 1 and 2, 10% of surveyed individuals were unprotected against poliovirus type 3. Indicators titers of antibodies to type 3 polioviruses were lower than those of polio virus types 1 and 2.

Key words: polio, vaccination in Ukraine, immunity.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Задорожна В.І., Демчишина І.В., Бондаренко В.І., Зубкова Н.Л., Доан С.І.* Історія поліомієліту в Україні та перспективи на майбутнє. // Сучасні інфекції. — 2005. — №1. — С. 8–12.
2. *Закон України* про затвердження Загальнодержавної програми імунізацій та захисту населення від інфекційних хвороб на 2009–2015 роки від 21 жовтня 2009р. № 1658-VI.
3. *Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита.* ВОЗ Женева — 1998. — С. 86.
4. *A. Le Menach, A.E. Llosa, I. Mouniaman-Nara, F. Kouassi, J. Ngala, N. Voxall, K. Porten, and R.F. Grais* Poliomyelitis Outbreak, Pointe-Noire, Republic of the Congo, September 2010–February 2011 // *Emerging Infectious Diseases* — 2011. — 17, № 8. — P. 1506–1509.
5. *Global Polio Eradication Initiative strategic plan 2004–2008* / WHO — Geneva — 2003. — P. 40.
6. *R.J. Duintjer Tabbens, M.A. Pallansch, S.L. Cochi, S. Wassilak, J. Linkins, R.W. Sutter, R.B. Aylward, K.M. Thompson* Economic analysis of the global polio eradication initiative // *Vaccine* — 2011. — V. 29. — P. 334–343.
7. *Controlling the polio outbreak in China.* WHO. Global eradication initiative. Режим доступу http://www.wpro.who.int/immunization/documents/CHN_PolioOutbreakControl_ENG.pdf
8. *Rнreza M.C., Oliveraa I., Diabarboureb H., Montanoa A., Baracanoc R., Vаднаа F., Bonnet M.-C.* Seroprevalence of anti-polio antibodies in a population 7 months to 39 years of age in Uruguay: Implications for future polio vaccination strategies // *Vaccine* — 2009. — V. 20. — P. 2689–2894.
9. *Wild poliovirus (WPV) cases 19 October 2011.* World Health Organization — Global Polio Eradication. Режим доступу http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/disca

Стаття надійшла до редакції 08.04.2013 р.



УДК 579.222:579.262

Мухлис Абедалабас, Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ И СИНТЕЗ РАМНОЛИПИДОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 В ПРИСУТСТВИИ СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА И ЕГО СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ

Цель. Оценка влияния экзогенного сигнального хинолона (*Pseudomonas* Quinolone Signal – PQS) – одного из аутоиндукторов системы quorum sensing у *Pseudomonas aeruginosa* – и его синтетических аналогов на синтез рамнолипидов. **Методы.** Клетки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 инкубировали 24 часа в 48-луночных планшетах «Nunclon» в присутствии синтетических аналогов 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS), или его синтетических аналогов (2-октил-, 2-нонил-, или 2-лаурил-3-гидрокси-4-хинолона). Конечные концентрации соединений содержали от 10 до 120 мкМ. Содержание рамнолипидов определяли по реакции с орциновым реактивом. **Результаты.** Показано, что экзогенный PQS в концентрациях 40, 60 и 80 мкМ вызывает возрастание уровня рамнолипидов в 1,9; 3,3 и 5,2 раза, соответственно. Повышение концентрации сигнального хинолона до 100 и 120 мкМ снижает его стимулирующее действие на 26% и 50% по сравнению с уровнем, который был зарегистрирован при 80 мкМ PQS. При этой концентрации количество планктонных клеток увеличивается в 3,4 раза, а масса биоплёнки вдвое. Активность синтетических аналогов зависит от числа атомов углерода в ацильной цепи: октил-хинолон (C_8) > нонил-хинолон (C_9) > лаурил-хинолон (C_{11}). Наибольшее повышение уровня биосурфактантов отмечено в присутствии 80 мкМ октил-хинолона – на 65%. Два других аналога увеличивают его на 35% и 20%. **Выводы.** Оптимальная концентрация сигнального хинолона (PQS), которая максимально повышает синтез рамнолипидов, составляет 80 мкМ. Исследованные синтетические аналоги PQS уступают ему в способности активировать синтез биосурфактантов *Pseudomonas aeruginosa*.

Ключевые слова: рамнолипиды, PQS, синтетические аналоги PQS, *Pseudomonas aeruginosa*.

Рамнолипиды – биосурфактанты, продуцируемые бактериями рода *Pseudomonas*, а также некоторыми представителями других родов и семейств [4], благодаря своим физико-химическим свойствам находят широкое практическое применение. Они не уступают химическим сурфактантам по эмульгирующей способности [3,8], что дает возможность

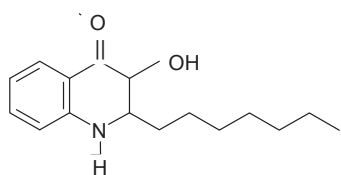
© Мухлис Абедалабас, Н.Б. Галкин, А.С. Семенец, Т.О. Филиппова, 2013



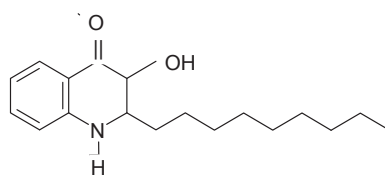
ефективно використовувати їх для біоремедиації забруднених ґрунтів [11], підвищення нафтоотдачі [17]. Крім того, вони мають антимікробну активність [16], використовуються в косметології, виробництві засобів побутової хімії [5]. Особливий інтерес представляє їх застосування як лікарських засобів в онкології та дерматології [14]. Практичне використання рамноліпідів обмежене високою вартістю їх виробництва. У зв'язі з цим, актуальною задачею є оптимізація процесів отримання біосурфактантів та підвищення виходу кінцевих продуктів. В даний час для цього використовують декілька підходів: вибір оптимального складу культуральних середовищ, селекція надпродукторів, генна інженерія [10]. Враховуючи, що синтез рамноліпідів відбувається під контролем системи міжклітинної комунікації (*quorum sensing*) і, зокрема, її *rhl*-зв'язки [12,13] представляє перспективний підхід, оснований на активації функціонування даної системи. Метою даної роботи було оцінити вплив екзогенного сигнального хінолону (PQS) — одного з аутоіндукторів системи *quorum sensing* у *Pseudomonas aeruginosa* — та його синтетических аналогів на синтез рамноліпідів.

Матеріали та методи

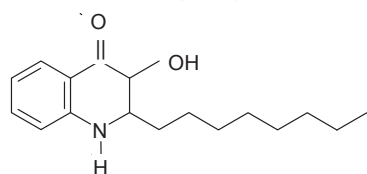
У роботі використовували штамп *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 (ONU 300) з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Сигнальний хінолон (PQS) та його синтетическі аналоги, що відрізняються довжиною ацильної ланцюга, були синтезовані в Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І.І. Мечникова:



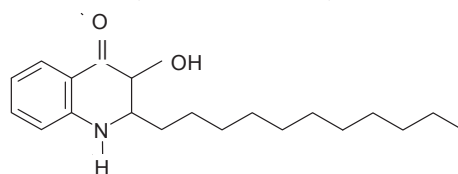
2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон
(PQS)



2-ноніл-3-гідрокси-4-хінолон
(ноніл-хінолон)



2-октил-3-гідрокси-4-хінолон
(октил-хінолон)



2-лаурил-3-гідрокси-4-хінолон
(лаурил-хінолон)

Исследования проводили в системе планктон—биоплёнка в 48-луночных полистироловых плоскодонных планшетах «Nunclon». Суточную культуру *P. aeruginosa* разводили стерильным физиологическим раствором и вносили в лунки планшетов, содержащих по 1 мл среды Гиса до конечной концентрации 10^3 клеток/мл. Планшеты инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. Для оценки эффектов PQS и его синтетических аналогов их добавляли в лунки планшетов до конечных концентраций 10–120 мкМ.

Через 24 часа из каждой лунки тщательно отбирали планктонные культуры и спектрофотометрически оценивали количество клеток при длине волны 540 нм. Биоплёнки на дне лунок отмывали физиологическим раствором и фиксировали 96% этанолом в течение 10 мин [15]. Затем их окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового в течение 5 мин при комнатной температуре. Планшеты с окрашенной биоплёнкой высушивали 24 часа при комнатной температуре и добавляли в каждую лунку по 1 мл лизирующего раствора, содержащего 1% додецилсульфата натрия в 0,1 М NaOH. Планшеты выдерживали 1,5 часа при комнатной температуре до полного растворения биоплёнки. Количество кристаллического фиолетового определяли по оптической плотности опытных и контрольных образцов на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary) при длине волны 592 нм.

Рамнолипиды из супернатанта, полученного после центрифугирования культур при 1500 g, осаждали после доведения рН до 6,5 75 мМ раствором $ZnCl_2$ [7]. Через 20 мин преципитат растворяли в 0,1 М натрий фосфатном буфере (рН 6,5). Полученные растворы дважды экстрагировали 5 мл хлороформа. Органическую фазу отбирали в чистые 20 мл флаконы и испаряли насухо. Осадок на дне флаконов растворяли в 100 мкл метанола.

Количество рамнолипидов в образцах определяли с помощью орцинового теста. К 100 мкл образца рамнолипидов в метаноле добавляли 400 мкл H_2O и 500 мкл орцинового реактива. Реакционную смесь кипятили на водяной бане 20 мин до изменения окраски с жёлтой на зелёную и измеряли экстинкцию контрольных и опытных образцов при длине волны 670 нм [9].

Все эксперименты проводили трижды с 6 повторами в каждом.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием общепринятых методов вариационного анализа. Рассчитывали средние значения показателей (\bar{X}) и их стандартную ошибку ($S_{\bar{X}}$). Достоверность отличий между средними определяли по критерию Стьюдента на уровне значимости не менее 95% ($p \leq 0,05$). Математические расчеты осуществляли с помощью компьютерной программы Excel [2].

Результаты и их обсуждение

Учитывая, что синтез рамнолипидов находится у *Pseudomonas aeruginosa* под контролем системы межклеточной коммуникации, ис-



слідования проводили в умовах, сприяючих активації всіх звеньїв *quorum sensing*. Отримані результати (рис. 1) показали, що екзогенний сигнальний хінолон підвищує синтез біосурфактанта, починаючи з концентрації 40 мкМ. Менші концентрації PQS помітного ефекту не мали. В діапазоні концентрацій 40–80 мкМ спостерігається пропорційне збільшення синтезу рамноліпідів. Їх рівень зростає в 1,9; 3,3 і 5,2 рази в присутності 40, 60 і 80 мкМ PQS, відповідно. Далі збільшення концентрації сигнального хінолона знижує його стимулюючий ефект. При концентраціях 100 і 120 мкМ вміст рамноліпідів в супернатанті зменшується на 26% і 50% порівняно з максимальним рівнем, який спостерігався при 80 мкМ. Зміни двох інших показників: кількості планктонних кліток і маси біоплівки, мають такий же характер. В присутності 80 мкМ PQS кількість планктонних кліток зростає в 3,4 рази, а маса біоплівки вдвічі порівняно з контролем. Більш низький рівень приросту біоплівки порівняно з планктонними клітками пов'язано, згідно з даними, з високим вмістом рамноліпідів, які сприяють відокремленню кліток від біоплівки і їх переходу в рідку фазу [6].

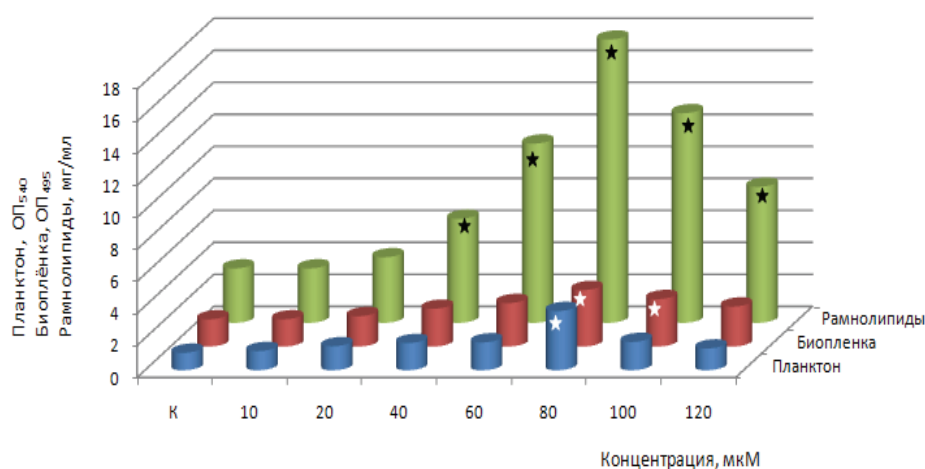


Рис. 1. Синтез рамноліпідів в системі планктон–біоплівка в присутності екзогенного PQS

Примечание: ★ — различия достоверны по сравнению с контролем

Fig. 1. Rhamnolipids biosynthesis in plankton–biofilm system in presence of exogenous PQS

Note: ★ — the differences were significant in comparison with control

Синтетическіє аналоги сигнального хінолона також підвищують синтез рамноліпідів, однак їх ефективність суттєво нижче порівняно з PQS (рис. 2).



Активность синтетических аналогов зависит от числа атомов углерода в ацильной цепи: октил-хинолон (C_8) > нонил-хинолон (C_9) > лаурил-хинолон (C_{11}). Наибольшее увеличение уровня биосурфактантов отмечено в присутствии 80 мкМ октил-хинолон — на 65%. Два других аналога (нонил- и лаурил-хинолоны) повышают его на 35% и 20%. Количество планктонных клеток при внесении в среду культивирования этих веществ

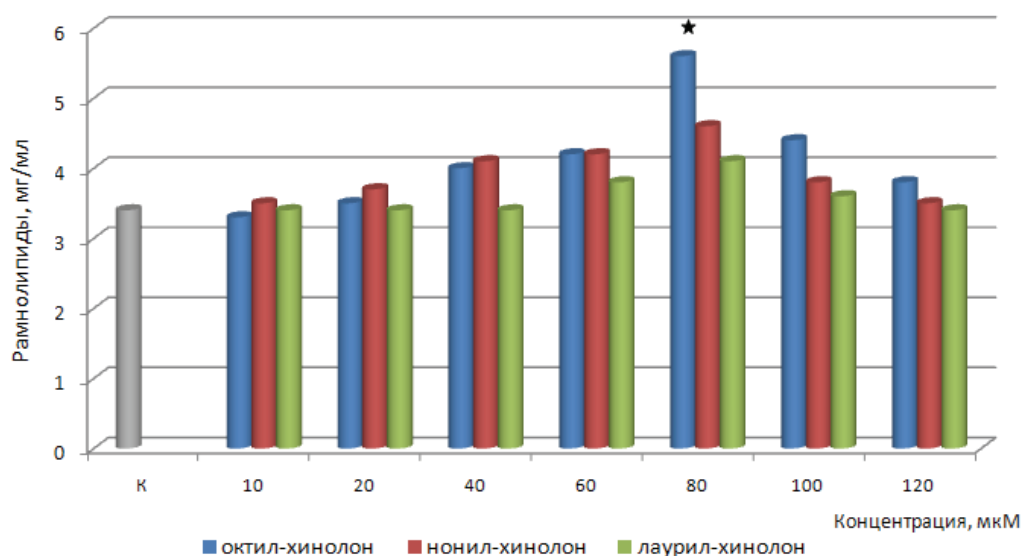


Рис. 2. Синтез рамнолипидов в системе планктон—биоплёнка в присутствии синтетических аналогов PQS

Примечание: ★ — различия достоверны по сравнению с контролем

Fig. 2. Rhamnolipids biosynthesis in plankton-biofilm system in presence of P QS synthetic analogs

Note: ★ — the differences were significant in comparison with control

Таким образом, проведенное исследование показало, что сигнальный хинолон *P. aeruginosa* в системе планктон—биоплёнка существенно увеличивает синтез рамнолипидов, который обеспечивается *rhl*-звеном системы межклеточной коммуникации. Полученные результаты подтверждают важную роль *pqs*-звена в активации процессов, контролируемых *rhl*-звеном. Ранее было показано, что экзогенный PQS увеличивает продукцию пиоцианина штаммом *P. aeruginosa* PA01 [6,10] и восстанавливает синтез этого пигмента в присутствии ингибиторов quorum sensing [1]. Кроме того, *pqs*-мутанты, имеющие полноценное *rhl*-звено, не образуют рамнолипиды, синтез которых восстанавливается после внесения в среду сигнального хинолона [10].



Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, А.С. Семенець, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ І СИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 ЗА ПРИСУТНОСТІ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ ТА ЙОГО СИНТЕТИЧНИХ АНАЛОГІВ

Реферат

Мета. Дослідження синтезу рамноліпідів *P. aeruginosa* за впливу екзогенного сигнального хінолону (PQS) та його синтетичних аналогів з різним числом атомів вуглецю в ацильному заміснику. **Методи.** Клітини *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 інкубували 24 години у 48-лункових планшетах «Nuclon» у присутності 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS), або його синтетичних аналогів (2-октил-, 2-нонил- або 2-лаурил-3-гідрокси-4-хінолону). Кінцеві концентрації сполук становили від 10 до 120 мкМ. Вміст рамноліпідів визначали за реакцією з орциновим реактивом. **Результати.** Встановлено, що екзогенний PQS за концентрацій 40, 60 і 80 мкМ викликає зростання рівня рамноліпідів у 1,9; 3,3 і 5,2 рази, відповідно. Підвищення концентрації сигнального хінолону до 100 і 120 мкМ зменшує його стимулюючу дію на 26% та 50% у порівнянні з рівнем, що був зареєстрований при 80 мкМ PQS. За цієї концентрації кількість планктонних клітин зростає у 3,4 рази, а маса біоплівки вдвічі. Активність синтетичних аналогів залежить від числа атомів вуглецю в ацильному ланцюгу: октил-хінолон (C_8) > нонил-хінолон (C_9) > лаурил-хінолон (C_{11}). Найбільше підвищення рівня біосурфактантів відмічено за присутності 80 мкМ октил-хінолону — на 65%. Два інших аналога підвищують його на 35% і 20%. **Висновки.** Оптимальна концентрація сигнального хінолону (PQS), що максимально підвищує синтез рамноліпідів, дорівнює 80 мкМ. Досліджені синтетичні аналоги PQS поступаються йому в здатності активувати синтез біосурфактантів *P. aeruginosa*.

Ключові слова: рамноліпіди, PQS, синтетичні аналоги PQS, *Pseudomonas aeruginosa*.



Muchlis Abedalabas, M.B. Galkin, A.S. Semenets, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

BIOFILM FORMATION AND RHAMNOLIPIDES BIOSYNTHESIS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 15692 IN PRESENCE OF SIGNALING QUINOLONE AND ITS SYNTHETIC ANALOGS

Summary

Aim. Discovering of the rhamnolipids biosynthesis in *P. aeruginosa* in presence of exogenic concentrations of Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) and its synthetic analogs with different amount of carbon atoms in acyl chain. **Methods.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 cells were incubated for 24 hours in 48-wells plates «Nuclon» in presence of the 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS), or its synthetic analogs (2-octyl-, 2-nonyl- or 2-lauryl-3-hydroxy-4-quinolon). Final concentrations of the discovered substances were from 10 to 120 μM . Rhamnolipids concentrations were determined with the orcinic test. **Results.** It was shown that PQS in concentration 40, 60 и 80 μM causes increase of rhamnolipides level in 1.9; 3.3 and 5.2 times, respectively. Increasing of the PQS concentration to 100 и 120 μM decrease its stimulation effect to 26% and 50% in compare with the level, it was determined with treatment of *P. aeruginosa* culture with 80 μM of PQS. When this concentration was used, planctonic cells numbers increase in 3.4 times, and biofilm mass – twice. Synthetic analogs activity depended on carbon atoms numbers in the acyl chain: octyl-quinolone (C_8) > nonyl-quinolone (C_9) > lauryl-quinolone (C_{11}). The highest level of the biosurfactant stimulation was determined in presence of the 80 μM of the octyl-PQS – up to 65%. Two other analogs increase its level in 35% and 20%. **Conclusions.** Signaling quinolone (PQS) optimal concentration, that increases rhamnolipids biosynthesis in maximum level was 80 μM . Studied synthetic PQS analogs showed the lowest ability to increase biosurfactants biosynthesis in *P. aeruginosa* compare with PQS.

Key words: rhamnolipids, PQS, PQS synthetic analogs, *Pseudomonas aeruginosa*.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Галкін М.Б., Іваниця В.О. Синтез піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* за впливу вісмутових металокомплексів порфіринів та аутоіндукторів системи *quorum sensing* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2013. — № 1. — С. 29–36.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабищ П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Abalos A., Pinazo A., Infante M., Casals M., Garcıa F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes // Langmuir. — 2001. — V. 17. — P. 1367–1371.
4. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 86. — P. 1323–1336.
5. Banat I., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M., Fracchia L., Smyth T., Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential // Applied Microbiology and Biotechnology. — 2010. — V. 87. — P. 427–444.
6. Diggle S.P., Winzer K., Chhabra Siri Ram, Worrall K.E, Cбmara M., Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR // Molecular Microbiology. — 2003. — V. 50, № 1. — P. 29–43.
7. Guerra-Santos L., Kappeli O., Fiechter A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source // Appl. environ. microbiol. — 1984. — V. 48. — № 2. — P. 301–305.
8. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044 // Biotech. Bioeng. — 2003. — V. 81, № 3. — P. 316–322.
9. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants // J. bacteriol — 1991. — V. 173. — № 13. — P. 4212–4219.
10. Mьller M.M., Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: Traditional and advanced engineering towards biotechnological production // Applied. Microbiology and Biotechnology. — 2011. — V. 91, № 2. — P. 251–264.
11. Nguyen T.T., Youssef N.H., McInerney M.J., Sabatini D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation // Water Research. — 2008. — V. 42. — P. 1735–1743.



12. *Ochsner U.A., Reiser J.* Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. — V. 92. — P. 6424–6428.

13. *Pearson J.P., Pesci E.C., Iglewski B.H.* Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes // J. bacteriol. — 1997. — V. 179. — P. 5756–5767.

14. *Piljac G., Piljac V.* Pharmaceutical preparation based on rhamnolipid // USA Patent № 5455232, 3 Oct. 1995.

15. *Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // J. microbiol. methods. — 2000. — V. 40, № 2. — P. 175–179.

16. *Vatsa P., Sanchez L., Clement C., Baillieul F., Dorey S.* Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes // Int. J. Molecular Sci. — 2010. — V. 11. — P. 5095–5108.

17. *Wang Q.H., Fang X.D., Bai B.J., Liang X.L., Shuler P.J., Goddard W.A., Tang Y.C.* Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery // Biotech. Bioeng. — 2007. — V. 98. — P. 842–853.

Стаття надійшла до редакції 07.05.2013 р.



И.А. Скороход¹, А.А. Рой¹, А.И. Мелентьев², И.К. Курдиш¹

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

²Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ФОСФАТМИНЕРАЛИЗУЮЩИХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS* НА СЕМЕНА РАСТЕНИЙ, ПОДВЕРГНУТЫЕ ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕССУ

Цель. Исследование влияния биологически активных веществ, синтезируемых фосфатминерализующими штаммами рода *Bacillus* на семена растений, подвергнутые оксидативному стрессу. **Методы.** Использован ряд микробиологических и биохимических методов исследования.

Результаты. Установлено, что штаммы *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и *Bacillus subtilis* ИБ-22 способны минерализовать глицерофосфат кальция, который являлся единственным источником фосфорного питания, и продуцировать в культуральную среду (КС) биологически активные вещества (БАВ), оказывающие положительное влияние на прорастание, всхожесть семян и развитие проростков. Комплекс БАВ, синтезируемый этими бактериями в КС представлен энзимами, аминокислотами, органическими кислотами, соединениями фенольной природы и др. В каждом классе этих веществ обнаружены соединения, обладающие антиоксидантными свойствами: среди энзимов – каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза; аминокислот – L-метионин, L-лизин, L-гистидин; органических кислот – молочная, пропионовая, масляная. Выше перечисленные БАВ могут принимать участие в снижении оксидативного стресса у семян сельскохозяйственных культур.

Выводы. Биологически активные вещества *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и *Bacillus subtilis* ИБ-22 играют важную роль в защите растений от фитопатогенных бактерий, в частности от штаммов *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter*, которые приносят большие потери урожая зерновых, бобовых и овощных культур.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, биологически активные вещества, аминокислоты, энзимы, оксидативный стресс.

Бактерии рода *Bacillus* Sohn синтезируют ряд биологически активных веществ (БАВ), колонизируют ризосферу культурных растений и стимулируют их рост [3, 5, 9]. Эти микроорганизмы – эффективные агенты биоконтроля фитопатогенных бактерий и микромицетов [6, 7]. Они про-



дуцируют ряд соединений (антибиотики, энзимы, органические кислоты, лектины, вещества фенольной природы и др.) способных вызывать нарушение цикла развития, а также лизис клеточных стенок фитопатогенов [5, 7]. Бациллы являются основой биопрепаратов для многих видов сельскохозяйственных культур [5, 18].

Бактерии рода *Bacillus* Cohn одного и того же вида, выделенные из различных географических регионов, отличаются по количественному и качественному составу БАВ, что обусловлено характеристиками экологических ниш распространения и существования [5]. Основные морфологические и физиолого-биохимические признаки таких бацилл могут совпадать. Однако их биохимические свойства могут различаться, что обусловлено условиями места обитания [5, 9].

Цель работы — исследовать накопление в культуральной среде штаммов *Bacillus subtilis*, выделенных из чернозема различных географических регионов Украины и России, некоторых БАВ, изучить их антагонистическую активность к фитопатогенным бактериям, а также влияние на снижение оксидативного стресса у семян сельскохозяйственных растений.

Материалы и методы

Объектами исследований были штаммы *B. subtilis* ИМВ В-7023 [18], выделенный из черноземной почвы Украины и *B. subtilis* ИБ-22 [19], изолированный из образца почвы типичного чернозема, отобранного на территории республики Башкортостан и поддерживаемый в коллекции микроорганизмов лаборатории прикладной микробиологии Института биологии Уфимского научного центра РАН. Бациллы выращивали в периодических условиях при 28 °С на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, которые содержали 100 мл питательной среды следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; NaCl — 0,3; KCl — 0,3; $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; FeSO_4 — 0,001; CaCO_3 — 5,0; глицерофосфат кальция — 2,0; глюкоза — 10,0; рН 6,8 — 7,2. Среду инокулировали суспензиями бактерий, приготовленными по стандарту мутности, снимая с картофельного агара выросшую культуру и перенося ее в физиологический раствор.

Полученную культуральную жидкость (КЖ) освобождали от клеток *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22 путем центрифугирования на центрифуге ОПн-8 на протяжении 15 мин при 6600 g.

Антагонистическую активность бацилл к фитопатогенным бактериям изучали методом радиальных штрихов [2]. Культуры фитопатогенов представлены музейными штаммами коллекции отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511, *P. fluorescens* 8573, *P. syringae* pv. *atrophaciens* 912, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8003b, *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovora* 8982, *Clavi-*



bacter michiganensis subsp. *michiganensis* 13a, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* 10₂, *Agrobacterium tumefaciens* 8628).

Белок определяли методом Bradford [14], фосфат методом Фиске-Суббароу [10]. Содержание растворимых соединений фенольной природы в культуральной среде (КС) оценивали по методу Фолина и Чокальтеу [15; 17] в модификации Синглетона и Росси [16].

Наличие свободных аминокислот в КС определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе BIOTRONIC LC-2000 (Германия). Качественный и количественный анализ органических кислот проводили на газожидкостном анализаторе Хром 5.

Для исследования антиоксидантного влияния бацилл на семена вики (*Vicia sativa* L.) сорта Маргарита их обрабатывали перекисью водорода (50%) на протяжении 25 мин. Затем отмывали стерильным физиологическим раствором (ФР), помещали в КС соответственного штамма бактерий и выдерживали в течении 1 часа. После этого отмывали ФР, раскладывали на смоченную стерильной водопроводной водой фильтровальную бумагу и проращивали в темноте при 20 °С [8].

Прорастание, всхожесть семян и развитие проростков растений определяли согласно ДСТУ 4138-2002 [1].

Статистическую обработку результатов проводили по Лакину [4].

Результаты и их обсуждение

Показано, что *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22 способны минерализовать глицерофосфат кальция [9]. При выращивании в минеральной среде с глюкозой и глицерофосфатом, исследуемые бациллы с различной скоростью потребляли глюкозу и накапливали в среде фосфатионы (табл. 1). При культивировании *B. subtilis* ИМВ В-7023 в течении 24 часов, концентрация глюкозы снижалась с 10 мг/мл до 1,35 мг/мл (в 7,4 раза), в то время как у *B. subtilis* ИБ-22 ее содержание уменьшалось в 17,2 раза.

Ранее нами были отмечены различия и по фосфатазной активности (ФА) у обоих штаммов. Так, после 48 часов культивирования в среде с глицерофосфатом кальция, ФА *B. subtilis* ИБ-22 составляла всего 6,3% от ФА *B. subtilis* ИМВ В-7023. Исследуемые бактерии отличались и по активности энзимов антиоксидантной защиты (каталазной и пероксидазной). Внеклеточная каталазная активность *B. subtilis* ИБ-22 была в 2 раза выше, по сравнению с *B. subtilis* ИМВ В-7023, а внутриклеточная — на 26%. Внеклеточная пероксидазная активность *B. subtilis* ИМВ В-7023 превышала в 6 раз аналогичный показатель у штамма *B. subtilis* ИБ-22, который характеризовался более высокой внутриклеточной пероксидазной активностью. [9].

Установлено, что исследуемые штаммы бацилл способны синтезировать соединения фенольной природы. Общее количество таких соединений в свободной форме для *B. subtilis* ИМВ В-7023 составляло $20,0 \pm 1,9$ мкг/мл,



Таблица 1
Ростовая активность, потребление глюкозы и накопление фосфата *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22 при выращивании в среде с глицерофосфатом

Table 1
Growth-regulating activity, consumption of glucose and accumulation of phosphate of *B. subtilis* IMV V-7023 and *B. subtilis* IB-22 at growing in medium with calcium glycerophosphate

Время культивирования, сутки	<i>B. subtilis</i> ИБ-22					<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023		
	рН	Численность бактерий, кл/мл	Содержание		рН	Численность бактерий, кл/мл	Содержание	
			PO ₄ ³⁻ , мг/л	глюкоза, мкг/мл			PO ₄ ³⁻ , мг/л	глюкоза, мкг/мл
0	7,1	(4,3±0,9)×10 ⁵	79,0±4,2	10000,0±127,0	7,1	(5,5±0,5)×10 ⁵	79,0±4,2	10000,0±135,7
1	5,9	(1,6±0,2)×10 ⁸	30,0±0,0	580,0±28,1	6,1	(2,7±0,1)×10 ⁸	52,0±3,0	1350,0±131,2
2	6,1	(5,6±0,3)×10 ⁹	46,0±4,0	216,0±10,6	6,6	(3,5±0,3)×10 ⁹	176,0±11,1	600,0±20,8
3	6,3	(7,1±0,2)×10 ⁹	84,0±0,0	108,0±9,8	6,7	(3,6±0,3)×10 ⁹	250,0±8,1	105,0±8,9
4	6,4	(1,2±0,9)×10 ¹⁰	122,0±8,1	70,0±6,9	6,7	(2,8±0,4)×10 ⁹	650,0±6,1	85,0±7,7



а для *B. subtilis* ИБ-22 — $22,0 \pm 2,0$ мкг/мл. Согласно литературным данным [17], эти вещества, помимо широкого спектра свойств, обладают высоким антиоксидантным потенциалом. Они эффективно ингибируют образование пероксидного, алкоксильного, гидроксильного радикалов, супероксидного анион-радикала и синглетного кислорода [16, 17].

Кроме выше указанных соединений бациллы продуцируют ряд свободных аминокислот, качественный и количественный состав которых зависит от времени культивирования бактерий (табл. 2). Более разнообразный качественный состав аминокислот в культуральной среде (КС) обоих штаммов отмечен после 48 часов культивирования.

Особый интерес вызывает наличие в КС бацилл метионина, лизина и гистидина. Эти аминокислоты способны нейтрализовать высокореакционные стресс-агенты, которые могут повреждать протеины, липиды, нуклеиновые кислоты [13]. Благодаря такой активности аминокислоты участвуют в сбалансировании редокс-гомеостаза в клетках микроорганизмов и могут принимать участие в снижении окислительного стресса у растений [12].

Таблица 2

Накопление свободных аминокислот (мкг/мл) *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22 в зависимости от времени культивирования в среде с глицерофосфатом

Table 2

Accumulation of free amino acids (mq/ml) of *B. subtilis* IMV V-7023 and *B. subtilis* IB-22 depending on time of cultivation in medium with calcium glycerophosphate

Аминокислота	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023			<i>B. subtilis</i> ИБ-22		
	24 ч.	48 ч.	72 ч.	24 ч.	48 ч.	72 ч.
Аспарагиновая	0,82	0,88	1,01	0,68	0,68	—
Серин	0,34	0,44	0,17	—	—	—
Глютаминовая	2,77	0,47	1,14	1,5	—	—
Треонин	—	0,19	0,14	0,24	—	—
Глицин	—	0,40	0,46	0,18	0,59	—
Аланин	—	1,07	1,16	0,34	0,42	—
Валин	—	3,61	—	—	—	—
Метионин	—	0,25	1,57	—	0,13	—
Изолейцин	—	0,40	0,28	—	0,66	0,70
Гистидин	—	3,20	2,92	—	2,14	2,86
Лизин	—	1,24	4,85	—	0,50	2,23

Примечание: „—” — аминокислота не обнаружена.



Бациллы также продуцируют органические кислоты, которые могут вносить положительный вклад в процесс защиты растений от фитопатогенов [7]. При исследовании накопления органических кислот *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22 показано, что содержание этих соединений в КС для каждого штамма отличается в зависимости от времени его культивирования (табл. 3). Так, после 24 ч. выращивания в КС *B. subtilis* ИМВ В-7023, обнаружены уксусная, пропионовая, масляная и молочная кислоты, сумма которых составляла 58,7% от общей суммы площадей пиков. Сумма неидентифицированных органических кислот достигала 41,3%. Клетки *B. subtilis* ИБ-22 продуцируют те же кислоты, но их содержание в сумме равно 12,3%, а неидентифицированных — 87,7%. В КС этого штамма не обнаружена молочная кислота, которую в значительных количествах синтезирует *B. subtilis* ИМВ В-7023 (табл. 3). После 48 ч. культивирования бактерий обоих штаммов синтез органических кислот еще больше отличался. Общее содержание идентифицированных органических кислот у *B. subtilis* ИМВ В-7023 увеличивалось с 58,7% до 74,3%, а неидентифицированных — снижалось до 25,6%. Аналогичный показатель в КС *B. subtilis* ИБ-22 за это время возрастал с 12,3% до 50,0%, а сумма неидентифицированных — уменьшалась с 87,0% до 50,0% (табл. 3).

Таблица 3

Содержание органических кислот в культуральной среде *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22

Table 3

Content of organic acids in cultural medium of *B. subtilis* IMV V-7023 and *B. subtilis* IB-22

Органическая кислота	Содержание органических кислот (% от общей суммы площадей пиков)			
	<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023		<i>B. subtilis</i> ИБ-22	
	24 ч.	48 ч.	24 ч.	48 ч.
Уксусная	0,78	27,06	0,30	1,70
Пропионовая	10,73	24,77	1,29	2,90
Масляная	9,93	5,32	10,74	45,40
Молочная	37,24	17,19	—	—
Всего	58,68	74,34	12,33	50,00
Неидентифицированных	41,32	25,60	87,67	50,00

Примечание: „—” — молочная кислота не обнаружена.



Установлено, що досліджувані штамми бацилл мають високу антагоністическу активність до фітопатогенних бактерій, це може бути обумовлено синтезом БАВ різної природи. Бактерії *B. subtilis* ІМВ В-7023 угнетали ріст всіх досліджуваних штамів фітопатогенів. При цьому антагоністическа активність *B. subtilis* ІБ-22 була декількома нижче, ніж у *B. subtilis* ІМВ В-7023. Однак під впливом штамма *B. subtilis* ІБ-22 радіус зони угнетення ріста *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovora* 8982 був на 30% більшим, ніж у *B. subtilis* ІМВ В-7023 (табл. 4).

Таблиця 4

Антагоністическа активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 і *B. subtilis* ІБ-22 до фітопатогенів сільськогосподарських рослин

Table 4

Antagonistic activity of *B. subtilis* IMV V-7023 and *B. subtilis* IB-22 to phytopathogenes of agricultural plants

Штамми фітопатогенних бактерій	Радіус зони (мм) угнетення фітопатогенів бациллами	
	<i>B. subtilis</i> ІМВ В-7023	<i>B. subtilis</i> ІБ-22
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> 8511	7,9 ± 0,4	3,2 ± 0,2
<i>P. fluorescens</i> 8573	4,6 ± 0,3	2,0 ± 0,1
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrophaciens</i> 912	4,0 ± 0,3	3,6 ± 0,2
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8003b	19,6 ± 0,3	19,6 ± 0,3
<i>E. carotovorum</i> subsp. <i>carotovora</i> 8982	7,9 ± 0,6	11,3 ± 0,3
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 13a	16,1 ± 2,6	13,2 ± 0,6
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> 10,	14,0 ± 1,3	9,8 ± 0,9
<i>A. tumefaciens</i> 8628	2,3 ± 0,4	—

Примечание: зона угнетения *Agrobacterium tumefaciens* 8628 отсутствует;

Следует отметить, что синтезируемые бациллами БАВ могут принимать участие в инактивации стресс-агентов. Представляло интерес исследовать влияние КС *B. subtilis* ІМВ В-7023 и *B. subtilis* ІБ-22 на снижение окислительного стресса у семян вики сорта Маргарита. Так, ранее было показано, что *B. subtilis* ІМВ В-7023 оказывал антиоксидантное действие на семена злаковых культур, которые подвергались оксидативному стрессу [8].



Установлено, что после обработки семян вики сорта Маргарита, которые предварительно подвергались действию перекиси водорода на протяжении 25 мин, культуральной средой *B. subtilis* ИМВ В-7023 наблюдали восстановление их всхожести на 51,9% и увеличение количества нормально сформированных проростков — на 58,6%. Это также снижало процент пораженности проросших семян грибами (табл. 5). Обработка семян этого же сорта вики, после действия на них стресс-фактора (H_2O_2), культуральной средой *B. subtilis* ИБ-22 способствовало восстановлению их всхожести на 44,9%, при этом количество нормально сформированных проростков возрастало на 54,2%. Проросшие семена в меньшей степени поражались грибами (табл. 5). Аналогичные данные были получены и для семян яровой пшеницы сорта Торчинская [9].

Таблица 5

Влияние культуральных сред *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22 на всхожесть семян, количество нормально сформированных проростков и степень их поражения грибами

Table 5

Influence of cultural media of *B. subtilis* IMV V-7023 and *B. subtilis* IB-22 on seed germination, amount of the normally formed plantlets and degree of their affection by fungi

Вариант	Всхожесть семян		Количество проростков пораженных грибами		Количество нормально сформированных проростков	
	количество	% к контролю	количество	% к контролю	количество	% к контролю
Контроль, H_2O_2	28,3 ± 1,1	100,0	24,3 ± 2,3	100,0	22,7 ± 4,9	100,0
H_2O_2 + КС <i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023	43,0 ± 0,0	151,9	10,0 ± 1,0	41,2	36,0 ± 3,2	158,6
H_2O_2 + КС <i>B. subtilis</i> ИБ-22	41,0 ± 0,0	144,9	9,0 ± 0,8	37,0	35,0 ± 2,9	154,2

Примечание: контроль — семена, обработанные 50% H_2O_2 на протяжении 25 мин; всхожесть семян не подвергнутых действию H_2O_2 составляла 41,0 шт. из 50.

Проведенные исследования свидетельствуют, что антиоксидантные системы семян не справляются с нарастанием оксидативного стресса, который вызван высокими концентрациями оксиданта при его продолжительном действии. Соответственно в клетках возникает ряд повреждений важных биомолекул, которые ведут к гибели целого организма [12]. Нами показано, что восстановлению редокс-состояния семян способствуют бактерии рода *Bacillus*. Следует отметить, что эти микроорганизмы обладают сложным протекторным комплексом, который состоит из соединений как энзимной, так и неэнзимной природы.



Таким образом, штаммы *B. subtilis* ИМВ В-7023 и *B. subtilis* ИБ-22, благодаря синтезу ряда биологически активных веществ (энзимы, аминокислоты, органические кислоты, соединения фенольной природы и др.), могут оказывать положительное влияние на прорастание, всхожесть семян и развитие проростков. По-видимому, комплекс этих соединений играет значительную роль в защите растений от фитопатогенов и позволяет снижать окислительный стресс у семян, подвергнутых действию активных форм кислорода.

І.О. Скороход¹, А.О. Рой¹, О.І. Мелентьев², І.К. Курдиш¹

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

²Інститут біології Уфимського наукового центру РАН, Уфа

ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ФОСФАТМІНЕРАЛІЗУЮЧИХ ШТАМІВ РОДУ *BACILLUS* НА НАСІННЯ РОСЛИН, ЯКЕ ЗАЗНАЛО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

Реферат

Мета. Дослідження впливу біологічно активних речовин, що синтезуються фосфатмінералізуючими штамми роду *Bacillus* на насіння рослин, яке зазнало оксидативного стресу. **Методи.** Використано ряд мікробіологічних і біохімічних методів. **Результати.** Встановлено, що штамми *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 і *Bacillus subtilis* ИБ-22 здатні мінералізувати гліцерофосфат кальцію, який в середовищі був єдиним джерелом фосфорного живлення, і продукувати в культуральне середовище (КС) біологічно активні речовини (БАР), які позитивно впливають на проростання, схожість насіння і розвиток проростків. Комплекс БАР, що синтезується цими бацилами в КС включає ензими, амінокислоти, органічні кислоти, сполуки фенольної природи та ін. В кожному класі цих речовин виявлені сполуки, які мають антиоксидантні властивості: серед ензимів — каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза; амінокислот — L-метіонін, L-лізин, L-гістидин; органічних кислот — молочна, пропіонова, масляна. Вище перераховані БАР можуть брати участь у зниженні оксидативного стресу у насіння сільськогосподарських культур. **Висновки.** Біологічно активні речовини *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 і *Bacillus subtilis* ИБ-22 відіграють важливу роль у захисті рослин від фітопатогенних бактерій, зокрема від штамів *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter*, які завдають значної шкоди урожаю зернових, бобових та овочевих культур.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, біологічно активні речовини, амінокислоти, ензими, оксидативний стрес.



I.O. Skorochod¹, A.O. Roy¹, O.I. Melentiev², I.K. Kurdish¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

²Institute of Biology, Ufa Scientific Centre of RAS, Ufa

INFLUENCE OF BIOACTIVE SUBSTANCES PHOSPHATE-MINERALIZING STRAINS GENUS *BACILLUS* ON PLANTS SEEDS EFFECTED BY OXIDATIVE STRESS

Summary

The **aim** of work was to investigate the influence of some bioactive substances of phosphate-mineralizing strains genus of *Bacillus* on the seeds of plants effected by oxidative stress. **Methods.** Using a number of microbiological and biochemical methods. **Results.** It was determined that strains of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 and *Bacillus subtilis* IB-22 able to mineralize neurosin that in medium was the only source of phosphoric feed, and product here a row biologically active substances (BAS), that positively influence on a germination, likeness of seed and development of plantlets. A complex BAS, that is synthesized by these bacilli in a cultural medium are enzymes, amino acids, organic acids, connections of phenolic nature and other. In every class of these substances found out connections, possessing antioxidant properties: among enzymes is catalase, peroxidase, superoxide dismutase; amino acids – L-methionine, L-lysin, L-histidin; organic acids – lactic, propionic, butyric. Higher enumerated BAS can take part in the decline of oxidative stress at the seed of agricultural cultures. **Conclusions.** It is also set that the bioactive substances of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 and *Bacillus subtilis* IB-22 play an important role protecting of plants from phytopathogenic bacteria. In particular from the strains of *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Clavibacter*, that inflict severe losses to the harvest of grain, leguminous and vegetable crops.

Key words: *Bacillus subtilis*, biologically active substances, amino acids, enzymes, oxidative stress.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Чинний від 2004-01-01. — Київ: Держспоживстандарт України, 2003. — 173 с.
2. Егоров Н. С. Практикум по микробиологии. — Москва: Изд-во МГУ, 1976. — 307 с.
3. Курдиш I.K. Интродукция микроорганизмов у агроэкосистемы. — Київ:Наук. думка. — 2010. — 253 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1968. — 24 с.



5. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Сohn в агроэкосистемах. — Москва: Наука, 2007. — 149 с.
6. Рой А.А., Рева О.Н., Курдиш И.К., Смирнов В.В. Биологические свойства фосфатмобилизирующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40, № 5. — С. 551–557.
7. Рой А.А., Пасичник Л.А., Церковняк Л.С., Ходос С.Ф., Курдиш И.К. Влияние бактерий рода *Bacillus* на возбудителя бактериального рака томатов // Микробиол. журн. — 2012. — Т. 74, № 5. — С. 74–80.
8. Скороход І.О., Церковняк Л.С., Курдиш І.К. Антиоксидантна дія *Bacillus subtilis* і *Azotobacter vinelandii* на насіння злакових культур // Микробиол. журн. — 2011. — Т. 73, № 1. — С. 44–50.
9. Скороход И.А., Рой А.А., Курдиш И.К., Мелентьев А.И. Некоторые биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, выделенных из чернозема различных географических регионов. Сборник материалов VIII Междун. конфер. 19–22 ноября 2012. Киев: Микробные биотехнологии: актуальность и будущее. daRstim 2012. — С. 299–300.
10. Унифицированные методы анализа вод / Под ред. Ю.Ю. Лурье. — М.: Химия, 1971. — 207 с.
11. Церковняк Л.С. Біологічно активні сполуки *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 і *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 та їх вплив на рослини: Автореф. дис. канд. біол. наук. — Київ, 2011. — 23 с.
12. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. УФА: Гилем, 2001. — 160 с.
13. Штаркман И.Н., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование перекиси водорода и гидроксильных радикалов в водных растворах L-аминокислот при воздействии рентгеновского излучения и тепла // Биофизика. — 2008. — 53, вып. 1. — С. 5–13.
14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — 72. — P. 248–254.
15. Folin O., Ciocalteu V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins // J. Biol. Chem. — 1927. — V. 73, № 2. — P. 627–650.
16. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phoungstic acid reagent // Am. J. Enol. Vitic. — 1965. — V. 16. — P. 144–158.
17. Wrolstad R.E., Wiley V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent // Methods in Enzymology. — 1999. — V. 299. — P. 152–178.
18. Патент України № 54923 А. Штам *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. / Опубл. 17.03 2003. Бюл. № 3.
19. Патент RU 2178970, МКИ А 01 N 63/00. Штам *Bacillus subtilis* ИБ-22 — продуцент цитокининов / Мелентьев А.И., Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Архипова Т.Н., Гильванова Е.А., Усанов Н.Г., Кузьмина Л.Ю., Симонян М.В., Бюл. №4, опубл. 10.02.2002.

Стаття надійшла до редакції 17.04.2013 р.



УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, М.М. Панченко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова.
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел. +38(0482)63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

МАТЕМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ШТАМУ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU87

Мета. Оптимізація складу поживного середовища для культивування молочнокислих бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 з одночасним вивченням впливу компонентів різних поживних середовищ на ростові характеристики і антагоністичну активність цих бактерій. **Методи.** Антагоністичну активність штаму *L. plantarum* ONU87 по відношенню до *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* визначали методом подвійних агарових шарів. Титр агробактерій визначали методом серійних розведень з наступним висівом на щільне середовище MRS. Оцінку впливу кожного чинника поживного середовища на показники, що перевіряли, здійснювали за допомогою неповної регресійної моделі. Оптимізація середовища базувалася на плануванні з використанням центрального композиційного ортогонального експерименту. Параметром оптимізації слугував показник концентрації бактерій. **Результати.** У результаті проведених досліджень встановлено, що на накопичення бактерій та їх антагоністичну активність впливають склад компонентів поживних середовищ та їх співвідношення, що було показано у одержаних математичних моделях. Кінцевим результатом проведених досліджень є поживне середовище OLB (глюкоза – 22,5 г/л, пептон – 8,5 г/л, дріжджовий екстракт – 4,5 г/л, K_2HPO_4 – 6,0 г/л, Na цитрат – 2,0 г/л, $CH_3COONa \times 3H_2O$ – 25,0 г/л, $MgSO_4$ – 0,2 г/л, $MnSO_4$ – 0,2 г/л та $Fe SO_4$ – 0,05 г/л), за росту на якому концентрація лактобактерій у стаціонарній фазі росту зростає до $3,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ кл/мл. **Висновки.** Математичне планування експерименту дозволило при незначній зміні кількісного складу поживного середовища значно збільшити накопичення біомаси.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, антагоністична активність до *Rhizobium radiobacter*, оптимізація поживного середовища, математична модель, коефіцієнт регресії, центральний композиційний ортогональний експеримент.

У попередніх дослідженнях було встановлено антагоністичні властивості бактерій *Lactobacillus plantarum*, які є нормальними мешканцями філосфери та ризосфери рослин, до фітопатогенних бактерій [8].

© Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, М.М. Панченко, В.О. Іваниця, 2013



Антагоністична активність лактобактерій зумовлена дією неспецифічних (органічні кислоти, низький окисно-відновний потенціал, конкурентність за поживні речовини) та специфічних (антибіотики та бактеріоцини) факторів [12]. На сьогодні, саме використання пробіотичних бактерій є альтернативою хімічним методам боротьби з фітопатогенами [11].

Для розробки пробіотичних препаратів постає задача оптимізації складу поживного середовища, оскільки, кожен штам бактерій має свої особливості росту та харчові потреби. Традиційно склад поживного середовища визначається методом тривалого емпіричного підбору, в ході якого визначається якісний і кількісний склад компонентів середовища. На сьогодні для полегшення цієї задачі все частіше застосовують математичний апарат [5, 7, 10]. Використання математичних методів планування і обробки результатів експериментів значно скорочує трудомісткість і тривалість виконання цієї задачі. Планування експерименту дозволяє варіювати одночасно важливі фактори і отримувати кількісні оцінки як самих факторів, так і ефектів взаємодії між ними [7]. Молочнокислі бактерії потребують складний набір мінеральних і органічних компонентів середовища, що вимагає уважного та цілеспрямованого підходу до їх вибору та збалансування [1, 13].

Метою роботи були математичний аналіз на підставі неповної лінійної регресії впливу компонентів поживних середовищ, їх сумісної дії на показники росту та антагоністичну активність штаму *L. plantarum* ONU87 та оптимізація складу поживного середовища з застосуванням методу математичного планування експерименту на підставі центрального композиційного ортогонального плану.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU87 [8] та патогенний штам *Rhizobium radiobacter* C58, що викликає бактеріальний рак винограду, люб'язно наданий Ф.І. Товкачем з Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ.

Для культивування молочнокислих бактерій використовували різні поживні середовища, які відрізняються якісним і кількісним складом інгредієнтів (табл. 1). Поживні середовища були виготовлені на основі рецептур фірми HiMedia Laboratories Pvt. Limited (<http://www.himedialabs.ru/>).

Лактобактерії культивували у колбах об'ємом 250 мл у 50 мл середовища за температури 37 °С впродовж 60 год. Середовища засівали посівним матеріалом, який вирощували на середовищі MRS протягом 24 год.

Титр лактобактерій визначали методом серійних розведень з наступним висівом на щільне середовище MRS [4, 6]. Для розрахунку питомої швидкості росту бактерій (μ) і часу подвоєння (T) використовували стандартні методики [4, 6].



Таблиця 1

Склад застосованих поживних середовищ(г/л)

Table 1

Composition of culture media used in the experiment (g/l)

Компоненти середовища	MRS	LP 048	LP641	LP 927	LP407	LP1180	LP2	LP4	LP5	LP 7
Казеїн			10,0	10,0						
Пептон	10,0	15,0			10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Дріжджовий екстракт	5,0	5,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Глюкоза	20,0	10,0	20,0	20,0	10,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Сахароза					5,0					
Арабіноза					5,0					
МПБ	10,0		10,0	10,0			5,0	5,0		5,0
Томатний сік				20,0					20,0	20,0
KCl				2,0						
Натрій оцтовокислий	5,0		5,0		15,0	25,0	5,0			
Амоній лимоннокислий			2,0		2,0	2,0				2,0
Na ₂ HPO ₄			2,0				6,0			
K ₂ HPO ₄	2,0	2,0			6,0	6,0		6,0		
MgSO ₄	0,6		0,1		0,6	0,6	0,5	0,1		
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,2								
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,2	0,05	0,05		0,2	0,2	0,1	0,05		



Антагоністичну активність досліджуваного штаму лактобацил по відношенню до *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* визначали методом подвійних агарових шарів на середовищі LB при 28 °C [3, 12]. Ступінь антагоністичної активності оцінювали за шкалою: «» — відсутність антагоністичної активності (зони інгібування росту *Rhizobium radiobacter* C58 відсутні); «+» — низька антагоністична активність (діаметр зони інгібування росту — до 0,3 см), «++» — середня антагоністична активність (діаметр зони інгібування росту — 0,3–0,5 см); «+++» — висока антагоністична активність (діаметр зони інгібування росту більше 0,5 см).

Для розрахунку лінійної регресійної моделі використовували метод найменших квадратів [2, 10]. Склад середовища оптимізували за допомогою центрального композиційного ортогонального експерименту [7]. Критерієм оптимізації слугувала концентрація життєздатних бактерій.

Математичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2007 і MatLab R2009a.

Результати та їх обговорення

За росту на середовищах різного складу було визначено концентрацію бактерій *L. plantarum* ONU87 на момент виходу культури в фазу стаціонарного росту, обчислено питому швидкість росту та період подвоєння бактерій (табл. 2).

Таблиця 2

Показники характеристик росту штаму *L. plantarum* ONU87
на середовищах різного складу

Table 2

Indicators of strain *L. plantarum* ONU87 growth characteristics
on different media

Середовище	Питома швидкість росту, год ⁻¹	Період подвоєння, год	Концентрація бактерій у фазі стаціонарного росту, КУО/мл
MRS	0,27	2,56	3,9±0,3×10 ⁷
LP 048	0,21	3,30	9,1±0,1×10 ⁸
LP 641	0,16	4,33	8,0±0,6×10 ⁸
LP 927	0,16	4,33	4,4±0,1×10 ⁶
LP 407	0,25	2,77	1,2±0,1×10 ⁶
LP 1180	0,36	1,92	5,7±0,4×10 ⁹
LP 2	0,12	5,77	4,1±0,1×10 ⁸
LP 4	0,34	1,87	8,0±2,9×10 ⁶
LP 7	0,12	5,57	4,1±0,1×10 ⁸



Як видно з наведених даних, ріст молочнокислих бактерій *L. plantarum* ONU87 закономірно залежить від складу поживних середовищ, що відображається в відмінностях між ростовими характеристиками. Так, наприклад, максимальний показник концентрації клітин у фазі стаціонарного росту – $5,7 \pm 0,4 \times 10^9$ КУО/мл реєстрували за культивування штаму на середовищі LP 1180, а мінімальне значення цього показника ($1,2 \pm 0,1 \times 10^6$ КУО/мл) – на середовищі LP 407 (табл. 2, рис. 1).

Саме на середовищі LP 1180 реєстрували найбільші значення питомої швидкості росту ($0,36 \text{ год}^{-1}$) та короткий час подвоєння кількості клітин – 1,92 години (табл. 2).

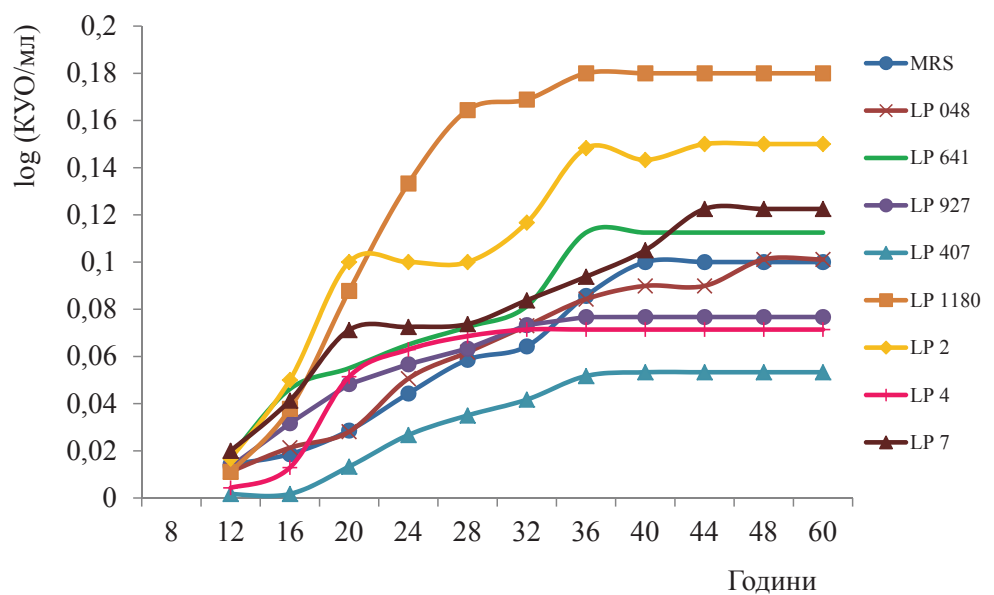


Рис. 1. Криві росту штаму *L. plantarum* ONU87 на середовищах різного складу

Fig. 1. The growth curves of strain *L. plantarum* ONU87 on different media

Аналіз динаміки кислотності середовища показав, що на відміну від стрімкого зниження рН на середовищі MRS (до рН 3,0), при використанні середовищ LP 1180, LP 407, LP 641 та LP 4 мало місце більш повільне зниження рН. У цих варіантах досліду після 36 години культивування показники кислотності середовища стабілізувалися на рівні рН 4,0 і до моменту закінчення культивування (60 год) не змінювалися.

Антагоністичну активність *L. plantarum* ONU87 по відношенню до збудника бактеріального раку винограду *R. radiobacter* C58 визначали через 12, 20, 24, 36, 48, 60 годин культивування бактерій. Показано, що найвищу антагоністичну активність *L. plantarum* ONU87 продемонстрував на середовищах LP 1180, LP 641, LP 2, LP 407 та LP 4 (табл. 3).



Таблиця 3

Антагоністична активність *L. plantarum* ONU87 до *R. radiobacter* C58
на середовищах різного складу

Table 3

Antagonistic activity of *L. plantarum* ONU87 growing on different culture
media compared with *R. radiobacter* C58

Середовище	Час					
	12 год	20 год	24 год	36 год	48 год	60 год
MRS	+	+	—	—	—	—
LP 048	++	+++	++	+	—	—
LP 641	++	+++	+++	+++	+++	++
LP 927	++	+++	+++	++	+	—
LP 407	++	+++	+++	+++	++	++
LP 1180	++	+++	+++	+++	+++	+++
LP 2	++	+++	+++	+++	++	—
LP 4	++	+++	+++	++	++	—
LP 7	++	++	+	+	—	—

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз (рис. 2) статистично підтвердив існування достовірного розходження між показниками, що контролювали (табл. 2 і 3). Достовірність підтверджена за допомогою порівняння табличного і розрахованих значень критерію Фішера ($F_{\text{табл}} < F_{\text{факт}}$) і визначення статистичної значимості різниці між середніми значеннями.

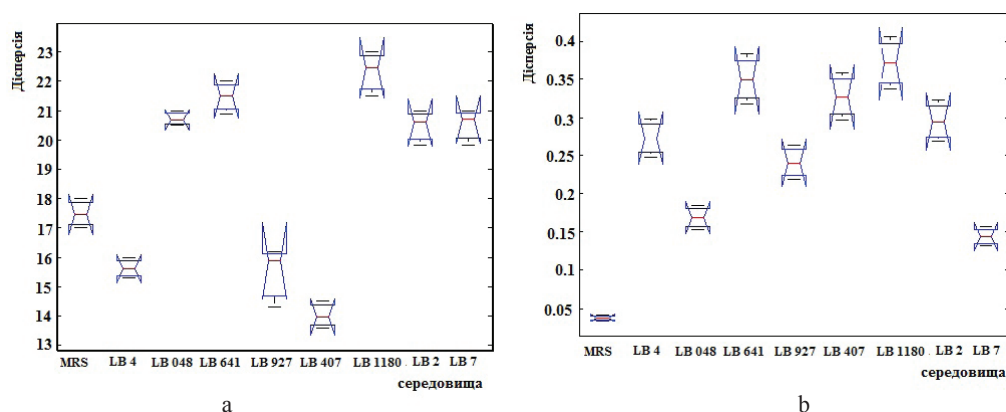


Рис. 2. Результати однофакторного дисперсійного аналізу

a — концентрація бактерій, КУО/мл, b — рівень антагоністичної активності

Fig. 2. The results of single-factor dispersion analysis

a — the concentration of bacteria, CFU/ml, b — the level of antagonistic activity



При перевірці різниці між показниками концентрації молочнокислих бактерій та рівнями антагоністичної активності підтверджено, що нерівність існує: $F_{\text{tab}}(19,16) < F_{\text{факт}}(76,52)$ для показника КУО/мл та $F_{\text{tab}}(19,16) < F_{\text{факт}}(58,52)$ для рівня антагоністичної активності.

За оцінювання ступеня впливу кожного з компонентів поживних середовищ на досліджувані показники за допомогою неповної регресійної моделі, особливу увагу звертали на показники математичного очікування, значення якого, відповідно до закону нормального розподілу, повинно бути мінімальним (у найкращому випадку $M(\hat{u}) \approx 0$), на показники дисперсії (σ) і значення квадрата помилки моделі (MSE), значення яких так само має бути мінімальним.

Вибір найбільш адекватної моделі серед усіх прорахованих, проводили на підставі отриманих статистичних оцінок. Це допомогло визначити вплив кожного компонента поживних середовищ, використаних у експерименті на показник, що перевірявся.

Незалежними змінними для побудови моделі вибрали: x_1 -пептон, x_2 – дріжджовий екстракт, x_3 – глюкоза, x_4 – м'ясо-пептонний бульйон, x_5 – натрій оцтовокислий ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), x_6 – цитрат амонію ($\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_7\text{N}_3$), x_7 – гідроортофосфат натрію (Na_2HPO_4), x_8 – гідроортофосфат калію (K_2HPO_4).

Значення коефіцієнта регресії характеризує ступінь впливу відповідного фактора на ріст і активність культури бактерії. Найбільш значущі розраховані моделі наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Математичні моделі, розраховані на підставі неповної регресії, та їх статистичні оцінки для показників, що перевіряли

Table 4

The mathematical models, calculated on the basis of incomplete regression and statistical estimates for verifiable biological indicators

Математичні моделі по показнику загальної кількості клітин						
Індекс моделі	Модель	sigma	MSE	MAPE	Fst	$M(\hat{u})$
A	$Y = 2,015x_1 + 0,52x_2 + 0,26x_3 - 0,54x_4 + 0,057x_5 - 1,80x_6 - 1,05x_7$	0,102	0,022	0,015	521,54	-5,28e-013
B	$Y = 1,03x_1 + 0,32x_3 - 0,067x_5 - 0,45x_6 + 0,86x_8$	0,16	1,40	0,43	252,54	-2,06e-013
Математичні моделі по показнику рівня антагоністичної активності						
A1	$Y = 0,05x_1 - 0,18x_2 + 0,13x_3 - 0,22x_4 + 0,09x_5 - 0,44x_6 + 1,26x_7$	0,39	0,088	18,78	15,10	-4,78e-014
B1	$Y = 0,14x_1 + 0,078x_3 + 0,07x_5 - 1,44x_6 + 1,21x_8$	0,39	0,17	29,32	22,32	-1,95e-014



Аналізуючи наведені у таблиці 4 моделі, можна дослідити закономірну зміну коефіцієнтів регресії в залежності від кожного досліджуваного показника.

Наприклад, коефіцієнти регресії при змінних x_1 (пептон), x_2 (дріжджовий екстракт) та x_3 (глюкоза) були максимальними для моделей, що описують вплив компонентів поживних середовищ на концентрацію бактерій (моделі А та В) (табл. 4). Проведена математична обробка статистично підтвердила, що дійсно, для росту культури молочнокислих бактерій необхідні середовища складного багатокomпонентного складу. В даному випадку значення коефіцієнтів регресії значно перевищували величину довірчого інтервалу ($\Delta b_i = 0,005$), що вказує на необхідність включення до складу органічної складової поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій усіх зазначених факторів.

Величини коефіцієнтів регресії при змінних x_5 (натрій оцтовокислий), x_6 (цитрат амонію), x_7 (гідроортофосфат натрію) та x_8 (гідроортофосфат калію) були незначними, що свідчить про те, що ці компоненти поживних середовищ менш пріоритетні для росту досліджуваних бактерій, у порівнянні з вищезазначеними. Отримані за допомогою математичного аналізу дані повністю співпадають з літературними джерелами [13, 9]. Лактобактерії є ауксотрофними організмами і тому вимогливі до складу штучних поживних середовищ [9]. Для їх росту в поживне середовище вносять різні добавки: дріжджовий екстракт, дріжджовий автолізат, які містять незамінні амінокислоти та вітаміни.

І, навпаки, саме змінні x_5 , x_6 , x_7 та x_8 мають більше значення для антагоністичної активності штаму *L. plantarum* ONU87 (табл. 4). В моделях А1 і В1 виявлено зростання величин коефіцієнтів регресії при цих змінних майже у 10 разів (табл. 4) у порівнянні з моделями А і В (табл. 4).

Пріоритетні для цих моделей фактори x_7 (Na_2HPO_4) і x_8 (K_2HPO_4) є джерелами фосфору, який необхідний мікроорганізмам для синтезу ряду найважливіших фосфатовмісних сполук.

На підставі отриманих даних (табл. 2 і 3) та результатів математичного аналізу (табл. 4) можна зробити висновок, що найбільш сприятливим середовищем для культивування штаму *L. plantarum* ONU87 є середовище LB 1180, яке може бути використане для подальшої оптимізації за допомогою центрального ортогонального композиційного експерименту.

Грунтуючись на отриманих результатах, для подальшої роботи з оптимізації поживного середовища вибрали комбінацію з пептону, дріжджового екстракту та глюкози, що позначатимуться як чинники: x_1 — глюкоза, x_2 — пептон, x_3 — дріжджовий екстракт. Кожен з цих факторів досліджували на трьох рівнях (нижньому, середньому і верхньому) (табл. 5) та у «зоряних точках» (табл. 6). Виходячи зі складу поживних середовищ, використаних в попередніх експериментах, визначили верхні і нижні рівні значущих чинників (табл. 5).



Таблиця 5

Одиниці варіювання (λ) і концентрації компонентів середовищ на нижньому (-1), середньому (0) і верхньому рівнях (+1)

Table 5

The variation units (λ) and the concentration of media components on the bottom (-1), the middle (0) and upper levels (+1)

Чинники	Фактор	Нижній рівень (-1)	Середній рівень (0)	Верхній рівень (+1)	Одиниця варіювання (λ)
Глюкоза	x1	15,0	20,0	25,0	5,0
Пептон	x2	7,0	10,0	13,0	3,0
Дріжджовий екстракт	x3	2,5	5,0	7,5	2,5

Взагалі, розробка математичної моделі у центральному ортогональному композиційному плані передбачає принцип від «простого до складного». У вигляді полінома цей принцип означає перехід від полінома першого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j$ до полінома другого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n x_i^2$.

Проведення факторного експерименту полягає у визначенні впливу обраного чинника на показник оптимізації. При плануванні за такою схемою реалізовані всі можливі комбінації, які наведені у таблиці 6.

Для розрахунку поточної дисперсії ($S_{y_u}^2$) кожен дослід здійснювали у трьох повторях, на основі чого отримали необхідні для 5% рівня значимості результати, за якими визначали дисперсію їх відтворюваності, а з урахуванням критерію Стюдента і меж значущості коефіцієнтів регресії (табл. 6).

На підставі коефіцієнтів регресії після проведення центрального ортогонального композиційного експерименту отримана математична модель залежностей концентрації бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 (Y) від концентрацій у середовищі компонентів x_1 , x_2 , x_3 :

$Y = 0,43 - 0,58x_1 + 0,7x_2 + 0,19x_3 + 0,2x_1x_3 + 0,19x_2x_3 + 0,59x_1^2 + 0,71x_2^2 + 0,98x_3^2$, де x_1 — глюкоза, x_2 — пептон, x_3 — дріжджовий екстракт, Y — концентрація бактерій.

Після знаходження коренів рівнянь, обчислювали пошукувані концентрації факторів середовища використовуючи формулу:

$$c_i = x_i \lambda + c_{0i}$$

де x_i — кодоване значення фактора (безрозмірна величина); c_i та c_{0i} — натуральні значення фактора (відповідно поточне значення і значення на нульовому рівні); λ — натуральне значення інтервалу варіювання факторів (ΔC) [7].



Таблиця 6

Матриця планування експерименту, розраховані значення коефіцієнтів регресії та їх статистичні оцінки

Table 6
The planning matrix of the experiment, the calculated values of the regression coefficients and their statistical evaluation

Дослід	Рівні факторів										Значення показника оптимізації		Дисперсія S_{y_a}
	x_1	x_2	x_3	x_1^2	x_2^2	x_3^2	$x_1 x_2$	$x_1 x_3$	$x_2 x_3$	$x_1 x_2 x_3$	$\bar{y} \pm \Delta$		
1	-1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	3,4±0,2	0,28	
2	+1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	-1	-1	-1	3,9±0,7	0,37	
3	-1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	+1	+1	-1	3,5±0,5	0,30	
4	+1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	-1	-1	-1	3,5±0,3	0,31	
5	-1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	-1	-1	3,2±0,7	0,26	
6	+1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	-1	+1	+1	+1	4,2±0,1	0,43	
7	-1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	3,7±0,1	0,34	
8	+1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	0	0	0	0	4,9±0,2	0,59	
9	-1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	3,4±0,1	0,28	
10	+1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	3,1±0,1	0,24	
11	0	-1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	3,6±0,1	0,32	
12	0	+1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	3,5±0,3	0,30	
13	0	0	-1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	4,0±0,2	0,39	
14	0	0	+1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	3,9±0,1	0,37	
15	0	0	0	-0,73	-0,73	-0,73	0	0	0	0	3,1±0,1	0,23	
Дисперсія відтворюваності S_{b_i}	0,20												
Коефіцієнт регресії	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_1^2	b_2^2	b_3^2	$b_1^2 b_2^2$	$b_1^2 b_3^2$	$b_2^2 b_3^2$	b_0
	-0,58	0,7	0,20	-0,03	0,20	0,19	0,59	0,71	0,98	значущий	значущий	значущий	0,43
Висновок	Y=0,43-0,58x ₁ +0,7x ₂ +0,20x ₃ +0,2x ₁ x ₃ +0,19x ₂ x ₃ +0,59x ₁ ² +0,71x ₂ ² +0,98x ₃ ²												
	Критерій Кохрена G = 0,12												
	Критерій Фішера F = 2,49												

За розрахунковими показниками оптимізоване поживне середовище (середовище OLB) для збільшення загальної кількості бактерій *L. plantarum* ONU87 має наступний склад (г/л): глюкоза — 22,5, дріжджовий екстракт — 4,5, пептон — 8,5, натрій оцтовокислий — 25,0, гідроортофосфат калію — 6,0, цитрат амонію 3-х заміщений — 2,0, сульфат магнію, марганцю і заліза в слідових кількостях.

При перевірці оптимізованого середовища OLP, отриманого за результатами центрального ортогонального композиційного експерименту, показано, що концентрація бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 досягала значення $3,51 \pm 0,10 \times 10^{10}$ кл/мл у порівнянні з $5,7 \pm 0,4 \times 10^9$ кл/мл на вихідному середовищі. При цьому питома швидкість росту складала 0,34 год⁻¹.

Таким чином, за математичного аналізу впливу складу поживних середовищ на показники концентрації бактерій та рівня антагоністичної активності, можна зробити висновок, що найбільш значущими для росту культури молочнокислих бактерій є глюкоза, дріжджовий екстракт та пептон. Дослідженнями методом математичного планування експерименту, з використанням центрального композиційного ортогонального експерименту, оптимізовано поживне середовище, яке дозволяє суттєво підвищити врожай бактерій пробіотичного штаму *L. plantarum* ONU87.

УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильева, Н.В. Коротаева, Н.Н. Панченко, В.А. Іваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ШТАММА *LACTOBACILLUS* *PLANTARUM* ONU87

Реферат

Цель. Целью данной работы была оптимизация состава питательной среды для культивирования штамма молочнокислых бактерий *L. plantarum* ONU87 с одновременным изучением влияния компонентов различных питательных сред на ростовые характеристики и антагонистическую активность этих бактерий. **Методы.** Антагонистическую активность штамма лактобацилл относительно *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* определяли методом двойных агаровых слоев. Титр агробактерий определяли методом серийных разведений с последующим высевом на плотную среду MRS. Оценку влияния каждого фактора



питательных сред на исследуемые показатели проводили с помощью неполной регрессионной модели. Оптимизация среды проведена с использованием центрального композиционного ортогонального эксперимента. Параметром оптимизации служил показатель концентрации бактерий. **Результаты.** В результате проведенных исследований показано, что на накопление бактерий и их антагонистическую активность влияет состав компонентов питательных сред и их соотношение, что было доказано с помощью полученных математических моделей. Конечным результатом проведенных исследований являлась питательная среда OLB (глюкоза — 22,5 г/л, пептон — 8,5 г/л, дрожжевой экстракт — 4,5 г/л, K_2HPO_4 — 6,0 г/л, Na цитрат — 2,0 г/л, $CH_3COONa \times 3H_2O$ — 25,0 г/л, $MgSO_4$ — 0,2 г/л, $MnSO_4$ — 0,2 г/л и $FeSO_4$ 0,05 г/л), при росте на которой концентрация лактобактерий в стационарной стадии роста возросла до $3,51 \pm 0,10 \times 10^{10}$ кл/мл. **Выводы.** Математическое планирование эксперимента позволило при незначительном изменении количественного состава питательной среды, значительно увеличить накопление биомассы.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, антагонистическая активность к *Rhizobium radiobacter*, оптимизация питательной среды, математическая модель, коэффициент регрессии, центральный композиционный ортогональный эксперимент.

UDC 579.852.11.24

N.Yu. Vasylieva, N.V. Korotaeva, M.N. Panchenko, V.O. Ivanytsia

Odesa Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

MATHEMATICAL ANALYSIS AND OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR STRAIN *LACTOBACILLUS* *PLANTARUM* ONU87

Summary

Aim. The aim of this work was to optimize the composition of the nutrient medium for cultivation the strain *L. plantarum* ONU87 of lactic acid bacteria while studying the impact of various components of culture media on the growth characteristics and antagonistic activity of these bacteria. **Methods.** The antagonistic activity of the strain *L. plantarum* ONU87 relatively to *Rhizobium radiobacter* C58 in vitro was determined by the double agar layer. The titer was determined by method of serial delutions of *Rhizobium radiobacter* C58 followed by plating on solid medium MRS.



Methodological basis for the work were well-known methods, which allowed determine the quantitative values of the index CFU/ml and antagonistic activity. Assess the impact of each factor of the growth media on verifiable indicators was performed using the partial regression model. Optimization of culture medium was performed using the central composite orthogonal design. The indicator of bacterial concentration served as a parameter optimization. **Results.** The studies show that the accumulation of bacteria and their antagonistic activity depends on the components of culture media and their relationship, which was proved by mathematical models. The final result of the research was the new culture medium – OLB (glucose – 22.5 g/l, peptone – 8.5 g/l, yeast extract – 4.5 g/l, K_2HPO_4 – 6.0 g/l, Na citrate – 2.0 g/l, $CH_3COONa \times 3H_2O$ – 25.0 g/l, $MgSO_4$ – 0.2 g/l, $MnSO_4$ – 0.2 g/l $FeSO_4$ – 0.05 g/l) by using it the concentration of lactic acid bacteria in the stationary phase of growth increased to $3.51 \pm 0.10 \times 10^{10}$ CFU/ml. **Conclusion.** It has been shown that the mathematical design of the experiments, allows with little change in the quantitative composition of the culture medium, significantly increase the accumulation of biomass.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, culture media, antagonistic activity, optimization, the mathematical model, the regression coefficients, the central composite orthogonal design.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дзержинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов . – Астрахань: Изд-во АГТУ., 2008. – 348 с.
2. Дронов С.В. Многомерный статистический анализ. – Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та., 2003. – 213 с.
3. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – 44, № 6. – С. 33–40.
4. Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов: учеб. пособие / Под ред. В.П. Гончаровой. – Л.: Лен. ун-т, – 1983. – 188 с.
5. Конькова Н.К. Пути усовершенствования питательных сред, используемых в технологии производства медицинских и ветеринарных пробиотиков : Автореф. дис. канд. биол. наук. Н. Новгород, 2002. – 21 с.
6. Методы общей бактериологии: В 3 т. /Под ред. Ф. Герхарда и др. – М.: Мир, 1983. – Т. 1.– 536 с.
7. Мухачев В.А. Планирование и обработка результатов эксперимента. – Томск: Томский государственный университет систем управления., 2007. – 118 с.
8. Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильева Н.Ю., Товкач Ф.І., Іваниця В.О. Вплив *Lactobacillus plantarum* ONU87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі //Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 18–28.



9. Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И., Катунина Л.С. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капуста среда для культивирования лактобактерий // Вестник Московского государственного областного университета серия «Естественные науки». — 2010. — № 2. — С. 51–55.

10. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. — СПб.: ВМедА., 2002. — 266 с.

11. Gilligan C.A. Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective // Philosophical Transactions of the Royal Society. — 2008. — 363, № 1492. — P. 741–759.

12. ten Brink B, Minekus M, van der Vossen J.M., Leer R.J., Huis in't Veld J.H.. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46 // J. Appl. Bacteriol. — 1994. — Vol. 77, № 2. — P. 140–148.

13. Пат. 2216587 Российская Федерация. Питательная среда для выращивания лактобактерий. // Н.К. Конькова, И.С. Горлова, Н.А. Голубева. — Оpubл. 20.11.2003 р.

Стаття надійшла до редакції 11.05.2013 р.



УДК 579.2:[504.062+546.7]

К.В. Шоляк, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського 4, Львів, 79005, Україна,
тел: +38 (032) 239 40 53, e-mail: Sholjak@gmail.com

СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ, СТІЙКІ ДО ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМУ

Мета роботи. Вивчити морфо-фізіологічні та біохімічні особливості сульфатвідновлювальних бактерій, стійких до підвищених концентрацій Cr (VI) та дослідити природу донорів та акцепторів електронів для них. **Методи.** Бактерії культивували у середовищах Постгейта В та Постгейта С за температури 30 °С у пробірках об'ємом 25 мл, за анаеробних умов. Біомасу визначали турбідиметрично на фотоелектроколометрії КФК-3. Концентрацію Cr (VI) визначали спектрофотометрично дифенілкарбазидним методом. Для визначення Cr (III) використовували хромазуrol S. Вміст сульфатів визначали турбідиметрично після їх осадження барій хлоридом. **Результати.** Клітини бактерій мають овальну або паличкоподібну форму. Виділені сульфатвідновлювальні бактерії здійснюють неповне окиснення органічних сполук до ацетату, не утворюють спор, грамнегативні, облігатні анаероби, мезофіли. Оптимальною температурою для росту є 27–35 °С, рН = 7. Як кінцевий акцептор електронів сульфатвідновлювальні бактерії використовують сульфат. За відсутності сульфату в середовищі, бактерії використовують елементну сірку, фумарат, Cr (VI), Fe (III), нітрат як кінцеві акцептори електронів. За наявності сульфатів у середовищі культивування усі культури, як джерело карбону, використовують лактат, фумарат, піруват, сукцинат, малат, фруктозу, глюкозу, цитрат. Ацетат, етанол, бутанол, пропіонат, гліцерин не забезпечували їх росту. Досліджено вплив різних концентрацій хромату на ріст сульфатвідновлювальних бактерій. Показано закономірності використання хромату бактеріями та відновлення високотоксичного Cr (VI) до менш токсичного Cr (III). **Висновок.** Виділені бактерії були ідентифіковані як *Desulfomicrobium* sp. Ці сульфатвідновлювальні бактерії, на нашу думку, можуть бути використані для очистки водного середовища від сульфатів, нітратів та солей важких металів і в першу чергу шестивалентного хрому.

Ключові слова: хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії, Cr(VI), сульфат.



Сульфатвідновлювальні бактерії це облигатні анаероби, які здійснюють окиснення органічних субстратів в процесі анаеробного сульфатного дихання, використовуючи сульфат як кінцевий акцептор електронів [5].

Деякі представники сульфатвідновлювальних бактерій як акцептор електронів можуть використовувати, крім сульфатів, Cr (VI), Pd (II), Mn (IV), Tc (VI), Fe (III), U (VI) та інші йони металів, а також нітрити і нітрати з таким же виходом енергії і навіть більшим, ніж при редукції сульфатів [5, 6].

Субстратом для живлення сульфатвідновлювальних бактерій можуть бути різні органічні сполуки (етанол, лактат, пропіонат, бутират, глутамат, серин, аланін, аргінін та інші амінокислоти тощо) [9]. Кінцевим продуктом окиснення органічних субстратів у одних видів сульфатвідновлювальних бактерій є ацетат (такий шлях окиснення характерний для представників родів *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfomonas*, *Desulfovibrio*, *Thermodesulfobacterium*), у інших (*Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfomonile*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfurella*, *Desulfuromonas*) органічні субстрати окиснюються повністю до CO₂ і H₂O [5].

Продуктом відновлення сульфатів є гідроген сульфід, який з одного боку, як відновник стимулює ріст анаеробів, а з другого – взаємодіє з йонами металів, утворюючи нерозчинні сульфіди [6, 8]. В цей спосіб знешкоджуються йони ртуті, срібла, міді, кадмію, хрому, кобальту та ін.

Недавно показано [7] здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за відсутності сульфатів у середовищі використовувати як акцептор електронів шестивалентний хром Cr (VI).

Широке використання сполук хрому у різних галузях промисловості (гальванічні і фарбувальні цехи, текстильні підприємства, шкірзаводи, підприємства хімічної промисловості тощо) призводить до нагромадження значної кількості цього металу в навколишньому середовищі. Останніми роками кількості хрому з викидами зростають, що дає підстави розглядати його як один з найбільших забруднювачів навколишнього середовища [7, 10]. Для очистки від хромату застосовують різні методи (механічні, фізичні та хімічні). Найбільш перспективним в останній час вважають біологічні, які виявилися більш ефективними, ніж фізичні та хімічні. Особливої уваги заслуговує використання резистентних до хрому штамів бактерій, які можна іммобілізувати на відповідних носіях. Однак високі концентрації Cr (VI) пригнічують ріст мікроорганізмів, що перешкоджає їхньому використанню для очищення навколишнього середовища, забрудненого йонами цього металу [10].

Метою цієї роботи було вивчити морфо-фізіологічні та біохімічні особливості сульфатвідновлювальних бактерій, стійких до підвищених концентрацій Cr (VI) та дослідити природу донорів та акцепторів електронів для них.



Матеріали і методи

У роботі використовували чотири штами сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium* sp. (CrR1, CrR2, CrR3, CrR4), виділені з очисних споруд м. Львова [11].

Бактерії культивували у середовищах Постгейта В та Постгейта С [8] за температури 30 °С у пробірках об'ємом 25 мл, за анаеробних умов. Напіврідкі середовища містили 0,8% агару.

При дослідженні впливу шестивалентного хрому на бактерії їх культивували у модифікованому середовищі Постгейта С такого складу (г/л): калій дигідрофосфат — 0,5; амоній хлорид — 1,0; натрій хлорид — 3,7; кальцій хлорид гексагідрат — 0,06; магній хлорид гексагідрат — 0,055; натрій лактат — 6; дріжджовий екстракт — 1; ферум хлорид тетрагідрат — 0,004; натрій цитрат дигідрат — 0,3; рН середовища — 7,6.

Cr (VI) вносили після стерилізації у формі водного розчину $K_2Cr_2O_7$ у концентрації 1 мМ.

У дослідах з вивчення здатності бактерій використовувати Cr (VI) як кінцевий акцептор електронів із середовища виключали сульфати.

Для вивчення здатності бактерій засвоювати різні джерела карбону до середовища Постгейта С, замість натрій лактату у еквімолярній кількості додавали фумарат, піруват, сукцинат, ацетат, етанол, бутанол, пропіонат, гліцерин, малат, фруктозу, глюкозу, цитрат. Для дослідження здатності сульфатвідновлювальних бактерій використовувати різні акцептори електронів, у середовище Постгейта С замість сульфатів вносили елементну сірку (10 г/л), $K_2Cr_2O_7$ та Fe (III) цитрат у концентраціях 1 мМ, натрій нітрат та фумарат у концентраціях 12 мМ.

Біомасу визначали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda=340$ нм, кювета 3 мм).

Вміст ацетату у культуральній рідині визначали титруванням 0,1 н NaOH до появи рожевого забарвлення, як індикатор використовували розчин фенолфталеїну [1].

Для електронномікроскопічних досліджень використовували 48-годинну культуру. Клітини відмивали дистильованою водою і осаджували центрифугуванням при 8000 г впродовж 20 хв. Клітини фіксували протягом 20 хв в 1,5% водному розчині $KMnO_4$ при кімнатній температурі. Постфіксацію проводили з використанням 1% OsO_4 у какодилатному буфері протягом 90 хв при 0 °С. Фіксовані клітини промивали, обезводнювали в розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і оксиду пропілену. Зразки переносили в епоксидну смолу Ероп 812. Ультратонкі зрізи отримували за допомогою ультрамикротому УМТП-6 і контрастували плумбум цитратом [15]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 7 кВ.

Концентрацію Cr (VI) визначали спектрофотометрично ($\lambda=540$ нм, кювета 10 мм) дифенілкарбазидним методом [13]. Для визначення Cr (III) використовували хромазуrol S ($\lambda=590$ нм, кювета 10 мм) [12]. Вміст

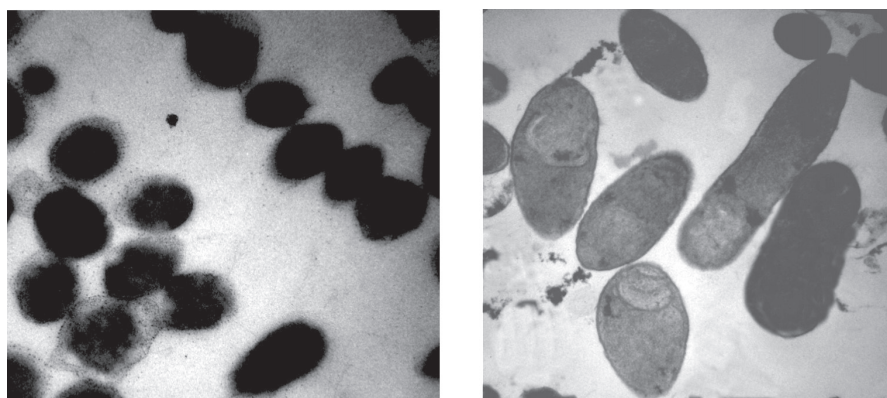


сульфатів визначали турбідиметрично ($\lambda = 520$ нм, кювета 10 мм) після їх осадження барій хлоридом. В ролі стабілізатора суспензії використовували гліцерин [2].

Статистичне опрацювання результатів проводили за Лакіним [4].

Результати та їх обговорення

Сульфатвідновлювальні бактерії за умов росту на середовищі з сульфатом утворюють водень сульфід, який, взаємодіючи з йонами Fe^{2+} , що містяться у середовищі, утворює ферум (II) сульфід (FeS) чорного кольору, тим самим спричиняючи специфічне забарвлення колоній мікроорганізмів. Здійснюють неповне окиснення органічних сполук до ацетату, не утворюють спор, грамнегативні. Клітини бактерій мають овальну або паличкоподібну форму (рис. 1, А) довжиною 2,5 – 4,0 мкм і шириною 0,7 – 1,0 мкм.



А

Б

Рис. 1. Морфологія клітин штамів хромрезистентних сульфатвідновлювальних бактерій

А – без $Cr(VI)$, Б – з $Cr(VI)$. (x 10 тис. електронна мікроскопія)

Fig. 1. Morphology of cell cultures of chromium resistant sulfate-reducing bacteria
A – without $Cr(VI)$, B – with $Cr(VI)$. (x 10 000 electron microscopy)

За умов росту сульфатвідновлювальних бактерій у середовищі з $Cr(VI)$ клітини набувають видовженої форми (рис. 1, Б). Про подібні зміни в морфології клітин при рості бактерій у середовищі з $Cr(VI)$ повідомляли Міхель та співавт. [14].

В клітинах наявні цитоплазматичні включення, які не забарвлюються суданом чорним, це свідчить про відсутність гранул полі- β -оксимаєсної кислоти.

Виділені бактерії – облігатні анаероби, мезофіли. Оптимальний ріст та утворення водню сульфідів спостерігається в діапазоні температур 27–35 °C та pH 7,0. Не виявляють додаткової потреби у вітамінах групи В.

Донором електронів для сульфатвідновлювальних бактерій у середовищі з сульфатом слугують різні органічні сполуки [9]. Найкращий ріст виділених штамів сульфатвідновлювальних бактерій спостерігається у середовищі з лактатом. Малат, глюкоза, фумарат, піруват, сукцинат, цитрат, етанол та фруктоза забезпечували значно менший приріст біомаси. Ацетат, пропіонат, гліцерин і бутанол досліджуваними бактеріями не використовуються (табл. 1).

Таблиця 1

Ріст штамів сульфатвідновлювальних бактерій у середовищі з різними джерелами вуглецю як донорами електронів

Table 1

Growth of sulfate-reducing bacteria strains in medium with different carbon sources as electron donors

Джерело вуглецю	Біомаса г/л			
	CrR1	CrR2	CrR3	CrR4
Контроль*	0,24±0,03	0,27±0,04	0,28±0,03	0,28±0,05
Ацетат	0,32±0,03	0,34±0,04	0,34±0,03	0,35±0,05
Пропіонат	0,37±0,07	0,37±0,08	0,39±0,08	0,40±0,11
Гліцерин	0,21±0,11	0,21±0,10	0,23±0,11	0,21±0,11
Етанол	0,91±0,02	1,1±0,01	0,80±0,02	0,93±0,02
Бутанол	0,39±0,02	0,41±0,01	0,38±0,00	0,36±0,03
Малат	2,01±0,08	2,09±0,11	2,17±0,07	2,34±0,22
Лактат	3,24±0,11	3,84±0,09	4,21±0,12	3,76±0,10
Піруват	2,06±0,03	2,08±0,07	2,17±0,15	2,24±0,09
Фруктоза	0,78±0,02	0,88±0,03	0,72±0,18	0,86±0,13
Фумарат	1,47±0,07	1,48±0,04	1,51±0,09	1,58±0,09
Сукцинат	2,58±0,23	2,38±0,11	2,56±0,09	2,73±0,17
Цитрат	2,26±0,58	2,31±0,46	2,44±0,39	2,40±0,42
Глюкоза	2,14±0,31	1,5±0,63	3,19±0,26	1,12±0,74

* Контроль – середовище Постгейта С без донора електронів

Виділені штами сульфатвідновлювальних бактерій здатні використовувати широкий спектр речовин в ролі акцепторів електронів, нагромаджуючи значну біомасу протягом семи діб культивування (табл. 2).



Як кінцевий акцептор електронів бактерії ефективно використовують сульфати, відновлюючи їх до гідроген сульфід, але за відсутності сульфату ростуть у середовищі, у якому єдиним акцептором електронів є Cr (VI), Fe (III), нітрат, фумарат або елементна сірка.

Таблиця 2

Ріст сульфатвідновлювальних бактерій за наявності в середовищі різних акцепторів електронів

Table 2

Growth of sulfate-reducing bacteria at presence in medium of different electron acceptors

Акцептор електронів	Біомаса г/л			
	CrR1	CrR2	CrR3	CrR4
Контроль*	0,22±0,09	0,23±0,05	0,24±0,07	0,22±0,06
Сульфат	3,24±0,11	3,84±0,09	4,21±0,12	3,76±0,10
Елементна сірка	1,56±0,02	1,45±0,18	1,54±0,03	1,63±0,04
Cr (VI)	3,28±0,19	3,15±0,15	3,77±0,27	3,6±0,03
Fe (III)	2,02±0,13	1,52±0,06	1,07±0,02	1,95±0,11
Нітрат	2,79±0,05	2,80±0,15	2,95±0,07	2,86±0,13
Фумарат	1,98±0,41	1,87±0,56	2,06±0,05	2,11±0,09

* Контроль – середовище Постгейта С без акцептора електронів

Таким чином за морфологічними ознаками та фізіологічними властивостями, досліджувані сульфатвідновлювальні бактерії, згідно визначника Берджі, належать до роду *Desulfomicrobium* [5].

Встановлено, що найвищий рівень нагромадження біомаси за різних концентрацій Cr (VI) спостерігається за умов внесення 0,5–1 мМ Cr (VI) (рис. 2). Їх біомаса у середовищі була такою ж як у середовищі з сульфатом, що слугувало контролем. Збільшення концентрації Cr (VI) до 2–3 мМ спричиняло нагромадження приблизно у 3–6 разів меншої біомаси штамів сульфатвідновлювальних бактерій порівняно з контролем. За наявності у середовищі 5 та 10 мМ Cr (VI) бактерії не ростуть.

Таким чином, виділені бактерії можна вважати резистентними до шестивалентного хрому. Їх резистентність обумовлена, з одного боку, здатністю використовувати Cr (VI) як акцептор електронів, а з другого – бактерії за наявності сульфатів продукують гідроген сульфід, який хімічно відновлює Cr (VI) [7].

Оскільки, найкращий ріст досліджуваних бактерій у середовищі з різними акцепторами електронів спостерігався у штаму CrR3, то він був



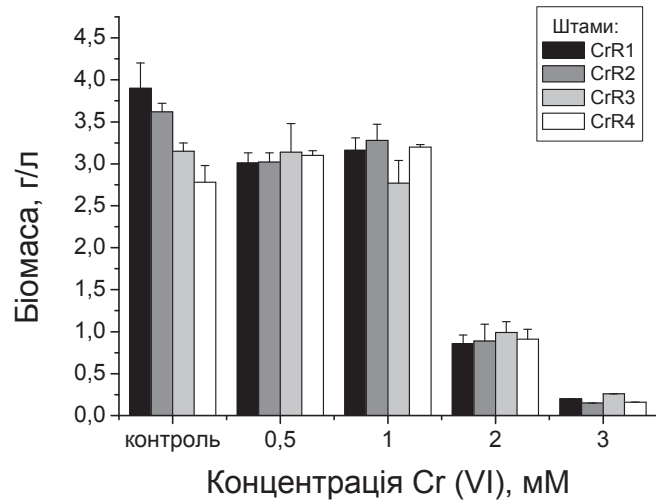


Рис. 2. Нагромадження біомаси виділеними штамми сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfomicrobium* sp. за різних концентрацій Cr (VI) у середовищі Постгейта С без сульфатів. Контроль – середовище без Cr (VI) з сульфатом

Fig. 2. Accumulation of biomass by isolated strains of sulfate-reducing bacteria *Desulfomicrobium* sp. under different concentrations of Cr (VI) in medium Postgate C without sulfate. Control is the medium without Cr (VI) with sulfate

обраний для подальших досліджень. Динаміка використання Cr (VI) як кінцевого акцептора електронів штамом CrR3 за концентрації 1 мМ у середовищі показана на рис. 3.

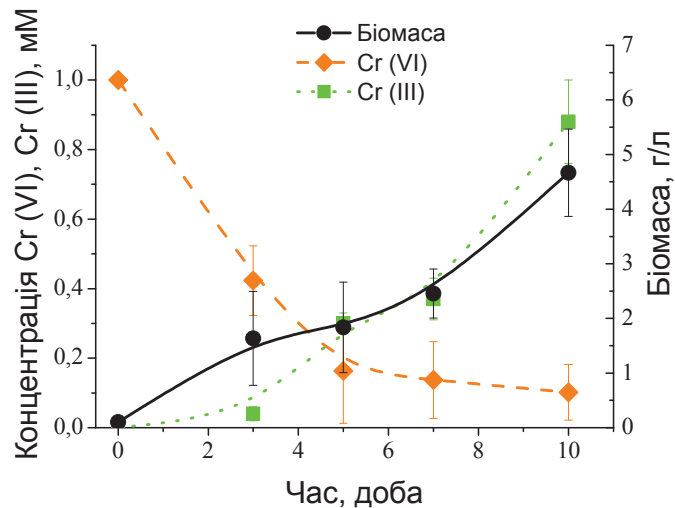


Рис. 3. Ріст і використання Cr (VI), нагромадження Cr (III), штамом CrR3 *Desulfomicrobium* sp. у середовищі Постгейта С без сульфатів

Fig. 3. Growth and consumption of Cr (VI), accumulation of Cr (III) by CrR3 strain *Desulfomicrobium* sp. in medium of Postgate C without sulfate



Як видно з рис. 3, протягом перших двох діб культивування відбувається інтенсивне збільшення біомаси бактерій та зниження концентрації Cr (VI).

Починаючи з третьої доби, бактерії дещо сповільнювали ріст. Це може бути зумовлено утворенням токсичного інтермедіату, яким є п'ятивалентний хром Cr (V), що є сильним інгібітором росту бактерій. Подібні результати отримані Кшемінською та співавт. [3] при дослідженні впливу Cr (VI) на дріжджі *Pichia guilliermondii*. Починаючи з другої доби культивування, в середовищі відбувається нагромадження Cr (III). На п'яту добу культивування спостерігається відновлення росту культури та зростання вмісту Cr (III) у середовищі. Така тенденція простежується до десятої доби культивування, коли із середовища практично повністю використовується Cr (VI) і нагромаджується Cr (III).

Отримані результати дають підставу вважати, що виділені культури сульфатвідновлювальних бактерій здатні використовувати високотоксичний Cr (VI) як кінцевий акцептор електронів, відновлюючи його до Cr (III).

За умов росту сульфатвідновлювальних бактерій у середовищі з Cr (VI), як єдиним акцептором електронів, їхня біомаса досягала такого ж рівня як і в середовищі з сульфатом, що свідчить про високий вихід енергії в процесі анаеробного окиснення органічних сполук і високоефективне використання Cr (VI) як акцептора електронів.

Отже, виділені нами сульфатвідновлювані бактерії виявилися активними хроматвідновлювачами. Як і в більшості хроматрезистентних мікроорганізмів їхня максимальна хроматредуктазна активність спостерігається за температури 30 °С. Вони використовують різні органічні речовини (вуглеводи, спирти, жирні кислоти тощо), як донори електронів для відновлення Cr (VI). Крім того вони здатні в анаеробних умовах використовувати як акцептори електронів сульфати та нітрати, наявність яких в середовищі може негативно впливати на хроматредукцію, тому питання взаємодії бактерій та інших компонентів середовища потребує більш глибокого вивчення.

Виділені бактерії, на нашу думку, можуть бути використані для очищення водного середовища від сульфатів, нітратів та солей важких металів і в першу чергу шестивалентного хрому.

K.V. Sholiak, T.B. Peretiatko, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv,
4, Grushevsky str., Lviv, 79005, Ukraine,
тел: +38(032) 239 40 53, e-mail: Sholjak@gmail.com

SULFATE-REDUCING BACTERIA RESISTANT TO INCREASED LEVELS OF HEXAVALENT CHROMIUM

Summary

The **aim** of this work was to study the morpho-physiological and biochemical properties of chromium-resistant sulfate-reducing bacteria and to



investigate the nature of electron donors and their acceptors. **Methods.** Bacteria were cultivated in Postgate B and Postgate C media at temperature 30 °C in 25 ml tubes under the anaerobic conditions. Biomass was determined turbidimetrically using the photoelectrocolorimeter СРК-3. The concentration of Cr (VI) was determined spectrophotometrically by the diphenylcarbazide method. Chromazurol S was used for Cr (III) determination. The sulphates content was determined turbidimetrically after their precipitation by barium chloride. **Results.** Bacterial cells are oval or rod-shaped. Derived sulfate-reducing bacteria hold incomplete oxidation of organic compounds with acetate formation and do not form spores, gram-negative, mesophilous obligate anaerobes. The optimum temperature for growth is 27–35 °C, pH=7. As a final electron acceptor sulfate-reducing bacteria use sulfate. Bacteria use elemental sulfur, fumarate, Cr (VI), Fe (III), nitrate as a terminal electron acceptor under absence of sulfate in the environment. In presence of sulfate in culture medium all cultures as a source of carbon, used lactate, fumarate, pyruvate, succinate, malate, fructose, glucose, citrate. Acetate, ethanol, butanol, propionate, glycerol did not provide their growth. The effect of different concentrations of chromate on the growth of sulfate-reducing bacteria have been investigated. There were shown the patterns of use of chromate by bacteria, and reduction highly toxic Cr (VI) to less toxic Cr (III). **Conclusions.** Isolated bacteria, were identified as *Desulfomicrobium* sp. These sulfate-reducing bacteria, in our opinion, can be used for treatment of water environment from sulfates, nitrates and salts of heavy metals and especially hexavalent chromium.

Key words: chromium-resistant sulfate-reducing bacteria, Cr (VI), sulfate.

Е.В. Шоляк, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франка,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,
тел: +38(032) 239 40 53, e-mail: Sholjak@gmail.com

СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ БАКТЕРИИ, СТОЙКИЕ К ПОВЫШЕННЫМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ШЕСТИВАЛЕНТНОГО ХРОМА

Реферат

Целью работы было изучить морфо-физиологические и биохимические особенности сульфатредуцирующих бактерий, устойчивых к повышенным концентрациям Cr (VI) и исследовать для них природу доноров и акцепторов электронов. **Методы.** Бактерии культивировали в средах Постгейта В и Постгейта С при температуре 30 °C в пробирках объемом 25 мл,



в анаэробных условиях. Биомассу определяли турбидиметрически на фотоэлектроколориметре КФК-3. Концентрацию Cr (VI) определяли спектрофотометрически дифенилкарбазидным методом. Для определения Cr (III) использовали хромазурол S. Содержание сульфатов определяли турбидиметрически после их осаждения барий хлоридом. **Результаты.** Клетки бактерий имеют овальную или палочковидную форму. Выделенные сульфатредуцирующие бактерии осуществляют неполное окисление органических соединений до ацетата, не образуют спор, грамтрицательные, облигатные анаэробы, мезофилы. Оптимальной температурой для роста является 27–35 °С, рН = 7. Как конечный акцептор электронов сульфатредуцирующие бактерии используют сульфат. При отсутствии сульфата в среде, бактерии используют элементную серу, фумарат, Cr(VI), Fe (III), нитрат как конечные акцепторы электронов. При наличии сульфатов в среде культивирования все культуры, как источник углерода, используют лактат, фумарат, пируват, сукцинат, малат, фруктозу, глюкозу, цитрат. Ацетат, этанол, бутанол, пропионат, глицерин не обеспечивали их рост. Исследовано влияние различных концентраций хромата на рост сульфатредуцирующих бактерий. Показано закономерности использования хромата бактериями и восстановление высокотоксичного Cr (VI) до менее токсичного Cr (III). **Вывод.** Выделенные бактерии были идентифицированы как *Desulfomicrobium* sp. Эти сульфатредуцирующие бактерии, по нашему мнению, могут быть использованы для очистки водной среды от сульфатов, нитратов и солей тяжелых металлов, в том числе и от соединений шестивалентного хрома.

Ключевые слова: хромрезистентные сульфатредуцирующие бактерии, Cr (VI), сульфат.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабко А.К., Пятницький І.В. Кількісний аналіз. — К.: Вища школа, 1974. — С. 243.
2. ГОСТ 26426-85. Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. — М.: Изд-во стандартов, 1985. — 7 с.
3. Кшеминская Г.П., Гайда Г.З., Иваиш М.Ф., Гончар М.В. Хромат-резистентные мутанты дрожжей *Pichia guilliermondii*: получение и свойства // Микробиология. — 2011. — Т. 80, № 3. — С. 308–319.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
5. *Определитель* бактерий Берджи. В 2-х т. Т.1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. — М.: Мир, 1997. — 432 с.
6. Перетятко Т.Б., Галушка А.А., Гудзь С.П. Використання металів як кінцевих акцепторів електронів сульфатвідновлювальними бактеріями // Біологічні студії. — 2009. — Т. 3, № 3. — С. 131–148.



7. *Перетятко Т.Б., Гудзь С.П.* Відновлення сполук шестивалентного хрому сульфатвідновлювальними бактеріями // Біологічні студії. — 2010. — Т. 4, № 2. — С. 39–48.

8. *Розанова Е.П.* Методы культивирования и идентификации анаэробных бактерий, восстанавливающих серу и ее окисленные соединения // Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. — 1978. — С. 123–136.

9. *Розанова Е.П., Назина Т.Н.* Сульфатвостанавливающие бактерии (систематика и метаболизм) // Успехи микробиологии. — 1989. — Т. 23. — С. 191–226.

10. *Франк Ю.А., Лушников С.В.* Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // Экология и промышленность. — 2006. — № 1. — С. 10–13.

11. *Шоляк К.В., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П.* Хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії, виділені із стічних вод промислових підприємств // II міжнародна наук. конф. «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (19-22 вересня 2011 р.). — Донецьк: Вид-во «Ноулідж», 2011. — С. 269.

12. *Honchar T.M., Ksheminska H.P., Patsay I.O., Huta O.M., Gonchar M.V.* Assay of chromium (III) in microbial cultures using chromazurol S and surfactants for monitoring chromate remediation processes // Біотехнологія. — 2008. — Т. 1, № 4. — С. 85–94.

13. *Marchart H.* Über die Reaktion von Chrom mit Diphenylcarbazid und Diphenylcarbazon // Anal. Chim. Acta. — 1964. — Vol. 196, № 30. — P. 11–17.

14. *Michel C., Brugna M., Aubert C., Bernadac A., Bruschi M.* Enzymatic reduction of chromate: comparative studies using sulfate-reducing bacteria // Appl Microbiol Biotechnol. — 2001. — Vol. 55. — P. 95–100.

15. *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — Vol. 17. — P. 208–212.

Стаття надійшла до редакції 01.04.2013



И.Н. Курченко, А.К. Павличенко, Е.М. Юрьева

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП Д 03680, Украина, тел.: +38(044) 526 11 89,
e-mail: irinakurchenko@ukr.net

РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭНДОФИТНЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ALTERNARIA ALTERNATA* И *CERATOCYSTIS SP.*

Цель исследования – сравнительное изучение ростовых характеристик и особенностей потребления глюкозы эндофитными и фитопатогенными штаммами *A. alternata* и *Ceratocystis sp.* *Методы.* В работе использованы общепринятые микробиологические методы исследований, проведена статистическая обработка данных. *Результаты.* Разница в значениях удельной скорости роста между фитопатогенными и эндофитными штаммами одного вида оказалась недостоверной. Уровень накопления биомассы эндофитного штамма *Ceratocystis sp.* был на 56,3% выше, чем фитопатогенного, при этом для штаммов *A. alternata* наблюдалась противоположная тенденция – у фитопатогена он был на 11,7% выше, чем у эндофита. Для экономического коэффициента исследованных штаммов *Ceratocystis sp.* и *A. alternata* установлена противоположная закономерность: он был на 38,5% ниже у фитопатогена *Ceratocystis sp.* и на 40,7% – у эндофита *A. alternata*. Эндофитный штамм *A. alternata* и фитопатогенный *Ceratocystis sp.* характеризовались высокой скоростью потребления глюкозы (0,019 и 0,017 ч⁻¹ соответственно). Значения метаболического коэффициента были ниже у штаммов с высокими экономическими коэффициентами – фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis sp.* Таким образом, по ростовым характеристикам фитопатогенных и эндофитных штаммов *Ceratocystis sp.* и *A. alternata* установлены противоположные закономерности.

Ключевые слова: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis sp.*, удельная скорость роста, экономический коэффициент, эндофит, фитопатоген.

В последние десятилетия значительно возросло количество исследований, посвященных изучению видового разнообразия и физиологических особенностей группы эндофитных грибов, а также их биологической роли, которая до настоящего времени выяснена недостаточно [3, 18]. При изучении видового состава эндофитных грибов мхов, кустарничков порядка *Ericales* и других растений мезоолиготрофных и олиготрофных болот Ровенской и Житомирской областей нами выявлены общие для



этих растений виды грибов-эндофитов [3]. Для дальнейших исследований были отобраны доминирующие и часто встречающиеся виды эндофитов *Ceratocystis* sp., *Penicillium funiculosum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium poae*, а для сравнения — штаммы соответствующих видов микроскопических грибов — патогенов растений и почвенных сапрофитов.

Большинство видов *Alternaria* — сапрофиты, обитающие обычно в почве или на разлагающихся растительных остатках. Они получают источники питания и энергии за счет гидролиза целлюлозосодержащих субстратов и встречаются в разных местообитаниях как убиквисты. Некоторые виды являются патогенами растений и возбудителями латентной инфекции [16, 19].

Виды рода *Ceratocystis* обнаруживаются при сосудистом микозе древесных растений, однако не существует единого мнения относительно патогенных свойств представителей этого рода [12, 14, 17]. Виды рода *Ceratocystis* были выделены нами с высокой частотой как эндофиты болотных растений, а также среди комплекса патогенных видов при массовом усыхания дубрав Украины [3, 5].

Особенности роста *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. представлены лишь в единичных работах [15, 16, 19]. К сожалению, отсутствуют данные относительно ростовых характеристик штаммов разных трофических групп исследуемых видов как интегрального показателя их общего физиологического состояния. Цель данного исследования — сравнительное изучение ростовых характеристик и особенностей потребления глюкозы эндофитными и фитопатогенными штаммами *A. alternata* и *Ceratocystis* sp.

Материалы и методы

Объектами исследования были 2 штамма: эндофит *A. alternata* 16801 (стебель сабельника, Ровенская обл., 2002), фитопатоген *A. alternata* 16819 (плоды томата, Херсонская обл., 2009); а также эндофитный штамм *Ceratocystis* sp. 16871 (верхушка сабельника, Житомирская обл., 2010) и фитопатогенный штамм *Ceratocystis* sp. 16872 (ветка дуба, Житомирская обл., 2012), которые поддерживаются в коллекции культур грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Посевным материалом служила стандартная суспензия (1×10^6 колоний/мл) 10-суточной культуры грибов, которую вносили в количестве 10% (об/об) в среду Чапека, содержащую 20 г/л глюкозы [10]. Культивирование исследованных штаммов проводили в течение 10 суток в колбах Эрленмейера емкостью 0,75 л, содержащих 0,2 л среды, на качалках (232 об/мин, температура 26–28 °С), рН среды 4,7.

Накопление биомассы определяли гравиметрически после высушивания до постоянного веса при 70 °С, концентрацию глюкозы в среде — модифицированным методом Бертрана [9, 10].



Удельную скорость роста (μ) в экспоненциальной фазе, экономический (Y) и метаболический (q) коэффициенты в стационарной фазе рассчитывали в соответствии с общепринятыми формулами [11].

Полученные результаты были обработаны статистически (средние значения, ошибки средних, средние квадратичные отклонения для $n=9$ при уровне значимости $P=0,95$), представлены графически и проанализированы с применением пакета STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Все штаммы *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. на питательной среде с глюкозой характеризовались мицелиальным ростом и в общем росли медленнее, чем изученные ранее штаммы *Fusarium poae* и *Penicillium funiculosum* из разных местообитаний [8]. Log-фаза у всех изученных штаммов наступала через 24–36 часов после начала культивирования, ее продолжительность достигала 48 часов у эндофитных штаммов и 12–24 часа — у фитопатогенных (табл.; рис.). Как правило, все штаммы выходили на стационарную фазу роста к 7–9 суткам.

Таблица

Ростовые характеристики и потребление глюкозы штаммами *Alternaria alternata* и *Ceratocystis* sp.

Table

Growth characteristics and glucose utilization by *Alternaria alternata* and *Ceratocystis* sp. strains

Штамм	μ , час ⁻¹	log фаза, час	Глюкоза на 10 сут, г/л	q , час ⁻¹	Биомасса, г/л	Y , %
<i>Alternaria alternata</i> 16801	0,150 ± 0,022	48	3,10 ± 0,90	0,019 ± 0,0007	3,760 ± 0,633	27,70 ± 0,94
<i>Alternaria alternata</i> 16819	0,130 ± 0,032	24	6,50 ± 0,09	0,013 ± 0,0014	4,260 ± 1,867	46,70 ± 4,83
<i>Ceratocystis</i> sp. 16871	0,210 ± 0,089	48	3,10 ± 0,80	0,010 ± 0,0009	5,420 ± 1,491	44,40 ± 3,81
<i>Ceratocystis</i> sp. 16872	0,170 ± 0,014	12	11,60 ± 0,31	0,017 ± 0,0006	2,370 ± 0,139	27,30 ± 0,34

Удельная скорость роста была максимальной у эндофитного штамма *Ceratocystis* sp., несколько ниже — у фитопатогенного и еще ниже — у эндофитного и фитопатогенного штаммов *A. alternata*. Следует отметить тот факт, что разница между фитопатогенными и эндофитными штаммами одного вида оказалась недостоверной (табл.).

Максимальный и минимальный уровни накопленной биомассы в стационарной фазе роста были отмечены у штаммов *Ceratocystis* sp., при-



чем фитопатоген образовывал на 56,3% меньше биомассы, чем эндофит (табл.). Уровень биомассы штаммов *A. alternata* из разных местообитаний был ниже, чем у эндофитного штамма *Ceratocystis* sp. 16871, при этом наблюдалась противоположная тенденция – у фитопатогена он был на 11,7% выше, чем у эндофита.

У эндофитного штамма *Ceratocystis* sp. 16871 при максимальных уровнях биомассы и удельной скорости роста экономический коэффициент составлял $44,4 \pm 3,81\%$ и был практически таким же, как и у фитопатогена *A. alternata* 16819 с минимальной среди изученных штаммов удельной скоростью роста (табл.).

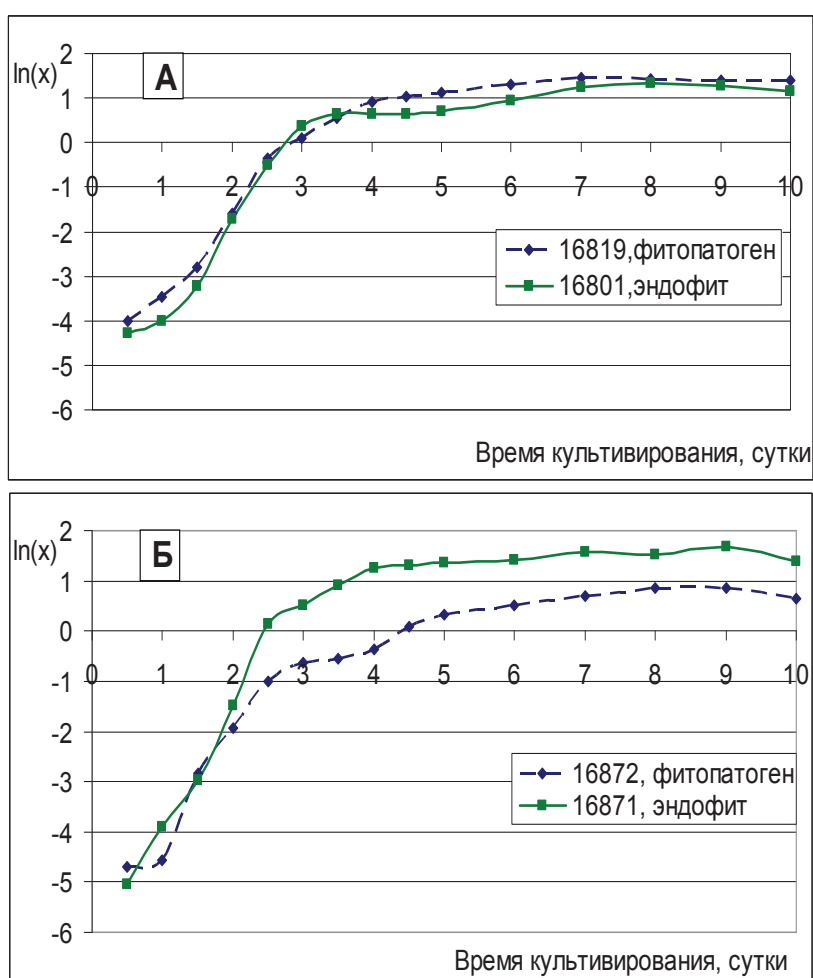


Рис. Накопление биомассы штаммами *Alternaria alternata* (А) и *Ceratocystis* sp. (Б): x – биомасса, г/л

Fig. Biomass accumulation by *Alternaria alternata* (A) and *Ceratocystis* sp. (B) strains: x – biomass, g/l



В целом, для исследованных штаммов разных видов были установлены противоположные закономерности: для *Ceratocystis* sp. экономический коэффициент был в 1,6 раза выше у эндофита, для *A. alternata* — в 1,7 раза выше у фитопатогена. Значения метаболического коэффициента были ниже у штаммов с максимальными экономическими коэффициентами — фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis* sp.

Максимальная скорость потребления глюкозы была отмечена у эндофитного штамма *A. alternata* и фитопатогенного *Ceratocystis* sp. (табл.), причем экономические коэффициенты этих штаммов были минимальными среди всех изученных. При этом метаболические коэффициенты фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis* sp. характеризовались минимальными значениями при максимальных уровнях накопления биомассы и экономического коэффициента. Следует отметить, что эндофиты *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. потребляли глюкозу активнее, чем фитопатогены этих же видов — остаточная концентрация глюкозы в среде на 10 сутки у эндофитных штаммов составила 15,5% от начального содержания, в то время как у фитопатогена *A. alternata* она достигала 32,5% и еще выше у фитопатогена *Ceratocystis* sp. — 59,5% (табл.).

При культивировании штаммов *A. alternata* pH среды изменялось от исходного 4,6–4,7 в щелочную сторону: до 7,6 у эндофита и до 8,0 у фитопатогена. Изученные штаммы *Ceratocystis* sp. также подщелачивали среду в процессе роста: эндофит — до 7,7 и фитопатоген — до 7,0.

Таким образом, полученные нами данные сравнимы с результатами, известными для других видов грибов, обладающих высокой скоростью роста. Так, удельная скорость роста двух морфофизиологических форм (пеллеты и гифы) *Thielavia* sp. на среде с глюкозой не зависела от мицелиальной структуры и составляла в первой экспоненциальной фазе 0,306 ч⁻¹ (пеллеты) и 0,349 ч⁻¹ (гифы). Значения экономического коэффициента достигали 30,5 и 43,6% для пеллет и гиф, соответственно. При пеллетной форме роста *Thielavia* sp. экономический и метаболический коэффициенты свидетельствовали о преобладании в их метаболизме катаболических процессов. Для штамма *T. terrestris* величина экономического коэффициента также была выше у гифальной формы (45,3% на стадии ветвления мицелия и 53,3% — набухания конидий) [1].

Ранее нами было установлено, что штаммы *F. poae* и *P. funiculosum*, выделенные из разных местообитаний, различались по ростовым характеристикам [8]. Так, удельная скорость роста эндофитного штамма *F. poae* была максимальной (0,38 ч⁻¹), ниже — у фитопатогенного (0,30 ч⁻¹) и наименьшей — у почвенного штамма (0,18 ч⁻¹). Однако для изученных штаммов *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. из разных местообитаний разница в значениях удельной скорости роста была не достоверной (табл.).

Уровень накопления биомассы *F. poae* был максимальным у почвенного и минимальным — у фитопатогенного штаммов, в то время как



эндофит занимал промежуточное положение [8]. Такая же закономерность была установлена для изученных штаммов *Ceratocystis* sp. Однако, для фитопатогена *A. alternata* был характерен более высокий уровень накопления биомассы, чем для эндофита.

При изучении штаммов *F. poae* было установлено, что экономический коэффициент фитопатогена был выше, чем у эндофита. Для штаммов *A. alternata* установлена аналогичная закономерность — экономический коэффициент эндофита был на 40,7% ниже, чем у фитопатогена. Противоположная тенденция отмечена для штаммов *Ceratocystis* sp. — у фитопатогена его значение было на 38,5% ниже, чем у эндофита. У изученного ранее почвенного штамма *P. funiculosum* экономический коэффициент был на 55,8% ниже по сравнению с эндофитным. Такие различия в значениях экономического коэффициента характерны для грибов и ранее были установлены для других видов. Так, для *Phoma solanicola* величина экономического коэффициента составляла 25%, для штаммов *F. sporotrichiella* она варьировала в пределах 23–57%, *P. spinulosum* — 38–55%, *P. westlingii* — 14–40%, а для *P. aurantiogriseum* в среднем составляла 41% [2, 13].

В результате изучения ростовых характеристик эндофитных и фитопатогенных штаммов *A. alternata* и *Ceratocystis* sp. были сделаны следующие выводы:

— штаммы *A. alternata* и *Ceratocystis* sp., выделенные из разных местообитаний, росли медленнее, чем изученные ранее штаммы *F. poae* и *P. funiculosum*;

— удельная скорость роста эндофитных штаммов *Ceratocystis* sp. и *A. alternata* была выше, чем у фитопатогенов этих же видов, однако, в отличие от *F. poae*, эта разница была значительно менее выражена и практически не выходила за пределы статистической ошибки;

— по величине экономического коэффициента для исследованных штаммов *Ceratocystis* sp. и *A. alternata* установлены противоположные закономерности: для *Ceratocystis* sp. он был на 38,5% ниже у фитопатогена, а для *A. alternata* — на 40,7% ниже у эндофита;

— значения метаболического коэффициента были ниже у штаммов с максимальными экономическими коэффициентами — фитопатогена *A. alternata* и эндофита *Ceratocystis* sp.

Таким образом, ростовые параметры фитопатогенных штаммов *Ceratocystis* sp. и *F. poae* более сходны между собой (меньшая удельная скорость роста, уровень биомассы, более медленное потребление глюкозы) отличаются от таковых, полученных для штаммов *A. alternata* [4, 6, 7].



І.М. Курченко, А.К. Павличенко, О.М. Юр'єва

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна,
тел.: +38(044) 5261189, e-mail: irinakurchenko@ukr.net

РОСТОВІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕНДОФІТНИХ ТА ФІТОПАТОГЕНИХ ШТАМІВ *ALTERNARIA ALTERNATA* І *CERATOCYSTIS* SP.

Реферат

Мета досліджень — порівняльне вивчення ростових характеристик та особливостей споживання глюкози ендofітними і фітопатогенними штамми *A. alternata* та *Ceratocystis* sp. **Методи.** В роботі використані загальноприйняті мікробіологічні методи досліджень, проведена статистична обробка даних. **Результати.** Різниця у величинах питомої швидкості росту між ендofітними та фітопатогенними штамми одного виду виявилася недостовірною. Рівень накопичення біомаси ендofітного штаму *Ceratocystis* sp. був на 56,3% вищим, ніж у фітопатогенного, при цьому для штамів *A. alternata* спостерігалася протилежна тенденція — у фітопатогена він був на 11,7% вищим, ніж у ендofіта. Для економічного коефіцієнта досліджених штамів *Ceratocystis* sp. і *A. alternata* встановлена протилежна закономірність: він був на 38,5% нижчим у фітопатогена *Ceratocystis* sp. і на 40,7% — у ендofіта *A. alternata*. Ендofітний штам *A. alternata* і фітопатогенний *Ceratocystis* sp. характеризувалися високою швидкістю споживання глюкози (0,019 і 0,017 год⁻¹ відповідно). Значення метаболічного коефіцієнта були нижчими у штамів з високими економічними коефіцієнтами — фітопатогена *A. alternata* і ендofіта *Ceratocystis* sp. Таким чином, за ростовими характеристиками фітопатогенних та ендofітних штамів *Ceratocystis* sp. і *A. alternata* встановлені протилежні закономірності.

Ключові слова: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis* sp., питома швидкість росту, економічний коефіцієнт, ендofіт, фітопатоген.

I.N. Kurchenko, A.K. Pavlychenko, E.M. Yurieva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154,
Acad. Zabolotny St., Kiev, GSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38(044) 526 11 89, e-mail: irinakurchenko@ukr.net

GROWTH CHARACTERISTICS OF ENDOPHYTIC AND PLANT PATHOGENIC *ALTERNARIA ALTERNATA* AND *CERATOCYSTIS* SP. STRAINS

Summary

The **aim** of our investigation — a comparative study of growth characteristics and peculiarities of glucose utilization by endophytic and



plant pathogenic *A. alternata* and *Ceratocystis* sp. strains. **Methods.** The standard methods of microbiological research were used; statistical analysis of the data was carried out. **Results.** The difference in specific growth rate between plant pathogenic and endophytic strains of the same species was not significant. Biomass accumulation level of endophytic *Ceratocystis* sp. strain was by 56.3% higher than of plant pathogenic ones, while the opposite trend observed for *A. alternata* strains – it was by 11.7% higher for plant pathogen than for endophyte. The opposite regularity in economic coefficient was established for *Ceratocystis* sp. and *A. alternata* strains. It was by 38.5% lower for plant pathogenic *Ceratocystis* sp. strain and by 40.7% – for endophytic *A. alternata* ones. Endophytic *A. alternata* and plant pathogenic *Ceratocystis* sp. strains characterized by high rate of glucose utilization (0.019 and 0.017 h⁻¹ respectively). The metabolic coefficient values were lower for strains with the high economic coefficients – plant pathogenic *A. alternata* and endophytic *Ceratocystis* sp. Thus, the opposite regularities in growth characteristics of plant pathogenic and endophytic *Ceratocystis* sp. and *A. alternata* strains were established.

Key words: *Alternaria alternata*, *Ceratocystis* sp., specific growth rate, economic coefficient, endophyte, plant pathogen.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громозова Е.Н., Фомина М.А., Блажчук И.С., Подгорский В.С. Физиологические особенности роста различных мицелиальных структур *Thielavia* sp. на среде с глюкозой // Микробиол. журн. – 1989. – 51, № 1. – С. 43–46.
2. Дорожкин Н.А., Бельская С.И., Попов Ф.А. Влияние источников углеродного и азотного питания на рост и развитие *Phoma solanicola* Prill. et Del. // Микол. и фитопатол. – 1978. – 12, № 4. – С. 310–314.
3. Курченко И.Н., Соколова Е.В., Орлов А.А., Жданова Н.Н. Эндофитные микромицеты высших растений и их экологическая роль в круговороте ¹³⁷Cs в биогеоценозах сфагновых болот Украинского Полесья // Прикладная радиоэкология леса. – Житомир: Полісся, 2007. – С. 359–412.
4. Курченко І.М., Соколова О.В., Жданова Н.М., Яринчин А.М., Йовенко О.М. Целюлазна і ксиланазна активності фітопатогенних та ендоефітних штамів грибів *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler // Микробиол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 25–30.
5. Курченко І.М., Соколова О.В., Орлов О.О., Юр'єва О.М., Іванюк Т.М. Мікобіота *Quercus robur* L. дібров Житомирської області // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 5. – С. 23–33.
6. Курченко І.М., Соколова О.В., Юр'єва О.М., Жданова Н.М. Целюлазна активність *Ceratocystis* sp. різних трофічних груп // Микробиол. журн. – 2009. – 71, № 6. – С. 27–34.



7. Курченко І.М., Соколова О.В., Юр'єва О.М. Ксиланазна активність фітопатогенних і ендоефітних штамів *Ceratocystis* sp. // Мікробіол. журн. — 2010. — 72, № 5. — С. 8–14.

8. Курченко І.Н., Павличенко А.К., Юр'єва Е.М. Ростовые характеристики штаммов *Fusarium roae* (Peck) Wollenw. и *Penicillium funiculosum* Thom // Микробиол. журн. — 2013. — 75, № 5. — С. 40–44.

9. Методы биохимического исследования растений / Под ред. Н.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, Ленинградское отделение, 1987. — С. 134–135.

10. Методы экспериментальной микологии: Справочник. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.

11. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.

12. Селочник Н.Н. Трахеомикоз дуба // Микол. и фитопатол. — 1998. — 32, № 4. — С. 63–74.

13. Тугай Т.И., Василевская А.И., Артышкова Л.В., Бузарова Е.И., Наконечная Л.Т. Динамика роста и особенности потребления глюкозы некоторыми видами рода *Penicillium*, проявляющими радиоадаптивные свойства // Микол. и фитопатол. — 2010. — 44, № 5. — С. 452–461.

14. de Beer Z.W., Wingfield B.D., Wingfield M.J. The *Ophiostoma piceae* complex in the Southern Hemisphere: a phylogenetic study // Mycol. Res. — 2003. — 107, № 4. — P. 469–476.

15. Dickinson C.H., Boardman F. Physiological studies of some fungi isolated from peat // Trans. Brit. Mycol. Soc. — 1970. — 55, № 2. — P. 293–305.

16. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H. Compendium of soil fungi / Second edition. — Eching: IHW-Verlag, 2007. — 672 p.

17. Kamgan N.G., Jacobs K., de Beer Z.W., Wingfield M.J., Roux J. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species including three new taxa, associated with wounds on native South African trees // Fungal Diversity. — 2008. — V. 29. — P. 37–59.

18. Kusari S., Hertweck C., Spiteller M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites // Chemistry & Biology. — 2012. — 19, N 7. — P. 792–798.

19. Thomma B.P.H.J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite // Molecular Plant Pathology. — 2003. — 4, № 4. — P. 225–236.

Стаття надійшла до редакції 04.05.2013 р.



УДК 579.61:616-078

О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, Т.М. Полішко, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара,
пр-т Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, Україна,
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНИХ І НЕПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Мета. Вивчення біологічних властивостей штамів *Staphylococcus epidermidis*, їх здатності до плівкоутворення, факторів патогенності та рівнів чутливості до антибіотиків та до комерційних препаратів бактеріофагів. **Методи.** Використовували мікробіологічні та фізіолого-біохімічні методи. **Результати.** В ході досліджень було виділено 122 штами стафілококів, 37 з яких ідентифіковані як *S. epidermidis*. З них 20 штамів були здатні утворювати плівку. Встановлено, що більшість штамів *S. epidermidis* (15 плівкоутворювальних і 12 неплівкоутворювальних) чутливі до дії «Бактеріофага стафілококового рідкого». Всі виділені штами *S. epidermidis* виявилися чутливими до хінолонів другого покоління – офлоксацину та цiproфлоксацину. Також більшість (17 плівкоутворювальних та 15 неплівкоутворювальних) штамів були чутливі до гентаміцину, який належить до аміноглікозидів. **Висновок.** Із 20 плівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* – 75% були чутливими до дії «Бактеріофага стафілококового рідкого» та всі 100% штамів – чутливі до фторхінолонів.

Ключові слова: біоплівка, плівкоутворювальні штами, неплівкоутворювальні штами, *Staphylococcus epidermidis*.

Відомо, що стафілококи є збудниками значної частини позалікарняних та нозокоміальних інфекцій [11]. Основні ураження викликають *Staphylococcus aureus* і *S. epidermidis* [5, 9]. Останній, що найчастіше колонізує шкіру та слизові оболонки, характеризується слабкою вірулентністю, більшість викликаних ним інфекцій носить нозокоміальний характер, їх частіше спостерігають у пацієнтів зі зниженим імунітетом. Для *S. epidermidis* типовими є ураження, пов'язані з колонізацією різних поверхонь, в тому числі протезів, катетерів, дренажів, або гематогенне розповсюдження після хірургічного втручання, а також інфекційні ураження шкіри та м'яких тканин, кісток, суглобів. Доволі часто епідермальні стафілококи викликають ураження сечовидільної системи, особливо у людей старше 50 років з різними формами уропатологій [12].

© О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, Т.М. Полішко, А.І. Вінніков, 2013



Необхідність вивчення інфекцій, що викликані грампозитивними мікроорганізмами, особливо штамми із множинною резистентністю до антибіотиків, визнається у всьому світі [14]. Розповсюдження стафілококів, резистентних до метициліну або оксациліну, і стафілококів зі зниженою чутливістю до ванкоміцину є проблемою в сучасній медицині [13]. Такі особливості стафілококів стають причиною обмеженого вибору антибактеріальних препаратів для лікування інфекцій, викликаних цими штамми мікроорганізмів. Для епідермального стафілокока згадана проблема є актуальною, адже, саме серед коагулазонегативних стафілококів доволі поширеним явищем є антибіотикорезистентність. Розповсюдження таких штамів зумовлює необхідність використання поряд із антибіотиками інших протибактеріальних препаратів. Одним з ефективних методів у комплексі із застосуванням антибіотиків може стати використання бактеріофагів для лікування ряду інфекційних процесів.

Метою роботи було відібрати штамми *S. epidermidis*, вивчити їх здатність до плівкоутворення, фактори патогенності, рівні чутливості до антибіотиків та чутливість до комерційних препаратів бактеріофагів.

Матеріали та методи

Всього було ідентифіковано 122 клінічних штамми стафілококів, що були отримані із лабораторії мікробіології та імунології ДУ Інститут гастроентерології НАМН України.

Для подальших досліджень необхідно було відібрати штамми *S. epidermidis*.

Ідентифікацію отриманих штамів проводили відповідно до ознак, наведених у визначнику бактерій Берджі [8]. Для визначення приналежності до роду *Staphylococcus* на сольовий агар (10% NaCl) пересівали всі культури, у яких при мікроскопії спостерігали грампозитивні коки, зібрані у грона. Належними до виду *S. epidermidis* вважали коагулазонегативні штамми, що утворювали кислоту з сахарози та мальтози в анаеробних умовах, відновлювали нітрати, ферментували глюкозу і лактозу, давали ріст на середовищі Гіса з манітом без утворення кислоти в анаеробних умовах, чутливі до новобіоцину (мінімальна пригнічувальна концентрація <1,6 мкг/мл). Диференціацію стафілококів на коагулазопозитивні та коагулазонегативні проводили з використанням сухої цитратної плазми кролика (ЗАТ «Біолік», Україна) в реакції плазмокоагуляції. Облік результатів здійснювали через 2-, 3-, 18- та 24 годин. Візуально визначали утворення згустків плазми.

Вивчення здатності до плівкоутворення перевіряли у експрес-тесті: у кожну лунку 96-лункового стерильного імунологічного планшета (Sarstedt, Німеччина) вносили 0,2 мл м'ясо-пептонного бульона (МПБ) та засівали 50 мкл суспензії клітин добової культури стафілококів, що містила $3,2 \times 10^4$ клітин/мл. За плівкоутворенням спостерігали протягом 72 годин.



По закінченню інкубації залишки живильного середовища обережно відбирали шприцом. Якщо на стінках лунок планшета залишалася біоплівка, то штамп вважали плівкоутворювальним [4, 10].

Для вивчення динаміки приросту біоплівок на дно флаконів поміщали покривні скельця, вносили 0,4 мл бульйонної культури ($3,5 \times 10^6$ КУО/мл), інкубували в термостаті 3 год при 37 °С. Після чого додавали 1,6 мл свіжого м'ясо-пептонного бульйону до загального об'єму 2,0 мл. Флакони знову поміщали в термостат при 37 °С [10].

Через одну, дві та три доби визначали кількість КУО/мл у змитій з покривного скла в стерильну пробірку біоплівці, яку гомогенізували в 1 мл ізотонічного розчину (0,5% натрію хлориду).

У досліджуваних штамів проводили визначення і порівняння тестів патогенності таких, як гемолітична активність на кров'яному агарі, ліпазна та лецитиназна активність на жовтково-сольовому агарі [7].

Чутливість до антибіотиків визначали з використанням диск-дифузійного методу. Було використано диски з антибіотиками: цефтриаксон, цефтазидим, цефуроксим, азтреонам, тетрациклін, доксициклін гідрохлорид, сизоміцин, пеніцилін, олеандоміцин, оксацилін, цiproфлоксацин, офлоксацин, гентаміцин, еритроміцин (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Індія). Антибіотики обирали серед найбільш застосовуваних у клінічній практиці з урахуванням механізму їх дії згідно Наказу МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [6].

Визначали чутливість до таких комерційних препаратів бактеріофагів: «Інтесті-бактріофаг рідкий» (Мікроген, РФ), «Секстафаг» (Мікроген, РФ), «Бактеріофаг стафілококовий рідкий» (Мікроген, РФ). Для цього на чашки Петрі з МПА засівали 0,1 мл бактеріальної суспензії, яка містила $1,5 \times 10^8$ кл/мл. Розтирали шпателем і підсушували в термостаті протягом 30 хв при 37 °С. Потім на чашку з засівом наносили по 0,05 мл препаратів бактеріофагів. Чашки інкубували в термостаті при 37 °С 24 год. Через добу враховували результати. Чутливими вважали ізоляти, на газоні яких виявляли бляшки (негативні колонії).

Результати досліджень обробляли статистично з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Серед досліджених 122 клінічних штамів стафілококів, що були отримані із лабораторії мікробіології та імунології ДУ Інститут гастроентерології НАМН України до коагулазопозитивних належали 67 штамів, а до коагулазонегативних — 55. За результатами вивчення фізіолого-біохімічних властивостей, а саме анаеробного утворення кислоти з сахарози та мальтози, відновлення нітратів, ферментації глюкози та лактози, відсутності утворення кислоти з маніту у анаеробних умовах, чутливості



до новобіоцину (МПК < 1,6 мкг/мл) встановлено, що 37 штамів (30,3 %) належали до виду *S. epidermidis*.

Однією з біологічних властивостей багатьох бактерій є здатність до плівкоутворення і такі штами привертають особливу увагу, оскільки відомо, що в плівці антибіотикорезистентність вища, ніж у планктонних культурах. Визначено, що 54% досліджених штамів *S. epidermidis* плівкоутворювальні. Плівка формувалася протягом трьох діб, осідала на дно лунок планшета, за характером росту була тоненькою, гладкою, мала білуватий колір.

Основний приріст біоплівки спостерігали протягом перших двох діб, в середньому кількість клітин збільшувалася у $7,1 \times 10^5$ разів. Протягом третьої доби кількість КУО/мл збільшилася у $1,2 \times 10^3$ разів порівняно з другою добою.

Для всіх ідентифікованих штамів вивчали прояв факторів патогенності та визначали чутливість до антибіотиків. При вивченні факторів патогенності виявилось, що повний гемоліз (діаметр зони $18 \pm 0,3$ мм) на кров'яному агарі та ліпазу (діаметр зони $5 \pm 0,3$ мм) активність на ЖСА виявляли всі плівкоутворювальні штами *S. epidermidis*, лецитиназну активність спостерігали у 80% (діаметр зони $6 \pm 0,3$ мм) плівкоутворювальних штамів. Серед неплівкоутворювальних штамів повний гемоліз та ліпазу активність спостерігали у 89% (діаметр зони $11 \pm 0,3$ мм) та лецитиназну — у 71% (діаметр зони $5 \pm 0,3$ мм). Таким чином, можна відмітити, що частка штамів із проявом факторів патогенності вище серед плівкоутворювальних штамів.

Встановлення стійкості до антибіотиків проводили відповідно до критеріїв рівнів стійкості/чутливості [6].

Вивчення стійкості до антибіотиків показало, що використання фторхінолонів другого покоління (офлоксацину, цiproфлораксацину), які виявляють бактерицидний ефект, пригнічуючи два важливих ферменти мікробної клітини — ДНК-гіразу і топоізомеразу IV, внаслідок чого порушується синтез ДНК, були ефективними проти всіх 37 штамів *S. epidermidis* у планктонній культурі (рис. 1, 2). Помірночутливих та стійких як плівкоутворювальних, так і неплівкоутворювальних серед досліджених штамів стафілококів не виявлено.

На відміну від фторхінолонів, до тетрацикліну серед 20 плівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* (рис. 1) стійкими виявилось 8 штамів, а до доксициклін гідрохлориду — 7. Серед 17 неплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* (рис. 2) стійкими до тетрацикліну було 2 штами, а до доксициклін гідрохлориду — 3 штами. При використанні дисків з сизоміцином стійкість виявили 10 плівкоутворювальних штамів, а серед неплівкоутворювальних — 5 штамів. Ці антибіотики належать до тетрациклінів, які зв'язуються з 30S-субодиницею рибосоми та пригнічують синтез білка. Також порушують синтез білка і аміноглікозиди, серед яких

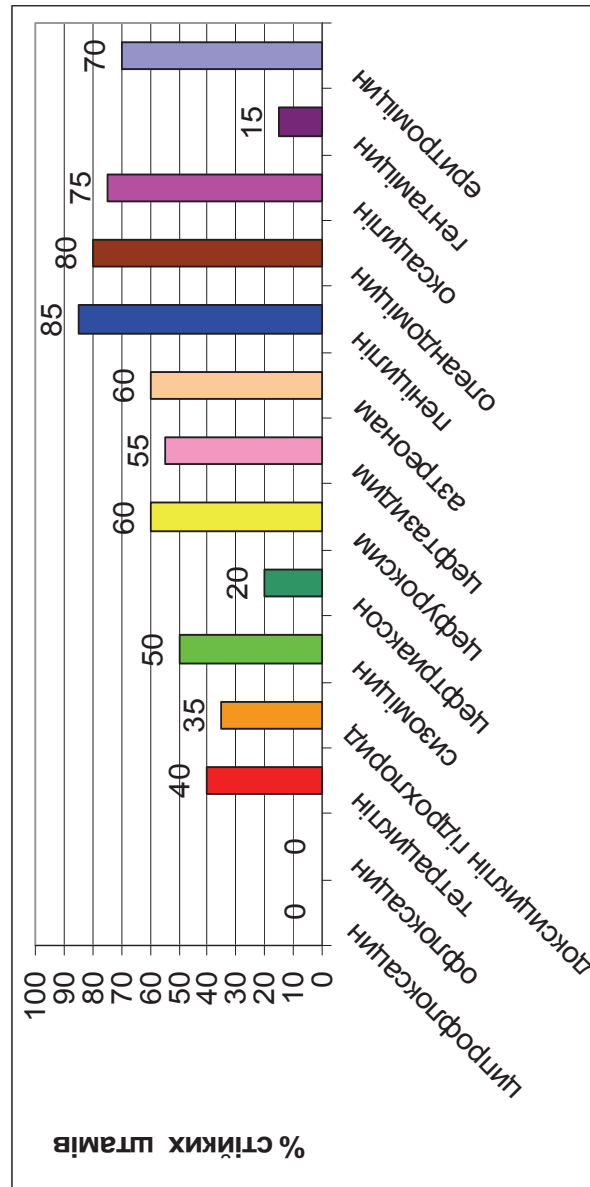


Рис. 1. Частота виявлення стійких до антибіотиків плівкоутворювальних штамів

Fig. 1. Incidence of antibiotic-resistant film-forming strain



стійкість визначено до гентаміцину. Стійкими виявилися 3 плівкоутворювальних та 2 неплівкоутворювальні штами.

До цефалоспоринів, що пригнічують синтез клітинної стінки бактерій належать цефтриаксон, цефуроксим та цефтазидим. До цефтриаксону стійкість спостерігали у 4 плівкоутворювальних штамів, а серед неплівкоутворювальних — 5 штамів. До цефуроксиму стійкість виявили 12, а до цефтазидиму — 11 плівкоутворювальних штамів. Серед неплівкоутворювальних штамів стійкість до цефуроксиму виявляли 10 штамів, а до цефтазидиму — 7 штамів.

При вивченні чутливості до азтреонаму, який є антибіотиком з класу монобактамів, що порушують синтез клітинної стінки, стійкість виявили 12 плівкоутворювальних та 3 неплівкоутворювальні штами.

Найменша кількість досліджуваних, як плівкоутворювальних так і неплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* виявилася стійкою до еритроміцину, пеніциліну, оксациліну та олеандоміцину. Стійкість до еритроміцину, що належить до макролідів, антимікробний ефект яких зумовлений порушенням синтезу білка на рибосомах мікробної клітини, виявляли 14 плівкоутворювальних та 11 неплівкоутворювальних штамів. Стійкість до пеніциліну виявили 17 плівкоутворювальних та 12 неплівкоутворювальних штамів, до оксациліну стійкість визначено для 15 плівкоутворювальних та до 11 неплівкоутворювальних штамів, а до олеандоміцину стійкі — 16 плівкоутворювальних та 9 неплівкоутворювальних штамів. Помірної чутливості не спостерігали. Оксацилін, олеандоміцин та пеніцилін відносяться до β -лактамів, які порушують синтез клітинної стінки бактерій.

Таким чином, як для плівкоутворювальних, так і неплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* найбільш ефективною мішенню дії антибіотиків виявилися ферменти, які беруть участь у процесах, пов'язаних з синтезом ДНК, — це ДНК-гіраза та топоізомераза, що пригнічується фторхінолонами, та 30S-субодиниця бактеріальної рибосоми, через вплив на яку пригнічується синтез білка тетрациклінами та аміноглікозидами. Найменш ефективним виявився вплив β -лактамічних антибіотиків, що пригнічують синтез клітинної стінки бактерій та ряду макролідів, які порушують синтез білка на рибосомах мікробної клітини внаслідок взаємодії з 50S-субодиницею, що було показано як для плівкоутворювальних, так і неплівкоутворювальних штамів. Останнє дозволяє припустити, що формування біоплівки підвищує стійкість мікроорганізмів лише до антибактеріальних препаратів, мішені дії яких мають внутрішньоклітинну локалізацію. Тобто плівкова організація культури, вірогідно дозволяє затримувати проникнення антибіотиків всередину клітини.

Здатність до плівкоутворення є додатковим фактором патогенності різних штамів мікроорганізмів. Відомо, що мікроорганізми, які здатні до плівкоутворення мають додаткові гени та є носіями плазмід, які роблять їх стійкими до більшості антибіотиків. Клітини стафілокока, які несуть



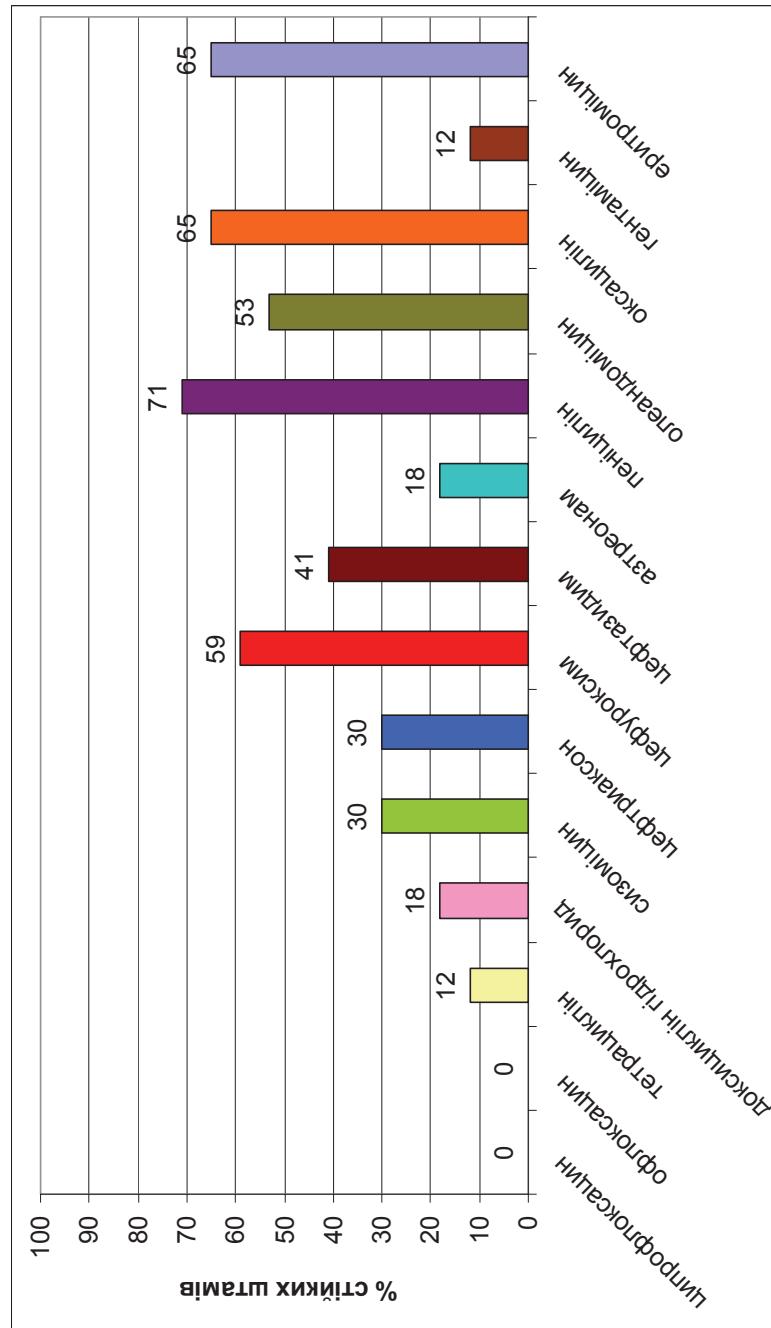


Рис. 2. Частота виявлення стійких до антибіотиків нелівоутворювальних штамів
 Fig. 2. Incidence of antibiotic-resistant non-film-forming strain

плазмідні стійкості до антибіотика, синтезують ферменти, що інактивують чи модифікують молекулу антибіотика [1, 3]. У зв'язку зі стійкістю серед досліджуваних плівкоутворювальних та неплівкоутворювальних штамів до пеніциліну — 85% і 71%, оксациліну — 75% і 65%, олеандомицину — 80% і 53% та еритромицину — 70% і 65%, відповідно, можна припустити наявність плазмідних або хромосомних детермінант стійкості до цих антибіотиків у вивчених штамів.

Таким чином, до використаних антибіотиків більше стійких штамів було серед плівкоутворювальних штамів *S. epidermidis*. Найменша кількість досліджуваних штамів *S. epidermidis* виявилася стійкою до антибіотиків з класів макролідів, які порушують синтез білка на рибосомах, та β -лактамів, що впливають на синтез клітинної стінки бактерій.

Поширення антибіотикорезистентності серед клінічних штамів перешкоджає комплексному використанню антибіотиків. Тому проводили вивчення чутливості до комерційних препаратів бактеріофагів. Лізис клітин *S. epidermidis* під дією «Бактеріофага стафілококового рідкого» спостерігали у 15 плівкоутворювальних та 12 неплівкоутворювальних штамів, під дією «Інтесті-бактеріофага рідкого» — у 12 плівкоутворювальних та 11 неплівкоутворювальних штамів. Всі 37 штамів *S. epidermidis* виявилися стійкими до дії препарату «Секстафаг».

Виділені плівкоутворювальні та неплівкоутворювальні штами *S. epidermidis* виявилися чутливими до препарату «Бактеріофаг стафілококовий рідкий», що свідчить про можливість комплексного використання бактеріофагів у лікуванні захворювань, зумовлених як стійкими, так і чутливими до антибіотиків штамми мікроорганізмів.

Визначено, що із 122 досліджених клінічних штамів стафілококів 37 штамів належали до *S. epidermidis*, з них 20 були плівкоутворювальними та 17 неплівкоутворювальними. Повний гемоліз на кров'яному агарі та ліпазну активність на ЖСА виявляли всі плівкоутворювальні штами *S. epidermidis*, лецитиназну активність спостерігали у 80% плівкоутворювальних штамів. Серед неплівкоутворювальних штамів повний гемоліз та ліпазну активність спостерігали у 89% та лецитиназну — у 71%.

Основний приріст біоплівки спостерігався протягом перших двох діб: в середньому кількість клітин збільшувалася у $7,1 \times 10^5$ разів. Протягом третьої доби кількість КУО/мл збільшилася у $1,2 \times 10^3$ разів порівняно з другою добою.

При дослідженні чутливості до антибіотиків показано, що всі виділені штами *S. epidermidis* були чутливими до фторхінолонів другого покоління — офлоксацину та ципрофлоксацину. Чутливість відмічено до гентаміцину у 17 плівкоутворювальних та 15 неплівкоутворювальних штамів, до цефтриаксону у 16 плівкоутворювальних та 12 неплівкоутворювальних штамів, до тетрацикліну — 12 плівкоутворювальних та 15 неплівкоутворювальних штамів, до доксициклін гідрохлориду у 13 плівкоутворювальних та 14 неплівкоутворювальних штамів.



Встановлено, що чутливість до дії «Бактеріофага стафілококкового рідкого» виявили 15 плівкоутворювальних і 12 неплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis*, до «Інтесті-бактеріофага рідкого» — 12 плівкоутворювальних та 11 неплівкоутворювальних штамів. Всі 37 штамів *S. epidermidis* були стійкими до фагів з препарату «Секстафаг».

Встановлено, що 100% плівкоутворювальних штамів виявилися чутливими до фторхінолонів другого покоління, 85% виявили чутливість до гентаміцину та 80% — до цефтриаксону, при цьому 80% були стійкими до β -лактамних антибіотиків і 70% — до еритроміцину.

О.И. Сидашенко, О.С. Воронкова, Т.Н. Полишко, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара,
пр-т Гагарина, 72, Днепропетровск, Украина,
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ И НЕПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Реферат

Цель. Изучение биологических свойств штаммов *Staphylococcus epidermidis*, их способности к пленкообразованию, факторов патогенности и чувствительности к антибиотикам и к коммерческим препаратам бактериофагов. **Методы.** Использовали микробиологические и физиолого-биохимические методы. **Результаты.** В ходе исследований были выделены 122 штамма стафилококков, 37 из которых идентифицированы как *S. epidermidis*. Из них 20 штаммов — пленкообразующие, а 17 — непленкообразующие. Установлено, что наибольшее количество штаммов *S. epidermidis* — и 12 непленкообразующих были чувствительны к действию «Бактериофага стафилококкового жидкого». Все выделенные штаммы *S. epidermidis* оказались чувствительными к хинолонам второго поколения — офлоксацину и ципрофлоксацину. Также для 12 пленкообразующих и 14 непленкообразующих штаммов наблюдалась чувствительность к гентамицину. **Выводы.** Таким образом, 75% пленкообразующих штаммов *S. epidermidis* были чувствительны к действию «Бактериофага стафилококкового жидкого» и все 100% штаммов — чувствительны к фторхинолонам.

Ключевые слова: биопленка, пленкообразующие штаммы, непленкообразующие штаммы, *Staphylococcus epidermidis*.



O.I. Sidashenko, O.S. Voronkova, T.M. Polishko, A.I. Vinnikov

Dnepropetrovsk National University of Oles Gonchar
Avenue Gagarin, 72, Dnipropetrovsk, Ukraine
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru

BIOLOGICAL PROPERTIES OF FILM-FORMATION AND NON-FILM-FORMATION STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS* *EPIDERMIDIS* STUDYING

Summary

The **aim** was to select the strains of *S. epidermidis*, to test their ability to film formation, to study biofilm growth, pathogenicity factors and sensitivity to antibiotics, to investigate the sensitivity to commercial bacteriophage preparations. **Methods.** The studies used the microbiological and biochemical methods. **Results.** 122 strains of *Staphylococci* were identified, 37 of which were identified as *S. epidermidis*. 20 of these strains were film-forming and 17 – non-film-forming. 15 film-forming and 12 non-film-forming strains of *S. epidermidis* were sensitive to “Staphylococcal bacteriophage liquid”. All of isolated strains of *S. epidermidis* were sensitive to quinolones of second generation – ofloxacin and ciprofloxacin. Also, 12 film-forming and 14 non-film-forming strains had sensitivity to gentamicin. **Conclusion.** Thus, 75% of film-forming strains of *S. epidermidis* have been sensitive to “Staphylococcal bacteriophage liquid” and 100% strains were susceptible to fluoroquinolones.

Key words: biofilm, film-forming strains, non-film-formation strains, *S. epidermidis*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоусов Ю.Б., Шатунов С.М. Устойчивость клинических штаммов коагулазоотрицательных стафилококков // Клин. фармакология и терапия. – 1994. – № 3. – С. 58–61.
2. Беляев А.В. Клиническое значение β -лактамаз расширенного спектра действия // Клиническая антибиотикотерапия. – 2003. – № 1. – С. 10 – 14.
3. Кондрапова О.А., Ещина А.С., Дмитриева Н.Ф. Генноопосредованная устойчивость к антибиотикам // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 7. – С. 26–30.
4. Коробов В.П., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Полюдова Т.В. Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 3, № 5. – С. 156–159.



5. Митрохин С.Д., Сергеев С.А., Махсон А.Н. Обоснованность применения мупироцина в формулярах антибактериальной терапии и профилактики нозокомиальной инфекции в онкологической клинике // Инфекции и антимикробная терапия. — 2000. — Т. 2., в. 6. — С. 181.
6. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». — К: МОЗ України, 2007. — 63 с.
7. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ № 535. — [чинний від 22.04.1985р.]. — М.: МОЗ СССР, 1985. — 65 с.
8. Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. — Москва «Мир», 1997. — 555 с.
9. Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Инфекции в интенсивной терапии — М. — 2000. — 144 с.
10. Тец В.В., Кнорринг Т.Ю., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Артеменко К.Л. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — № 12 — С. 9—13.
11. Carbon C. MRSA and MRSE: is there an answer? // Clin Microbiol Infect. — 2000. — 6., N 2. — P. 17—22.
12. Marshall S.A., WW Werner, MA Pfaller, RN. Jones Staphylococcus aureus and coagulase negative Staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility and molecular (mecA) characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE Program // Diagn Microbiol Infect Dis — 1998 — N. 30. — P. 205—214.
13. Shopsis B., Mathema B., Martines J. Prevalence of meticillin-resistant and meticillin-susceptible Staphylococcus aureus in the community // J Infect Dis. — 2000. — 182, N 1. — P. 12—18.
14. Real T.M. The thread of vancomycin-resistance // Am J Med. — 1999. — 106, N 5A — P. 26—37.
15. Jones R.N., Low D.E., Pfaller M.A. Epidemiological trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant Gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds // Diagn Microbiol Infect Dis. — 1999. — N33. — P. 101—112.
16. Gottlieb T., Mitchell D. The independent evolution of resistance to ciprofloxacin, rifampicin, and fusidic acid in MRSA in Australian teaching hospitals (1990—1995). Australian Group for Antimicrobial Resistance AGAR // J Antimicrob Chemother. — 1998. — N 42. — P. 67—73.
17. Raad I., Alrahwan A., Rolston K. Staphylococcus epidermidis: emerging resistance and need for alternative agents // Clin Infect Dis. — 1998. — N 26. — P. 2—7.

Стаття надійшла до редакції 04.05.2013



А.І. Чуєнко¹, М.Я. Вортман², В.В. Шевченко²

¹Інститут мікробіології і вірусології НАН України імені Д.К.Заболотного, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ, ДСП Д 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 11 89,
e-mail: helmhammer@ Rambler.ru

²Інститут хімії високомолекулярних сполук НАН України, Харківське шосе, 48, Київ, 02160,
Україна, тел.: +38 (044) 559 13 94, e-mail: vmar_1962@i.ua

ФУНГІЦИДНА АКТИВНІСТЬ ГУАНІДИНВІСНИХ ОЛІГОМЕРІВ, ПЕРСПЕКТИВНИХ ДО ЗАСТОСУВАННЯ В ГУМОВІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ

Мета. Дослідження фунгіцидної активності нових перспективних до застосування в гумовій промисловості речовин, що мали робочі назви J1 та M1 щодо мікроміцетів-деструкторів гумотехнічних матеріалів (ГТМ). **Методи.** Визначення фунгіцидної активності проводили за допомогою методу дифузії в агар за діаметром зон затримки росту мікроскопічних грибів. **Результати.** Показано, що речовина J1 мала активність лише щодо 5 ізолятів на відміну від M1, яка викликала значне пригнічення росту всіх мікроскопічних грибів, використаних в даній роботі. Досліджена фунгіцидна активність різних концентрацій M1 (0,5; 1,0; 3,0 та 5,0%). Встановлено, що в концентрації 3,0% речовина M1 мала високу фунгіцидну активність щодо всіх досліджених ізолятів (зони затримки росту $27,8 \pm 0,8$ – $87,8 \pm 3,2$ мм), та помірну – щодо *A. flavus* F-41432 (зона затримки росту $21,1 \pm 0,4$ мм). Відмічено посилення інтенсивності утворення пігментів у ізолятів *A. alternata* F-41431, *A. flavus* F-41432, *A. ustus* F-41437, *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermit* F-41404 та *F. roae* F-41416 під впливом досліджених сполук, що могло бути пов'язано з активацією одного з компонентів їх захисних систем. **Висновки.** Показано перспективність застосування речовини M1 у концентрації 3,0% для захисту гумотехнічних матеріалів від пошкоджень мікроскопічними грибами.

Ключові слова: грибостійкість, гумотехнічні матеріали, мікроскопічні гриби, фунгіциди, полігуанідини.

Пошкодження гумотехнічних матеріалів (ГТМ) мікроскопічними грибами часто відбувається при їх зберіганні, експлуатації в умовах підвищеної відносної вологості повітря (90% і вище) та введенні до їх складу технологічно необхідних компонентів (пластифікаторів, прискорювачів та активаторів вулканізації, антипіренів, барвників та ін.), які мають низьку грибостійкість [15].

Одним із засобів захисту гуми та виробів на її основі є введення до її складу фунгіцидів. Захист ГТМ фунгіцидами – відносно складна задача,



так як такі речовини можуть бути токсичними для людини та забруднювати навколишнє середовище. Деякі фунгіциди, зокрема сполуки міді, у поєднанні з компонентами гумової суміші досить часто втрачають свої властивості, або погіршують фізико-механічні властивості гуми [3].

Останнім часом увагу вітчизняних та зарубіжних дослідників [5, 9, 12] привертає застосування як фунгіцидів похідних гуанідину, зокрема їх олігомерів, що містять різні хімічні групи. Відмічено позитивний вплив похідних гуанідину на фізико-механічні властивості гумотехнічних матеріалів, а також зниження часу їх вулканізації [1]. Такі речовини мають широкий спектр дії, відносно низьку собівартість, безпечні для здоров'я людини. Механізм їх фунгіцидної дії пов'язаний з руйнацією біополімерів, які входять до складу клітинної мембрани, що призводить до порушення її функцій [10].

Слід звернути увагу, що для ефективного вибору засобу захисту ГТМ від грибного ураження необхідно враховувати особливості видового складу мікроскопічних грибів, що викликали їх пошкодження.

Метою даної роботи було дослідження фунгіцидної активності нових перспективних до застосування в гумовій промисловості речовин, щодо мікроміцетів-деструкторів ГТМ.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були мікроскопічні гриби, виділені нами з гумотехнічних матеріалів та їх компонентів [14]: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl. F-41431, *Aspergillus flavus* Link: Fr. F-41432, *A. fumigatus* Fresen. F-41489, *A. niger* van Tieghem F-41456, *A. sydowii* (Bainier et Sartory) Thom et al. F-41420, *A. ustus* (Bainier) Thom et Church F-41437, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries F-41436, *C. sphaerospermum* Penz. F-41404, *Fusarium poae* (Peck) Wollenw. F-41416, *Mucor racemosus* Fresen. F-41411, *Penicillium chrysogenum* Thom F-41427, *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes F-41410 та *Trichoderma viride* Pers.: Fr. F-41409.

Речовинами, фунгіцидна активність яких досліджувалася в даній роботі, були олігомерні похідні гуанідину гідрохлориду, що мали робочі назви: J1 та M1 (рис. 1).

Для визначення фунгіцидної активності даних сполук, готували їх водні розчини, що містили об'ємні частки діючих речовин, відповідні таким, що використовуються під час процесу вулканізації гуми. Для J1 вона становила 3%, а для M1 — 0,5; 1,0; 3,0; та 5,0%, відповідно. Як еталон фунгіцидної активності використовували 3%-ий водний розчин формальдегіду.

Мікроскопічні гриби вирощували та готували суспензію їх конідій згідно ГОСТ 9.048-89 [4].

Фунгіцидну активність визначали методом дифузії в агар [8]. За діаметром зони затримки росту тест-культур оцінювали їх чутливість щодо



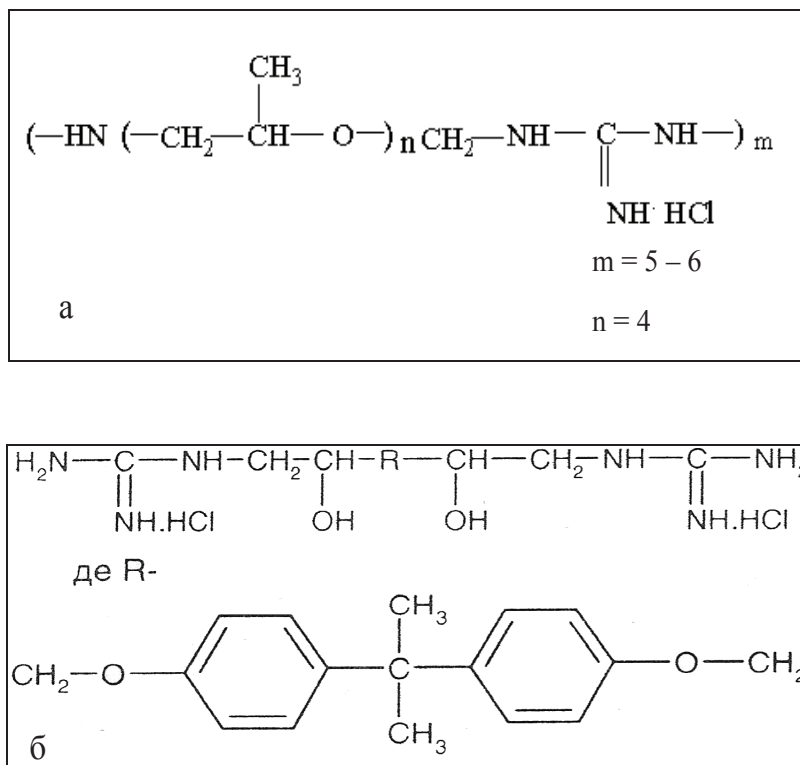


Рис. 1. Структурні формули досліджених сполук: а). J1; б). M1

Fig. 1. Structural formulae of investigated compounds: а). J1; б). M1

досліджених сполук: > 25 мм — висока; ≤ 25 мм — середня; < 15 мм — низька; 0 мм — відсутня [6]. Досліди проводили в трикратній повторності, результати експерименту оброблено методами математичної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel 2010, різницю між середніми величинами вважали достовірною за $P < 0,05$ [2].

Результати та їх обговорення

Наші випробування показали, що діаметр зон затримки росту штамів *A. niger* F-41456, *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermum* F-41404, *F. poae* F-41416 та *T. viride* F-41409 під впливом речовини J1 становив відповідно $5,0 \pm 0,2$; $23,3 \pm 0,6$; $31,1 \pm 1,0$; $5,5 \pm 0,7$ та $44,4 \pm 1,5$ мм. Речовина M1 на відміну від J1 більше пригнічувала ріст всіх штамів грибів, що були досліджені нами (табл. 1).

Речовина J1 виявилась неактивною по відношенню до 8 штамів грибів, мала низьку фунгіцидну дію щодо *A. niger* F-41456 та *F. poae* F-41416, середню — щодо *C. cladosporioides* F-41436 та високу щодо *C. sphaerospermum* F-41404 та *T. viride* F-41409.

На відміну від J1 речовина M1 проявляла високу активність щодо всіх досліджених ізолятів, окрім *A. flavus* F-41432, що характеризувався

помірною чутливістю. Найбільше пригнічення росту спостерігали у ізолятивах *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermum* F-41404, *S. chartarum* F-41410 та *T. viride* F-41409, що становило $87,8 \pm 3,2$; $62,2 \pm 2,0$; $60,0 \pm 1,4$ та $73,33 \pm 1,6$ мм, відповідно.

Таблиця 1

Фунгіцидна активність 3%-их водних розчинів досліджених сполук

Table 1

Fungicidal activity of 3% water solutions of investigated compounds

Штам	Діаметр зони затримки росту, мм		
	М1	Ј1	Еталон (формальдегід)
<i>A. alternata</i> F-41431	$55,5 \pm 2,0$	0,0	$90,0 \pm 0,3$
<i>A. flavus</i> F-41432	$21,1 \pm 0,4$	0,0	$90,0 \pm 0,5$
<i>A. fumigatus</i> F-41489	$36,7 \pm 0,7$	0,0	$90,0 \pm 0,2$
<i>A. niger</i> F-41456	$46,7 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,2$	$90,0 \pm 0,1$
<i>A. sydowii</i> F-41420	$44,4 \pm 2,0$	0,0	$90,0 \pm 0,5$
<i>A. ustus</i> F-41437	$31,1 \pm 1,5$	0,0	$85,0 \pm 2,0$
<i>C. cladosporioides</i> F-41436	$87,8 \pm 3,2$	$23,3 \pm 0,6$	$90,0 \pm 0,2$
<i>C. sphaerospermum</i> F-41404	$62,2 \pm 2,0$	$31,1 \pm 1,0$	$69,3 \pm 3,2$
<i>F. poae</i> F-41416	$36,7 \pm 1,2$	$5,5 \pm 0,7$	$21,6 \pm 1,2$
<i>M. racemosus</i> F-41411	$27,8 \pm 0,8$	0,0	$90,0 \pm 0,2$
<i>P. chrysogenum</i> F-41427	$30,0 \pm 0,6$	0,0	$90,0 \pm 0,1$
<i>S. chartarum</i> F-41410	$60,0 \pm 1,4$	0,0	$90,0 \pm 0,2$
<i>T. viride</i> F-41409	$73,33 \pm 1,6$	$44,4 \pm 1,5$	$90,0 \pm 0,4$

Розчин формальдегіду у концентрації 3% повністю пригнічував ріст всіх досліджених грибів за винятком *A. ustus* F-41437, *C. sphaerospermum* F-41404 та *F. poae* F-41416. На нашу думку, це може бути пов'язано з адаптивними властивостями досліджених ізолятів, зокрема здатністю до посиленого утворення пігментів [13].

Сильний фунгіцидний ефект речовини М1, ймовірно, пов'язаний з наявністю у її складі дифенілпропанової групи. Відомо, що в молекулах органічних речовин під впливом наявних в них різних за своєю природою атомів або атомних груп відбувається перерозподіл електронної густини хімічних зв'язків (позитивний або негативний індукційний ефект). Наявність дифенілпропанової групи в молекулі М1 спричиняє негативний індукційний ефект — замісник зменшує електронну густину на тому атомі



вуглецю, з яким він зв'язаний. При цьому замісник набуває часткового негативного заряду (δ^-), а атом вуглецю — часткового позитивного заряду (δ^+) [7]. За даними літератури, величина (δ^+) може бути одним з факторів, що підсилює взаємодію фунгіцидних речовин з клітинною стінкою грибів [11].

До складу сполуки J1 входить оксиізопропіленова група, що проявляє позитивний індукційний ефект. При цьому такий замісник набуває часткового позитивного заряду (δ^+), а атом вуглецю — часткового негативного заряду (δ^-) [7], що в свою чергу може знижувати ефективність фунгіциду внаслідок зменшення його взаємодії з грибним міцелієм.

Відомо, що макромолекули гуанідинових полімерів адсорбуються на негативно зарядженій поверхні клітини, блокуючи тим самим процеси дихання та живлення (транспорту метаболітів через клітинну стінку та цитоплазматичну мембрану). Вони дифундують через клітинну стінку, спричиняючи незворотні пошкодження всередині клітини та інактивацію ряду ферментів [10].

Одночасно з вивченням фунгіцидної активності спостерігали посилення пігментації у штамів *A. alternata* F-41431, *A. flavus* F-41432, *A. ustus* F-41437, *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermum* F-41404 та *F. poae* F-41416, що може бути пов'язано з їх реакцією на несприятливі умови довкілля (а саме дію фунгіциду) шляхом посилення синтезу пігментів, як одного з компонентів захисної системи мікроміцетів. Останнє узгоджується зі спостереженнями Сухаревича зі співавт. [13], що наполягали на обережному використанні фунгіцидів у промисловості, так як при розвитку грибів-деструкторів на матеріалі, попередньо обробленому фунгіцидом, ефект їх пошкодження значно посилюється.

Наступним етапом досліджень був підбір оптимальної діючої концентрації речовини M1 для подальшого застосування в гумовій промисловості (табл. 2).

Найефективнішою виявилася 3%-ва концентрація речовини M1. Менші її концентрації — 0,5 та 1% мали нижчу фунгіцидну активність, а підвищення її до 5% призводило до зростання інгібування лише трьох штамів — *A. sydowii* F-41420, *A. ustus* F-41437, *S. chartarum* F-41410. На штами *A. alternata* F-41431, *A. flavus* F-41432, *F. poae* F-41416 та *P. chrysogenum* F-41427 підвищення концентрації M1 з 3 до 5% не впливало. У інших шести штамів (*A. fumigatus* F-41489, *A. niger* F-41456, *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermum* F-41404, *M. racemosus* F-41411 та *T. viride* F-41409) при збільшенні концентрації M1 фунгіцидна активність знижувалася. На нашу думку таке явище пояснюється зниженням розчинності фунгіциду M1 у воді з підвищенням його концентрації та як наслідок — послабленням дифузії його в агар і, відповідно, зменшенням його потрапляння до конідій мікроскопічних грибів, що проростали. Окрім того введення даної речовини до складу гумової суміші у концентрації вище 3% є технологічно не вигідним.



Фунгіцидна активність різних концентрацій речовини М1*

Fungicidal activity of different concentrations of substance M1*

Штам	Концентрація М1, %			
	0,5	1,0	3,0	5,0
<i>A. alternata</i> F-41431	24,4±1,0	40,0±1,5	55,5±2,0	55,5±2,0
<i>A. flavus</i> F-41432	11,1±0,4	21,1±0,4	21,1±0,4	21,1±0,4
<i>A. fumigatus</i> F-41489	11,1±0,4	31,1±1,5	36,7±0,7	28,9±1,5
<i>A. niger</i> F-41456	11,1±0,4	26,7±1,2	46,7±1,0	18,9±0,5
<i>A. sydowii</i> F-41420	28,9±1,5	40,0±2,8	44,4±2,0	62,2±2,4
<i>A. ustus</i> F-41437	20,0±1,0	31,1±1,5	31,1±1,5	43,3±1,8
<i>C. cladosporioides</i> F-41436	33,3±0,4	51,1±2,5	87,8±3,2	58,9±2,7
<i>C. sphaerospermum</i> F-41404	33,3±0,4	70,0±2,8	62,2±2,0	53,3±2,5
<i>F. poae</i> F-41416	25,6±0,8	36,7±0,5	36,7±1,2	36,7±2,1
<i>M. racemosus</i> F-41411	11,1±0,4	38,9±0,6	27,8±0,8	25,6±0,3
<i>P.chrysogenum</i> F-41427	11,1±0,4	28,9±1,7	30,0±0,6	30,0±0,8
<i>S. chartarum</i> F-41410	50,0±2,4	54,4±2,2	60,0±1,4	67,8±1,9
<i>T. viride</i> F-41409	31,1±1,1	73,3±2,6	73,33±1,6	50,0±0,7

*Примітки: діаметр зони затримки росту мікроскопічних грибів, мм

*Notes: diameter of zone of inhibition of fungal growth, mm

Таким чином, речовина М1 у концентрації 3% проявляла максимальний фунгіцидний ефект до всіх досліджених нами грибів (окрім *A. flavus* F-41432) та може бути використана як засіб захисту гумотехнічних матеріалів від грибного ураження.



UDC 615.28:582.28

A.I. Chuienko¹, M.Y. Vortman², V.V. Shevchenko²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU, 154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, CSP D 03680, Ukraine, tel.:+38 (044) 526 11 89, e-mail: helmhammer@rambler.ru

²The Institute of Macromolecular Chemistry of the NASU, 48, Kharkivske avenu, Kyiv, 02160, Ukraine, tel.: +38 (044) 559 13 94, e-mail:vmар_1962@i.ua

FUNGICIDAL ACTIVITY OF GUANIDINE-CONTAINING OLIGOMERS, PERSPECTIVE FOR USING IN RUBBER MANUFACTURING

Summary

The **aim** of the work was to research fungicidal activity of the new substances, perspective for the using in rubber industry, and has work names J1 and M1, for the microscopic fungi that are destructors of rubber. **Methods.** Definition of fungicidal activity was explored by the method of diffusion to agar for the diameter of zones of growth inhibition of microscopic fungi. **Results.** It has been shown that substance J1 was active only for five strains, in difference of M1, which caused significant oppression of all investigated microscopic fungi. It had been studied fungicidal activity of different concentrations of M1 (0.5; 1.0; 3.0 and 5.0 %). It was concluded that in concentration 3.0% substance M1 had high fungicidal activity for all explored strains (zones of growth inhibition 27.8 ± 0.8 – 87.8 ± 3.2 mm) and middle – for *A. flavus* F-41432 (zones of growth inhibition 21.1 ± 0.4 mm). It was marked increasing of intensity of the formation of pigments at strains *A. alternata* F-41431, *A. flavus* F-41432, *A. ustus* F-41437, *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermum* F-41404 and *F. poae* F-41416 under influence of investigated substances that may be linked with activation of some components of their adaptive systems. **Conclusions.** The results of the study showed the perspectivity of using of substance M1 in concentration 3.0% for the protection of rubber technical materials from the deterioration caused by microscopic fungi.

Key words: resistance to fungal action, rubber technical materials, microscopic fungi, fungicides, polyguanidine.



УДК 615.28:582.28

А.И. Чуенко¹, М.Я. Вортман², В.В. Шевченко²

¹Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины имени Д.К. Заболотного,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП Д 03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 11 89, e-mail: helmhammer@ Rambler.ru

²Институт химии высокомолекулярных соединений НАН Украины, Харьковское шоссе, 48,
Киев, 02160, Украина, тел.: +38 (044) 559 13 94,
e-mail: vmar_1962@i.ua

ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ГУАНИДИНСОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОМЕРОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕЗИНОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Реферат

Цель. Исследование фунгицидной активности новых перспективных к использованию в резиновой промышленности веществ, имеющих рабочие названия J1 и M1, относительно микромицетов-деструкторов резинотехнических материалов. **Методы.** Определение фунгицидной активности проводили при помощи метода диффузии в агар по диаметру зон задержки роста микроскопических грибов. **Результаты.** Показано, что вещество J1 проявило активность лишь по отношению к 5 изолятам, в отличие от M1, которое вызывало значительное угнетение роста всех микроскопических грибов, использованных в данной работе. Была исследована фунгицидная активность разных концентраций M1 (0,5; 1,0; 3,0 и 5,0%). Установлено, что в концентрации 3,0% вещество M1 имело высокую фунгицидную активность по отношению ко всем исследованным изолятам (зоны задержки роста $27,8 \pm 0,8$ – $87,8 \pm 3,2$ мм), и умеренную – к *A. flavus* F-41432 (зона задержки роста $21,1 \pm 0,4$ мм). Отмечено усиление интенсивности образования пигментов у изолятов *A. alternata* F-41431, *A. flavus* F-41432, *A. ustus* F-41437, *C. cladosporioides* F-41436, *C. sphaerospermum* F-41404 та *F. poae* F-41416 под влиянием исследованных соединений, что могло быть связано с активацией одного из компонентов их защитных систем. **Выводы.** Показана перспективность использования вещества M1 в концентрации 3,0% для защиты резинотехнических материалов от повреждений микроскопическими грибами.

Ключевые слова: грибостойкость, резинотехнические материалы, микроскопические грибы, фунгициды, полигуанидины.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аверко-Антонович Ю.О. Технология резиновых изделий / Ю.О. Аверко-Антонович, Р.Я. Омельченко, Н.А. Охотина, Ю.Р. Эбич. — Л.: Химия, 1991. — 352 с.



2. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов. — К.: ФМД, 2006. — 558 с.
3. Говорова О.А. Рецептуростроение и свойства резин на основе этиленпропиленовых каучуков / О.А. Говорова // Обзор инф., сер. Производство РТИ и АТИ. — М.: ЦНИИТЭнефтехим, 1989, вып. 4. — 60 с.
4. ГОСТ 9.048 — 89. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. Действующий от 1989 — 26 — 06. М.: Из-во стандартов, 1989. — 22 с.
5. Демченко Н.С. Вплив четвертинних солей піридинію та триазолазепінію на розвиток корозійного мікробного угруповання ґрунту: автореф. дис. канд. біол. наук: спец 03.00.07 «Мікробіологія» / Н.С. Демченко. Київ, 2012. — 20 с.
6. Дослідження впливу біоцидних препаратів на старіння реставраційних паперів: Методичні рекомендації / Держкомархів України. УНДІАСД; Інститут мікробіології і вірусології ім. Заболотного НАН України; ВАТ «Український науково-дослідний інститут паперу». Уклад.: О.П. Володіна, Н.М. Жданова, Л.М. Канарьова, П.М. Сидорченко. — К., 2005. — 35 с.
7. Ластухін Ю.О. Органічна хімія / Ю.О. Ластухін, С.А. Воронов. — Львів: Центр Європи, 2009. — 868 с.
8. Методы экспериментальной микологии. / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. [ред. В.И. Билай]. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
9. Ольховик В.К. Синтез и фунгицидная активность четвертичных аммониевых солей на основе замещенных бифенилов / В.К. Ольховик, Д.А. Василевский, Ю.В. Матвиенко, В.Г. Петушок, Р.А. Желдакова, В.В. Лысак // Научно-практическая конференция «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения»: Тез. докл. — Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2009. — С. 137.
10. Опарин П.С. Прошлое настоящее и будущее четвертичных аммонийных соединений / П.С. Опарин, Н.А. Тюрнева, С.И. Шептунов и др. / Дезинфектология на современном этапе: ВС НЦ СО РАМН — Иркутск, 2003. — С. 53—61.
11. Светлов Д.А. Биоцидные препараты на основе производных полигексаметиленгуанидина / Д.А. Светлов, В.Т. Ерофеев, Е.А. Морозов и др. // Вторая Международная. научно-техническая. конференция «Биоповреждения и биокоррозия в строительстве»: Сб. статей. — Саранск: Изд-во — 2006. — С. 270—273.
12. Стельмах С.А. Водорастворимые полимеры и гидрогели на основе гуанидинов: автореф. дисс. канд. хим. наук: спец. 02.00.06 «Высокомолекулярные соединения» / С.А. Стельмах. — Иркутск, 2012. — 20 с.
13. Сухаревич В.И. Рост микромицетов и синтез пигментов на средах, содержащих фунгициды и ингибиторы пигментообразования / В.И. Су-



харевич, И.Л. Кузикова, И.Г. Медведева, Ю.А. Гриднева // Микология и фитопатология. — 2000. — Т.34, вып.3. — С. 43–47.

14. *Чуєнко А.І.* Видовий склад грибів, виділених з уражених гумових шин та їх компонентів / А.І. Чуєнко, Л.Т. Наконечна, Н.М. Жданова // Мікробіологічний журнал. — 2010. — Т. 72, № 2. — С. 21–29.

15. *Чуєнко А.І.* Ураження суцільнолитих гумових шин мікроскопічними грибами / А.І. Чуєнко, А.Г. Суббота, С.В. Олішевська, В.А. Заславський, Н.М. Жданова // Мікробіологічний журнал. — 2010. — Т. 72, № 3. — С. 36–42.

Стаття надійшла до редакції 04.04.2013 р.



VIII ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

З 27 травня по 14 червня 2013 року на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології та Біотехнологічного науково-навчального центру Одеського національного університету імені І.І. Мечникова спільно з Інститутом мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, за підтримки Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського та Співки біологів і біотехнологів Одеси проходила VIII Літня школа «Молекулярна мікробіологія і біотехнологія».

Серед слухачів Літньої школи були молоді вчені та аспіранти з університетів та наукових закладів з Києва, Чернівців, Сум, Сімферополя, Чернігова, Харкова, Одеси, Мінська, Санкт-Петербурга, Саратова, Тюмені і Казані.

Лекційний курс VIII Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології висвітлював питання молекулярної генетики і мікробіології, бактеріальної геноміки, еволюції і специфічності геному, надвидових генетичних систем, молекулярно-генетичних аспектів мікробно-рослинної взаємодії, метагеноміки мікробних угруповань ґрунту, кластерного аналізу і нумеричної таксономії та ін. Лекції читали: заступник директора ІМВ НАНУ завідувач відділом молекулярної генетики бактеріофагів, д.б.н. Товкач Федір Іванович, акад. НААНУ Сиволап Юрій Михайлович керівник Південного біотехнологічного центру в рослинництві НААНУ, співробітники Державної наукової установи Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН, м. Санкт-Петербург: директор, д.б.н., проф., академік РАСГН та НААНУ Тихонович Ігор Анатолійович; заст. директора, д.б.н. Проворов Микола Олександрович; с.н.с. лабораторії селекції і генетики мікроорганізмів к.б.н. Оніщук Ольга Петрівна; зав. лабораторії мікробіологічного моніторингу та біоремедіації ґрунтів к.б.н. Андронов Євген Євгенович; зав. лабораторії ризосферної мікрофлори, д.б.н. Белімов Андрій Олексійович; зав. лабораторії технології мікробних препаратів, к.б.н. Чеботарь Володимир Кузьмич; професор кафедри генетики С.-Петербурзького державного університету, д.б.н., Лутова Людмила Олексіївна; провідний науковий співробітник Інституту біохімії і фізіології рослин і мікроорганізмів РАН д.х.н., проф. Камнев Олександр Анатолійович, м. Саратов; завідувач лабораторії молекулярної біології Казанського інституту біохімії та біофізики РАН, к.б.н. Гоголев Юрій Вікторович.

Практичні заняття на Літній школі вели наукові співробітники кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології і Біотехнологічного ННЦ Одеського національного університету імені І.І. Мечникова — с.н.с., к.б.н. Сергеева Ж.Ю., н.с. к.б.н. Крилова К.Д., доц., к.б.н. Ліманська Н.В., с.н.с., к.б.н. Васильєва Н.Ю., асп. Қоротаєва Н.В., Інституту мікробіології



і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ — завідувач лабораторії, к.б.н. Остапчук А.М., асп. Король Н.А. та співробітник компанії БіоРад доктор Гюла Шанаді (Угорщина).

Впродовж трьох тижнів на практичних заняттях учасники VIII Літньої школи опанували сучасні методи рідинної та газової хроматографії, виділення бактеріальної та фагової ДНК і білків, метод полімеразної ланцюгової реакції, рестрикційний аналіз, електрофорез в поліакриламідному та агарозному гелях, методи титрування та препаративного отримання бактеріофагів, здійснювали трансформацію бактерій плазмідною ДНК, ознайомилися з основними методами біоінформатики та ідентифікації мікроорганізмів за спектром жирних кислот з використанням газової хроматографії.

Під час перерв та у вихідні дні учасники школи відвідали Палеонтологічний, Зоологічний та Мінералогічний музеї Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

На урочистому закритті учасники VIII Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології отримали посвідчення, які вручав керівник Літньої школи, проректор з наукової роботи, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету професор, д.б.н. В.О. Іваниця та заступник директора ІМВ НАНУ завідувач відділом молекулярної генетики бактеріофагів, д.б.н. Товкач Ф. І.

Організатори Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології запрошують аспірантів та молодих учених взяти участь у IX Літній школі, яка відбудеться у травні-червні 2014 року!

Телефон: (0482) 68-79-64

Електронна адреса: sergeeva.zh@onu.edu.ua.

Відповідальний секретар
Літньої школи
к.б.н. Сергеева Жанна Юріївна



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) та еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми, віруси.

Тематична спрямованість: мікробіологія, вірусологія, імунологія, молекулярна біотехнологія, створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, антимікробні засоби, біосенсори, діагностичуки, 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: «Оглядіві 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 співавтори.

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. №7-05/1, 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 цілей 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 статті (2 примірники) обсягом не більше 8 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди — до 15 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

До рукопису додається електронний варіант статті на дисківі (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;



— прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, 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);

— назва статті великими літерами;

— анотація із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);

— ключові слова (не більше п'яти);

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; література.

До кожного примірника статті додається анотація мовою оригіналу та реферати українською / російською (в залежності від мови оригіналу статті), та англійською мовами (кожен реферат на окремому аркуші). Особливу увагу слід приділяти написанню резюме статті англійською мовою. Для цього доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором(-ами). Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, повну назву статті відповідною мовою. Реферат обсягом 200–250 слів має бути структурованим: мета (чітко сформульована), методи дослідження, результати дослідження (стисло), узагальнення або висновки. Після тексту реферату з абзацу розміщуються ключові слова.

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 за фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абrevіатури 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.

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 та дублюються окремим файлом на CD.

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 літератури складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця) і розміщується в кінці статті. 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.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

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 phthalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. — 1982. — 132, № 2. — P. 185-188.

На тези доповідей

Мацелюх Б.П. Розробка біотехнології одержання ландоміцину E // 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.

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов остаточний варіант тексту статті після рецензування.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки (чітко, синьою або чорною ручкою неправильно закреслити, а поряд з цим на полі написати правильний варіант) 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 рисунки до неї не були опубліковані в інших виданнях.

Відхилені статті не повертаються.

Редакція приймає до друку на сторінках і обкладинках журналу платні рекламні оголошення біотехнологічного та медичного напрямів; виробників лабораторного обладнання, діагностикумів, реактивів тощо для наукових досліджень.



Instructions for the authors

Scientific journal «Microbiology and Biotechnology» invites you to spotlight the results of scientific investigations in the field of microbiology and biotechnology

Aims. Journal «Microbiology and Biotechnology» publishes primary research papers on microbiology and biotechnology of prokaryotic (bacteria, archaea) and eucaryotic (fungi, microscopic algae, protozoans) microorganisms, viruses.

Topics: microbiology, virology, molecular biotechnology, development and selection of new microbial strains, microbial preparations, antimicrobial preparations, biosensors, diagnosticums, microbial technologies in agriculture, microbial technologies in food production, environment protection and enhancement, development of energy vectors and new raw materials, etc.

Languages: Ukrainian, Russian, English.

Types of publications: «Reviews», «Experimental works», «Reviews», «Original Research Papers», «Discussions», «Short communications», «Conferences, congresses, trend schools», «Scientific life chronicles», «Pages of history», «Anniversaries», «Book reviews», «Bookshelf».

The manuscript should be accompanied with a letter from an institution expert commission that should state that the paper is suitable for publication in MSM, and comprise a recommendation of the institution where the research was carried out, signed by the chief and a signed agreement of institution leader.

Article appearance:

The manuscript should satisfy journal topics and according to Resolution of Higher Attestation Commission of Ukraine (15.01.2003, № 7-05/1, p. 3) must contain the following elements: problem definition with the reference to main scientific and practical tasks; analysis of recent studies and publications that form a basis for problem decision; highlighting of main unsolved tasks; article task; narrative of main results with their full substantiation; conclusions and main challenges in given area of focus.

The following articles are accepted:

- original research papers — at most 10 pages (with pictures, tables, and captions, summary, bibliography)
- reviews — at most 15 pages
- book reviews — at most 3 pages
- short communications — at most 2 pages.



The manuscript should be given in 2 carbon copies with an electronic variant on CD (Word, font Times New Roman, 14, line spacing automatic, at most 30 lines per page, page margins – 2 cm on all sides).

While writing the manuscript the author(s) have to keep the following plan :

- UDC index on the first page top left;
- author(s) full name(s) in source language, name(s) of institution(s), institution postal address (in international format), contact phone number, e-mail address. Authors names and institutions they represent should be clearly stated by using superscript numbers;
- article title uppercase;
- article abstract (200–250 words);
- key words pertaining to the subject matter (5 maximum).

The manuscript should be divided into the following sections: Introduction, Materials and methods, Results and discussion, Concluding remarks, and References.

Abstracts in source language, Ukrainian/Russian (depending on article language) and English (each one on a single page) should be attached to every copy of an article. **Author(s) name(s), institution(s) and article title** should be followed by word «Abstract», abstract itself and key words (new paragraph).

Particular attention should be given to writing the abstract to the manuscripts written in English. For this purpose the author(s) should use the services of the qualified linguists with further scientific editing the text by the author (s). Before the word «Abstract» it should be written the names and initials of the authors , name of the scientific establishment, full title of the article in the appropriate language. Abstract volume of 200-250 words should be structured: the goal (articulated), research methods, findings (briefly), synthesis and conclusions. After the text of the abstract there should be given the key words.

Next to the article text the contact details should be set: names of all the authors, institution names, postal address, phone/fax number, e-mail.

The manuscript should be signed by the author (all the authors) and dated on the last page.

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

Repeated word-combinations can be abbreviated. An abbreviation is set in brackets when first introduced, e. g. polimerase chain reaction (PCR).

Bibliography references should be numeral and are given in the text in square brackets according to their order in the bibliography list.

Tables should be compact, and numbered with Arabic numerals; all columns and rows should be arranged in logical and graphical order. All



material presented in the tables (figures) should be clear and should not duplicate an article text. Results should be processed statistically.

All pictures should be presented in TIFF or JRG format, axes named. Figures should be placed in article body with electronic copies on CD in separate file.

Section «Results and Discussion» should clearly state revealed effects, cause-effect relations, compare obtained data with literature data and give the answers on questions specified in the introduction.

References should be numbered sequentially in alphabetical-chronological order (Cyrillic first, then Latin) at the end of the manuscript. If the first author in several references is the same, all these references are arranged in chronological order. Reference list should be numbered. The numbers should be set in square brackets in the text, *i. e.* [2, 15].

References should contain all the authors' names. Original research papers should contain at most 15 references. Patent documents should be mentioned at the end of the list.

Books

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.

Journals

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

Theses of reports

Deposited scientific works

Standards

Thesis abstracts

Online Resources

http://www.foodnetwork.com/article/perfect_souffle. 20 February 2013.

The date of article acceptance is that one when the final variant comes to the publisher after a prepublication review.

After obtaining the proof sheet the author should correct mistakes (clearly cancel incorrect variant with blue or black ink and put the correct variant on border) and send the revised variant to the editor (by post, e-mail or phone).

In case of delays, editors keeping to the schedule have a right to publish the revised variant without author's proofreading.



Author's signature vouches that author grants a copyright to the publisher. Author vouches that the work has not been published elsewhere, either completely, or in part and has not been submitted to another journal.

Not accepted manuscripts will not be returned.

The publisher accepts paid-for advertisement on biotechnology, medicine, laboratory equipment, research diagnosticums, tests, reagents for publication on the cover or journal pages.



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.

Макет В.Г. Вітвицька
Зам. № 685. Тираж 100 прим.

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