

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
Microbiology & Biotechnology

№ 2(3)
2008

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 2(3)

2008

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsya

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

I.V. Dovgal, V.O. Fedorenko, B.M. Galkin, P.I. Gvozdyak, R.I. Gvozdyak, S.P. Gudz, G.O. Iutynska, L.V. Kapreliants, O.A. Kiprianova, N.K. Kovalenko, I.K. Kurdish, B.P. Matselyuh, B.N. Milkus, G.G. Minicheva, V.P. Patyka, V.S. Pidgorsky, V.P. Polishuk, V.K. Pozur, I.S. Sherbatenko, I.G. Skrypal, M.Ya. Spivak, A.A. Sybirny, Yu.M. Sivolap, V.M. Totsky, F.I. Tovkach, L.D. Varbanets, A.I. Vinnikov, Yu.L. Volyanskiy, Yu.P. Zaytsev

Scientific editor V.O. Ivanytsya, T.O. Filipova

The journal is established by
Odesa National Mechnykov University.

Registration certificate: KV № 11462-335R. Date of issue 07.07.2006.

PUBLISHER

Odesa National Mechnykov University

Approved for publishing by Academic Council of
Odesa National Mechnykov University

Publishing editor N.G. Yurgelaitis
Editors: I.M. Omelchenko, L.B. Kotlyarova

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel. 7317151, 7466391

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2008

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
№ 2(3)

•
2008

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т.В. Бурлака

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

Л.Д. Варбанець, А.І. Вінніков, Ю.Л. Волянський, Б.М. Галкін, П.І. Гвоздяк, Р.І. Гвоздяк, С.П. Гудзь, І.В. Довгаль, Ю.П. Зайцев, Г.О. Іутинська, Л.В. Капрельянц, О.А. Кіпріанова, Н.К. Коваленко, І.К. Курдиш, Б.П. Мацелюх, Б.Н. Мілкус, Г.Г. Мінічева, В.П. Патица, В.С. Підгорський, В.К. Позур, В.П. Поліщук, А.А. Сибірний, Ю.М. Сиволап, І.Г. Скрипаль, М.Я. Співак, Ф.І. Товкач, В.М. Тоцький, В.О. Федоренко, І.С. Шербатенко

Наукові редактори випуску В.О. Іваниця, Т.О. Філіпова

Журнал заснований
Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова
Свідоцтво: серія КВ № 11462-335Р від 07.07.2006 р.

ВИДАВЕЦЬ

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс
Редактори: І.М. Омельченко, Л.Б. Котлярова

Адреса редакції:
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
Тел. 7317151, 7466391
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
www.mbt.onu.edu.ua

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2008

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- Yu. P. Zaitsev**
MICROORGANISMS COMMUNITY OF MARINE SANDY BEACHES PORE
WATERS. DATA AND HYPOTHESES..... 8

EXPERIMENTAL WORKS

- O. N. Rzaeva, L. D. Varbanets, O. S. Brovarska**
SOME PROPERTIES OF α -L-RHAMNOSIDASES FROM *PENICILLIUM*
COMMUNE 266..... 20

- V. O. Ivanytsya, T. V. Gudzenko, T. O. Filipova, B. M. Galkin,
T. V. Ivanytsya, E. G. Gorshkova, N. Chanishvili**
ESTIMATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BACTERIOPHAGE
CYTOTOXIC PROPERTIES IN VITRO ON THE HUMAN CELLS HEP-2
PASSAGED CULTURE MODEL 31

- O. G. Mameeva, V. S. Pidgorsky**
THE OPTIMIZATION OF THE CR (VI) IONS BIOSORPTION BY YEAST
S. CEREVISIAE UCM Y-1968 BY THE STATISTICAL ANALYSIS METHODS.... 37

- O. A. Zakharova, N. E. Kozhukhova, Yu. M. Syvolap**
PCR-ANALYSIS OF GENOME CHANGEABILITY AND *FUSARIUM* FUNGI
IDENTIFICATION TECHNOLOGY DEVELOPMENT..... 48

- N. S. Vodzinska, O. Yu. Zinchenko, T. O. Philipova, B. M. Galkin,
S. V. Vodzinskiy, Yu. V. Ishkov**
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS FA2 SENSITIVITY TO THE SYNTHETIC
PORPHYRINS ACTION..... 5

- V. O. Ivanytsya, A. E. Bukhtiyarov**
BACTERIOPLANKTON RESISTANCE OF THE ODESA COAST TO LEAD,
CADMIUM, MERCURY 64

- O. S. Voronkova, E. A. Sirokvasha, T. N. Polishko, A. I. Vinnikov**
SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF WHITE LABORATORY MICE IN
HEALTH AND UNDER SOME PATHOLOGICAL CONDITIONS..... 70

- G. V. Coev, E. D. Burets, S. V. Shvets, S. A. Burtseva**
UTILIZATION OF LOCAL LACTIC ACID BACTERIA STRAINS FOR
PRODUCTION OF CHEESE WITH USING THE SOY ALBUMEN..... 76

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Ю. П. Зайцев

СООБЩЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ ПОРОВЫХ ВОД ПЕСЧАНЫХ ПЛЯЖЕЙ ЧЕРНОГО МОРЯ. ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ 8

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

О. М. Рзаєва, Л. Д. Варбанець, О. С. Броварська

ДЕЯКІ ВЛАСТИВОСТІ α -L-РАМНОЗИДАЗ *PENICILLIUM COMMUNE* 266..... 20

В. О. Іваниця, Т. В. Гудзенко, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін,

Т. В. Іваниця, О. Г. Горшкова, Н. Чанішвілі

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN VITRO НА МОДЕЛІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ НЕР-2..... 31

О. Г. Мамєєва, В. С. Підгорський

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСОРБЦІЇ ІОНІВ CR (VI) ДРІЖДЖАМИ *S. CEREVISIAE* УКМ У-1968 МЕТОДАМИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ 37

О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап

ПЛР-АНАЛІЗ МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM*..... 48

Н. С. Водзінська, О. Ю. Зінченко, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін,

С. В. Водзінський, Ю. В. Ішков

ЧУТЛИВІСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FA2 ДО ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ 55

В. О. Іваниця, А.Є. Бухтіяров

СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІОПЛАНКТОНУ ОДЕСЬКОГО ПРИБЕРЕЖЖЯ ДО СВИНЦЮ, КАДМІЮ ТА РТУТІ 64

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

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ІМУНІТЕТУ БІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ МИШЕЙ В НОРМІ ТА ПРИ РІЗНИХ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ 70

Г. В. Коев, Е. Д. Бурец, С. В. Швец, С. А. Бурцева

ПРИМЕНЕНИЕ МЕСТНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОЕВОГО БЕЛКА 76

ANNIVERSARY DATES

I. G. Skrypal D. K. ZABOLOTNY DREAM, WHICH CAME TRUE... ..	83
--	----

GLIMPSE OF HISTORY

V. A. Kuznetsov THE LIFE AND SCIENTIFIC EDUCATIONAL ACTIVITY OF THE UKR. SSR ACADEMY OF SCIENCES MEMBER L. J. RUBENCHIK WERE STUDIED (03.04.1896-14.12.1988).....	94
---	----

CHRONICALE OF SCIENTIFIC LIFE

III SUMMER SCHOOL IN MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY Odesa, May 12-30, 2008	111
INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCES HERALD «PHAGE BIOLOGY, ECOLOGY AND THERAPEUTICS»	114

ЮВІЛЕЇ ТА ДАТИ

І. Г. Скрипаль МРІЯ Д. К. ЗАБОЛОТНОГО, ЩО ЗДІЙСНИЛАСЯ	83
---	----

СТОРІНКИ ІСТОРІЇ

В. О. Кузнецов ЖИТТЯ ТА НАУКОВО-ПЕДАГОГІЧНА ДІЯЛЬНІСТЬ ЧЛЕНА-КОРЕСПОНДЕНТА АН УРСР Л. Й. РУБЕНЧИКА (03.04.1896-14.12.1988)	94
---	----

ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

ІІІ ЛІТНЯ ШКОЛА З МОЛЕКУЛЯРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ Одеса, 12 – 30 травня, 2008 р.	111
МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ «ФАГОВА БІОЛОГІЯ, ЕКОЛОГІЯ ТА ТЕРАПІЯ»	114
ИНФОРМАЦИОННОЕ СООБЩЕНИЕ ДЛЯ АВТОРОВ	116

УДК 262.5:573.4 (591.553:551.435.74)

Ю. П. Зайцев

Одесский филиал Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского
НАН Украины, ул. Пушкинская, 37, Одесса, 65011, Украина,
тел.: 8 (048) 725 09 17, e-mail: yu.zaitsev@paco.net

СООБЩЕСТВО МИКРООРГАНИЗМОВ ПОРОВЫХ ВОД ПЕСЧАНЫХ ПЛЯЖЕЙ ЧЕРНОГО МОРЯ. ФАКТЫ И ГИПОТЕЗЫ

Поровые пространства (интерстиции) морских песчаных пляжей постоянно заполнены водой и населены мельчайшими водными организмами морского, речного и наземного происхождения: бактериями, одноклеточными водорослями, грибами, их спорами и цистами, простейшими, беспозвоночными. Они находят здесь благоприятные условия, в частности, обилие питательных веществ, не испытывают присутствия крупных врагов и успешно размножаются. Волны постоянно наполняют интерстиции водой и организмами, а избыточные поровые воды с их богатым населением выходят в море в зоне линии уреза воды. Это привлекает сюда молодь рыб и многих беспозвоночных. Важная и мало изученная экологическая функция песчаных пляжей – продуцирование бактерий, микроскопических водорослей и мелких животных, а также детрита. Различные антропогенные изменения природного состояния песчаных пляжей означают угрозу для прибрежных нагульных биотопов рыб и беспозвоночных, в том числе, важных промысловых видов. Предлагаются основные задачи изучения мало исследованного микроскопического населения песчаных пляжей.

К л ю ч е в ы е с л о в а: Черное море, песчаные пляжи, поровые воды, микроорганизмы, сообщество.

Введение

В своих трудах В. И. Вернадский [3, 4] подчеркивал особую биогеохимическую и экологическую роль граничных поверхностей в жизни морей и океанов. Этот принципиальный вывод получил дальнейшее развитие в более поздних исследованиях. На границе моря и атмосферы, в слое 0 – 5 см, который считали неблагоприятным для живых существ, было открыто специфическое сообщество организмов – морской нейстон, играющее ключевую роль в морской экосистеме [9,10,11,12]. На границе море-дно, в батииали насыщенной сероводородом, где, как полагали, обитают лишь сульфатредуцирующие бактерии, были обнаружены жизнеспособные споры оксибионтов из верхнего слоя моря [14]. В развитие фундаментальных идей Вернадского были разработаны научные концепции контактных зон [5] и контурных биотопов моря [13, 27]. Под контактными зона-

© Ю. П. Зайцев, 2008



ми К. А. Виноградов подразумевал прибрежные мелководные области, включая лиманы, лагуны и приустьевые акватории, а также поверхность морей и океанов. Эти зоны, согласно К. А. Виноградову, охватывают достаточно обширные водные пространства, измеряемые километровыми расстояниями. По видовому составу гидробионтов, их биомассе и продуктивности они существенно отличаются от остальных областей шельфа и открытых вод морей и океанов. Масштабы контурных биотопов, по Зайцеву, измеряются метровыми расстояниями, а видовое разнообразие, численность, биомасса и продуктивность населяющих их организмов (контуробионтов), в свою очередь, существенно превышают эти показатели обитателей контактных зон моря. В связи с граничным положением, контурные сообщества оказались «экологическими мишенями» для различных негативных факторов. Эти материалы подтвердили принципиальную важность фундаментальных положений учения В. И. Вернадского.

Предлагаемая работа относится к исследованиям в том же перспективном направлении научного поиска.

Два сгущения живого вещества в море

В море известны две области максимальной плотности организмов: на поверхности пелагиали — в нейстали и на дне — в бентали [11, 17, 20]. Верхнее и нижнее «сгущения живого вещества» (выражение В. И. Вернадского) эволюционно образовались как следствие сосредоточения веществ и энергии на поверхности пелагиали и на дне в результате действия природных физико-химических процессов и гравитации. В результате, на поверхность воды поднимаются частицы с положительной плавучестью, а на дно оседают частицы с отрицательной плавучестью. Между нейсталью и бенталью располагается обширная область пелагиали или толщи воды, в которой, по мнению В. И. Вернадского, находится «рассеянная жизнь».

В целом, общая масса населения пелагиали значительно выше общей массы организмов нейстона (нейстонтов) и бентоса (бентонтов). Однако их плотность (линейное расстояние между особями) в нейстали и бентали на порядки величин выше, чем в пелагиали, что имеет определяющее значение для процессов взаимоотношения особей внутри популяций и между ними.

Стратегия органической эволюции и баланс экологических компонентов

Эволюция морских организмов протекала в направлении освоения, прежде всего, наиболее благоприятных биотопов нейстали и бентали. Эволюционный процесс обеспечивался естественным отбором и происходил в соответствии с третьим законом экологии в формулировке Б. Коммонера [16] «Природа «знает» лучше». Поэтому, самые высокие в море постоянные скопления организмов сформировались на поверхности пелагиали и на дне. В соответствии с законом сохранения массы и первым законом термодинамики, сохранение баланса экологических компонентов, необходимого для устойчивого равновесия в поверхностной и донной экосистемах, возможно лишь при условии, когда приток веществ и энергии в нейсталь и бенталь уравновешивается их оттоком.

Изучение этих потоков веществ и энергии показало следующее.

Приход в нейсталь осуществляется за счет: а) выпадений из атмосферы частиц, оседающих на пленке поверхностного натяжения; б) пеннообразования, когда в оболочках пузырьков газа из толщи воды и дна на поверхность доставляются органические вещества; в) подъема на поверхность отмерших организмов («антидождя» трупов); г) образующихся в нейстали высоких численностей бактерионей-



стона, миконейстона, фитонейстона, зоонейстона, ихтионейстона; е) прихода на поверхность пелагиали циркадных (суточных) вертикальных мигрантов.

Расход веществ и энергии в нейстали происходит благодаря: а) уходу в толщу воды и на дно личинок, завершивших нейстонную фазу развития (виды планктона, бентоса и рыб); б) уходу в толщу воды и на дно циркадных мигрантов; в) выеданию нейстонтов беспозвоночными, рыбами, птицами, а в некоторых случаях и дельфинами.

Аналогичные процессы происходят в бентали. Приход здесь обеспечивается: а) оседанием частиц детрита; б) оседанием отмерших организмов («дождем» трупов); в) оседанием пелагических личинок донных видов; г) массовым развитием фитобентоса, зообентоса; д) возвращением на дно циркадных мигрантов.

Расход веществ и энергии в бентали осуществляется через: а) вымет донными организмами яиц в пелагиаль и нейсталь; б) выедание беспозвоночными, рыбами, птицами (у берегов) и дельфинами.

Многие из перечисленных процессов измерены и имеют количественные выражения.

Область контакта и взаимодействия всех биоциклов биосферы

Единственное место на планете, где соприкасаются и взаимодействуют все три биоцикла биосферы — море, суша и пресные воды — расположено на берегах морей и океанов. Также, только у линии уреза воды сходятся области нейстали, бентали и пелагиали. Поэтому, естественно, возникает вопрос: что здесь происходит с живыми организмами?

Ответ может показаться парадоксальным: при всей доступности берега для исследований, его биология и экология изучены гораздо меньше, чем биология и экология нейстали, пелагиали и бентали открытых вод моря [1, 7, 28]. Объясняет такое положение традиционно сложившаяся океанологическая парадигма — преобладающая система методологических подходов в современной океанологии. При организации работ судовых экспедиций, сеть точек (станций) для отбора проб воды и морских организмов строится обычно таким образом, чтобы охватить весь водоем, все основные водные массы пелагиали. В результате создается некий образ «моря без берегов», зоны, куда судно войти не могло, да и не предусматривало. На изучение граничной области «море-берег», фактически, не остается ни времени, ни материальных и интеллектуальных возможностей. Поэтому она осталась вне круга основных интересов биологии и экологии моря. Такое объяснение выглядит достаточно субъективным, однако прецеденты в гидробиологии известны. Например, самый доступный для исследования поверхностный слой пелагиали долгое время оставался неизученным и морской нейстон с его ключевой ролью в жизни моря был открыт лишь во второй половине XX столетия [10,11,12].

Песчаный берег (псаммоконтур моря) как биотоп

Во время прибоя волны развивают огромную энергию, которая расходуется на раздробление горных пород, перемещение наносов и их сортировку [15]. В результате образуется самая большая по суммарной поверхности площадь раздела твердой и жидкой фаз в мировом океане — граница «вода — измельченное твердое вещество».

Образно говоря, самое крупное механохимическое «предприятие» на планете расположено в волноприбойной зоне морей и океанов [1]. Механохимия — это



раздел науки, изучающий химические превращения, происходящие под воздействием механических сил. Однако значение этого особого «предприятия» для живых существ остается белым пятном в биологии и экологии моря.

Сильное, в тысячи и десятки тысяч раз, ускорение реакции посторонних веществ, адсорбированных на твердых поверхностях, называется гетерогенным катализом. Молекулы и даже атомы, поглощенные поверхностью твердых тел, деформируются и от этого становятся более реакционноспособными. Гетерогенный катализ давно и успешно применяют на практике. Однако экологическое значение гетерогенного катализа на псаммоконтуре моря еще не изучалось.

Песок представляет собой рыхлую осадочную горную породу, сложенную из угловатых или окатанных обломков размером от 0,01 до 2,0 мм (по другим источникам, от 0,05 до 2,0 мм). Эти размерные характеристики зерен песка (песчинок) сохраняются на берегах всех морей и океанов планеты. Пески однородного размера в природе встречаются редко. Чаще они содержат примеси мелких (алевритовых) и глинистых частиц. При каждом волнении происходит сортировка частиц по крупности, и самые мелкие из них уносятся в море, за пределы зоны действия волн. Величина песчинок определяет размеры пор между ними, заполненных поровой водой, в которой обитают различные мелкие организмы.

На берег постоянно воздействует прибой. Морская вода накатывается на пляжи, часть ее проникает в поры между песчинками, остальная — откатывается обратно и движение продолжается. Прибой протекает при любом состоянии поверхности моря, усиливаясь по мере увеличения высоты волн. Интерстициальные пространства между песчинками постоянно заполнены морской, солоноватой либо пресной водой. Уровень капиллярных вод — выше уровня моря, что обусловлено силами поверхностного натяжения и явлением капиллярного лифта (рис. 1).

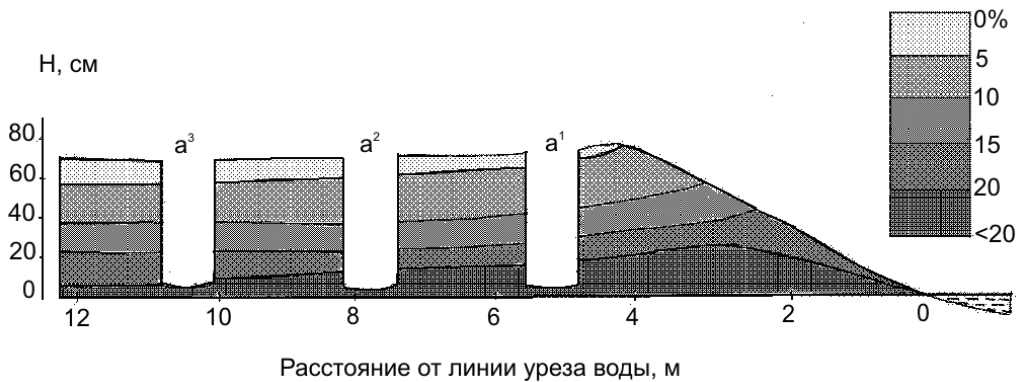


Рис. 1. Распределение поровой воды в песчаном пляже (в % от массы песка) и выемки (копанцы) (a¹, a², a³) для накопления поровой воды (по [24], с дополнениями)

Fig. 1. Pore water distribution in a sandy beach (% from the sand mass) and grooves (a¹, a², a³) for accumulation of pore water (from [24] with additions)

Сходным образом, в теле пляжа распределяются соленость, кислород, биогенные вещества и другие характеристики поровой воды. Ее соленость отражает динамическое равновесие между морской водой в набегающей волне и пре-

сной водой, которая просачивается со стороны суши и поступает с атмосферными осадками. Имеются данные о том, что через поры одного погонного метра пологого песчаного пляжа в течение суток проходят (просачиваются) от 20 м³ до 200 м³ морской воды. Средняя скорость дренажа через поры составляет при этом 300 мкм • сек⁻¹ [26].

Штормовые выбросы и потери морской биоты

Вместе с водой волны выбрасывают на берег множество различных организмов, которые, как правило, погибают. Лишь немногие из них способны вернуться обратно в море (крабы, креветки, раки-отшельники), или на сушу (наземные насекомые). Штормовые выбросы — неизбежная потеря живого вещества моря от природных факторов.

Из констатации факта, что гибель на берегу угрожает большинству гидробионтов, следует вывод, что псаммоконтур — зона величайшего экологического бедствия в морской экосистеме, зона, где постоянно погибает не «разреженная жизнь» пелагиали, а «сгущенная жизнь» нейстали, морской пены и прибрежной бентали, причем, с численным преобладанием ранних стадий онтогенеза. Если этот вывод справедлив, тогда на пляжах должны постоянно образовываться танатоценозы — скопления погибших организмов, распространяющих характерный запах тления и привлекающих различных некрофагов. Однако в природе подобного не наблюдается, за исключением случаев краткосрочного разложения выброшенных на берег волнами моллюсков и других организмов, которых тут же поедают наземные и морские обитатели.

Возможно ли такое? Мог ли исторический процесс органической эволюции в морской среде «смириться» с постоянной утратой наиболее плотных скоплений живого вещества? И почему, в таком случае, не сработали ни естественный отбор, ни третий закон экологии Коммонера «Природа «знает» лучше»? Эта загадка нуждается в специальном научном расследовании.

Методологический подход

Ф. Г. Добржанский [23] — профессор Киевского и Ленинградского университетов, впоследствии работавший в США — подчеркивал, что в биологии все наполняется смыслом лишь в тех случаях, когда трактуется с точки зрения эволюции. В самом деле, исходя из положений эволюционного учения, трудно согласиться с тем, что на протяжении длительного периода органической эволюции естественный отбор среди гидробионтов не «учел» опасности волнового выброса на берег наименее подвижных существ из числа тех, которые находят самые благоприятные условия для жизни именно вблизи линии уреза воды. Каким мог бы быть выход из положения?

Погибнуть на берегу, или укрыться в интерстициях. Третьего не дано. Единственным спасением для выброшенных волнами на берег мелких организмов могла бы быть их способность укрыться в интерстициальных полостях. Обеспечить такую возможность естественный отбор мог бы через преимущественное выживание особей мелких размеров, способных покидать накатившуюся на пляж волну и свободно проникать в заполненные поровой водой полости интерстициев.

Исходя из этих умозрительных построений, можно сформулировать следующие гипотезы:



Гипотеза 1. Большинство видов многоклеточных обитателей прибрежной полосы моря имеют размеры тела, не превышающие величину интерстициальных полостей, а именно, 0,05 — 2,0 мм, что позволяет им свободно проникать в поры песчаного пляжа.

На то, что экоморфогенез [2] среди многоклеточных беспозвоночных моря проходил по такому сценарию, указывает наличие в современных флоре и фауне многих таксонов высокого уровня (отделов, типов, классов, отрядов, семейств), представители которых имеют размеры тела, приближенные к размерам интерстициальных полостей псаммоконтура, то-есть, $1,0 \pm 0,9$ мм. Другого подобного примера совпадения размеров тела большого числа видов в столь узком диапазоне величин, в море не известно.

В этой связи можно высказать предположение, что все одноклеточные, а также многоклеточные беспозвоночные, относимые к размерным категориям микро- и мейобентоса, эволюционно возникли в порах песчаных пляжей, а затем расселились во всей бентали. Это — бактерии, одноклеточные водоросли, грибы, их споры и цисты, большинство видов простейших, многие беспозвоночные. В порах песчаных пляжей Черного моря обнаружена разнообразная и богатая мейофауна из представителей Nematoda, Turbellaria, Oligochaeta, Harpacticoida, Gastrotricha, Ostracoda, Halacarida, Tardigrada, Kinorhyncha, Polychaeta, Archiannelida, Mollusca и других таксонов [7].

В сотнях проб поровой воды, собранных в выемках (копанцах) на супрали-торали песчаных пляжей Черного и Азовского морей, В. И. Монченко [18] обнаружил все известные виды свободно живущих циклопообразных, обитающих в Понто-Азове не только в бентали (представители мейобентоса), но также в пелагиали — планктонные виды *Oithona minuta* и *O. similis*. Помимо взрослых особей циклопообразных, в пробах поровой воды встречались науплии и копеподиты, а также множество других мелких организмов, не учтенных при лабораторной обработке материалов.

Условия обитания в поровой воде

Кислород поступает в толщу песка под воздействием волн, а его содержание в поровой воде зависит от пористости и аэрации песка. По содержанию биогенных веществ, поровые воды относятся к категории наивысшей трофности [24]. Солнечный свет проникает в песчаные пляжи в количестве, вполне достаточном для одноклеточных водорослей. Известно, что максимальная интенсивность фотосинтеза диатомовых, обитающих в интерстициальных полостях, происходит при освещении всего 12 г/кал/см²/ч [24]. Важное экологическое значение имеет также то обстоятельство, что в интерстициальной среде, в отличие от всех других биотопов моря, практически отсутствуют крупные растительноядные и плотоядные животные.

Следовательно, в нормальных природных условиях, интерстициальные полости песчаных пляжей не могут оказаться зонами экологического риска для попавших в них организмов. Высказывается даже мнение, что среди других биотопов, интерстициаль песчаных пляжей представляет собой наиболее благоприятную среду для самых мелких гидробионтов [18].

Если это утверждение справедливо, тогда в интерстициальных полостях песчаных пляжей должны находиться постоянные скопления организмов-



потребителей минеральных и органических питательных веществ, а также детрита и мельчайших организмов. Речь идет о скоплениях, а не об одиночных «отшельниках» или «узниках», которых, по определению, не может быть много. Это уже доказано находением десятков видов бактерий [21], одноклеточных водорослей [8], инфузорий [25], организмов мейофауны, не специфичных для интерстициали, а обитающих также и в сублиторали [6,7,18].

В данном контексте уместно сослаться на биогеохимические принципы (постулаты) Вернадского: 1. Биогенная миграция атомов химических элементов в биосфере всегда стремится к максимальному своему проявлению. 2. Эволюция видов в ходе геологического времени... идет в направлении, увеличивающем биогенную миграцию атомов в биосфере. Логично предположить, что в наиболее полной мере постулаты Вернадского реализуются в местах максимальных скоплений живого вещества, таких как поры песчаных пляжей. Высказанное предположение согласуется, кстати, и с известными гипотезами Дж. Бернала и А. И. Опарина о зарождении на рубеже моря и суши самой жизни на Земле.

С целью получения дополнительных фактов о химических и биологических особенностях поровых вод песчаных пляжей, в сравнении с водой из смежных участков моря, в нескольких местах северо-западного побережья Черного моря были начаты предварительные исследования (таблица 1).

При всей их предварительности, полученные данные весьма показательны.

Поровые воды заметно отличаются от морских вод по гидрохимическим характеристикам. По этому поводу в литературе используют термины «интерстициальная соленость» и «интерстициальная химия» [22, 24]. Поровые воды песчаных пляжей других морей относятся к разряду высокотрофных, однако Черное море в этом отношении, практически, не изучалось. На обилие биогенных веществ положительно реагируют многие гидробионты. Кроме приведенных в таблице 1, в поровых водах из этих проб встречались другие организмы, относимые к планктону и бентосу, хотя в условиях капиллярных полостей трудно разграничивать особей парящих в воде (планктон) от тех, которые парить в воде не способны (бентос). Это — покоящиеся стадии водорослей-макрофитов, различные инфузории, амёбы, солнечники и другие (личное сообщение О. П. Гаркуши).

Конечно, изучая жизнь песчаных пляжей, нужно иметь в виду то, что не все их обитатели могут оказаться в извлеченных пробах поровых вод. Одни организмы остаются прикрепленными к песчинкам, другие избегают дневного освещения и больших объемов воды (истинные стигобионты). Таких, очевидно, меньшинство и обнаружить их можно, исследуя зерна песка, а основную массу составляют все же временные обитатели поровых вод, попавшие в поры пляжа с морской водой.

В своей совокупности, население поровых вод песчаных пляжей представляет собой полноценный биоценоз, состоящий из продуцентов (водоросли), консументов (беспозвоночные) и редуцентов (бактерии, грибы).

Непрерывная загрузка

Нагонные ветры и порождаемые ими волны вызывают изменения гранулометрического состава пляжей, их пористости и загружают капилляры песчаных пляжей новыми порциями морской воды вместе с растворенными и взвешенными в ней веществами и существами. Изучение этого сложного природного процесса открывает широкие перспективы в области динамической диверситологии, концепция которой разработана А. А. Протасовым [19].



Таблица 1
Химическая и биологическая характеристики поровых вод песчаных пляжей и прилегающих к ним морских вод на разных участках северо-западного побережья Черного моря (предварительные данные)

Table 1
Chemical and biological characteristics of pore water sandy beaches and littoral sea waters on the different sections of the North-Western Black Sea Coast (preliminary data)

Параметры	Поровая вода	Морская вода
Мористая сторона среднего участка косы Будаковского лимана (11.05.07)		
<i>Гидрохимические показатели (данные Г. П. Гаркавой)</i>		
Соленость (‰)	14,57	15,59
P-PO ₄ (мкг · л ⁻¹)	138,201–138,20	53,67–53,67
N-NO ₂	142,71	9,96
N-NO ₃	1661,50	11,61
<i>Биохимические показатели (данные В. К. Головенко и Л. М. Руснак)</i>		
Белок (Б), мг · л ⁻¹	0,22	0,17
Нуклеиновые кислоты (НК), мг · л ⁻¹	0,27	0,28
НК/Б	1,2	1,6
Хлорофилл «а», мг · м ⁻³	5,63	3,06
<i>Одноклеточные водоросли, кл · л⁻¹ (данные Д. А. Нестеровой)</i>		
Диатомовые планктонные, всего	258 144	686 000
В том числе:		
<i>Skeletonema costatum</i>	250 200	680 000
<i>Cyclotella caspia</i>	1 986	3 000
<i>Thalassiosira parva</i>	1 986	0
Диатомовые бентические	5 957	0
Динофлагелляты планктонные, всего	33 246	99 300
В том числе:		
<i>Prorocentrum cordatum</i>	1 986	3 000
<i>Prorocentrum micans</i>	1 493	0
<i>Gyrodinium cornutum</i>	0	87,300
<i>Protoperidinium bipes</i>	0	9 000
<i>Heterocapsa triquetra</i>	7 943	0
<i>Katodinium sp.</i> , цисты	21 842	0
Зеленые планктонные, всего	55 151	6 000
В том числе:		
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	37 728	6 000
Синезеленые планктонные, всего	65 907	0
Эвгленовые планктонные, всего	0	6 000
Пляж «Лузановка» (13.11.07)		
<i>Бактерии, кл · мл⁻¹ (данные Л. М. Нидзвецкой)</i>		
Сапрофитные бактерии	4 100	250
Бактерии группы кишечной палочки	100	50
Пляж «Ланжерон» (14.11.07)		
<i>Бактерии, кл · мл⁻¹ (данные Л. М. Нидзвецкой)</i>		
Сапрофитные бактерии	6 500	20
Бактерии группы кишечной палочки	230	0



Априори, однако, понятно, что пляж, как естественная система, бесконечно загружаться не может. Загрузка должна уравниваться разгрузкой, также как и в случаях нейстали и бентали, и в соответствии с фундаментальными законами естествознания. Каким образом может осуществляться разгрузка?

Часть детрита и живых существ поедается такими специализированными псаммофилами, как двустворка *Donacilla cornea*, полихета *Ophelia bicornis* и бокоплав *Pontogammarus maoticus*. Их, в свою очередь, поедают кулики и другие птицы, зондирующие клювами псевдолитораль [29]. Однако основная масса мелких частиц и существ должна покидать поровые полости, куда волны обеспечивают все новые поступления. Как это может осуществляться?

Гипотеза 2. Избыточная капиллярная вода из поровых пространств песчаного пляжа вместе с содержащимися в ней веществами и существами постоянно вытекает (сочится, разгружается) в области псевдолиторали и верхней сублиторали моря. Таким путем происходит разгрузка интерстициальных полостей. Вероятно, она протекает постоянно, но усиливается при сгоне, когда уровень моря у берега понижается.

Если гипотеза 2 получит подтверждение, зона разгрузки поровых вод предстанет в виде биотопа, изобилующего частицами детрита, различными спорами, цистами, бактериями, другими мелкими одноклеточными, а также многоклеточными беспозвоночными, которые накопились, сохранились и размножились в период временного пребывания в благоприятных условиях интерстициальных полостей песчаного пляжа. В таком случае, в экологической норме, псаммоконтур моря должен выполнять функцию природного генератора микроорганизмов и детрита.

Если это так, тогда на месте предполагаемого выхода интерстициальных вод из песчаных пляжей должно наблюдаться устойчивое скопление потребителей частиц детрита и самых мелких гидробионтов.

Это подтверждается, в частности, высокой численностью и биомассой таких амфипод как *Pontogammarus maoticus*, которых местами добывают в промышленных масштабах. Вероятно также, что устойчивое сосредоточение именно у линии уреза воды личинок и мальков десятков видов черноморских рыб [28] — еще одно подтверждение этому.

Возникшие по ходу настоящего изложения предположения и высказанные гипотезы требуют специальных исследований. Учитывая то, что речь идет об одном из крупных пробелов в фундаментальных знаниях о жизни моря, очередные задачи его восполнения видятся автору такими:

Задача 1. Методом получения больших объемов поровых вод на различных участках песчаных пляжей и баров, изучить их абиотические и биотические характеристики, в том числе — биологическое разнообразие бактерий, грибов, растений и животных. Изучить биоценоз псаммоконтура моря, разнообразие его компонентов на различных участках берега, определить его биопродукционные и биоэнергетические характеристики.

Задача 2. Исходя из того, что на морских берегах соприкасаются все биоциклы биосферы, изучить происхождение обитателей поровых вод песчаных пляжей, в том числе — выходцев из пресноводных и наземных биотопов.

Задача 3. Определить условия и возможности размножения и развития организмов в период пребывания в интерстициальных полостях песчаных пляжей.



Задача 4. На примерах преобразованных человеком песчаных побережий, изучить проявления Закона обратной связи взаимодействия человека и биосферы в системе «человек — псаммоконтур моря».

Задача 5. Разработать и сформулировать практические рекомендации по определению и расчету последствий вмешательства человека в экологию псаммоконтура моря при составлении Оценок Воздействия на Окружающую Среду (ОВОС), оценить вызванные изменения в «экологической валюте» и в денежных единицах.

Исходя из приведенных выше фактов и высказанных предположений, можно с большой долей уверенности утверждать, что дальнейшее изучение всех проявлений жизни внутри полостей песчаных пляжей открывает многообещающие перспективы в области фундаментальной науки и практики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Айзатуллин Т. А., Лебедев В. Л., Хайлов К. М. Океан. Активные поверхности и жизнь. — Л.: Гидрометеиздат, 1979. — 192 с.
2. Алеев Ю. Г. Экоморфология. Киев: Наукова думка, 1986.- 423 с.
3. Вернадский В. И. Биосфера. Избранное. Труды по биогеохимии. М.: Мысль, 1967.- 376 с.
4. Вернадский В. И. Химическое строение биосферы Земли и ее окружения. М.: «Наука», 1987.- 340 с.
5. Виноградов К. А. (ред.) Экологическая биогеография контактных зон моря. К.: Наук. думка, 1968.- 157 с.
6. Воробьева Л. В. Мейобентос украинского шельфа Черного и Азовского морей. К.: Наук. думка, 1999.- 300 с.
7. Воробьева Л. В., Зайцев Ю. П., Кулакова И. И. Интерстициальная мейофауна песчаных пляжей Черного моря. К.: Наук. думка, 1992. — 144 с.
8. Гусяков М. О., Ковтун О. О. Сучасні аспекти досліджень інтерстиціальної альгофлори Чорного моря та його лиманів // Тез. доп. ІХ з'їзду Укр. бот. т-ва.- К., 1992.- С. 368-369.
9. Зайцев Ю. П. Про існування біоценозу нейстону в морській пелагіалі. Наук. зап. Одеськ. біол. ст., 1960, 2.- С. 29-42.
10. Зайцев Ю. П. Приповерхностный пелагический биоценоз Черного моря. Зоол. журн., 1961, XL, вып. 6.- С. 818-825.
11. Зайцев Ю. П. Морская нейстонология. К.: Наук. Думка, 1970.- 264 с.
12. Зайцев Ю. П. Жизнь морской поверхности.- К.: Наукова думка, 1974.- 111 с.
13. Зайцев Ю. П. Контурные сообщества морей и океанов.- Сб. Фауна и гидробиология шельфовых зон Тихого океана. Материалы XIУ Тихоокеанск. научн. конгресса (Хабаровск, авг.1979), секция «Морская биология», Владивосток, 1982, вып.4, с.51-54.
14. Зайцев Ю. П., Поликарпов И. И., Егоров В. Н. Александров Б. Г., Гаркуша О.П., Копытина Н.И., Курилов А.В., Нестерова Д.А., Нидзвецкая Л.М., Никонова С.Е., Поликарпов И.Г., Поповичев В.Н., Руснак Е.М., Стокозов Н.А., Теплинская Н.Г., Теренько Л.М. Средоточие останков оксифионтов и банк живых спор высших грибов и диатомовых в донных отложениях сероводородной батииали Черного моря // Доповіді Національної академії наук України, 2007, № 7.- С. 159-164.
15. Зенкович В. П. Берега Черного и Азовского морей. М.: Гос. издат. геогр.. лит-ры., 1958.- 374 с.
16. Коммонер Б. Замыкающийся круг. Л: Гидрометеиздат, 1974.- 325 с.
17. Константинов А. С. Общая гидробиология. Учебник для студентов биол. спец. вузов.- 4-е изд., М.: Высшая школа, 1986.- 472 с.
18. Монченко В. И. Свободноживущие циклопообразные копеподы Понто-Каспийского бассейна. К.: Наук. думка, 2003.- 350 с.
19. Протасов А. А. Биоразнообразие и его оценка. Концептуальная диверсикология. К. Б. и., 2002.- 105 с.
20. Романенко В. Д. Основы гидроэкології. К.: Обереги, 2001.- 728 с.



21. Теплинская Н. Г. Липолитическая микрофлора северо-западной части Черного моря: Автореф. Дис. канд. биол. наук. Одесса, 1979.- 22 с.
22. Boaden P. J. S., Seed R. An Introduction to Coastal Ecology. Glasgow and London: Blackie, 1985.- 218 p.
23. Dobzhansky Th. Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution // The American Biology Teacher, 1973, 35, P. 125-129.
24. Perkins E. J. The biology of estuaries and coastal waters.- London, New York: Acad. Press, 1974.- 678 p.
25. Petran A. Cercetări asupra faunei de ciliate psamobionte la plajele din sudul litoralului romvnesc al Mării Negre // Ecologie marină. 1967. 2. P. 169-191.
26. Riedl R. J. How much water passes through sandy beaches? Int. Revue ges. Hydrobiol., 1971, 56, P. 923-946.
27. Zaitsev Yu. P. Contourbionts in Ocean Monitoring. Environmental Monitoring and Assessment, 7, (1986). D. Riedel Publishing Company, 1986, Dordrecht. The Netherlands, P.31-38.
28. Zaitsev Yu. Littoral concentration of life in the Black Sea area and coastal management requirements //Journ. of the Black Sea/Mediterranean Environment 2006, 12.- P. 113-128.
29. Zaitsev Yu. An Introduction to the Black Sea Ecology. Odessa^ Smil Editing and Publishing Agency ltd., 2008.- 228 p.

Ю. П. Зайцев

Одеська філія Інституту біології південних морів імені А. О. Ковалевського
НАН України, вул. Пушкінська, 37, Одеса, 65011, Україна,
тел.: 8 (048) 725 09 17, e-mail: yu.zaitsev@paco.net

УГРУПОВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ ПОРОВИХ ВОД ПІЩАНИХ ПЛЯЖІВ ЧОРНОГО МОРЯ. ФАКТИ І ГІПОТЕЗИ

Реферат

Порові простори (інтерстиції) морських піщаних пляжів постійно заповнені водою і населені найдрібнішими водними організмами морського, річкового та наземного походження: бактеріями, одноклітинними водоростями, грибами, найпростішими, спорами і цистами, безхребетними. Вони мають тут сприятливі умови, зокрема, величезна кількість поживних речовин, не відчувають присутності великих ворогів і успішно розмножуються. Хвилі постійно наповнюють інтерстиції водою і організмами, а надлишкові порові води з їх багатим населенням виходять в море в зоні урізу води. Це приваблює сюди молодь риб та багатьох безхребетних. Важлива і мало досліджена екологічна функція піщаних пляжів — продукування бактерій, мікроскопічних водоростей та дрібних тварин, а також детриту. Різні антропогенні зміни природного стану піщаних пляжів означають загрозу для прибережних нагульних біотопів риб і безхребетних, у тому числі, важливих промислових видів. Пропонуються основні задачі вивчення мало дослідженого мікроскопічного населення піщаних пляжів.

К л ю ч о в і с л о в а: Чорне море, піщані пляжі, порові води, мікроскопічні угруповання.



Yu. P. Zaitsev

Odessa Branch, A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, NASU,
Pushkinska Str., 37, Odessa, 65011, Ukraine, tel.: 8 (048) 725 09 17, e-mail: yu.
zaitsev@paco.net

MICROORGANISMS COMMUNITY OF MARINE SANDY BEACHES PORE WATERS. DATA AND HYPOTHESES

Summary

The pore spaces (interstices) of marine sandy beaches are permanently filled with water and inhabited by the aquatic organisms originated from the sea, rivers and land soil. They are: bacteria, unicellular algae, fungi, their spores and cysts, protozoans, small invertebrates, which found favourable living conditions, in particular abundance of nutrients, absence of large consumers and propagate themselves here. Waves are a permanent factor of filling the interstices and it is presumed that the surplus of water with detritus particles and microscopic organisms is trickling out in the water edge zone. This is the reason of accumulation of young fishes and many species of invertebrates here. An important ecological function of sandy beaches is the production of bacteria, microscopic algae and animals and detritus particles. Therefore man-made change in the natural state of sandy beaches is an impact on littoral feeding grounds of invertebrates and fish, including commercially important species. The main tasks in the study of microscopic organisms of the Black Sea sandy beaches are proposed.

K e y w o r d s: the Black Sea, sandy beaches, pore waters, microorganisms, community



УДК: 577.15:577.152.3

О. М. Рзаєва, Л. Д. Варбанець, О. С. Броварська

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154,
Київ МСП, Д03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv. imv. kiev. ua

ДЕЯКІ ВЛАСТИВОСТІ α -L-РАМНОЗИДАЗ *PENICILLIUM COMMUNE* 266

Встановлено, що *Penicillium commune* 266 продукує дві високоефективні α -L-рамнозидази, які активні в діапазоні рН 4,0 - 6,0 з оптимумом 4,0 - 4,2. Активність α -L-рамнозидаз 1 та 2 в розчині не змінюється впродовж 120 хв при 37 °С в інтервалі значень рН 4,0 - 6,0; термооптимум обох препаратів 60 °С. Молекулярна маса за даними гель-фільтрації на сефарозі 6В становить 120 ± 10 та 105 ± 10 кДа, відповідно, для α -L-рамнозидаз 1 та 2. В молекулах ферментів переважають основні (29 та 24 %), гідрофобні (25 та 36 %) та кислі (10 та 13 %) амінокислоти, відповідно для α -L-рамнозидази 1 і 2. В молекулах обох ферментів присутній вуглеводний компонент (2 %), який представлений в препараті 1 – галактозою, манозою, рамнозою та глюкозаміном, а в препараті 2 – галактозою та рамнозою.

К л ю ч о в і с л о в а: α -L-рамнозидаза, рН-оптимум, термооптимум, компонентний склад, молекулярна маса.

Одним з ферментів, що привертає увагу багатьох дослідників протягом останніх десятиріч, є α -L-рамнозидаза. Це фермент класу гідролаз (α -L-рамнозид-рамногідролаза, КФ 3.2.1.40), який характеризується специфічністю щодо залишків L-рамнози, яка присутня у деяких біофлавоноїдах, глікопротеїнах, гліколіпідах та інших глікокон'югатах. Сфера застосування α -L-рамнозидази доволі широка: в харчовій промисловості, зокрема в виноробстві для покращення якості та аромату вин, при виробництві цитрусових соків та отриманих з них напоїв, для видалення гірких компонентів (нарингін), завдяки чому покращується якість та харчова цінність цих продуктів; в науково-дослідних роботах як аналітичний інструмент для вивчення структури складних вуглеводмісних біополімерів. Відсутність вітчизняних препаратів α -L-рамнозидази поставила перед нами завдання пошуку продуцента даного ферменту. В результаті скринінгу, проведеного серед музейних штамів мікроорганізмів з колекції ІМВ НАН України, нами був відібраний перспективний штам *Penicillium commune* 266 [3], підбрано оптимальне середовище та умови культивування [5]. З культуральної рідини продуцента було отримано два препа-

© О. М. Рзаєва, Л. Д. Варбанець, О. С. Броварська, 2008



рати α -L-рамнозидази, які відрізнялись між собою за рівнем питомої активності та ступенем очистки.

Метою даної роботи було вивчення деяких фізико-хімічних, біохімічних характеристик та компонентного складу отриманих препаратів α -L-рамнозидаз *P. commune* 266.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був *P. commune* 266, люб'язно наданий нам з колекції живих культур відділу фізіології і систематики мікроміцетів ІМВ НАН України.

Культуру мікроміцету *P. commune* 266 вирощували як описано раніше [3, 5].

Ферментний препарат α -L-рамнозидази, одержаний із культуральної рідини *P. commune* 266 шляхом осадження сульфатом амонію (від 30 до 90 % насичення), діалізували, концентрували і наносили на колонку з DEAE-TSK 650 М гелем, урівноважену 0,01 М Tris-HCl буфером рН 7,0 промивали цим самим буфером і елюювали білки, що сорбувалися, стартовим буфером в лінійному градієнті NaCl від 0 до 1 М. Фракції, які проявляли α -L-рамнозидазну активність, збирали, об'єднували і діалізували проти стартового буферу [2].

Ідентифікацію нейтральних моноцукридів проводили після гідролізу препаратів у 2 н розчині HCl протягом 5 год при 100 °С. Обробку зразків здійснювали за методом Albersheim із співав. [6]. Після гідролізу проби висушували (під вакуумом) та тричі промивали дистильованою водою, додавали боргідрид натрію та залишали на 10 годин при кімнатній температурі (в захищеному від світла місці). Нейтралізували за допомогою йонообмінної смоли КУ-2 в H⁺ формі, фільтрували, висушували і тричі обробляли метанолом (по 1 мл), випаровуючи. До проби додавали 0,5 мл піридину (перегнаного) та 0,5 мл оцтовокислого ангідриду і гідролізували протягом 15 хв при 100 °С. Висушували, додавали 2-3 мл перегнаного хлороформу, центрифугували при 2500 g, 20 хв. Супернатант, який містив суміш нейтральних моноцукридів у вигляді ацетатів поліолів, розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30м x 0,25мм x 0,25мкм, газ носій — гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування — 250 °С, інтерфейса — 280 °С, термостата — 220 °С (режим ізотермічний). Пробу вводили з діленням потоку 1:100. Ідентифікацію моноцукридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також з використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моноцукридів визначали у відсотках від загальної суми площ піків.

Для визначення амінокислотного складу ферментні препарати гідролізували в 6 н HCl при 105 °С у вакуумованих ампулах протягом 24 годин. Кількісний і якісний склад гідролізатів амінокислот досліджували на автоматичному амінокислотному аналізаторі "Hitachi" KLA-5, Японія. Для внесення поправки на розклад деяких амінокислот (треонін, серин, тирозин) застосовували інтерполяцію до нульового часу гідролізу. Результати аналізу інших амінокислот усереднювали.

Визначення молекулярної маси ферментів у нативній системі проводили за допомогою гель-фільтрації [1] на колонці (1,3x50 см) з Sepharose 6B. Вільний об'єм колонки, який був встановлений із застосуванням блакитного декстрану 2000, становив 20 мл. Колонку було урівноважено 0,01 М фосфатним буфером рН 6,0. На колонку наносили 1 мл розчину ферменту (10 мг), збільшивши попередньо густину



розчину додаванням цукрози в кінцевій концентрації 0,5 М. Елюцію проводили тим самим буфером з 0,1 М NaCl. Швидкість елюції — 0,3 мл/хв. Калібрувальну криву для розрахунку молекулярної маси будували за допомогою високомолекулярних білків-маркерів фірми “Pharmacia” (Швеція): альдолази (158 кДа), каталази (232 кДа), феритину (440 кДа) та тіроглобуліну (669 кДа).

Дослідження впливу температури і рН на α -L-рамнозидазну активність і стабільність ферменту визначали в отриманих нами препаратах ферменту та при постійному контролі рН. Дослідження здійснювали в інтервалі температур від 0 °С до 80 °С та рН 2,0 — 8,0 (інтервал рН створювався 0,01 М фосфатно-цитратним буфером (ФЦБ)). При визначенні рН- і термостабільності по завершенні часу дії на ферменти відповідного фактору відбирали аліквоти по 0,1 мл, додавали по 0,2 мл ФЦБ, рН 5,2 та по 0,1 мл субстрату, розчиненого в цьому самому буфері. Термостабільність препаратів визначали при температурі 37 °С (час експозиції 90 хв), рН-стабільність — при показниках рН середовища 4,0; 5,0; 6,0 та 7,0 (час експозиції 24 год).

Реакційна суміш для визначення активності α -L-рамнозидази містила 0,1 мл розчину ферменту в 0,1 М ФЦБ, рН 5,2; 0,2 мл цього ж буферу і 0,1 мл 2,5 мМ розчину відповідного *n*-нітрофеніл- α -L-рамнопіранозиду. Суміш інкубували впродовж 10 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М розчину Na₂CO₃. Кількість *n*-нітрофенолу, який вивільнився в результаті ферментативної реакції, вимірювали колориметричним методом [3, 5] за поглинанням при 400 нм (КФК-2МП). Кількість білка в пробі становила 6 — 12 мкг/мл.

Вміст білка на всіх етапах дослідження реєстрували на спектрофотометрі СФ-26 при 280 нм, його кількість визначали за методом Lowry et al. [10].

Вміст вуглеводів визначали фенол-сірчанним методом [8].

Результати та їх обговорення

Отримані препарати було досліджено на амінокислотний та моноцукридний склад. Дані щодо амінокислотного складу ферментних препаратів 1 та 2 представлені у табл. 1. Як видно з наведених даних, спостерігаються розходження за якісним та кількісним амінокислотним складом α -L-рамнозидаз 1 та 2. Досліджувані ферменти характеризуються невисоким вмістом дикарбонових та сірковмісних амінокислот: α -L-рамнозидаза 1 містить більшу кількість аспарагінової кислоти порівняно з глутаміною (6,1 % та 4,1 %, відповідно), на відміну від α -L-рамнозидази 2, яка, навпаки, характеризувалася вдвічі більшим вмістом глутамінової кислоти порівняно з аспарагіною кислотою (9,3 % та 4,5 %, відповідно). Препарат α -L-рамнозидази 1 містив 2,1 % цистеїну та 1,3 % метіоніну, тоді як в препараті α -L-рамнозидази 2 кількість цистеїну складала (1,9 %), а метіонін відсутній.

Цікавим є те, що у препараті α -L-рамнозидази 1 відсутній пролін, в той час як у препараті α -L-рамнозидази 2 відмічали його значний вміст (17,4 %), що може свідчити про наявність неупорядкованих ділянок у поліпептидному ланцюгу фермента. Обидва ферментні препарати не містили триптофану.

У складі α -L-рамнозидази 1 відзначали вдвічі більший вміст лізину, гліцину та серину (9,1; 6,7 та 11 % %) порівняно з α -L-рамнозидазою 2 (3,4; 3,1 та 5,9 % %, відповідно). Слід відзначити значний вміст (більше 10 %) у складі обох ферментів тирозину та гістидину.



За вмістом інших амінокислот обидва препарати майже не відрізнялися між собою.

Ферментні препарати α -L-рамнозидаз 1 та 2 містять у своєму складі 25 та 36 % неполярних гідрофобних амінокислот, 10 % та 13 % кислих амінокислот, а також порівняно високий вміст основних позитивно заряджених амінокислот – 29 % та 24 %, відповідно. Такий значний вміст гідрофобних амінокислот сприяє створенню та стабілізації структури, яка є специфічною для кожного білка.

Таблиця 1

**Амінокислотний та моноцукридний склад ферментних препаратів
 α -L-рамнозидаз 1 та 2 *P. commune* 266**

Table 1

**Aminoacidic and monosaccharide contents of enzyme preparations of
 α -L-rhamnosidases 1 and 2 *P. commune* 266**

Компонентний склад	% від загальної площі піків	
	α -L-рамнозидаза 1	α -L-рамнозидаза 2
Аспарагінова кислота	6,1	4,5
Треонін	4,1	3,6
Серін	11,0	5,9
Глутамінова кислота	4,1	9,3
Пролін	—	17,4
Гліцин	6,7	3,1
Аланін	5,1	3,2
Цистеїн	2,1	1,9
Валін	5,1	4,2
Метіонін	1,3	—
Ізолейцин	3,9	3,0
Лейцин	5,0	3,4
Тирозин	11,1	11,5
Фенілаланін	5,3	5,7
Гістидин	16,9	15,5
Лізін	9,1	3,4
Аргінін	3,1	4,4
Галактоза	14,1	75,9
Маноза	6,7	—
Рамноза	1,9	24,1
Глюкозамін	77,3	—

Примітка: “—” не виявлено.



Наступним етапом було дослідження моноцукридного складу отриманих препаратів. Треба відзначити, що частіше дослідники просто вказують на наявність вуглеводів у молекулі та їх кількість, але не ідентифікують компоненти. Нами встановлено, що в препаратах рамнозидази 1 і 2 вміст вуглеводів складав 2 % від їх сухої маси. У препараті 1 були ідентифіковані як нейтральні моноцукриди: галактоза, маноза та рамноза, так і заряджені — глюкозамін, тоді як у препараті 2 виявлені тільки галактоза та рамноза (табл. 1).

Факторами, які суттєво впливають на активність ферментів, є температура та рН середовища. Оптимуми рН глікозидаз можуть коливатися у досить широкому діапазоні. В деяких випадках ферменти навіть можуть мати два оптимуми дії, але зазвичай α -L-рамнозидази мають один широкий оптимум. Оптимум рН для ферменту змінюється залежно від використаного субстрату, його концентрації, йонної сили розчину, присутності інгібітору, а також ряду інших факторів.

Було показано, що α -L-рамнозидази 1 та 2 *P. commune* 266 досить активні у всьому дослідженому інтервалі значень рН (рис. 1). Оптимуми рН знаходилися при 4,0 для препарату 1 і 4,2 - для препарату 2. У діапазоні від 3,0 до 5,2 зберігалось до 65 – 90 % від максимальної активності (рис. 1).

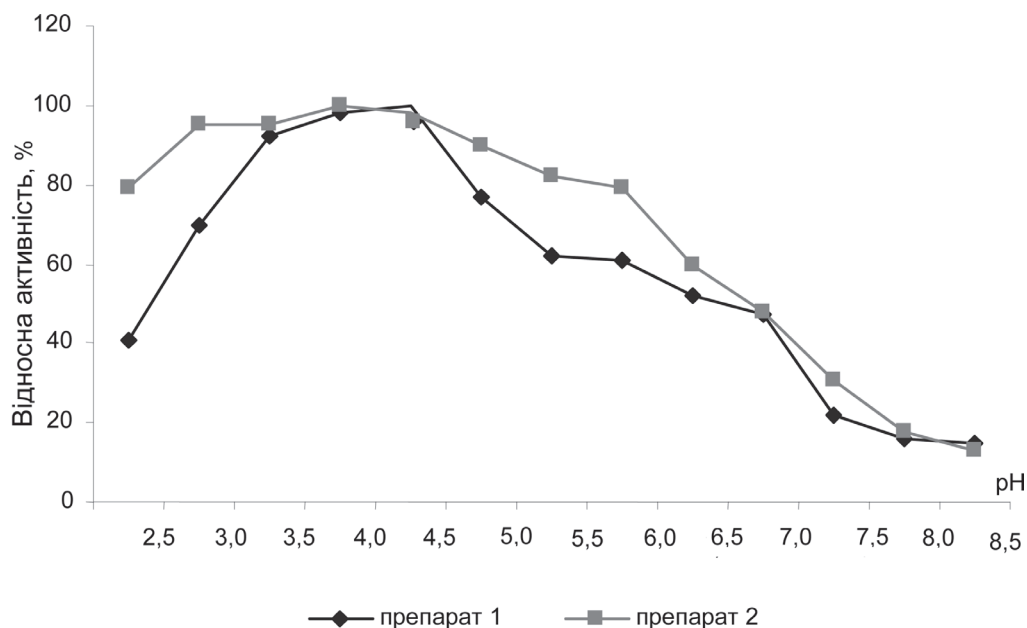


Рис. 1. Визначення рН-оптимуму препаратів α -L-рамнозидази 1 і 2 (у відсотках від максимальної активності)

Fig. 1. Determination of α -L-rhamnosidases 1 and 2 pH activity (percentage from maximum activity)

При визначенні рН-стабільності препаратів α -L-рамнозидази 1 і 2 за різних значень рН буфера було показано, що найбільш суттєвий вплив рН спостерігався з першої по четверту годину інкубації ферментної суміші, причому в деяких випадках



(при рН 4,0 на 4-у год інкубації, при рН 4,5 на 3-ю год інкубації, при рН 6,0 на 2-у год інкубації) спостерігалася незначна втрата активності для препарату 1, яка дещо підвищувалася при рН 5,0; для препарату 2 активність при всіх досліджених значеннях рН зростала з 1-ї по 4-у год інкубації (рис. 2).

Такий вплив рН середовища на молекули ферменту, можливо, є наслідком взаємодії стану та ступеню йонізації деяких функціональних груп (COOH-групи дикарбонових амінокислот, SH-групи цистеїну, імідазольної групи гістидину та ін.), оскільки білкова молекула ферменту є амфотерним поліелектролітом. При різних значеннях рН середовища активний центр може знаходитися в частково йонізованій та дейонізованій формі, що впливає на третинну структуру білка і відповідно, на формування активного фермент-субстратного комплексу. Крім того, можливо, має вплив і стан йонізації субстрату.

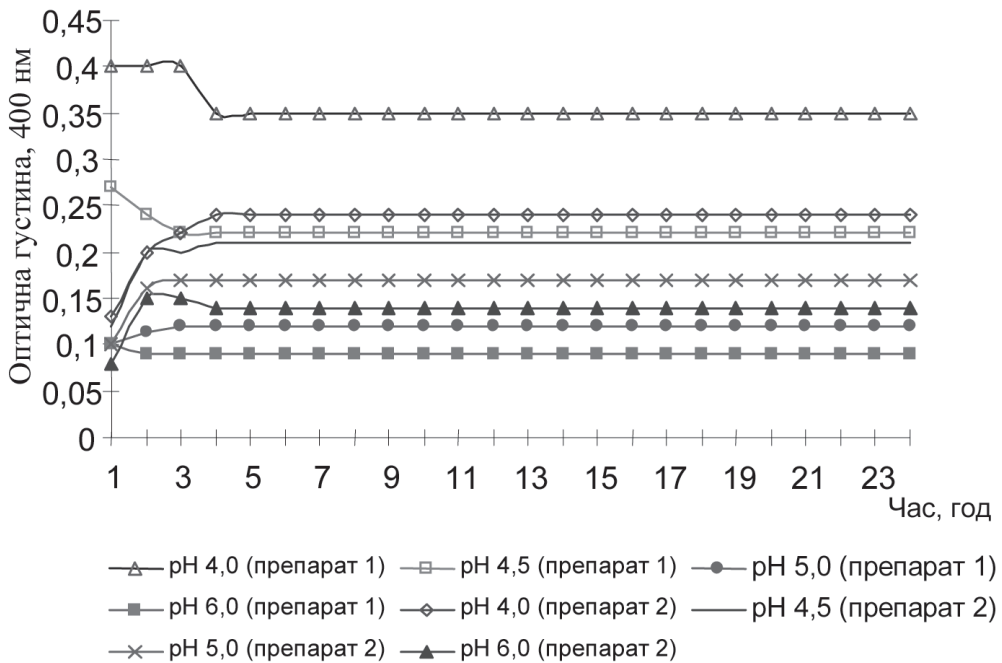


Рис. 2. Визначення рН-стабільності препаратів α -L-рамнозидази 1 і 2

Fig. 2. Determination of pH stability of α -L-rhamnosidases 1 and 2

Максимальна активність α -L-рамнозидази 1 та 2 спостерігалася при 60 °С та при оптимальних значеннях рН (рис. 3). Була також показана висока термостабільність досліджуваних ферментів (рис. 4). Так, спостерігалася повне збереження активності препаратів при кімнатній температурі 18 °С протягом доби та впродовж 120 хв — при 37 °С.

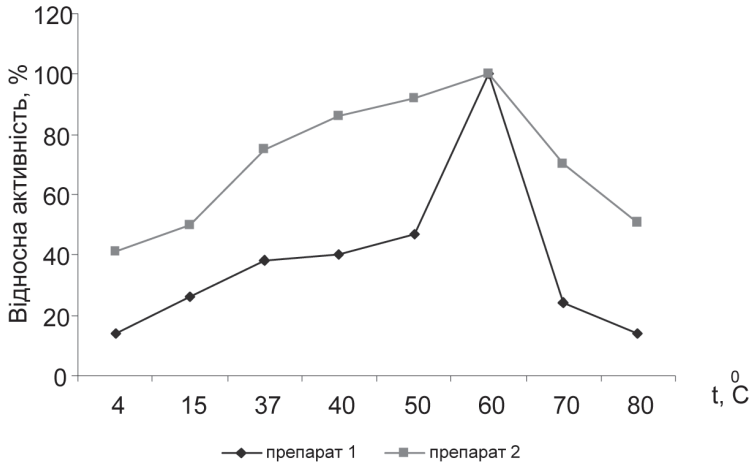


Рис. 3. Визначення термооптимуму дії препаратів α -L-рамнозидаз 1 і 2 *P. commune* 266 (у відсотках від максимальної активності)

Fig. 3. Determination of thermo optimum action of α -L-rhamnosidases 1 and 2 of *P. commune* 266 (percentage from maximum activity)

За даними гель-фільтрації на Sepharose 6В молекулярні маси ферментів у нативній системі становлять 120 ± 10 кДа та $105 \pm$ кДа, відповідно для препарату 1 і 2 (рис. 5). Такі значення є характерними для глікозидаз, що продукуються грибними продуцентами (до 100 кДа) [4, 9], на відміну від грамнегативних бактерій [4], для яких характерною є продукція ферментів з більш високою молекулярною масою (більше 150 кДа).

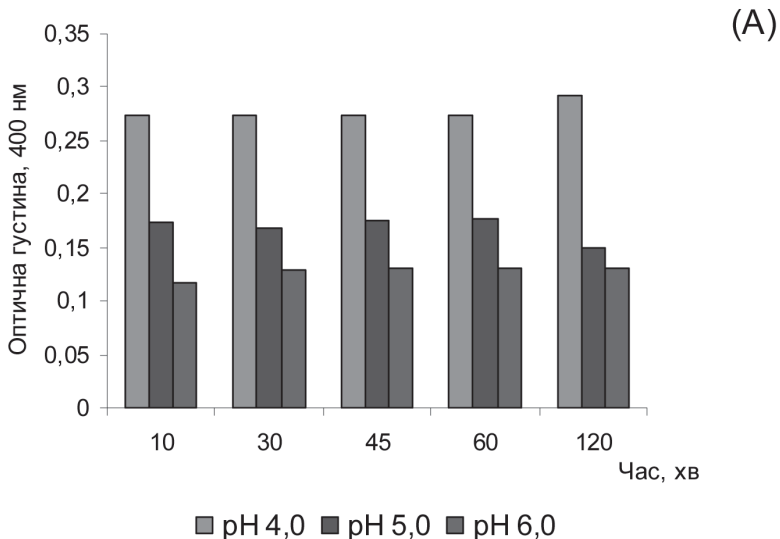


Рис. 4. Термостабільність ферментних препаратів α -L-рамнозидази *P. commune* 266 при 37 °С: (А) – α -L-рамнозидаза 1; (Б) – α -L-рамнозидаза 2

Fig. 4. Thermostability of *P. commune* 266 α -L-rhamnosidases at 37 °С: (А) – α -L-rhamnosidases 1; (Б) – α -L-rhamnosidases 2



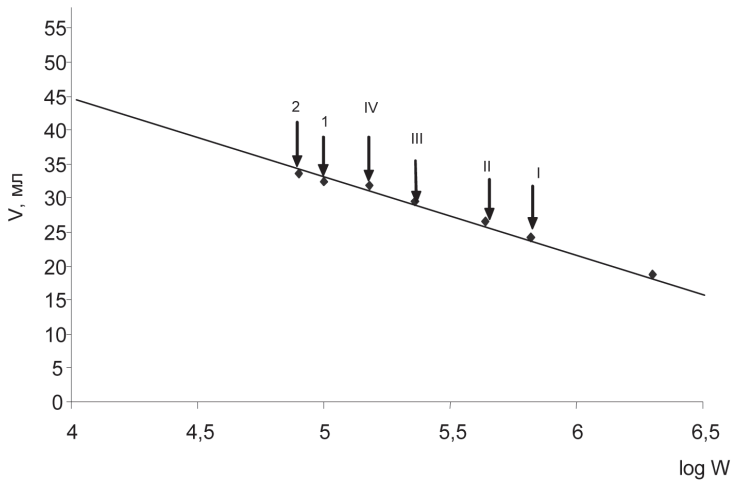


Рис. 5. Визначення молекулярної маси α -L-рамнозидаз 1 та 2 *P. commune* 266 у нативній системі.

Маркери молекулярних мас: I - тироглобулін - 669 кДа; II - феритин - 440 кДа; III - каталаза - 232 кДа; IV - альдолаза - 158 кДа; фракції з активністю ферментного препарату *P. commune* 266

Fig. 5. Determination of molecular masses of *P. commune* 266 α -L-rhamnosidases 1 and 2 in native system.

The markers of molecular masses: I - thyroglobulin; II - ferritin; III - catalase; IV - aldolase; fractions with *P. commune* 266 enzyme activity

Наявність субодиночної структури молекул ферментів досліджували додаванням у реакційну суміш таких денатурувальних агентів, як сечовина та гуанідингідрохлорид (рис. 6, 7).

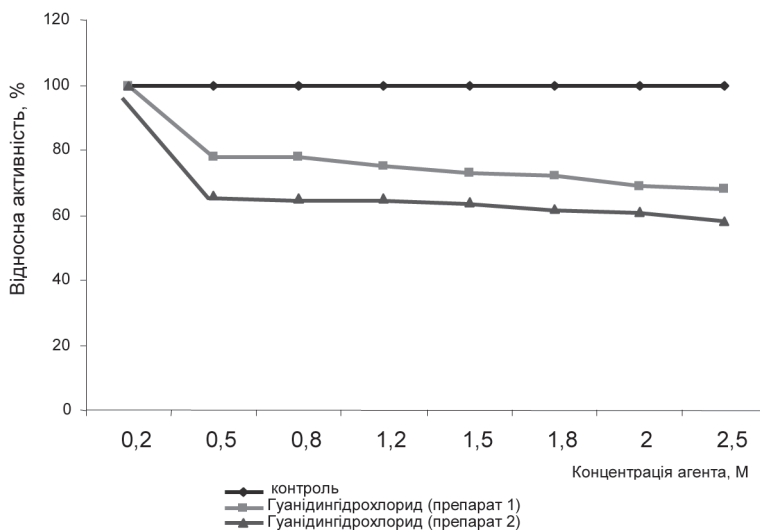


Рис. 6. Залежність активності α -L-рамнозидаз 1 та 2 *P. commune* 266 від концентрації гуанідингідрохлориду (у відсотках від максимальної активності)

Fig. 6. α -L-rhamnosidases 1 and 2 *P. commune* 266 activity dependence from guanidine hydrochloride concentration (percentage from maximum activity)

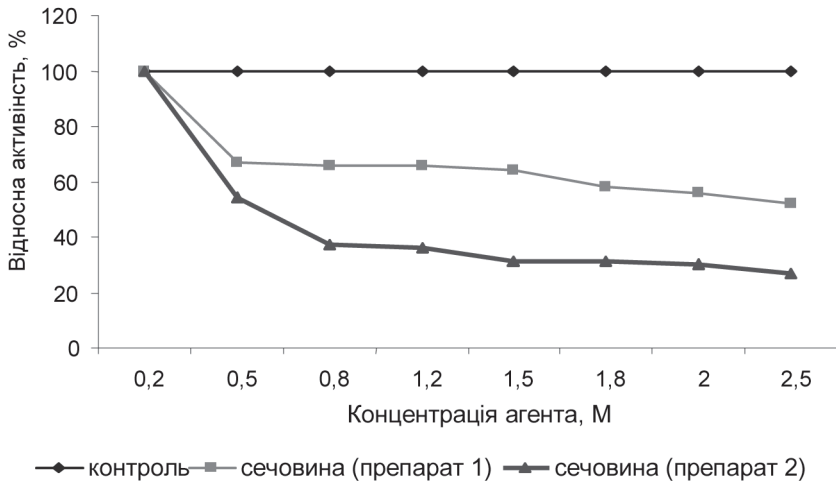


Рис. 7. Залежність активності α -L-рамнозидаз 1 та 2 *P. commune* 266 від концентрації сечовини (у відсотках від максимальної активності)

Fig. 7. α -L-rhamnosidases 1 and 2 *P. commune* 266 activity dependence from urea concentration (percentage from maximum activity)

Ферментативна активність α -L-рамнозидази 1 знижувалася на 65 % та 78 % від максимальної активності при додаванні у реакційну суміш 0,5 М сечовини та гуанідингідрохлориду, відповідно α -L-рамнозидаза 2 виявилася також чутливою до даних концентрацій агентів, втрачалася майже половина активності, а при концентрації сечовини 2,5 М залишалося лише 27 % від початкової активності.

Проте стверджувати про субодиночну структуру даних ферментів, навряд чи можна, тому що за літературними даними більшість грибних рамнозидаз мають мономерну структуру, а при додаванні таких концентрацій денатурувальних речовин до ферментів з гліколітичними властивостями спостерігалася повна втрата ними активності [1].

Таким чином, встановлено, що оптимальними умовами для гідролізу синтетичного субстрату ферментними препаратами є значення рН 4,0 – 4,2, температури 60 °С. Ферментні препарати стабільні при температурі від 0 до 20 °С в діапазоні рН від 4,0 до 6,0. Молекулярна маса обох ферментів за даними гель-фільтрації на сефарозі 6В становить 120 ± 10 та 105 ± 10 кДа. В молекулах ферментів переважають основні (29 та 24 %), гідрофобні (25 та 36 %) і кислі амінокислоти (10 та 13 %). В молекулах обох ферментів також присутній вуглеводний компонент (2 %), який представлений в препараті 1 галактозою, манозою, рамнозою та глюкозаміном, а в препараті 2 – галактозою та рамнозою.

Тобто, α -L-рамнозидази 1 та 2 *P. commune* 266 характеризуються подібними фізико-хімічними властивостями, проте відрізняються між собою за молекулярними масами та компонентним складом.

Висловлюємо подяку доктору біологічних наук Н. М. Ждановій і кандидату біологічних наук О. В. Соколовій за люб'язно наданий для досліджень штам *P. commune* 266.



ЛІТЕРАТУРА

1. Бакунина И. Ю., Иванова Е. П., Михайлова В. В., Недашковская О. И., Горшкова Н. М., Парфенова В. В. Распространение α -N-ацетилгалактозаминидазы среди морских и пресноводных микроорганизмов // Микробиология. - 1994. - Т. 63, № 5. - С. 847-853.
2. Варбанец Л. Д., Рзаева О. М., Сейфулліна І. Й. та ін. Індукція синтезу та активація α -L-рамнозидази // Укр. біохім. журн. — 2007. — Т. 79, № 4. — С. 19-29.
3. Рзаева О. М., Борзова Н. В., Варбанец Л. Д. та ін. Скринінг мікроорганізмів — продуцентів α -L-рамнозидази // Микробиол. журн. — 2005. — Т. 67, № 5. — С.19-27.
4. Рзаева О. М., Варбанец Л. Д. α -L-рамнозидаза мікроорганізмів // Микробиол. журн. — 2006. — Т. 68, № 1. — С.69-84.
5. Рзаева О. М., Варбанец Л. Д. Оптимізація умов культивування *Penicillium palitans* штаму 266, що синтезує α -L-рамнозидазу // Микробиол. журн. — 2006.— Т. 68, № 6. — С.10-20.
6. Albershein P., Nevis D. J., English P. D., Karr A. A method of analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // Carbohydr. Res. — 1976. — Vol. 5, № 3. — P. 340-345.
7. Andrews P. Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration // Biochem. J. - 1964. - Vol. 91, № 2. - P. 222-233.
8. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Anal. Chem. — 1956. — Vol. 28, № 2. — P. 350-356.
9. Kubo S. Glycosidases from soil microorganisms // J. Forensic. Sci. - 1989. - Vol. 34, № 1. - P. 96-104.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. — Vol. 193, № 2. - P. 265-275.

О. Н. Рзаева, Л. Д. Варбанец, О. С. Броварская

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика
Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина, тел.: 8 (044) 526 23 39, e-mail:
varbanets@serv. imv. kiev. ua

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА α -L-РАМНОЗИДАЗ *PENICILLIUM COMMUNE* 266

Реферат

Показано, что *Penicillium commune* 266 образует две высокоэффективные α -L-рамнозидазы, которые проявляли активность в диапазоне pH 4,0 — 6,0 с оптимумом 4,0 — 4,2. Активность α -L-рамнозидаз 1 и 2 в растворе не изменялась в течение 120 мин при 37 °С в интервале значений pH 4,0— 6,0; термооптимум обоих препаратов составляет 60 °С. Молекулярная масса по данным гель-фильтрации на сефарозе 6В составляет 120 ± 10 и 105 ± 10 кДа соответственно для α -L-рамнозидаз 1 и 2. В молекулах ферментов обнаружены основные (29 и 24 % %), гидрофобные (25 и 36 % %) и кислые (10 и 13 % %) аминокислоты, соответственно. В молекулах обоих ферментов присутствует углеводный компонент (2 %), который представлен в препарате 1 — галактозой, манозой, рамнозой и глюкозамином, а в препарате 2 — галактозой и рамнозой.

К л ю ч е в ы е с л о в а : α -L-рамнозидаза, pH-оптимум, термооптимум, компонентный состав, молекулярная масса, *Penicillium commune* 266.



O. N. Rzaeva, L. D. Varbanets, O. S. Brovarska

Institute of Microbiology and Virology, NASU, Academ. Zabolotny str., 154, Kyiv,
Ukraine, tel.: 8 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

SOME PROPERTIES OF α -L-RHAMNOSIDASES FROM PENICILLIUM COMMUNE 266

Summary

*It has been shown that *Penicillium commune* 266 has formed two high-level α -L-rhamnosidases which reveal activity in the range from 4.0 to 6.0, with optimum 4.0, 4.2. Activity of α -L-rhamnosidases 1 and 2 was constant during 120 min at 37 °C in the range of pH values 4.0 – 6.0; thermooptimum of both preparations was 60 °C. The molecular weights of the enzymes 1 and 2 estimated by gel filtration, were 125 ± 10 kDa and 105 ± 10 kDa, respectively. Enzyme preparations included high contents of basic, hydrophobic and acidic aminoacids, and carbohydrate component, represented by galactose, mannose, rhamnose, glucosamine (preparation 1) and galactose, rhamnose (preparation 2).*

Key words: α -L-rhamnosidase, pH-optimum, thermooptimum, composition, molecular weight, *Penicillium commune* 266.



**В. О. Іваниця¹, Т. В. Гудзенко¹, Т. О. Філіпова¹, Б. М. Галкін¹,
Т. В. Іваниця¹, О. Г. Горшкова¹, Н. Чанішвілі²**

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: tgl@inbox.ru

² Інститут бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліави,
Тбілісі, Грузія

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN VITRO НА МОДЕЛІ ПЕРЕЩЕПЛЮВАНОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЛЮДИНИ НЕР-2

*Використання культури клітин Нер-2 у логарифмічній і стаціонарній фазі росту для попередньої скринінгової оцінки безпеки застосування активного фага *Clostridium perfringens* у медичній практиці дозволило встановити слабо виражену цитотоксичну дію препарата в концентрації 10⁶ фагових часток у одному мілілітрі, що реєструвалася через 24 год експозиції.*

*Ключові слова: бактеріофаг, *Clostridium perfringens*, культура клітин Нер-2, цитотоксичні властивості.*

Харчове отруєння, викликане *Clostridium perfringens*, — у всіх країнах світу одне з найпоширеніших захворювань. В останні роки значно підвищився інтерес до використання бактеріофагів для лікування бактеріальних інфекцій. Це пов'язано, насамперед, з ростом резистентності збудників хвороб людини і тварин до антибактеріальних препаратів [1, 3, 4].

У 30 — 40 роках ХХ сторіччя цей ефективний і недорогий підхід успішно використовувався не тільки для лікування, але і для запобігання поширення багатьох інфекцій. За свою історію бактеріофаги пережили і великий інтерес до них в епоху їхнього зародження і практично повне забуття в 60 — 80-ті роки. В останні 5 років інтерес до них відродився [2, 5, 6, 10 — 14].

Для зменшення ризику шлунково-кишкових захворювань людини, що викликають *Clostridium perfringens* з придбаною стійкістю до лікарських засобів, в Інституті бактеріофагії, мікробіології і вірусології АН Грузії був створений препарат специфічного бактеріофага, що містить 10⁷ бляшкоутворювальних одиниць (БУО) в 1 мл. У даний час проводиться комплексна оцінка біологічних властивостей нового препарату in vitro і in vivo [9, 13].

Метою роботи було вивчення цитотоксичних властивостей бактеріофага *Clostridium perfringens* на моделі перещеплюваної культури клітин людини Нер-2 у логарифмічній і стаціонарній фазах росту.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* у концентрації 10^5 та 10^6 БУО/мл. Як експериментальну модель для вивчення біологічної активності вказаного препарату використовували перещеплювану культуру клітин карциноми гортані людини Нер-2. Оцінку цитотоксичного впливу бактеріофага на культуру клітин у логарифмічній фазі росту здійснювали по показниках: ступінь атракції кліток до поверхні носія, швидкість формування моношару клітин, величина мітотичної активності.

Вплив бактеріофага на культуру клітин у стаціонарній фазі росту оцінювали по показниках — морфологічні зміни і виживання клітин, ступінь дегенерації моношару [5, 7, 8]. При культивуванні як ростове використовували середовище 199, яке містить 10 % сироватки великої рогатої худоби. Посівна доза $30 - 50 \times 10^3$ клітин/мл ростового середовища. Температура культивування 37°C . У логарифмічній фазі росту, тобто через 24 години культивування, проводили контамінацію клітин бактеріофагом: додавали по 0,1 мл препарату у пеніциліновий флакон з 0,9 мл суспензії клітин. Облік результатів проводили через 24, 48, 72 год.

Для оцінки впливу бактеріофага на культуру клітин у стаціонарній фазі росту контамінацію перещеплюваної культури клітин здійснювали через 72 год культивування, тобто після закінчення формування моношару. Облік результатів проводили через 24, 48, 72 год експозиції шляхом візуальної оцінки морфологічних змін клітин та цілісності моношару. Ступінь дегенерації моношару клітин оцінювали за 4-плюсовою системою. Через 72 год здійснювали підрахунок кількості життєздатних клітин у моношарі. Для цього знімали клітини механічною дією з поверхні скла, забарвлювали трепановим синім у концентрації 0,01 %. Нежиттєздатні клітини при цьому забарвлювалися дифузно в синій колір, життєздатні залишалися не забарвленими. Підраховували забарвлені клітини у камері Горяєва.

Для вивчення впливу досліджуваного препарату на мітотичну активність клітин, культивування проводили на скельцях у флаконах. Отримані на скельцях препарати фіксували у фіксаторі Карнуа з подальшим забарвленням барвником Романовського-Гімза.

Експериментальні дослідження проводили у п'ятикратному повторі. Математичне опрацювання отриманих результатів здійснювали з використанням програми MS Excel. Вірогідність різниці показників оцінювали стандартними статистичними методами з використанням *t*-критерію Ст'юдента.

Результати та їх обговорення

У результаті досліджень встановлено незначну цитотоксичну дію бактеріофага в концентрації 10^6 БУО/мл, що виявляється в зниженні на 17 % атракції клітин до поверхні скла (рис. 1).

У дозі препарату 10^6 БУО/мл відзначалося пригноблення на 10 % формування моношару клітин Нер-2 (рис. 2). Причиною пригноблення формування моношару було зниження рівня мітотичної активності культури Нер-2 (рис. 3).

Бактеріофаг у концентрації 10^5 БУО/мл не призводив до негативного впливу на культуру клітин у логарифмічній фазі росту. У стаціонарній фазі росту культури клітин Нер-2, контамінованої бактеріофагом *C. perfringens* у концентрації 10^6 БУО/мл, морфологічні зміни окремих клітин виявлялися в зменшенні розмірів, появи клітин веретеновидної форми з дрібнокрапельною вакуолізацією цитоплазми.



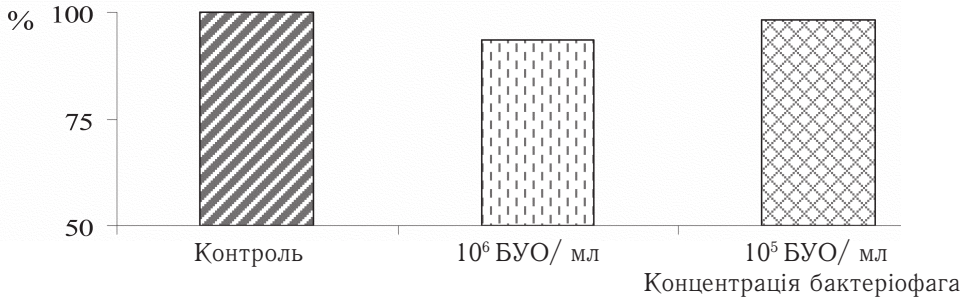


Рис. 1. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на ступінь атракції клітин Hep-2 до поверхні скла. Експозиція 24 год

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. *C. perfringens* bacteriophage effect on Hep-2 cell attraction on glass surface. Exposition for 24 hours

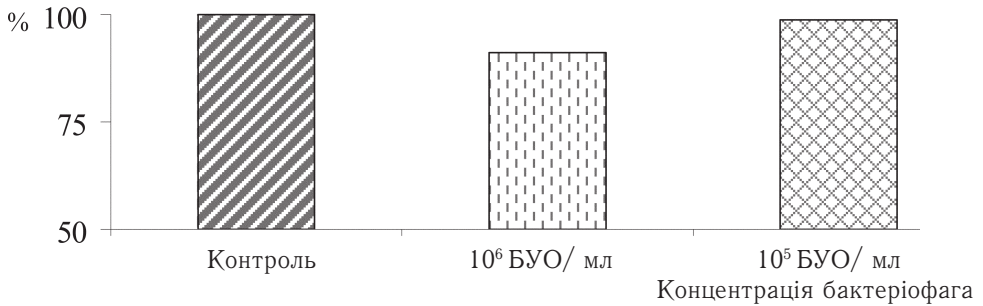


Рис. 2. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на формування моношару культури клітин Hep-2. Експозиція 72 год

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. *C. perfringens* bacteriophage effect on Hep-2 cell monolayer formation. Exposition for 72 hours

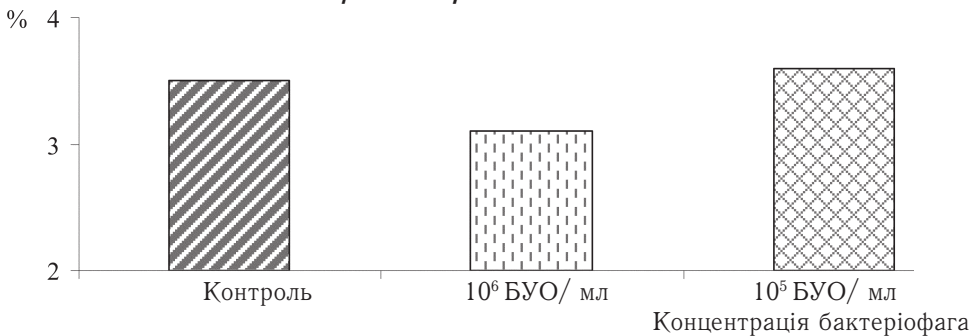


Рис. 3. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на мітотичну активність культури клітин Hep-2. Експозиція 48 год

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 3. *C. perfringens* bacteriophage effect on Hep-2 cell culture mitotic activity. Exposition for 48 hours

Через 72 год. реєструвалися деструктивні зміни моношару. При цьому кількість нежиттєздатних клітин у моношарі не перевищувала контрольного рівня (рис. 4).

Це свідчить про те, що деструкція моношару пов'язана не з прямою цитотоксичною дією фагового препарату, а опосередкована порушенням атракції клітин до носія.

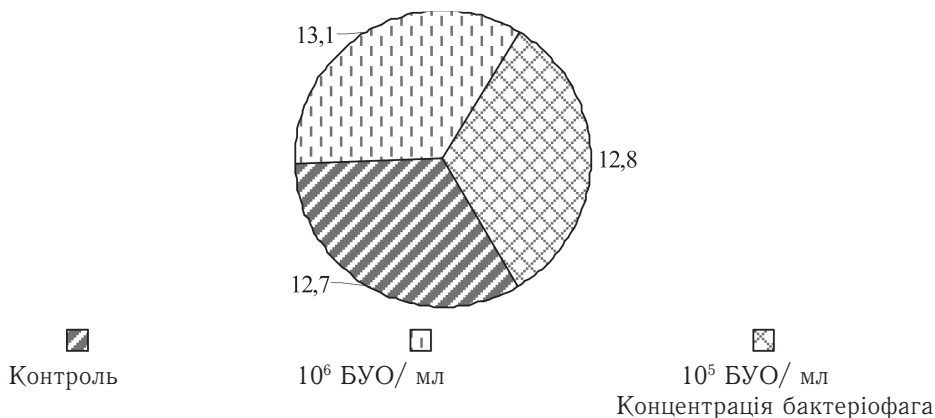


Рис. 4. Вплив бактеріофага *C. perfringens* на кількість нежиттєздатних клітин у моношарі Hep-2. Експозиція 72 год

Fig. 4. *C. perfringens* bacteriophage effect on the quality of inviable cells in Hep-2 monolayer. Exposition for 72 hours

Препарат, що містив 10⁵ БУО/ мл, не призводив до морфологічних змін, збільшення числа нежиттєздатних клітин і деструкції моношару, у порівнянні з контролем.

Таким чином, у результаті проведених досліджень була встановлена незначна цитотоксична дія препарату в концентрації 10⁶ БУО/ мл, що реєструвалося через 24 год експозиції. Показана можливість використання популяції клітин Hep-2 для попередньої скринінгової оцінки безпеки застосування активних фагів у медичній практиці.

ЛІТЕРАТУРА

1. Асланов Б. И. Проблемы фаготерапии гнойных инфекций в стационаре для пациентов с хроническими остеомиелитами // Проблемы теории и практики укрепления общественного и индивидуального здоровья в современных условиях. Сборник научных трудов СПбГМА имени И. И. Мечникова. — Санкт-Петербург: Здоровье, 1999. — С. 104.
2. Асланов Б. И., Гончаров А. Е. Перспективы использования псевдомонадных бактериофагов для диагностики и терапии внутрибольничной инфекции // Актуальные проблемы санитарно-эпидемиологического благополучия населения Северо-Западного региона. Материалы науч.-практ. конф., посвященной организации Центра Госсанэпиднадзора в Санкт-Петербурге. — Санкт-Петербург: Здоровье, 2000. — С. 263 — 264.
3. Бельмер С. В., Гасилина Т. В. Рациональная терапия дисбактериоза у детей // Клиническая медицина. — 1998.- 76., № 10. — С. 35 — 38.
4. Голиков С. Н., Рысс Е. С., Фишзон-Рысс Ю. И. Рациональная фармакотерапия гастроэнтерологических заболеваний. — С.- Пб.: Питер, 1993. — 57 с.
5. Голубев Д. Б. Руководство по применению клеточных культур в вирусологии. — Л.: Медицина, 1976. — 184с.



6. Григорьев П. Я., Яковенко Э. П. Диагностика и лечение болезней органов пищеварения.- С.-Пб.: Питер, 1997. — С. 298 — 320.
7. Гудзенко Т. В., Кожанова Г. А., Синенко Г. И. Методические указания по определению патогенных / инвазивных и цитотоксических / свойств бактерий, выделенных из водной среды, на модели культуры клеток. Для студентов биологического факультета специальности микробиология. — Одесса: ОГУ, 1988.-22 с.
8. Елизарова О. Н., Рязанова Р. А. Клеточные культуры как биологическая модель в токсикологических исследованиях. — М.: Всес. НИИ мед. и мед.-техн. информации, 1982. — 60 с.
9. Иваница В. О., Гудзенко Т. В., Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Чанішвілі Н., Бабуташвілі Т., Іваница Т. В., Горшкова О. Г. Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональний стан макрофагів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — 2, №1. — С. 23 — 28.
10. Линник С. А., Асланов Б. И., Ли В. И. Профилактика гнойно-септических инфекций в травматологическом стационаре //Медико-биологические и эколого-гигиенические проблемы оценки и прогнозирования воздействия факторов окружающей среды. Тезисы докладов на Всероссийской науч.-практ. конф. — Санкт — Петербург: Питер, 1998. — С. 195.
11. Яфаев Р. Х., Зуева Л. П., Любимова А. В., Асланов Б. И., Околов И. Н. Перспективы использования бактериофагов с лечебной и профилактической целью //В кн.: Инфекционный контроль в лечебно-профилактических учреждениях. — Санкт-Петербург: Питер, 1998. — С. 55 — 58.
12. Яфаев Р. Х., Асланов Б. И., Зуева Л. П. Эпидемиологическая оценка перспектив использования лечебных синегнойных бактериофагов // Современные технологии диагностики и терапии инфекционных болезней. Материалы Всероссийской научной конференции. — Санкт-Петербург: Питер, 1999. — С. 357 — 358.
13. Ivanytsya V., Philippova T., Gudzenko T., Galkin B., Rusakova M., Stepanova T., Ivanytsya T., Chanishvili N., Burbutashvili T. Anti-inflammatory and cytotoxic properties of *Clostridium perfringens* bacteriophage //Тези доповіді науково-практичної конференції „Пошук та розробка нових профілактичних і лікувальних протимікробних засобів, антисептиків, дезінфектантів та пробіотиків. — 2006. — Харьков: ХМИ, 2006. — С. 15.
14. Elizabeth Kutter. Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics. Evergreen State College, Olympia, WA 98505 — Nov. 15. — 1997. — 42 p.

Робота виконана за підтримки гранту INTAS Ref. Nr. 03-51-5563.

В. А. Иваница ¹, Т. В. Гудзенко ¹, Т. О. Филиппова ¹, Б. Н. Галкин ¹,
Т. В. Иваница ¹, Е. Г. Горшкова ¹, Н. Чанишвили ².

¹ Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 687964, tgl@inbox.ru

² Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии, Тбилиси, Грузия

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN VITRO НА МОДЕЛИ ПЕРЕВИВАЕМОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НЕР-2

Реферат

Показана возможность использования перевиваемой культуры клеток человека Нер-2 для предварительной скрининговой оценки безопасности применения активного фага *Clostridium perfringens* в медицинской практике. In vitro установлено слабо выраженное цитотоксическое действие бактериофага *Clostridium perfringens* в концентрации 10⁶ ф. ч. / мл на перевиваемую культуру клеток Нер-2 в стационарной и логарифмической фазе роста.

Ключевые слова: бактериофаг, *Clostridium perfringens*, культура клеток Нер-2, цитотоксические свойства.



V. O. Ivanytsya¹, T. V. Gudzenko¹, T. O. Filippova¹, B. M. Galkin¹,
T. V. Ivanytsya¹, E. G. Gorshkova¹, N. Chanishvili².

¹ Odesa Mechnykov National University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: tgl@inbox.ru

² Eliava Institute of bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia

ESTIMATION OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BACTERIOPHAGE CYTOTOXIC PROPERTIES IN VITRO ON THE HUMAN CELLS HEP-2 PASSAGED CULTURE MODEL

Summary

The passaged culture of human cells Hep-2 can be used for the initial screening of safe use of *Clostridium perfringens* active phage in medicine. Low-expressed cytotoxicity effect of *Clostridium perfringens* bacteriophage in concentration of 10^6 php/ml on Hep-2 passaged cell culture on both stationary and logarithmic growth phase has been determined in vitro.

Key words: bacteriophage, *Clostridium perfringens*, Hep-2 cell culture, cytotoxicity.



О. Г. Мамеєва, В. С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 11 79,
e-mail: *Mameeva@ukr.net*

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСОРБЦІЇ ЙОНІВ Cr (VI) ДРІЖДЖАМИ *S. CEREVISIAE* УКМ У-1968 МЕТОДАМИ СТАТИСТИЧНОГО АНАЛІЗУ

*Рівень аерації, рН та початкова кількість йонів Cr (VI) були досліджені з використанням методів статистичного аналізу (моделі Бокса-Бенкена). Оптимальними є значення рН 2,0, аерація 100 % та початкова кількість йонів Cr (VI) у MES-буфері 100 мг/л, щодо біосорбції йонів Cr (VI) дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968. Найвищий розрахований ймовірний рівень біосорбції йонів Cr (VI) дорівнює 40,708 мг/г за 3 години впливу факторів. Були отримані регресійні рівняння, як функція від двох основних ефектів, таких як рівень рН та початкова концентрація йонів Cr (VI) в середовищі культивування з коефіцієнтами регресії та коефіцієнтами детермінації R^2 : 0,9648; 0,9766; 0,9524; 0,9334.*

Ключові слова: Saccharomyces cerevisiae, статистична оптимізація, модель Бокса-Бенкена, біосорбція, йони Cr (VI).

Питання біосорбції та біоаккумуляції йонів шестивалентного хрому дріжджами широко висвітлюється в останні роки в науковій літературі [2, 5, 12]. Але переважно вивчення сорбційної спроможності живої біомаси дріжджів, як правило, носить порівняльний характер. Так, в роботах Volesky В. із співавторами зазначається, що нежива біомаса дріжджів сорбує на 40 % більше йонів металів, ніж жива [11, 12]. В роботах інших авторів показано, що сорбція пекарськими дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* при використанні сухої біомаси у випадку дослідження йонів Cr (VI) дорівнює 29,12 мг/г, а живої — 17,68 мг/г [4], а для деяких штамів *S. cerevisiae* (10 шт.) біосорбційна спроможність по відношенню до йонів Cr (VI) варіює від 1 мг/г до 26 мг/г щодо сухої біомаси [5].

В наших попередніх дослідженнях спиртовий промислово важливий штам *S. cerevisiae* УКМ У-1968 мав максимальну біосорбційну спроможність щодо йонів Cr (VI) на рівні 40,02 мг/г, розраховану за ізотермою Ленгмюра, з паралельним встановленням оптимальних умов для проведення сорбційних експериментів [3, 6, 13, 14]. Але слід відзначити, що оптимізація проводилася відносно великої кількості досліджуваних штамів та йонів міді, свинцю і хрому. Отже, отримані нами параметри не можна вважати на 100 % оптимальними для *S. cerevisiae* УКМ У-1968 і йонів Cr (VI), оскільки відомо, що біосорбція — процес штамоспецифічний. Саме тому виникла необхідність оптимізації за такими основними параметрами, як рН, рівень аерації та початкова кількість йонів Cr (VI) в середовищі культивування для штаму *S. cerevisiae* УКМ У-1968.



Метою роботи була оптимізація рівнів біосорбції йонів шестивалентного хрому дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968 за такими параметрами як рН, рівень аерації та початкова кількість йонів Сг (VI) з використанням статистичних методів планування експериментів та аналізу даних.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були спиртові дріжджі *S. cerevisiae* Meyen ex Hansen (1883) УКМ У-1968 з Української колекції мікроорганізмів (УКМ).

В роботі використовували середовище Рідер, яке містило (г/л дистильованої води): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 3,0$, $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,1$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,0$, $\text{MgSO}_4 - 0,7$, $\text{NaCl} - 0,5$, глюкоза — 1 %, дріжджовий екстракт — 0,1 %; та 5 мМ MES-буфер (2-(N-морфолино)-етансульфонова кислота). Для отримання потрібного значення рН у розчин додавали кристали гідроксиду тетраметил амонію [10]. рН розчинів визначали на рН-метр (рН-150МА).

Для інокуляції використовували культури дріжджів, попередньо вирощені на сусло-агарі протягом 24 годин. Всі експерименти провадили за однакових умов, культивування здійснювали в гойдальних пробірках, що містили 9,9 мл середовища та 0,1 мл дріжджової суспензії з концентрацією клітин 99,0 мг/мл, при температурі 28 °С. Приріст біомаси досліджуваних культур вимірювали фотоелектроколориметрично (фотоелектроколориметр ЛМФ-69), проводили перерахунок на абсолютно суху вагу.

Для визначення біосорбційної активності дріжджі відділяли від середовища центрифугуванням 5 хв, 6000 об/хв, залишкову кількість йонів шестивалентного хрому визначали дифенілкарбозидним методом [15].

Відповідно кількість металу, що може виводитись з розчину, підраховували за формулою: $q = V (C_i - C_f) / S$,

де V — об'єм розчину з сорбентом (л), C_i і C_f — початкова і рівноважна концентрації металів в розчині (мг/л), S — кількість біосорбенту (г АСР), q — кількість сорбованого металу (мг/г АСР) [11, 12, 14].

Умовами оптимізації рівня біосорбції йонів шестивалентного хрому дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968 були рівень рН (X_1), рівень аерації (X_2) та вихідна концентрація йонів Сг (VI) у MES-буфері або середовищі Рідер (X_3) з використанням моделі Бокса-Бенкена, впродовж 1, 3, 144 годин експерименту.

Експериментальна модель визначає вплив комбінації вказаних факторів процесу та їх взаємозв'язки при зміні відгуку. Ця модель описує три рівновіддалені фактори (X_1 , X_2 і X_3) та зміну відгуку рівня біосорбції йонів Сг (VI) (Y):

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i \cdot X_j \quad (1)$$

де b_0 — константа, b_i — лінійний коефіцієнт, b_{ii} — квадратичний коефіцієнт, b_{ij} — коефіцієнт взаємодії другого порядку.

Загалом, було використано 15 комбінацій факторів (табл. 1). Рівні трьох факторів та їх рівновіддаленість були відібрані, орієнтуючись на дані попередніх експериментів [3, 6, 13, 14].

Дисперсійний аналіз використаний для визначення достовірної різниці отриманих результатів і для визначення середніх значень при 95 % ймовірності ($p \leq 0,05$). Вплив кожного з факторів та їх взаємозв'язки з отриманим результатом оцінені за допомогою ANOVA (Analysis of Variance) (табл. 2). Дані з оптимізації впливу



умов середовища на рівень біосорбції йонів (VI), проаналізовані для отримання коефіцієнтів регресії і побудови регресійних рівнянь [1].

Таблиця 1.

Незалежні фактори, використані для оптимізації експерименту

Table 1.

The independent factors used for experimental optimization

№	Рівень рН X_1	Рівень аерації, % X_2	Концентрація йонів Cr (VI), мг/л X_3
1	2,0	0,0	50,0
2	6,0	0,0	50,0
3	2,0	100	50,0
4	6,0	100	50,0
5	2,0	50,0	0,0
6	6,0	50,0	0,0
7	2,0	50,0	100
8	6,0	50,0	100
9	4,0	0,0	0,0
10	4,0	100	0,0
11	4,0	0,0	100
12	4,0	100	100
13	4,0	50,0	50,0
14	4,0	50,0	50,0
15	4,0	50,0	50,0

Функція ймовірності вирахована методом найменших квадратів, та графіки площин для біосорбції йонів Cr (VI) побудовані, як функція від значень рН та початкової концентрації йонів Cr (VI), з використанням програмного забезпечення STATISTICA 6,0 (StatSoft Inc., 2001).

Результати та їх обговорення

Комбінації факторів оцінювались в трьох часових проміжках, орієнтуючись на попередньо отримані дані, протягом 1, 3 та 144 годин за сталої температури 28 °C [3, 6, 13, 14].

Значимими факторами, які впливають на зміни рівня біосорбції йонів Cr (VI) (Y), мг/л є рівень рН MES-буферу (X_1) та початкова концентрація йонів Cr (VI), де (X_2) – лінійна залежність та (X_3^2) – квадратична залежність. Результати, отримані після проведення експерименту впродовж 1, 3 та 144 годин за стандартних умов, описуються рівняннями 1, 2, 3, відповідно:

$$Y = 9,916 + 5,875 \cdot X_1 + 10,250 \cdot X_3 + 6,500 X_1 \cdot X_3 \quad (1),$$

$$Y = 9,250 - 5,250 \cdot X_1 + 10,500 \cdot X_3 - 2,729 \cdot X_3^2 - 6,750 X_1 \cdot X_3 \quad (2),$$

$$Y = 10,416 - 8,125 \cdot X_1 - 3,395 \cdot X_1^2 + 9,000 \cdot X_3 - 6,500 X_1 \cdot X_3 \quad (3),$$

де Y – рівень біосорбції йонів Cr (VI), мг/л, 9,916; 5,875; 10,250 і т. д. – коефіцієнти регресії.



Рівняння регресії (4), отримане після проведення оптимізаційного експерименту впродовж 144 годин у середовищі Рідер:

$$Y = 20,75 + 20,375 X_3 \quad (4),$$

Регресійна модель включає від 2-х (4), 4-х (1), 5-ти (2, 3) коефіцієнтів регресії, з лінійною (1, 4) і квадратичною залежністю впливу (2, 3) та лінійний вплив взаємодій факторів і описує взаємозв'язки між відповіддю (Y) та експериментальними факторами (1, 4) (X_1, X_3).

Отже, отримані регресійні рівняння свідчать, що рівень біосорбції йонів шестивалентного хрому є функцією впливу двох факторів з використанням коефіцієнту регресії, якими є рівень рН середовища та початкова концентрація йонів Cr (VI) в середовищі культивування. При проведенні даних експериментів рівень аерації є єдиним фактором, який не впливає на рівень біосорбції йонів Cr (VI). При тривалості експерименту впродовж 1 години спостерігаємо сумачію двох основних факторів X_1 і X_3 та позитивний ефект від їх взаємодії.

Збільшення тривалості експерименту призводить до зміни параметрів регресійних рівнянь, за 3 години основний вплив здійснює саме фактор початкової концентрації йонів Cr (VI) (X_3), тоді як за 144 години — фактор рН (X_1), за умови проведення експерименту в MES-буфері. Проведення експерименту в середовищі Рідер впродовж 144 годин нівелює квадратичні впливи і являє собою лінійну взаємодію, причому основним діючим фактором, що позитивно і в значній мірі впливає на рівень біосорбції йонів Cr (VI), є фактор початкової концентрації даних йонів (X_3), що також підтверджує ANOVA аналіз — сума квадратів є найвищою при оцінці усіх впливів (табл. 2) та діаграма Парето, де проводиться оцінка впливу абсолютних значень кожного ефекту (табл. 3, 4).

Таблиця 2.

ANOVA для рівня біосорбції йонів Cr (VI)

Table 2.

ANOVA for the level of Cr (VI) ions biosorption

Фактори	Сума квадратів	Розподілення числа ступенів свободи між факторами	Середня сума квадратів	F	p
протягом 1 години (MES — буфер)					
pH (X_1)	276,125	1	276,125	8,53	0,003669
Cr (VI) (X_3)	840,50	1	840,50	25,96	0,000290
$X_1 \cdot X_3$	169,00	1	169,00	16,12	0,010107
протягом 3 годин (MES — буфер)					
pH (X_1)	220,50	1	220,50	30,91	0,002589
Cr (VI) (X_3)	882,00	1	882,00	123,64	0,000103
Cr (VI) (X_3^2)	110,00	1	110,00	15,42	0,011103
$X_1 \cdot X_3$	182,25	1	182,25	25,54	0,003918
протягом 144 годин (MES — буфер)					
pH (X_1)	528,12	1	528,12	32,23	0,002360
pH (X_1^2)	224,16	1	224,16	13,68	0,014015
Cr (VI) (X_3)	648,00	1	648,00	39,55	0,001494
$X_1 \cdot X_3$	169,00	1	169,00	10,31	0,023682
протягом 144 годин (середовище Рідер)					
Cr (VI) (X_3)	3321,25	1	3321,25	101,99	0,000008

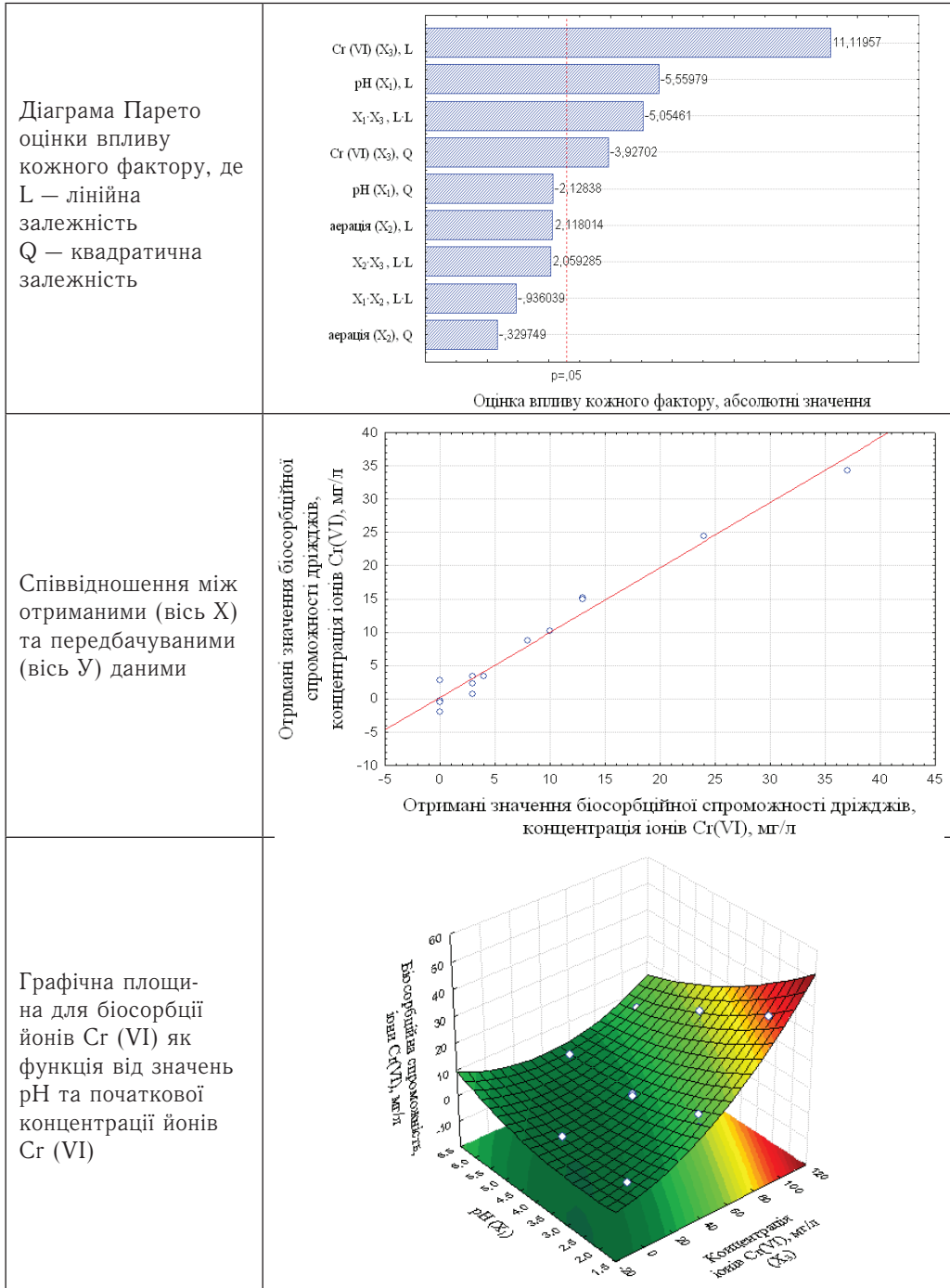


Таблиця 3.

Статистична обробка даних методом Бокс-Бенкен щодо впливу факторів на рівень біосорбції йонів Cr (VI) протягом 3 годин експерименту у MES-буфері

Table 3.

Statistical data-processing of the factors influenced on the level of Cr (VI) ions biosorption for 3 hours in the MES-buffer by Box-Behnken design

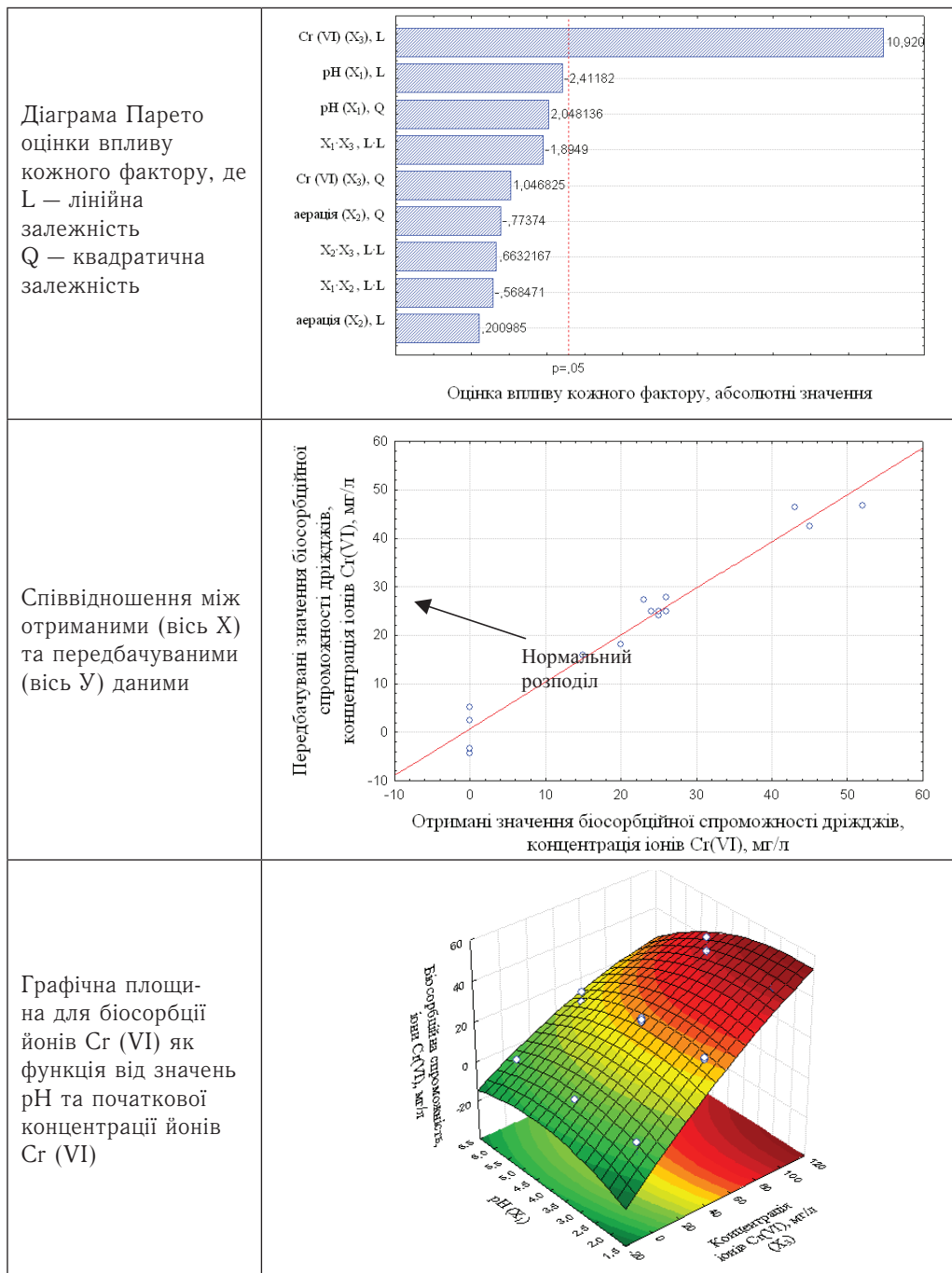


Таблиця 4.

Статистична обробка даних методом Бокс-Бенкен щодо впливу факторів на рівень біосорбції йонів Cr (VI) протягом 144 годин експерименту у середовищі Рідер

Table 4.

Statistical data-processing of the factors influenced on the level of Cr (VI) ions biosorption for 144 hours in the Rider-medium by Box-Behnken design



З практичної точки зору, такий ефект можна пояснити впливом приросту біомаси *S. cerevisiae* УКМ У-1968, оскільки середовище Рідер є досить оптимальним для росту біомаси дріжджів за достатньо довгий проміжок часу та впливом зростаючої кількості біомаси на процеси акумуляції йонів хрому, які відбуваються впродовж цього часу.

Кореляція між отриманими (вісь X) та передбачуваними (вісь Y) даними є досить високою (коефіцієнт детермінації, R^2 : 0,9648 — для рівняння 1; 0,9766 — для рівняння 2; 0,9524 — для рівняння 3; 0,9334 — для рівняння 4), що свідчить про те, що регресійні рівняння можуть бути використані для визначення рівня біосорбції йонів Cr (VI) (табл. 3, 4).

Графічні площини для біосорбції йонів Cr (VI), як функція від значень рН та початкової концентрації йонів Cr (VI), показують, що у випадку тривалості експерименту протягом 1 години рівень біосорбції йонів Cr (VI) буде закономірно збільшуватись із зростанням рН та початкової концентрації йонів Cr (VI). При більш тривалому експерименті топографія графічної площини змінюється, при цьому нижчі значення рН та висока початкова концентрація йонів Cr (VI), призводять до зростання рівня біосорбції йонів Cr (VI), що є характерним для 3 годин (табл. 3) та 144 годин експерименту у MES-буфері та у середовищі Рідер (табл. 4).

Профілі прогнозованих значень та бажаних рівнів оптимізації біосорбції йонів Cr (VI) показують, що наявність у середовищі початкової концентрації йонів Cr (VI) на рівні 100 мг/л (X_3) є оптимальним для всіх часових експериментів, змінними елементами є фактор рН (X_1) та фактор аерації (X_2), хоча останній фактор не є значимим фактором регресійного рівняння. Найвищий розрахований імовірний рівень біосорбції йонів Cr (VI) у MES-буфері відповідає 3 год впливу факторів і дорівнює 40,708 мг/г, при 144 годинах впливу у середовищі Рідер цей показник вищий і відповідає 45,844 мг/г і нижчий у MES-буфері — 38,167 мг/г (рис. 1, 2).

На біосорбційну активність рН розчину впливає, змінюючи поверхневі властивості біомаси і самого металу. Більшість дослідників засвідчують, що значення рН в межах 4,0 — 8,0 є оптимальним для сорбції різних металів, а такі метали, як хром і срібло сорбуються при більш кислих значеннях рН від 2,0 до 4,0 [6, 7, 11, 12]. Окрім цього, протягом всього часу культивування дріжджів в середовищі з йонами хрому відбувається зниження рН до 2,0. Özer A. та Özer D. показали, що оптимальне значення рН для біосорбції йонів Cr (VI) клітинами *S. cerevisiae* дорівнює 1,0 [8].

Таке зниження рН корелює зі зростанням кількості біомаси в середовищі, та відповідним збільшенням кількості вторинних метаболітів, що і призводить до закислення середовища. Фактор рН (X_1) має оптимальне значення на рівні 2,0 у MES-буфері (рис. 1). В середовищі Рідер рН дорівнює 3,0, що у комплексі з найвищим значенням рівня біосорбції йонів Cr (VI) 45,844 мг/г свідчить про комплексуювальну роль йонів, які входять до складу середовища і тим самим підвищують рівень зв'язування йонів Cr (VI), метаболічну активність дріжджових клітин та біоаккумуляційну спроможність дріжджів *S. cerevisiae* УКМ У-1968 (рис. 2).



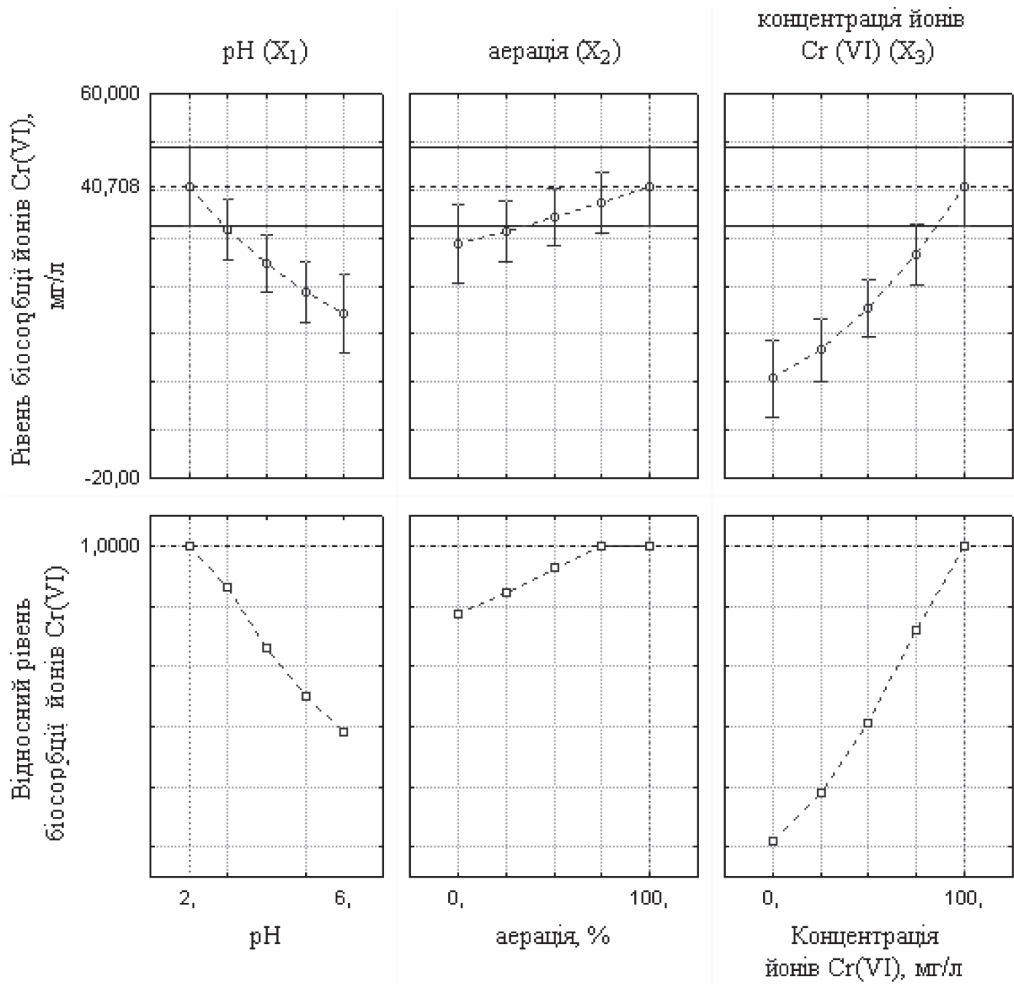


Рис. 1. Профілі прогнозованих значень для оптимізації біосорбції йонів Cr (VI), де вплив факторів здійснюється протягом 3 годин у MES-буфері.

Fig. 1. The profiles of predicted values for optimization of Cr (VI) ions biosorption under the factors influenced for 3 hours in the MES-buffer.



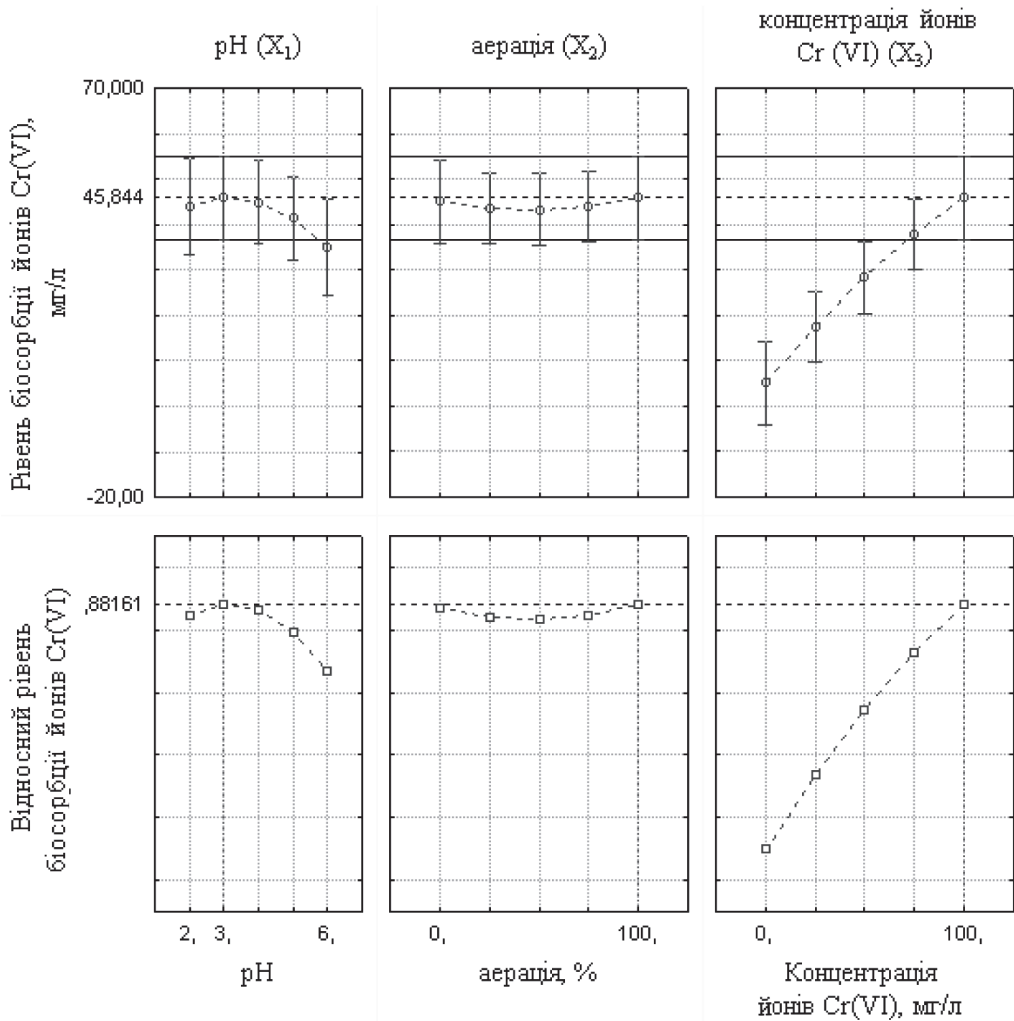


Рис. 2. Профілі прогнозованих значень для оптимізації біосорбції йонів Cr (VI), де вплив факторів здійснюється протягом 144 годин у середовищі Рідер.

Fig. 2. The profiles of predicted values for optimization of Cr (VI) ions biosorption under the factors influenced for 144 hours in the Rider medium.

Таким чином, статистична оптимізація біосорбції йонів Cr (VI) дріжджами *S. cerevisiae* УКМ У-1968 показує, що оптимальними є значення pH 2,0, аерація 100 % та початкова кількість йонів Cr (VI) у MES-буфері 100 мг/л. Найвищий розрахований ймовірний рівень біосорбції йонів Cr (VI) за зазначених параметрів відповідає 3 год впливу факторів і дорівнює 40,708 мг/г. Отже, всі проведені статистичні дослідження повністю підтверджують раніше отримані експериментальні дані, а дріжджі *S. cerevisiae* УКМ У-1968 можуть бути використані як експериментальна модель для подальшого вивчення механізмів біосорбції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Armstrong R., Hilton A. The use of variance (ANOVA) in applied microbiology // *Microbiologist*. — 2004. — 12. — P. 18-21.
2. Cervantes C., Campos-Garcia J., Devars S. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants // *FEMS Microbiology Reviews*. — 2001. — 25. — P. 335-347.
3. Kasatkina T., Lozovaya O., Podgorsky V. Chromium (VI) biosorption by yeasts: influence of pH and biomass concentration on the biosorption // 11th European Congress on Biotechnology, 24-29 August 2003, Basel, Switzerland. Book of Abstract. — p. 128.
4. Kratochvil D., Volesky B. Advances in the biosorption of heavy metals // *Trends. Biotechnol.* — 1998. — 16, №7. — P. 291-300.
5. Krauter P., Martinelli R., Williams K., Martins S. Removal of Cr (VI) from ground water by *Saccharomyces cerevisiae* // *Biodegradation*. — 1996. — 7, №4. — P. 277-286.
6. Lozovaya O. G., Kasatkina T. P., Podgorsky V. S., Fomina M. A Hexavalent chromium removal by yeasts biomass // 15th International Biohydrometallurgy Symposium, 26-29 September 2005, Cape Town, South Africa. — P. 617-624.
7. Mameeva O. G., Kasatkina T. P., Podgorsky V. S. The role of carotenoid pigments in Cr (VI) tolerance, biosorption and bioaccumulation by *Rhodotorula mucilaginosa* UCM Y-1776 and its mutants // *Advanced Materials Research*. — 2007. — Vols. 20-21. — p. 611-614.
8. Özer A. and Özer D. Comparative study of the biosorption of Pb (II), Ni (II) and Cr (VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats // *J. Hazard Mater.* — 2003. — 100. — P. 219-229.
9. Paknikar K. M., Puranik P. R., Pethkar A. V. Development of microbial biosorbents — a need for standardization of experimental protocols // In: *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century (part B): International Biohydrometallurgy Symposium-Proceedings*; Amils R., Ballester A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, — 1999. — P. 363-372.
10. Soares E. V., Duarte A. and Soares H. Study of the suitability of 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid pH buffer for heavy metals accumulation studies using *Saccharomyces cerevisiae* // *Chemical Speciation and Bioavailability*. — 2000. — 12, 2. — P. 59-65.
11. Volesky B., Holan Z. R. Biosorption of heavy metals: a review // *Biotechnol. Prog.* — 1995. — 11. — P. 235-250.
12. Volesky B., May-Phillips H. A. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1993. — 42. — P. 797-806.
13. Лозовая О. Г., Касаткина Т. П., Подгорский В. С. Влияние хрома (VI) на физиологию роста и сорбционную способность дрожжей // *Мікробіол. журн.* — 2004. — т.66, №3. — С. 42-50.
14. Лозова О. Г. Дріжджі — сорбенти деяких йонів важких металів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 2004. — 20 с.
15. Лурье Ю. Ю., Рыбникова А. И. Химический анализ производственных сточных вод, — М.: Химия, — 1974. — 335 с.



О. Г. Мамеева, В. С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академіка Заболотного 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина, тел.: 8 (044)
526 11 79,
e-mail: Mameeva@ukr.net

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСОРБЦИИ ИОНОВ CR (VI) ДРОЖЖАМИ *S. CEREVISIAE* УКМ У-1968 МЕТОДАМИ СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Реферат

Уровень аэрации, pH, и начальная концентрация ионов Cr (VI) были исследованы с использованием методов статистического анализа (модель Бокса-Бенкена). Оптимальными являются значения pH 2,0, аэрация 100 % и начальная концентрация ионов Cr (VI) в MES-буфере 100 мг/л для биосорбции ионов Cr (VI) дрожжами *S. cerevisiae* УКМ У-1968. Самый высокий рассчитанный вероятностный уровень биосорбции ионов Cr (VI) равен 40,708 мг/г за 3 часа влияния факторов. Были получены уравнения регрессии, как функция от двух основных эффектов, таких как уровень pH и начальная концентрация ионов Cr (VI) в среде культивирования с коэффициентами регрессии и коэффициентами детерминации R^2 : +0,9648; +0,9766; +0,9524; +0,9334.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, модель Бокса-Бенкена, статистическая оптимизация, биосорбция, ионы Cr (VI).

O. G. Mameeva, V. S. Pidgorsky

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, Academ. Zabolotny str.,
154, Kyiv, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: Mameeva@ukr.net

THE OPTIMIZATION OF THE CR (VI) IONS BIOSORPTION BY YEAST *S. CEREVISIAE* UCM Y-1968 BY THE STATISTICAL ANALYSIS METHODS

Summary

The level of aeration, pH and initial concentration of Cr (VI) ions have been investigated with use of statistical analyses experiments (Box-Behnken design). The values pH 2.0, aeration of 100 % and initial concentration of Cr (VI) ions in the MES-buffer of 100 mg/l for biosorption of Cr (VI) ions of yeasts' *S. cerevisiae* UCM Y-1968 are optimum ones. The highest calculated predicted level of the biosorption of Cr (VI) ions was 40,708 mg/g for 3 hours of the factors influence. The received regression equations as the function from two main effects, such as a level pH and initial concentration of ions Cr (VI) in cultivation medium with use of regress factors were derived by the statistical analysis, and the models with multiple correlation coefficient R^2 : 0,9648; 0,9766; 0,9524; 0,9334 were obtained.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, Box-Behnken design, statistical optimization, biosorption, Cr (VI) ions.



О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,
Овідіопольська дор., 3, Одеса-36, 65036, Україна, тел.: 8 (0482) 395 274,
e-mail: olyza@rambler. ru.

ПЛР-АНАЛІЗ МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM*

Дослідження внутрішньоштамової варіабельності ДНК Fusarium moniliforme Sheldon var. lactis показало, що при контакті зі стійкими та сприйнятливими до фузаріозу генотипами кукурудзи, при різних термінах культивування та серіях пасажів, спостерігаються зміни у електрофоретичних спектрах штамів. При дослідженні мінливості геному серед колекційних та свіжовиділених штамів F. moniliforme виявлено, що рівень поліморфізму в межах цих груп складає 49,4 % та 97,9 %, відповідно. Розподіл свіжовиділених штамів за даними кластеризації відповідає спеціалізації за перевагою до живильного субстрату рослини-хазяїна. Розроблено систему ПЛР-детекції фузарій з використанням родо-, видо- та штамоспецифічних послідовностей нуклеотидів ДНК.

К л ю ч о в і с л о в а: полімеразна ланцюгова реакція, Fusarium, варіабельність геному, ПЛР-детекція фузарій.

Фузарієві гриби є космополітами і уражують майже всі агрономічно важливі культури [2]. Вірогідність і ступінь ураження кукурудзи фузаріями набагато вищі, ніж у інших злакових рослин, що використовують в рослинництві. Це обумовлено особливостями будови і компонентного складу рослин та насіння кукурудзи, які забезпечують грибам оптимальне середовище існування і живильний субстрат. Причиною фузаріозу зерна кукурудзи є гриб *F. moniliforme Sheldon var. lactis*. Для представників роду *Fusarium* характерний високий ступінь мінливості морфологічних, фізіологічних і молекулярно-генетичних ознак, що приводить до подолання резистентності стійких до фузаріозного ураження рослин кукурудзи [3]. Молекулярно-генетичний аналіз організації та динаміки мінливості геномів даних грибів дозволить розглядати проблему цілісно: рослина-хазяїн – патоген.

ДНК-технології на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяють проводити дослідження консервативних та варіабельних регіонів геному [9]. Роль консервативних ділянок полягає в регулюванні життєво важливих функцій та їх послідовності, які не змінюються, чи змінюються незначно протягом еволюції. Варіабельні регіони представлені набором олігонуклеотидних послідовностей, які схильні до змін під дією зовнішніх чинників, що, в першу чергу, еволюційно необхідно для підтримки відповідного гомеостазу організмів у популяції. Зменшення чи збільшення таких послідовностей визначається високою частотою подій нерівного кросинговеру в рекомбінаційних точках, що є одною з причин значного геномного поліморфізму [10].

© О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап, 2008



Інформація про молекулярно-генетичний поліморфізм, мінливість структури популяції грибів роду *Fusarium* при утриманні на зразках кукурудзи різних сортів, а також створення системи ПЛР-діагностики збудників фузаріозу може слугувати важливим ключем для захисту людини від мікотоксикозів та урожаю кукурудзи від ураження фузарієвими грибами, що і визначає мету наших досліджень.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували штами *F. moniliforme var. lactis* 94 m (Fmon94m) і *F. moniliforme var. lactis* 34-17 (Fmon34-17), контрастні за ознаками патогенності (високо- та слабкопатогенний, відповідно) з колекції відділу фітопатології та ентомології Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення УААН (СГІ, Одеса). Штами зберігалися на штучних живильних середовищах (ЖС) [2]. Відновлення патогенності здійснювали шляхом «проведення» штамів «через рослину» [1] з використанням зерен контрастних за стійкістю до фузаріозу генотипів кукурудзи (стійка лінія — Одеська 139 (Од139) і сприйнятлива лінія — R221A). Повітряний міцелій з поверхні зерен пересівали у чашки Петрі з ЖС Чапека (30 г глюкози, 2 г NaNO_3 , 1 г KH_2PO_4 , 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г KCl , 18 мг $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 1000 мл dH_2O) і культивували в термостаті при температурі 24 °С 7, 14, 21 добу. Виділення ДНК здійснювали згідно методики [12].

Для дослідження внутрішньовидового поліморфізму використовували довільні вибірки *F. moniliforme var. lactis*: 31 штамп з колекції Південного біотехнологічного центру в рослинництві УААН (ПБЦ, Одеса) та 18 штамів з колекції СГІ. Умови проведення ДП (довільно праймованого)-ПЛР-аналізу, електрофорезу та комп'ютерної обробки даних згідно [4, 7, 8].

Дослідний матеріал та умови ПЛР-детекції наведені у [5, 11].

Результати та їх обговорення

Подолання захисних систем рослини та розвиток інфекції на стійких генотипах обумовлений лабільністю генетичного апарату фітопатогенних грибів роду *Fusarium*. Тривале культивування фузарій в умовах лабораторії на штучному ЖС призводить до фенотипового перетворення мікроорганізмів (зміна біохімічних і фізіологічних процесів) [2]. З одного боку, це пов'язано з активацією або пригніченням експресії генів [14], з іншого — з накопиченням спонтанних мутацій, з рекомбінацією ДНК, переміщенням мобільних генетичних елементів, внаслідок чого відбувається добір найбільш пристосованих до умов існування генотипів [13].

При дослідженні внутрішньоштамової молекулярно-генетичної мінливості моноспорових зразків роду *Fusarium* в лабораторних умовах при різних термінах культивування та внаслідок пасажів культур штамів спостерігалися зміни їх електрофоретичних спектрів. ПЛР з праймером OPB-05 (5'-tgcgcccttc-3') дозволила виявити поліморфні фрагменти у спектрах різних варіантів штамів, відтворювані при повторних експериментах та ампліфікації. На рисунку 1 показана електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації ДНК штаму Fmon94m (доріжка № 1) та його варіантів, які вирощували на кукурудзі генотипів Од139 та R221A протягом 7, 14 та 21 доби.

Виявлено, що при контакті штаму Fmon94m, що зберігався, із зернами стійкого до фузаріозу генотипу кукурудзи, спостерігається зміна в його ДНК-



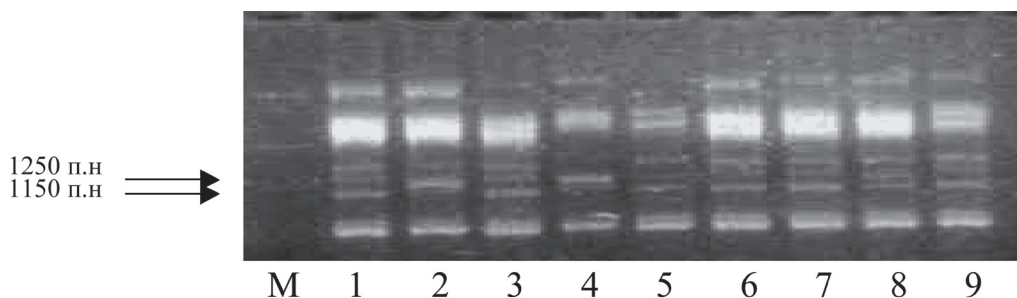


Рис. 1. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації ДНК з праймером ОРВ-05 культур штаму *F. moniliforme var. lactis* 94 m, які вирощували на різних за стійкістю до фузаріозу зернах кукурудзи протягом 7, 14, 21 діб.

1 — ДНК штаму Fmon94m, який тривало зберігався у колекції; культури штаму Fmon94m; 2 — ДНК Fmon94m/Од139; 3 — ДНК Fmon94m/R221A; 4 — ДНК Fmon94m/Од139/7; 5 — ДНК Fmon94m/R221A/7; 6 — ДНК Fmon94m/Од139/14; 7 — ДНК Fmon94m/R221A/14; 8 — ДНК Fmon94m/Од139/21; 9 — ДНК Fmon94m/R221A/21. М — маркер молекулярної ваги pGEM.

Fig. 1. Electrophoregram of DNA amplification products distribution with ORV-5 *F. moniliforme var. lactis* 94 m strain culture primer grown on different to fusarium resistance maize grains for 7, 14, 21 days.

1 — Fmon94m strain DNA, kept prolonged at the collection; Fmon94m strain culture; 2 — Fmon94m/Od 139 DNA; 3 — Fmon94 m/R 221A DNA; 4 — Fmon94m/Od139/7 DNA; 5 — Fmon94m/R 221A/7 DNA; 6 — Fmon94m/Od139/14 DNA; 7 — Fmon94m/R221A/14 DNA; 8 — Fmon94m/Od139/21; 9 — Fmon94 m/R221/A/21. M — molecular weight pGEM marker

спектрі варіанту (Fmon94m/Од139), яка полягала у зникненні фрагменту в 1150 п. н. і появи фрагменту розміром 1250 п. н. (рис. 1, доріжка 2) при порівнянні із спектрами ДНК Fmon94m з колекції і варіанту, який вирощений на сприйнятливому генотипі кукурудзи (Fmon94m/R221A). Профіль ДНК культури штаму Fmon94m/R221A, залишився ідентичним спектру Fmon94m/R221A (рис. 1, дор. 1, 3). Семидобове культивування на середовищі Чапека показало, що ДНК культури Fmon94m/Од139/7 також мала фрагмент розміром 1250 п. н. і позбавлена фрагменту в 1150 п. н. (рис. 1, дор. 4). Спектр ДНК Fmon94m/R221A/7 (рис. 1, дор. 5) такий самий, як і в доріжках 1 та 3. Виснаження ЖС і відсутність вільного простору для росту міцелію є факторами, при яких настає «старіння» культур. Спектри ДНК, що виділена з 14 — 21-добових культур, при ПЛР-ампліфікації не мали фрагментів, що відрізнялися, у культур, вирощених на зернах як стійкого, так і сприйнятливого генотипів кукурудзи (рис. 1, дор. 6 — 9) і співпадали із спектром ДНК колекційного штаму. Дослідження ДНК культур слабкопатогенного штаму Fmon94m/R221A також дозволило виявити відтворні поліморфні фрагменти молекулярною вагою 1250 п. н. у культур, патогенні властивості яких відновлювали на стійкому (Од139) до фузаріозу генотипі кукурудзи. На відміну від культур *F. moniliforme var. lactis* 94m, культури *F. moniliforme var. lactis* 34-17, зберігали придбаний фрагмент впродовж усіх трьох термінів культивування (дані не приведені).

При ПЛР-аналізі мінливості штамів унаслідок п'яти пасажів не виявлено змін у спектрі ампліфікованої ДНК культур (Fmon34-17/R221A і Fmon34-17/Од139) слабо патогенного штаму Fmon34-17. Дослідження впливу пасажів на мінливість ДНК високопатогенного штаму дозволило виявити відмінності у спектрах ампліфікації його культур (Fmon94m/R221A і Fmon94m/Од139), що проявилось у появі та зникненні фрагментів ампліфікації розміром 2700 п. н., 1250 п. н. і 900 п. н. протягом трьох пасажів та стабілізацією спектрів у четвертому, п'ятому пасажах.

Показано, що спектр ДНК культур штаму, що тривало зберігалися в лабораторних умовах, відрізняється від ДНК-спектрів культур, які вирощені на зернах рослини-хазяїна. Культивування штамів, відмінних за ознаками патогенності на різних за стійкістю до збудника генотипа кукурудзи, призводить до різного ступеня часової стабільності (мінливості) спектрів ДНК. Аналогічні дослідження проведені на штамі молочнокислих бактерій *Oenococcus oeni*, де показано, що різні умови культивування призводять до змін у ДНК-спектрах цих бактерій [6].

Еволюція фузарій тісно пов'язана зі зміною субстрату, зокрема рослинного походження [3]. При вивченні генетичної варіабельності довільної вибірки з 31 штаму *F. moniliforme var. lactis*, свіжовиділених з уражених зерен кукурудзи за допомогою ДП-ПЛР аналізу, виявлено, що рівень поліморфізму серед штамів дорівнює 97,9 % [8], у протилежність рівню поліморфізму, який складає 49,4 %, вибірки з 18 штамів *F. moniliforme var. lactis*, виділених з різних генотипів кукурудзи, але тривало зберігалися і багато разів пересівалися на штучних ЖС [7]. Низький рівень поліморфізму «старих» культур свідчить про збалансованість генотипів штамів в умовах певного температурного режиму і складу живильних речовин. Висока ступінь поліморфізму «свіжих» штамів може обумовлюватися конкуренцією за живильний субстрат та тиском захисних систем рослини-хазяїна.

Обробка даних ДП-ПЛР-аналізу за допомогою комп'ютерної програми «MEGA 4.0» [8] (кластерний аналіз та конструювання дендрограм) дозволило виявити, що при кластеризації «старих» штамів *F. moniliforme var. lactis* не спостерігається закономірності угруповання зразків (дані не приведені). На дендрограмі (рис. 2), що побудована за даними молекулярно-генетичного аналізу «свіжих» штамів, виявлено розподіл штамів у два кластери, які відповідають зразкам, виділеним з білозерних та жовтозерних форм кукурудзи, відповідно. Усередині кластерів спостерігається угруповання у субкластери, які відобразили спорідненість штамів, ізольованих з певної рослини-хазяїна. Рівень поліморфізму у субкластерах варіював у діапазоні 64,5 % – 72,7 %, що показує відносно слабку дивергенцію геномів штамів *F. moniliforme var. lactis* в межах однієї рослини, з якої вони були ізольовані. В той же час, субкластери генетично віддалені один від одного, що, можливо, пов'язано зі спеціалізацією даних фітопатогенів до живильного субстрату рослини-хазяїна.

Виявлення послідовностей нуклеотидів ДНК, які специфічні до роду та окремих видів фузарій, надає можливість їх молекулярно-генетичної ідентифікації. Специфічні нуклеотидні послідовності ДНК є консервативними. Детекція здійснюється за рахунок молекулярної ДНК:ДНК гібридизації, або за допомогою ПЛР-аналізу шляхом синтезу і ампліфікації специфічних до даного роду чи видів ПЛР-фрагментів.



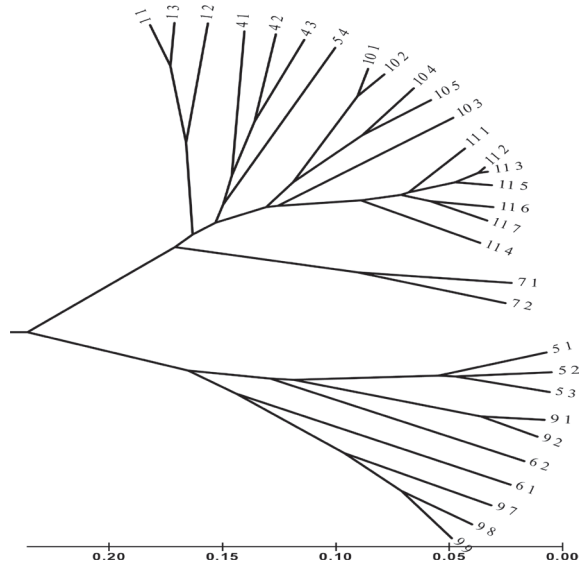


Рис. 2. Дендрограма феногенетичних відносин 31 штаму *F. moniliforme var. lactis*, що сконструйована за даними ДП-ПЛР.

Fig. 2. Dendrogram of phenogenetic relations of 31 *F. moniliforme var. lactis* strain, designed upon the DP-PLR data.

На рисунку 3 наведено приклад ПЛР-детекції специфічних послідовностей роду *Fusarium* та видів *F. moniliforme*, *F. graminearum* у зерні кукурудзи, що є показником наявності інфекції.

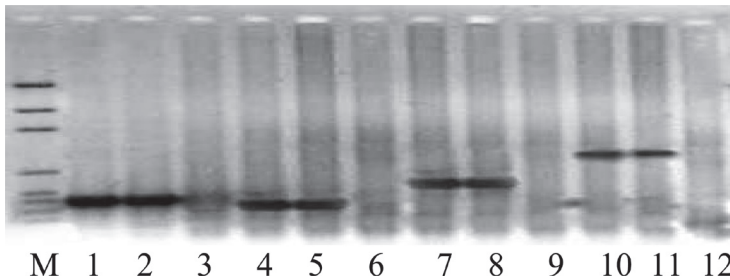


Рис. 3. Детекція роду *Fusarium* та видів *F. moniliforme*, *F. graminearum* у зерні кукурудзи.

1, 4 – позитивний контроль роду *Fusarium* (ДНК чистих культур 8 видів); 2, 5, 8, 11 – зерно кукурудзи (лінія ГК26); 3, 6, 9, 12, 15 – контроль контамінації; 7 – позитивний контроль виду *F. moniliforme*; 10 – позитивний контроль виду *F. graminearum*; М – маркер молекулярної ваги рGEM.

Fig. 3. Genus *Fusarium* and species *F. moniliforme*, *F. graminearum* detection of maize grains.

1, 4 – positive control of genus *Fusarium*; 2, 5, 8, 11 – maize grains; 3, 6, 9, 12, 15 – contramination control; 7 – positive control of the species *F. moniliforme*; 10 – positive species *F. graminearum* control; М – molecular weight pGEM marker.

Розроблено систему ПЛР-детекції безпосередньо роду *Fusarium*, видів *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* та генів токсинуотворення (на прикладі *tri5*-гену, який кодує триходієнсінтазу, що каталізує перший крок біосинтезу трихотеценів) у геномах даного роду грибів у харчових виробках рослинного походження. Впровадження даної системи надасть можливість проводити експрес-контроль якості рослинної та харчової продукції на наявність інфекції та потенційну токсичність, що дозволить захистити врожаї та здоров'я людини.

Таким чином, показано, що в різних умовах існування та живлення виявляється молекулярно-генетична мінливість окремих представників та популяцій мікро-скопичних грибів роду *Fusarium*. Мінливість обумовлена лабільністю генетичного апарату, тобто можливістю здійснення перебудови варіабельних послідовностей ДНК, за рахунок чого виживають клітини грибів з найбільш відповідною до умов існування комбінацією генів. Наявність консервативних нуклеотидних послідовностей у геномах фузарій надає можливість детекції патогену на рівні роду, виду та штамів за допомогою ПЛР.

ЛІТЕРАТУРА

1. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии: справочник / Киев: Наукова думка. — 1982. — С. 550.
2. Билай В. И. Фузари. — Київ: Научная мысль, 1977. — 442 с.
3. Грушка Я. Монография о кукурузе. — Москва: Колос, 1965. — 751 с.
4. Дерев'янку О. О., Кожухова Н. Е., Бабаянц О. В., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетичний аналіз популяцій *Fusarium* spp. південного регіону України // Вісник ОНУ. — 2004. — т. 9, в. 5, № 1. — С. 105-112.
5. Дерев'янку О. А., Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры геномов фузариий для определения инфицированности зерна кукурузы // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Київ: Аграрна думка, 2006.— С. 93-97.
6. Загоруйко В. А., Ткаченко М. Г., Кишковская С. А., Танащук Т. Н., Иванова Е. В., Ткачев И. Ф., Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Захарова О. А. Совершенствование микробиологического контроля винодельческого производства на основе использования ПЦР-анализа // Вестник «Кримська якість» — 2006. — № 2 (8).— С. 113-114.
7. Захарова О. А., Вареник М. Б., Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Генетическая вариабельность *Fusarium moniliforme* Sheldon, поражающего зерна кукурузы // Зб. наук. праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології» — Київ: ЛОГОС. — 2007.— С. 40-44.
8. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Molecular Biology and Evolution 2007 — <http://www.10.1093/molbev/msm092>.
9. Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М. Генетика: Энциклопедический словарь / Минск: Технология, 1999. — 448 с.
10. Кожухова Н. Е., Захарова О. О. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична ідентифікація мікотоксигенних фузаріїв // Одеський медичний журнал. — 2007. — № 6 (104). — С. 54-56.
11. Moller E., Bahnweng G., Sandermann H., Geiger H. Simple and efficient protocol for isolation high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, infected plant tissues // Food Mycol. — 1998. — Vol. 1. — P. 6115-6116.
12. McClintock B. Chromosome organization and genic expression // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1951. — Vol. 16. — P. 13-47.
13. Smith J., Smith O. The use of morphological, biochemical, and genetic characteristics of *Fusarium* // Trends Genet. — 1997. — Vol. 15. — P. 200-211.



УДК 577.21: 575.17

О. А. Захарова, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Овидиопольская дор. 3, Одесса, 65036, Украина, тел.: 8 (0482) 395 274,
e-mail: olyza@rambler. ru.

ПЦР-АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОМА И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

Реферат

Проведено исследование внутриштаммовой варибельности *F. moniliforme* Sheldon var. *lactis*. Показано, что при контакте с устойчивыми и восприимчивыми к фузариозу генотипами кукурузы, при разных сроках культивирования и сериях пассажей наблюдаются изменения в электрофоретических спектрах культур штаммов. При изучении внутривидовой изменчивости коллекционных и свежевыделенных штаммов *F. moniliforme* обнаружено, что уровень полиморфизма составляет 49,4 % и 97,9 %, соответственно. Распределение свежевыделенных штаммов по данным кластеризации соответствует специализации по предпочтению к питательному субстрату растения-хозяина. Разработана система ПЦР-детекции фузарий с использованием родо-, видо- и штаммоспецифических последовательностей нуклеотидов ДНК.

К л ю ч е в ы е с л о в а: полимеразная цепная реакция, *Fusarium*, варибельность генома, ПЦР-детекция фузарий.

УДК 577.21: 575.17

О. А. Zakharova, N. E. Kozhukhova, Yu. M. Syvolap

South Plant Biotechnology Center UAAS,
Ovidiopolska road 3, Odesa, 65036, Ukraine, tel.: 8 (0482) 395 274,
e-mail: olyza@rambler. ru.

PCR-ANALYSIS OF GENOME CHANGEABILITY AND *FUSARIUM* FUNGI IDENTIFICATION TECHNOLOGY DEVELOPMENT

Summary

Fusarium moniliforme Sheldon var. *lactis* intrastrains variability research was carried out. We observed the changes in electrophoretic spectrums of the strains cultures that obtained in result of contact with fusariosus resistant and sensible maize genotypes, by different cultivation terms and series passages. At the study of collection and recently isolated *F. moniliforme* strains intraspecific changeability it was found out that the polymorphism level was 49,4 % and 97,9 %, accordingly. The recently isolated strains clusterization corresponds to plant-owner specialization. It has been developed the PCR-detection system of fusaria with the help of genus-, species- and strain-sequences of DNA nucleotides.

Key words: polymerase chain reaction, *Fusarium*, genome variability, PCR-detection of fusaria.



**Н. С. Водзінська, О. Ю. Зінченко, Т. О. Філіпова, Б. М. Галкін,
С. В. Водзінський, Ю. В. Ішков**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 7653361,
email: nsvod@ukr.net

ЧУТЛИВІСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FA2 ДО ДІЇ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ

*Досліджено темнову та фотоіндуковану дію нових синтетичних порфіринів з різними зарядами молекул на збудника бактеріального раку рослин – *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, що найбільш ефективними як у темнових умовах, так і при фотоактивації є катіонні порфірини. Найбільш активними з цієї групи сполук виявилися асиметрично заміщені порфірини, що в одному з мезо-положень мають н-ноніл, які практично повністю пригнічують ріст *A. tumefaciens* при фотосенсибілізації. Встановлено, що ці порфірини за темнових умов мають бактерицидну дію, яка, вірогідно, обумовлена блокуванням важливих процесів життєдіяльності.*

*К л ю ч о в і с л о в а : *Agrobacterium tumefaciens*, порфірини, антибактеріальна активність, фотосенсибілізація.*

Погіршення фітосанітарної ситуації в сільському господарстві обумовлює необхідність удосконалення захисту рослин і пошуку альтернативних шляхів боротьби з патогенами на додаток до традиційних методів. На сьогодні у світовій практиці прийнята концепція інтегрованої системи захисту рослин, в основі якої лежить обмеження використання хімічних пестицидів, які залишаються серйозним фактором забруднення навколишнього середовища, за рахунок застосування альтернативних екологічно безпечних препаратів.

Інфекційні хвороби рослин викликаються фітопатогенними грибами й бактеріями. Одним із цих патогенів є *Agrobacterium tumefaciens*, що викликає захворювання на бактеріальний рак у плодів рослин. Уражуючи виноградники, вона стає причиною масових збитків виноградарів внаслідок зменшення врожайності кущів і погіршення якості продукції. Сортів винограду, стійких до бактеріального раку, не зафіксовано.

Пряких заходів боротьби з бактеріальним раком, які дозволили б звільнити хворі рослини від інфекції або поліпшити їх стан, немає.

На сьогоднішній день існує новий підхід до лікування бактеріальних і вірусних захворювань людини — фотодинамічна терапія, головним принципом якої є використання фотосенсибілізаторів (ФС) — молекул, здатних поглинати світло з певною довжиною хвилі і генерувати активні форми кисню, цитотоксичні для клітини-мішені [1, 7 — 9]. Одними з найефективніших ФС на даний момент є порфірини та їх похідні [7, 8]. Останнім часом показано, що порфірини мають не лише фотодинамічну, а й

темнову активність щодо патогенних та умовно-патогенних для людини бактерій [2 – 7, 11, 13]. Відомості щодо активності цих сполук у відношенні фітопатогенних бактерій на сьогоднішній день у літературі відсутні. Тому метою роботи було визначення чутливості *Agrobacterium tumefaciens* FA2 до низки синтетичних порфіринів та їх металокомплексів.

Матеріали і методи

У роботі досліджували активність 10 сполук, синтезованих в проблемній лабораторії синтезу лікарських засобів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (табл.). Усі досліджувані сполуки розчиняли у дистильованій воді. З вихідного розчину готували робочі розведення.

Тест-об'єктом слугував штам фітопатогенної бактерії *Agrobacterium tumefaciens* (за новою класифікацією *Rhizobium radiobacter*) FA2, люб'язно наданий д. б. н. Мілкусом Б. Н.

Зберігання тест-штаму проводили на поверхні скошеного картопляного агару при температурі 4 °С. Для експерименту брали добову культуру, яку вирощували у пробірці на скошеному картопляному агарі при 25 °С.

Дію досліджуваних сполук на тест-штам вивчали шляхом визначення їх так званого темного та фотоіндукованого впливу.

Таблиця

Перелік досліджених сполук

Table

The studied compounds list

Назва речовини	№
Катіонні мезо-хінолінілзаміщені	
Германієвий комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато тетратозилату	I
Олов'яний комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато хлориду тетратозилату	II
Марганцевий комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато тетратозилату	III
Марганцевий комплекс мезо-тетра (N-метил-6-хінолініл) порфіринато тетратозилату ацетату	IV
Катіонні асиметрично заміщені	
5,10,15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл) порфіринато тритозилат	V
Цинковий комплекс 5,10,15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл) порфіринато тритозилату	VI
5,10, 15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)-порфіринато тритозилат	VII
Цинковий комплекс 5,10, 15-три (N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)-порфіринато тритозилату	VIII
Аніонні	
Мезо-тетра (п-карбоксіфеніл) порфірин	IX
Цинковий комплекс мезо-тетра (п-карбоксіфеніл) порфірину	X

Для вивчення темного впливу досліджуваних речовин готували рідке середовище LB [14]. Середовище розливали в пробірки по 1 мл. Для кожної сполуки



ставили три ряди пробірок з середовищем, які містили 10, 20 та 40 мкМ досліджуваної сполуки. Кількість паралелей для кожного варіанту дорівнювала 5. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 1 атм. Всі експерименти проводили у 3 – 5 повторях.

Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному картопляному агарі в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Суспензію розводили до концентрації 10^3 кл/мл і вносили по 50 мкл в пробірки зі стерильним середовищем LB.

Культури з порфіринами інкубували в термостаті при температурі 25 °С протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжині хвилі 540 нм [4]. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі LB без додавання досліджуваних речовин.

Для визначення фотоіндукованого впливу порфіринів готували суспензію клітин тест-мікроорганізмів аналогічно попередній методиці. Суспензію розводили до концентрації 10^3 кл/мл і вносили по 50 мкл в пробірки зі стерильним середовищем LB.

Культури з порфіринами інкубували при сонячному світлі та кімнатній температурі протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжині хвилі 540 нм. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі LB без додавання досліджуваних речовин. Кількість повторів та оцінка результатів аналогічні попередній методиці.

Для найбільш активних сполук було визначено характер дії порфіринів на бактеріальні клітини. Для цього культуру *Agrobacterium tumefaciens* вирощували протягом 24 годин при 25 °С на поверхні скошеного картопляного агару та змивали стерильним фізіологічним розчином. Суспензію клітин тест-мікроорганізму вносили у 20 мл свіжого стерильного середовища LB таким чином, щоб кінцева концентрація клітин у середовищі дорівнювала 10^3 і підрозували на водяній бані з шейкером при 25 °С до початку логарифмічної фази, вимірюючи оптичну густину культури при довжині хвилі 540 нм через кожні 30 хв [7]. Після чого до поживного середовища додавали досліджувані речовини у відповідних концентраціях і визначали екстинкцію культуральної рідини з порфіринами. Після додавання досліджуваних речовин продовжували вимірювання оптичної густини культури через кожні 30 хв протягом 4 годин. Про характер дії судили, виходячи зі швидкості накопичення біомаси, яку реєстрували вимірюванням оптичної густини.

За контроль правили культури тест-мікроорганізму, вирощені в аналогічних умовах без додавання досліджуваних сполук.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Математичні розрахунки проводили за допомогою комп’ютерної програми Excel [5].

Результати та їх обговорення

У групі мезо-хінолінілзаміщених порфіринів найбільш активними щодо клітин *A. tumefaciens* виявились марганцевий комплекс (III) у концентрації 20 мкМ та олов’яний комплекс (II) у концентрації 40 мкМ, які пригнічували ріст культури на 29 % у порівнянні з контролем (рис. 1). Затримка росту на 23 % спостерігалася при максимальній концентрації марганцевого комплексу (III). Олов’яний комплекс (II) у



концентрації 20 мкМ пригнічував ріст 5 % клітин. Мінімальний вміст цих сполук у поживному середовищі знижував інтенсивність росту бактерій на 10 %.

При вивченні дії сполук I та IV виявлено, що залежність ефекту від концентрації в даному випадку була зворотною. (Ряд авторів, зокрема, Merchat M. та ін. [12], вважають причиною цього явища ефект насичення поверхневих клітинних рецепторів молекулами порфіринів.) Крім того, обидві речовини майже однаково впливали на ріст культури. Так, найменша концентрація затримувала ріст *A. tumefaciens* на 20 %, концентрація у 20 мкМ – на 12 %. Максимальна концентрація германієвого комплексу (I) інгібувала ріст 9 % клітин, тоді як марганцевий комплекс (IV) у цій концентрації не впливав на ріст культури (рис. 1).

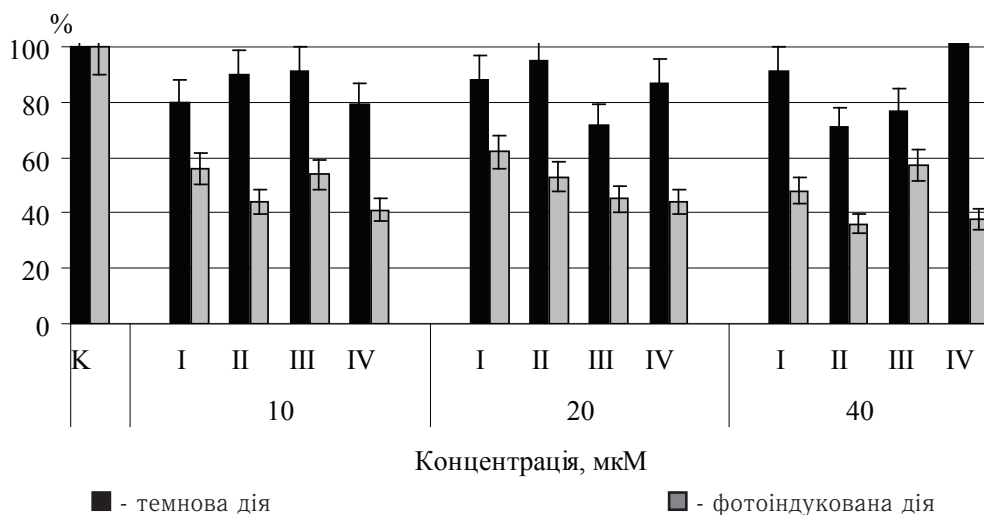


Рис. 1. Ріст культури *Agrobacterium tumefaciens* FA2 за темної та фотоіндукованої дії мезо-хінолінілзаміщених порфіринів

Fig. 1. The *Agrobacterium tumefaciens* FA2 culture growth under dark and photoinduced action of meso-quinolinyl substituted porphyrins

Вивчення фотодинамічної дії досліджуваних сполук показало, що найбільшу активність виявили сполуки II та IV, які знижували ріст культури після опромінення на 64 % та 62 %, відповідно, у концентрації 40 мкМ. Ця ж концентрація виявилась найбільш ефективною у сполуки I, де затримка росту складала 52 %, а для сполуки III – 43 %.

Сполуки I, II та IV у концентрації 20 мкМ викликали фотосенсибілізацію 38 %, 47 % та 56 % клітин, відповідно. Для речовини III концентрація 20 мкМ виявилася максимально ефективною і викликала зменшення росту на 55 % (рис. 1).

При опроміненні у присутності найменшої концентрації 10 мкМ більш ефективними виявилися сполуки II та IV, вони зменшували ріст у межах 56 – 59 %. Для інших сполук цієї групи пригнічення росту становило 45 %.

Порівняння даних з темної та фотодинамічної антимікробної активності мезо-хінолінілзаміщених порфіринів дозволяє стверджувати, що всі досліджені сполуки виявляють фотосенсибілізуючу активність щодо клітин тест-мікроорганізму.

При вивченні дії синтетичних порфіринів з асиметричною будовою молекули найбільш потужне пригнічення росту *A. tumefaciens* спостерігали при додаванні



до поживного середовища сполуки VI (рис. 2). Так у присутності 10 мкМ цієї речовини ріст культури інгібувався на 31 %, а у присутності 20 мкМ та 40 мкМ — на 55 % та 65 %, відповідно. Для сполук V, VII та VIII концентрація у 40 мкМ також виявилася найефективнішою і пригнічувала ріст бактерій на 24 %, 27 % та 25 %, відповідно, а концентрація у 20 мкМ — на 3 %, 21 % та 6 %, відповідно. При додаванні до поживного середовища 10 мкМ сполук V та VIII затримка росту культури складала 21 % та 9 %, відповідно, а речовина VII у цій концентрації ніяк не впливала на ріст бактерій. Таким чином, для сполук VI та VII спостерігалася пряма залежність між активністю та концентрацією речовини у середовищі.

Вивчення фотодинамічної активності синтетичних порфіринів з асиметричною будовою молекули показало, що досліджені сполуки виявляють високий ступінь фотосенсибілізуючої активності щодо культури *A. tumefaciens* (рис. 2). Найактивнішими фотосенсибілізаторами виявилися вільна основа (V) та її комплекс з цинком (VI).

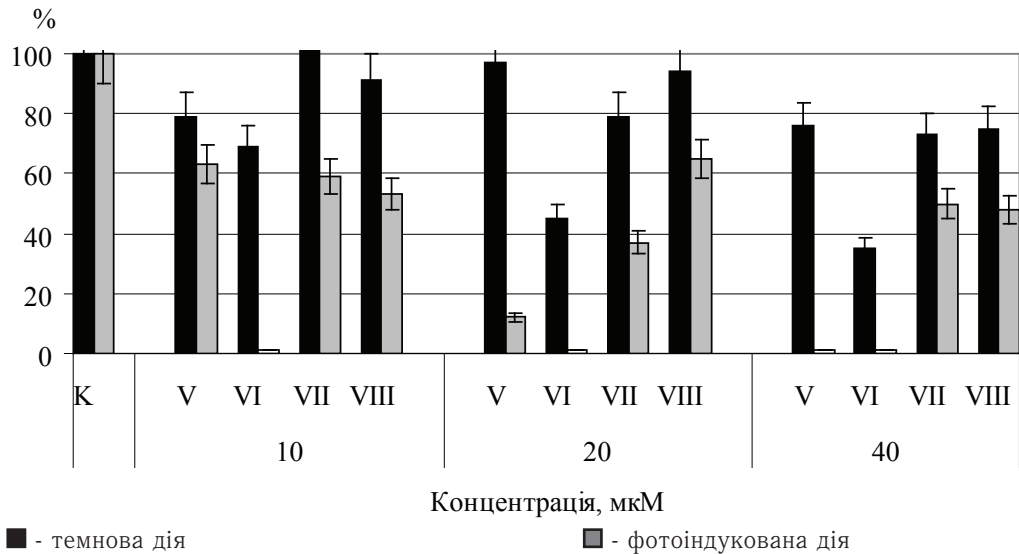


Рис. 2. Ріст культури *Agrobacterium tumefaciens* FA2 за темної та фотоіндукованої дії порфіринів з асиметричною будовою молекули

Fig. 2. The *Agrobacterium tumefaciens* FA2 culture growth under dark and photoinduced action of porphyrins with asymmetric molecular structure

При опроміненні у присутності цинкового комплексу (VI) ріст бактерій пригнічувався повністю в усіх використаних концентраціях. Висіви на щільні поживні середовища не зареєстрували присутності жодної живої клітини. За присутності вільної основи (V) у концентрації 40 мкМ також спостерігалася 100 % фотосенсибілізація клітин, а у концентраціях 10 мкМ та 20 мкМ вона становила 27 % та 88 %, відповідно.

Також фотодинамічні дослідження виявили, що при опроміненні у присутності 40 мкМ сполук VII та VIII життєздатність бактерій знижувалася наполовину. Але для вільної основи (VII) більш ефективною виявилася концентрація у 20 мкМ, яка призводила до фотодеструкції 63 % клітин, тоді як для металокомплексу вона

складала 35 %. Під дією 10 мкМ сполук VII та VIII спостерігався фотодинамічний ефект у межах 41 – 47 %.

Отже, вивчення фотосенсибілізуючих властивостей сполук даної групи показало, що більшу активність мають порфірини з коротшим вуглецевим ланцюгом в одному з мезо-положень, які повністю пригнічують ріст культури *A. tumefaciens*. Можливо, асиметричний замісник сприяє ефективному приєднанню молекул досліджуваних сполук до поверхні бактеріальних клітин, проте, вірогідно, що надто довгий боковий ланцюг віддаляє від неї порфіринове кільце [15]. Це може перешкоджати фотодеструкції клітин, оскільки активні радикали, що утворюються при збудженні молекули фотосенсибілізатора світлом, здатні реагувати тільки з найближчим оточенням. Таким чином, ці порфірини є дуже ефективними фотосенсибілізаторами.

Серед аніонних порфіринів активнішою виявилася вільна основа (IX), де максимальне зниження інтенсивності росту культури складало 24 % у присутності 20 мкМ речовини (рис. 3). Зменшення росту культури на 13 % спостерігалось при додаванні до поживного середовища до 10 мкМ цієї сполуки, а при концентрації 40 мкМ – на 10 %. Для цинкового комплексу (X) залежність пригнічувальної дії від дози речовини була зворотною. Найменша концентрація пригнічувала життєдіяльність 18 % клітин, а концентрація 20 мкМ – 14 %. Максимальна концентрація сполуки не впливала на ріст культури.

Максимальну фотосенсибілізацію 43 % спостерігали у присутності 40 мкМ металокомплексу (X). У нижчих концентраціях пригнічення росту було у межах 35 – 37 % (рис. 3).

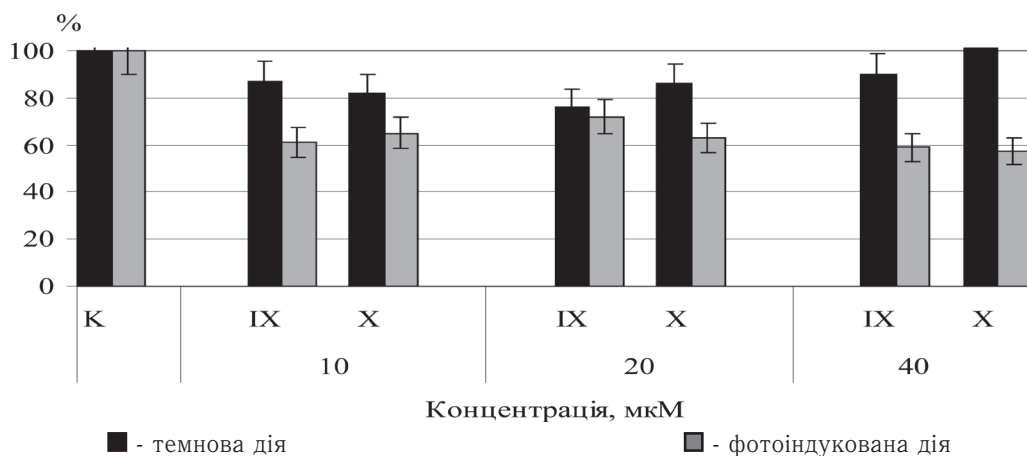


Рис. 3. Ріст культури *Agrobacterium tumefaciens* FA2 за темної та фотоіндукованої дії аніонних порфіринів

Fig. 3. The *Agrobacterium tumefaciens* FA2 culture growth under dark and photoinduced action of anionic porphyrins

При опроміненні у присутності вільної основи (IX) найбільш ефективними концентраціями виявилися 10 мкМ та 40 мкМ, за яких відбувалася сенсибілізація 40 % клітин (рис. 3).

Таким чином, досліджені аніонні порфірини виявляють більш високу активність при опроміненні світлом, тоді як у темних умовах спричиняють незначне змен-

шення розмноження бактерій. Дані літератури [10, 11] свідчать про неможливість фотосенсибілізації клітин мікроорганізмів за допомогою аніонних порфіринів. Отже, фотодинамічну активність аніонних порфіринів показано нами вперше.

Для визначення характеру антимікробної дії асиметрично заміщених порфіринів були відібрані сполуки, які проявили найбільшу активність щодо *Agrobacterium tumefaciens* FA2.

Спочатку було побудовано криву росту тест-мікроорганізму, за якою визначали початок логарифмічної фази. Початок експоненційного росту культури реєстрували після 120 хв культивування. Суспензії клітин даного мікроорганізму вносили у рідке середовище LB та підрозували протягом цього часу, після чого додавали розчини сполук V та VI, з кінцевим вмістом порфіринів у середовищі 40 мкМ.

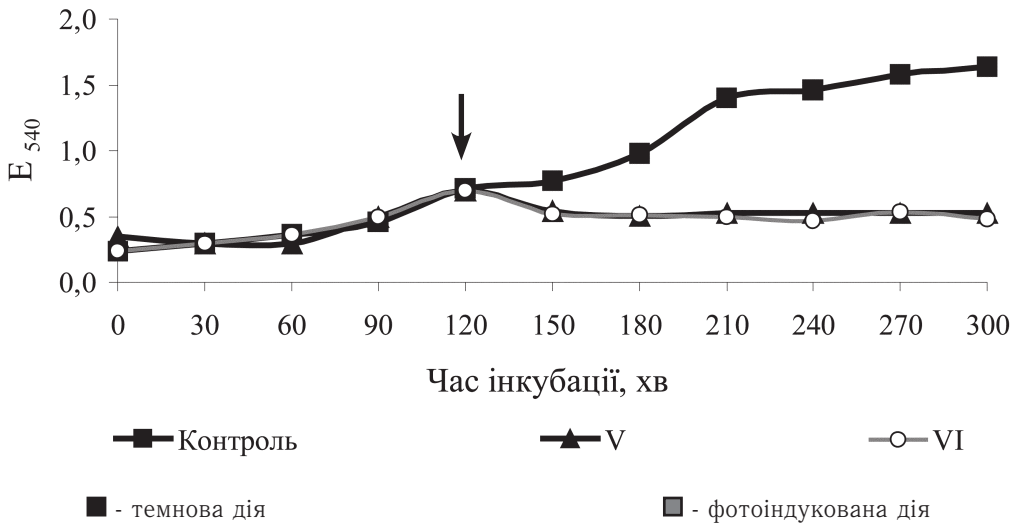


Рис. 4. Вплив синтетичних порфіринів на накопичення біомаси *Agrobacterium tumefaciens* FA2

Примітка: Стрілкою ▲ показано час додавання досліджуваних сполук.

Fig. 4. The synthetic porphyrin influence on *Agrobacterium tumefaciens* FA2 biomass accumulation

Note: The arrow ▲ shows the studied compound addition time

Після додавання сполук V та VI до культури *A. tumefaciens* у логарифмічній фазі росту, зростання оптичної густини відразу припинялося (рис. 4). Проте, зменшення оптичної густини культури протягом 3 годин не спостерігалось, тобто, лізису клітин не відбувалося. Однак, результати висіву на картопляний агар показали, що через 30 хв після додавання сполуки V кількість живих клітин у культурі зменшилася приблизно у 200 разів порівняно з попереднім значенням, сполуки VI – у 105 разів. Через годину після додавання порфіринів у дослідних варіантах живих клітин не було виявлено. У контролі кількість клітин продовжувала зростати.

Таким чином, можна припустити, що загибель клітин *A. tumefaciens* настає не внаслідок руйнування клітинних структур, а завдяки блокуванню порфіринами важливих процесів життєдіяльності.

Проведене дослідження свідчить про доцільність подальшого вивчення антимікробних властивостей синтетичних порфіринів. Перспективним напрямком є визначення їх активності стосовно широкого кола збудників захворювань рослин – не тільки бактеріальної, але й вірусної та грибової природи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Быховский В. Я. Тетрапирролы: разнообразие, биосинтез, биотехнология; Койфман О. И., Агеева Т. А. Структурные типы порфиринов; Миронов А. Ф. Фотодинамическая терапия рака // *Успехи химии порфиринов*. Т. 1. Под ред. проф. О. А. Голубчикова. – Санкт-Петербург: Изд-во НИИ Химии СПбГУ, 1997. – С. 6 – 74.
2. Зінченко О. Ю. Вплив порфіринів на ріст грам-позитивних і грам-негативних бактерій // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2003. – Т. 8, вип. 2. – С. 157 – 160.
3. Зінченко О. Ю., Русакова М. Ю., Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Жиліна З. І. Антимікробні властивості марганецьвмісних синтетичних порфіринів // *Biomedical and Biosocial Anthropology*. – 2004. – № 3. – С. 40 – 42.
4. Зінченко О. Ю., Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Жиліна З. І. Антимікробні властивості асиметрично мезо-заміщених порфіринів // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2005. – Т. 10, вип. 7. – С. 110 – 117.
5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.
6. Філіпова Т. О., Галкін Б. М., Зінченко О. Ю., Русакова М. Ю., Жиліна З. І., Водзінський С. В., Ішков Ю. В. Взаємодія мікроорганізмів з природними і синтетичними порфіринами // *Вісник ОНУ. Біологія*. – 2001. – Т. 6, вип. 2. – С. 317 – 322.
7. Філіпова Т. О., Зінченко О. Ю., Галкін Б. М., Жиліна З. І. Темнова та фотоіндукована дія синтетичних порфіринів на клітини *Pseudomonas aeruginosa* // *Одеський медичний журнал*. – 2004. – Т. 81, № 1. – С. 29 – 32.
8. *Coordination chemistry of macrocyclic compounds* // Ed. by G. A. Melson. – New York - London: Plenum Press, 1998. – 573 p.
9. Helander I. M., Alakomi H. L., Latva-Kala K., Koski P. Poly-ethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria // *Micryobiology*. – 1997. – V. 143. – P. 3193 – 3199.
10. Lavi A., Weitman H., Holmes R. The depth of porphyrin in a membrane and membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency // *Biophys. J.* – 2002. – V. 82, № 4. – P. 2101 – 2110.
11. Malik Z., Hanania J., Nitzan Y. Bactericidal effects of photoactivated porphyrins – an alternative approach to antimicrobial drugs // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – № 5. – P. 281 – 293.
12. Merchat M., Spikes J. D., Bertoloni G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 1996. – V. 32, № 2. – P. 149 – 157.
13. Philippova T. O., Galkin B. N., Zinchenko O. Yu., Rusakova M. Yu., Ivanitsa V. A., Zhilina Z. I., Vodzinskij S. V., Ishkov Yu. V. The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2003. – V. 7, № 11 – 12. – P. 737 – 742.
14. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning*. 2nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1659 p.
15. Soukos N. S., Hamblin M. R., Hasan T. The effect of charge on cellular uptake and phototoxicity of polylysine chlorin e6 conjugates // *J. Photochem. Photobiol.* – 1997. – V. 65, № 6. – P. 723 – 729.



Н.С. Водзинская, О.Ю. Зинченко, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин,
С.В. Водзинский, Ю.В. Ишков

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 765 33 61,
email: nsvod@ukr.net

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* FA2 К ДЕЙСТВИЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ

Реферат

Исследовано темновое и фотоиндуцированное действие новых синтетических порфиринов с разными зарядами молекул на возбудителя бактериального рака растений — *Agrobacterium tumefaciens*. Показано, что наиболее эффективными, как в темновых условиях, так и при фотоактивации являются катионные порфирины. Наиболее активными из этой группы соединений были асимметрично замещенные порфирины, имеющие в одном из *мезо*-положений *n*-нонил, которые практически полностью подавляли рост *A. tumefaciens* при фотосенсибилизации. Установлено, что эти порфирины в темновых условиях обладают бактерицидным действием, которое, по-видимому, обусловлено блокированием важных процессов жизнедеятельности.

К л ю ч е в ы е с л о в а : бактериальный рак растений, порфирины, антибактериальная активность, фотосенсибилизация.

N.S. Vodzinska, O.Yu. Zinchenko, T.O. Philipova, B.M. Galkin,
S.V. Vodzinskiy, Yu.V. Ishkov

Odesa National Mechnikov University, Dvoryanska str., 2,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (048) 765 33 61,
e-mail: nsvod@ukr.net

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS FA2 SENSITIVITY TO THE SYNTHETIC PORPHYRINS ACTION

Summary

Dark and photoinduced action of new synthetic porphyrins with different molecular charges has been studied towards plant bacterial cancer agent *Agrobacterium tumefaciens*. It has been shown that cation porphyrins are most effective upon both dark condition and photoactivation. The most active compounds in this group are asymmetric substituted porphyrins, with *n*-nonyl in one of *meso*-positions. They caused almost total photoactivated inhibition of *A. tumefaciens* growth. Under dark conditions these porphyrins also have bactericidal effect. The death of *A. tumefaciens* cells probably occurs as the result of important metabolic function inhibition.

Key words: bacterial plant cancer, porphyrins, antibacterial activity, photosensitization.



В.О. Іваниця, А.Є. Бухтіяров

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua

СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІОПЛАНКТОНУ ОДЕСЬКОГО ПРИБЕРЕЖЖЯ ДО СВИНЦЮ, КАДМІЮ ТА РТУТІ

*Встановлено, що вміст Pb і Cd у воді Одеського прибережжя перевищує мінімальну мутагенну концентрацію. З використанням тест-штаму *Salmonella typhimurium* TA 98 показано, що проби морської води мають мутагенну активність, яка корелює із присутністю у дослідженій акваторії Pb, Cd. Виявлено наявність в морських біоценозах мікроорганізмів, стійких до концентрацій металів, що у багато разів перевищують їхній вміст у морській воді. Визначено рівень стійкості представників бактеріопланктону Одеського прибережжя до вивчених важких металів. Встановлено, що в усі сезони найбільш стійкими до Pb, Cd, Hg є бактерії з районів з більшим рівнем антропогенного забруднення.*

К л ю ч о в і с л о в а: Одеське прибережжя, Pb, Cd, Hg, резистентність, бактеріопланктон.

Хімічне забруднення водойм, у тому числі сполуками, що мають мутагенну і генотоксичну дію, спричиняє збільшення частоти й накопичення індукованих мутацій, що призводить до техногенної мікроеволюції, зміни чисельності мікроорганізмів, структури мікробних ценозів та еколого-фізіологічних властивостей мікроорганізмів [1, 4].

Екологічні й епідеміологічні наслідки таких змін ще не визначені, але можна припустити, що генетичні перебудови сприяють адаптації мікроорганізмів до хімічних токсикантів.

У зв'язку з цим очевидна актуальність вивчення резистентності до важких металів у морських бактерій, ізольованих з районів з різним рівнем антропогенного навантаження з метою оцінки екологічної ситуації й оцінки можливих генетичних змін.

Метою даної роботи було вивчення гетеротрофного бактеріопланктону Одеського прибережжя і резистентності його до свинцю, кадмію, ртуті.

Матеріали і методи

Проби морської води відбирали на трьох станціях у районі Нафтової гавані Одеського порту, пляжів Дельфін і Дача Ковалевського, що відрізнялися екологічними умовами, з поверхневого шару води (0 – 50 см). Чисельність гетеротрофних бактерій визначали методом прямого посіву на модифіковане щільне живильне середовище [2] з діапазоном концентрацій солей важких металів (0,1; 0,5; 1; 1,5 ммоль/л Pb (NO₃)₂, 0,05; 0,1; 0,5; 1 ммоль/л CdCl₂, 0,005; 0,01; 0,05; 0,1 ммоль/л HgCl₂) [3, 4].



Вміст Pb, Cd у пробах визначали методом атомної спектрофотометрії в полум'ї ацетиленово-повітряної газової суміші, а Hg — методом холодних парів [5]. Культивування бактерій проводили при температурі 22 °С. Облік кількості колоній, що виросли, здійснювали через 2 доби.

Ступінь резистентності бактерій до важких металів визначали методом стандартних серійних розведень у щільному живильному середовищі [6].

Для оцінки мутагенної активності проб морської води застосовували тест Еймса [7] з використанням тест-штаму бактерій *Salmonella typhimurium* TA 98.

Статистичну обробку отриманих даних виконали, базуючись на загальноприйнятих методах [8], використовуючи пакети програм “STATGRAPHICS PLUS 3.0”, “Microsoft Excel 97” [9].

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що окремо взяті токсичні метали — свинець, кадмій і ртуть — виявили мутагенну дію на тест-штам бактерій *S. typhimurium* TA 98. Найбільший мутагенний ефект встановлено для кадмію й свинцю в концентраціях, відповідно, 0,4 і 0,5 ммоль/л і більше (табл. 1)

Таблиця 1

Мінімальні концентрації свинцю, кадмію й ртуті, що спричиняють мутагенну дію на бактерії штаму *Salmonella typhimurium* TA 98

Table 1

Minimal concentrations of lead, cadmium and mercury cause mutagenic effect on bacteria of *Salmonella typhimurium* TA 98 strain

Метал	ГДК у воді (мг/л)	ГДК у воді (нмоль/л)	ММК (нмоль/л)
Pb	150,0	0,5	312,5
Cd	8,9	0,4	19,8
Hg	2,5	2,5	1,0

П р и м і т к а:

ГДК — гранично допустима концентрація;

ММК — мінімальна мутагенна концентрація.

Як свідчать результати, представлені у таблиці 2, у пробах морської води містяться важкі метали (свинець і кадмій) у концентраціях, які можуть індукувати мутації у тест-бактерій з досить високою частотою. Виявлений в пробах морської води вміст кадмію перевищував ММК в 4,0 — 6,2 рази, а свинцю в 14,2 — 32,3 рази. Проведений аналіз не виявив у воді досліджуваних станцій наявність ртуті у кількості, яка може спричинити мутагенну дію.

Проби води, відібрані на станції Нафтова гавань, виявили токсичну дію, про що свідчить зниження числа життєздатних клітин *S. typhimurium* TA 98 на 16,8 — 30,4 % відносно контролю.



Таблиця 2
Вміст важких металів ($X_{cp} \pm s_x$ нмоль/л) у воді досліджуваних станційTable 2
Heavy metals content in the water of the investigated stations

Метал	Сезон	Нафтова гавань	Дача Ковалевського	Пляж Дельфін
Pb	літо	14,5 ± 0,15	13,5 ± 0,09	12,6 ± 0,12
	осінь	13,5 ± 0,09	15,0 ± 0,15	14,0 ± 0,12
	зима	8,7 ± 0,12	7,7 ± 0,09	6,8 ± 0,09
	весна	15,5 ± 0,09	13,5 ± 0,09	13,0 ± 0,3
Cd	літо	2,6 ± 0,06	2,8 ± 0,03	2,2 ± 0,09
	осінь	2,8 ± 0,09	2,5 ± 0,12	2,1 ± 0,09
	зима	2,1 ± 0,09	2,0 ± 0,14	1,8 ± 0,03
	весна	2,2 ± 0,06	2,4 ± 0,03	2,0 ± 0,09

Проведені дослідження показали, що проби морської води здійснювали мутагенну дію на тест-бактерії, викликаючи мутації, які реєструвалися за типом зміщення рамки зчитування, середні значення яких коливалися і перевищували рівень спонтанних мутацій у 1,2 – 7,2 рази (табл. 3).

Таблиця 3

Мутагенна дія забруднення морської води на *Salmonella typhimurium* TA 98

Table 3

Mutagenic influence of sea water contamination pollution upon *Salmonella typhimurium* TA 98

Сезон	Нафтова гавань		Дача Ковалевського		Пляж Дельфін		Контроль	
	КМ ¹	МА ²	КМ	МА	КМ	МА	КМ	МА
Літо	1,9 · 10 ⁻⁴	6,8	1,3 · 10 ⁻⁴	4,6	3,6 · 10 ⁻⁵	1,3	2,8 · 10 ⁻⁵	1,0
Осінь	2,0 · 10 ⁻⁴	7,2	1,4 · 10 ⁻⁴	4,7	3,7 · 10 ⁻⁵	1,4	2,7 · 10 ⁻⁵	1,0
Зима	1,8 · 10 ⁻⁴	6,1	1,3 · 10 ⁻⁴	4,6	3,9 · 10 ⁻⁵	1,3	3,0 · 10 ⁻⁵	1,0
Весна	2,0 · 10 ⁻⁴	6,9	1,3 · 10 ⁻⁴	4,6	3,4 · 10 ⁻⁵	1,2	2,9 · 10 ⁻⁵	1,0

П р и м і т к а:

1. Концентрація мутацій (%);
2. Мутагенна активність (%).

Хімічне забруднення в Нафтовій гавані індукувало утворення мутацій у тестштама *Salmonella typhimurium*, рівень яких перевищував фоновий у 6,1 – 7,2 рази.

Для вивчених акваторій встановлена наявність тісних кореляційних зв'язків між мутагенною активністю і присутністю у воді Нафтової гавані й Дачі Ковалевського кадмію ($r = 0,99$; $0,96$, відповідно) і свинцю ($r = 0,85$; $0,89$, відповідно).

Вміст бактеріопланктону на всіх станціях був найбільшим у літній період і зменшувався в ряду літо, осінь, весна, зима. Протягом усіх сезонів найменший



Таблиця 4

Доля бактерій (%), резистентних до різних концентрацій свинцю, кадмію й ртуті (ммоль/л)

Table 4.

Bacteria quata (%) resistant to different concentrations of lead, cadmium, mercury (mmol/l)

Концентрація металу, ммоль/л	Нафтова гавань			Дача Ковалевського			Пляж Дельфін			
	літо	осінь	зима	літо	осінь	зима	літо	осінь	зима	весна
0,000	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,100 Pb	96,0	92,9	91,8	85,4	86,6	76,5	51,7	50,5	37,5	42,1
0,500 Pb	42,7	38,9	38,8	34,4	35,1	23,5	15,5	13,6	0	12,6
1,000 Pb	22,2	16,0	16,3	2,7	3,7	0	0	0	0	0
1,500 Pb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,050 Cd	96,4	96,3	85,7	85,4	83,6	82,4	45,4	40,8	40,3	38,8
0,100 Cd	51,3	50,3	44,9	49,1	45,5	35,3	25,5	22,3	25,0	22,1
0,500 Cd	10,6	9,0	8,2	12,7	8,2	11,8	0,7	0,6	0	0,4
1,000 Cd	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,005 Hg	99,5	98,5	91,8	69,1	67,2	70,6	62,0	56,3	58,3	49,5
0,010 Hg	91,4	89,8	79,6	10,8	7,5	5,9	0,4	1,0	0	2,1
0,050 Hg	65,1	63,0	49,0	2,4	2,2	0	0	0	0	0
0,100 Hg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

вміст бактерій установлений на станції пляж Дельфін (від 120 до 2710 КУО/мл), а найбільший — на станції Нафтова гавань (від 490 до 9540 КУО/мл), що, очевидно, пов'язано з наявністю у воді порту високих концентрацій органічних сполук. На станції Дача Ковалевського кількість гетеротрофних бактерій коливалася від 170 до 3690 КУО/мл.

Показано, що в усі сезони року в досліджуваних біоценозах існують мікроорганізми, стійкі до концентрацій токсичних металів, які в багато разів перевищують значення рівнів токсикантів, що містяться у морській воді. Це може бути пов'язане з наявністю природних генетично детермінованих механізмів резистентності бактерій до важких металів.

Значення мінімальних інгібувальних концентрацій (МІК) усіх досліджених токсикантів зменшуються в ряду станцій Нафтова гавань, Дача Ковалевського, пляж Дельфін. МІК свинцю влітку, восени й навесні для представників гетеротрофного бактеріального населення станції Дельфін й взимку Дачі Ковалевського складала 1,0 ммоль/л, взимку для станції Дельфін — 0,5 ммоль/л. В інші сезони МІК свинцю для бактеріопланктону всіх досліджених станцій дорівнювалася 1,5 ммоль/л (табл. 4).

МІК кадмію для гетеротрофних бактерій досліджених станцій влітку, восени й навесні складала 1 ммоль/л, взимку для бактерій станції пляж Дельфін — 0,5 ммоль/л.

Значення МІК ртуті для бактеріопланктону Дачі Ковалевського взимку, Дельфіна влітку, восени й навесні складало 0,05 ммоль/л, взимку для станції Дельфін — 0,01 ммоль/л. В інші сезони МІК ртуті рівнялася 0,1 ммоль/л.

Співвідношення кількості резистентних і чутливих ($N_r : N_s$) бактерій до свинцю, кадмію й ртуті знижується в ряду: Нафтова гавань, Дача Ковалевського й пляж Дельфін. Найбільше значення співвідношення (189,8) відзначено для Нафтової гавані влітку на середовищі із ртуттю в концентрації 0,005 ммоль/л.

Таким чином, рівень резистентності представників гетеротрофного бактеріопланктону вивчених районів до Pb, Cd і Hg за всіма показниками (значенням мінімальної інгібувальної концентрації, частки стійких бактерій і співвідношенню $N_r : N_s$) в усі сезони зменшується в ряду станцій Нафтова гавань, Дача Ковалевського, пляж Дельфін, що цілком узгоджується з рівнем антропогенного забруднення води в цих районах.

Отримані результати дають підставу рекомендувати використання стійкості бактеріопланктону до свинцю, кадмію, ртуті як інтегрального показника відгуку мікробіоти морських біоценозів на антропогенне забруднення морського середовища в комплексному екологічному моніторингу морських екосистем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Израэль Ю. А., Цыбань А. В. Антропогенная экология океана. — Л.: Гидрометеиздат, 1989. — 527 с.
2. Горбенко Ю. А. О наиболее благоприятном количестве “сухого питательного агара” в средах для культивирования морских гетеротрофных микроорганизмов // Микробиология. — 1961. — Т. 30, Вып. 1. — С. 168—172.
3. Авакян З. А. Сравнительная токсичность тяжелых металлов для некоторых микроорганизмов // Микробиология. — 1967. — Т. 36, № 3. — С. 445—450.
4. Іваниця В. О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: автореф. дис.... докт. біол. наук. — Одеса, 1996. — 48 с.



5. Карякин А. В., Грибовская И. Ф. Методы оптической спектроскопии и люминесценции в анализе природных и сточных вод. — М.: Химия, 1987. — 304 с.
6. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда и др. — М.: Мир, 1983. — Т.1. — 576 с.
7. Ames B. N. et al. 1973. An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and cancerogens. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, № 3: 782-786.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
9. Лапач С. И., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы медико-биологических исследований с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 408 с.

В. А. Иваница, А. Е. Бухтияров

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: v_ivanit@te.net.ua

УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ОДЕСКОГО ПРИБРЕЖЬЯ К СВИНЦУ, КАДМІЮ И РТУТИ

Реферат

Установлено, что содержание Pb и Cd в воде Одесского побережья превышает минимальную мутагенную концентрацию. С использованием тест-штамма *Salmonella typhimurium* TA 98 показано, что мутагенная активность проб морской воды коррелирует с присутствием в исследованной акватории Pb, Cd. Выявлено наличие в морских биоценозах микроорганизмов, устойчивых к концентрациям металлов, которые во много раз превышают их содержание в морской воде. Определен уровень резистентности представителей бактериопланктона Одесского побережья к изученным тяжелым металлам. Показано, что во все сезоны наиболее устойчивые к Pb, Cd, Hg были бактерии из районов с большим уровнем антропогенного загрязнения.

К л ю ч е в ы е с л о в а: Одесское побережье, Pb, Cd, Hg, резистентность, бактериопланктон.

V. O. Ivanytsya, A. E. Bukhtiyarov

Odesa National I. I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65026,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: v_ivanit@te.net.ua

BACTERIOPLANCTON RESISTANCE OF THE ODESA COAST TO LEAD, CADMIUM, MERCURY

Summary

It was found that Pb and Cd levels in the Odesa coastal water exceeded their mutagenic concentrations. With use of test- strain of *Salmonella typhimurium* TA 98 it was shown that mutagenic activity of the water samples correlated with presence of Pb and Cd in the investigated area. Microorganisms resistant to toxic metal concentrations which many times exceeded the toxicants levels in the sea water were revealed in the marine biocenoses. The resistance level of heterotrophic bacterioplankton representatives of the Odesa coastal water to the investigated heavy metals was estimated. It was established that bacteria from the areas with higher levels of anthropogenic pollution were the most resistant to Pb, Cd and Hg in all year seasons.

К е у w o r d s: the Odesa coast, Pb, Cd, Hg, resistance, bacterioplankton.



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

Дніпропетровський національний університет,
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: 8 (0562) 46 92 52, e-mail: voronkova_olga@inbox. ru

ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ІМУНІТЕТУ БІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ МИШЕЙ В НОРМІ ТА ПРИ РІЗНИХ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ

Проведено вивчення показників імунітету лабораторних мишей за фізіологічного та різних патологічних станів. Порівняльний аналіз показників імунітету здорових вагітних та невагітних самиць мишей показав, що при фізіологічній вагітності спостерігається достовірне зниження кількості лейкоцитів та лімфоцитів. При вивченні показників імунітету за умов патологічних станів (екзогенне мікробне навантаження, екстрагенітальна патологія, антибіотичне навантаження) визначено, що при більшості досліджуваних станів спостерігаються зміни переважно таких показників як: загальна кількість лейкоцитів, кількість циркулюючих імунних комплексів та показник НСТ-тесту. Аналіз показників при патологічних станах порівняно із нормою визначив, що найбільш значне пригнічення імунітету відбувається в групі тварин з екстрагенітальною патологією.

К л ю ч о в і с л о в а: імунітет, мікробне навантаження, вагітність, екстрагенітальна патологія, антибіотики, миші.

Імунна система є однією з найбільш складнорегульованих систем організму. Сукупність взаємозв'язків імунітету досить складна і до того ж не до кінця вивчена. Здебільшого розповсюджені дані про стан показників імунного статусу, що характерні для фізіологічної норми, водночас вони мають певні варіації, зумовлені багатьма факторами, наприклад, станом навколишнього середовища, віком досліджуваної групи та місцевістю її проживання тощо [10]. Загальновідомою є інформація про головні тенденції змінення показників імунітету при різних захворюваннях: при інфекційному ураженні, онкопатології тощо. Слід констатувати, що ці дані здебільшого відображають картину імунітету при розвинутому захворюванні, тобто на тому етапі, коли пацієнт потрапляє до лікаря. Водночас відомостей про формування саме такої, а не іншої картини немає, бо ведення пацієнта починається з моменту початку клінічної маніфестації хвороби, що не включає спостереження в інкубаційний період.

З огляду на це, метою наших досліджень було визначення змін у показниках імунітету при дослідженні фізіологічних (здорові невагітні та вагітні тварини) та відтворенні деяких патологічних станів на початкових етапах після дії ряду факторів із проведенням порівняльного аналізу змін вивчених показників по відношенню до норми.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень була вибірка самиць білих лабораторних мишей. Всі дослідження на тваринах проводилися згідно до норм, встановлених законом України

© О. С. Воронкова, Т. М. Полішко, О. А. Сірокваша, А.І. Вінніков, 2008



№ 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” та норм, прийнятих в Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985 [8].

Тварин було поділено на групи: група 1 – здорові миші (n=10); група 2 – тварини, яким вводили суспензію добової культури клітин золотистого стафілококу (n=24); група 3 – тварини, яким вводили суспензію добової культури клітин кишкової палички, (n=24); група 4 – тварини, яким вводили розчин антибіотика доксіцикліна у максимальній дозі, (n=24); група 5 – тварини з фізіологічним перебігом вагітності (n=8); група 6 – тварини зі спонтанною екстрагенітальною патологією, (n=7).

Для дослідження стану показників імунного статусу при вагітності було відібрано 8 самиць мишей із фізіологічним перебігом вагітності. Відстеження показників проводили на 2-му тижні вагітності тварин.

Для створення екзогенного навантаження мікроорганізмами інтравагінально вводили 50 мкл суспензії добової культури золотистого стафілококу або кишкової палички із вмістом клітин 1×10^9 клітин/мл.

Для створення антибіотичного навантаження доксіциклін вводили тваринам у максимальній добовій дозі, яка для першого дня введення становить 0,08 мг; для 2 – 5-го днів введення становить 0,054 мг, пропорційно до ваги тварин.

Тварин з екстрагенітальною патологією відбирали із загальної маси утримуваних тварин за умов наявності у них абсцесів на кінцівках та черевці, з матеріалу яких робили висів на агар із додаванням крові (3 %). Вірогідно абсцеси могли бути наслідками укусів іншими тваринами.

Кров від тварин отримували шляхом декапітації. Загальну кількість лейкоцитів підраховували у камері Горяєва-Тома (використовували ацетатну кров); загальну кількість лімфоцитів [3, 5] та відсоток клітин із морфологічними ознаками апоптозу [7] підраховували на мазках. Загалом для кожної тварини готували 3 препарата крові (мазки): два з яких використовували для підрахування клітин крові (їх фіксували фіксатором Май-Грюнвальда та фарбували барвником Романовського-Гімзи) та вивчення їх морфології (всі клітини в полі зору розглядали на наявність ознак апоптозу), а третій – для вивчення активності нейтрофілів (НСТ-тест). Кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) визначали за методом Діжон із застосуванням поліетиленгліколя [3]. В якості антикоагулянту використовували розчин цитрату натрію (масова частка 3,8 %).

Статистичну обробку результатів проводили за методикою, запропонованою Лакінім [6], використовуючи критерій Стьюдента при рівні значущості 0,05.

Результати та їх обговорення

У таблиці 1 представлено дані по змінам показників імунітету в динаміці дії досліджуваних факторів. Показники знімали на 2-й та 10-й день відповідно: для груп 2 – після введення суспензії клітин золотистого стафілококу, 3 – після введення суспензії кишкової палички та 4 – після припинення курсу введення доксіцикліну. Дані, отримані для тварин експериментальних груп, представлені у порівнянні із даними для тварин контрольної групи 1.

З отриманих даних очевидним є, що екзогенне мікробне (2-й день після введення мікроорганізмів – групи 2 і 3) чи антибіотичне (2-й день після припинення введення антибіотика – група 4) інтравагінальне навантаження не викликає помітних пору-



шень у досліджуваних ланках імунітету. Так, кількість лейкоцитів та лімфоцитів у експериментальних групах тварин (яким створювали навантаження бактеріями та антибіотиком) близька до показнику норми, тобто, вірогідно, на даному етапі відбуваються латентні процеси або такі, що не пов'язані зі згаданими показниками. Близька також до норми і кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу, кількість ЦІК та відсоток активних нейтрофілів.

Таблиця 1

Показники імунної системи в динаміці впливу досліджуваних факторів

Table 1

Immune system markers in the dynamics of investigated factors influence

Показник		Лейкоцити, x10 ⁶ клітин/мл	Лімфоцити, %	Кількість апопто- тичних клітин, %	Показник НСТ-тесту, %	ЦІК, од. опт. густ.
Група мишей	Група 1, (контроль), n=10	9,53±0,95	36,8±1,61	19,3±2,43	18,1±2,59	0,72±0,12
День 2-й	Група 2, n=8	8,63±1,82	33,7±2,35	19,8±2,17	18,1±2,59	0,72±0,03
	Група 3, n=8	10,2±0,40	34,3±1,89	18,9±1,00	17,5±3,78	0,73±0,04
	Група 4, n=8	7,16±1,02*	33,4±0,74	18,5±1,45	16,9±2,59	0,73±0,05
День 10-й	Група 2, n=16	16,6±0,50*	67,1±8,22*	19,6±2,78	12,5±2,67*	1,72±0,06*
	Група 3, n=16	13,1±0,80*	35,6±4,72	20,1±1,80	18,1±3,72	1,46±0,04*
	Група 4, n=16	6,73±1,11*	34,1±1,37	20,4±1,24	13,1±3,72*	1,28±0,18*

* – встановлено статистичну різницю по відношенню до даних групи 1.

На відміну від 2-го дня на 10-й день кількість лейкоцитів зростає порівняно із нормою по групах тварин, яким вводили суспензії клітин стафілокока та кишкової палички (у 1,74 рази та у 1,37 рази, відповідно), а в групі тварин, яким інтравагінально вводили доксіциклін навпаки, зменшується у 1,42 рази порівняно із контролем.

Вибір трьох останніх показників, наведених у таблиці, зумовлений тим, що існують дані про їх взаємозв'язок. Так, відомо, що рештки клітин, які загинули шляхом апоптозу (а такий шлях загибелі типовий для імунних клітин крові [4]), мають бути утилізовані шляхом фагоцитозу, і здійснення цього може відбуватися лише за умов наявності у сироватці фактора β_2 -глікопротеїна-1 та антифосфоліпідних антитіл [12, 13]. Недостатня активність фагоцитозу може призвести до накопичення ЦІК, що в свою чергу може призвести до розвитку захворювань імунних комплексів [3]. Зниження активності макрофагів може бути зумовлене наявністю всередині них паразита. Так, відомо, що за умов наявності стафілококу відбувається не лише інгібування ферментних систем макрофагів, але й можлива ініціація апоптозу (опосередкована дією пептидоглікану та тейхоевих кислот грампозитивних бактерій) [2, 9, 11].



З отриманих на 10-й день даних очевидним є певне пригнічення активності фагоцитуючих клітин у групі тварин, яким вводили стафілокок. Водночас відбувається значне зростання рівня ЦІК у групах 2 та 3 більше, ніж у 2 рази. Підвищений рівень ЦІК в умовах інфекційного процесу до певної межі є нормальним явищем, що свідчить про активацію імунної системи. Але перевищення більше, ніж у 2 рази може також вказувати на недостатність системи комплементу та активності нейтрофілів, а також про можливість розвитку аутоімунної патології [10].

При інтравагінальному введенні доксіцикліна відбувається зниження відсотку активних нейтрофілів в 1,38 рази, що, однак, не виходить за межі статистичної помилки. Водночас рівень клітин з ознаками апоптозу лишається близьким до значень у контрольній групі, а тому саме зниження активності нейтрофілів, вірогідно, може опосередковувати збільшення кількості ЦІК (до $1,28 \pm 0,18$ од. опт. густини, при показникові норми $0,72 \pm 0,12$ од. опт. густини).

У таблиці 2 представлено дані для груп тварин із фізіологічним перебігом вагітності (група 5) та з екстрагенітальною патологією (група 6) у порівнянні із даними для контрольних тварин (група 1). Дані для тварин цих груп отримані на окремих вибірках та не досліджувалися в динаміці.

За результатами висіву матеріалу з абсцесів тварин групи 6 (екстрагенітальна патологія) визначено наявність мікроорганізмів, що належать до стафілококів та псевдомонад.

Таблиця 2

Показники імунної системи тварин із фізіологічним перебігом вагітності та екстрагенітальною патологією у порівнянні із здоровими тваринами

Table 2

Animals immune system markers with physiological pregnancy and extragenital pathology in comparison with healthy animals

Група мишей	Показник	Лейкоцити, $\times 10^6$ клітин/мл	Лімфоцити, %	Апоптичні клітини, %	Показник НСТ-тесту, %	ЦІК, од. опт. густ.
Група 1, n=10		9,53 \pm 0,95	36,8 \pm 1,61	19,3 \pm 2,43	18,1 \pm 2,59	0,72 \pm 0,12
Група 5, n=8		7,27 \pm 0,95*	25,8 \pm 2,18*	21,3 \pm 1,51	21,7 \pm 1,25	0,63 \pm 0,11
Група 6, n=7		6,73 \pm 0,50*	28,7 \pm 1,69*	16,6 \pm 1,80	8,14 \pm 1,35*	1,71 \pm 0,08*

* – встановлено статистичну різницю по відношенню до даних групи 1.

Досліджувані показники в групах тварин 5 (фізіологічна вагітність) та 6 (екстрагенітальна патологія) значно відрізняються від стану норми. Здебільшого це може бути зумовлено станом тварин та строками спостережень. Так, аналіз відповідних показників встановив, що кількість лейкоцитів та лімфоцитів в обох групах (5 та 6) є дещо нижчою за норму (у 1,31 рази та у 1,42 рази, відповідно). Нижчою за норму є також відносна кількість лімфоцитів, яка в нормі в середньому становить $36,8 \pm 1,61$ %, а в групах 5 – $25,8 \pm 2,18$ % і 6 – $28,7 \pm 1,69$ %. Взагалі, в літературі існують дані про те, що коливання норми відносної кількості лімфоцитів можливі від 20 до 80 % [1]. Кількість клітин, в яких визначено морфологічні ознаки апоптозу в нормі становить $19,3 \pm 2,43$ %, що в 1,1 рази нижче, ніж у групі 5, та у 1,28 рази вище, ніж у групі 6, і що не виходить за межі припустимої статистичної похибки.



Показник активності нейтрофілів в групі 5 вищий за норму у 1,19 рази, а в групі 6 нижчий за норму у 2,22 рази, що може бути зумовлено постійною персистенцією стафілококу в організмі тварини (мікроорганізм було висіяно з матеріалу абсцесу), а продукти життєдіяльності останнього, як відомо [2], можуть виступати в якості інгібітора активності фагоцитарних клітин.

Кількість ЦІК в групі 5 також близька до значень норми (яка становить $0,63 \pm 0,11$ одиниць оптичної густини), а от в групі 6 кількість ЦІК перевищує норму більше, ніж в 2 рази, що є однією з ознак розвитку патологічного стану.

Підсумовуючи проведені дослідження, слід відзначити, що зміни, які відбуваються із показниками імунітету при вагітності, є значними порівняно із нормою лише для кількості лейко- та лімфоцитів. Найбільш значні зміни у показниках імунної системи відзначено при розвитку екстрагенітальної патології: відбувається зростання кількості ЦІК більше, ніж в 2 рази, при одночасному зниженні порівняно із нормою всіх інших показників. На ранніх строках після створення екзогенного мікробного навантаження стафілококом та кишковою паличкою і при введенні антибіотика не фіксується значних змін у вивчених показниках імунітету (відповідно групи 2, 3 та 4). На 10-й день досліджень зміни показників імунітету мають подібні тенденції, що проявляється у зростанні кількості ЦІК і зниженні показнику НСТ-тесту для груп 2 і 3. Однак, є і відмінності, що виражаються у значному зниженні кількості лейкоцитів у групі тварин, яким вводили антибіотик, і значному зростанні цього показника у групах тварин, яким вводили стафілокок та кишкову паличку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ахметов И. З. Лабораторные и дикие грызуны. Содержание, разведение и использование в опытах. — Ташкент: ФАН, 1981. — 124 с.
2. Гайдаш І. С., Флегонтова В. В., Суглобов Є. В., Салманова О. М., Потьомкін Є.І Апоптозіндукуюча активність пептидогліканів та тейхоевих кислот грампозитивних збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих // Вестник гигиены и эпидемиологии — 2001. — №1. — С. 70 — 72.
3. Иммунный статус, принципы его коррекции и оценки иммунных нарушений: Монография / В. Г. Передерий, А. М. Земсков, Н. Г. Бычкова, В. М. Земсков. — К: Здоров'я, 1995. — 211с.
4. Їльїнська І. Ф. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді // Лабораторна діагностика. — 2002. — № 3. — С. 66 — 72.
5. Кашы Г. Д., Коюда Л. И. Методы оценки защитных систем организма млекопитающих // Учебно-методическое пособие. — Луганск: Элтон-2, 2003. — 95 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М: Высшая школа, 1980. — 293 с.
7. Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз). — М: Медицина, 2001. — 192 с.
8. Резніков О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5-7.
9. Швембергер И. Н., Гинкул Л. Б. Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии // Вопросы онкологии. — 2002. — № 2. — с. 153 — 157.
10. Якобисяк В. Імунологія. Вінниця: Нова книга, 2005. — 748с.
11. Behnia M., Robertson K. A., Martin W. J. Role of Apoptosis in Host Defense and pathogenesis of disease // Chest. — 2000. — № 117. — P. 1771 — 1777.
12. Manfredi A. A., Rovere P., Galati G., oth. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by antiphospholipide antibodies // Arthritis Rheumatology. — 1998. — Feb. 41(2). — p. 205-214.
13. Manfredi A. A., Rovere P., Heltai S., oth. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of Я₂-glycoprotein-1 // Arthritis Rheumatology. — 1998. — Feb. 41(2). — p. 215-223.



О. С. Воронкова, Т. Н. Полишко, Е. А. Сирокваша, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
тел.: 8 (0562) 46 92 52, e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Реферат

Проведено изучение показателей иммунитета лабораторных мышей при физиологическом и различных патологических состояниях. Сравнительный анализ показателей иммунитета здоровых небеременных и беременных самок мышей показал, что при физиологической беременности происходит достоверное снижение количества лейкоцитов и лимфоцитов. При изучении показателей иммунитета при развитии патологических состояний (экзогенная микробная нагрузка, экстрагенитальная патология, антибиотическая нагрузка) определено, что в большинстве исследованных случаев изменяются такие показатели как: общее количество лейкоцитов, количество ЦИК и показатель НСТ-теста. Анализ показателей при патологических состояниях в сравнении с нормой показал, что наиболее значимое угнетение иммунитета происходит в группе животных с экстрагенитальной патологией.

Ключевые слова: иммунитет, микробная нагрузка, беременность, экстрагенитальная патология, антибиотики, мыши.

O. S. Voronkova, E. A. Sirokvasha, T. N. Polishko, A. I. Vinnikov

Dnipropetrovsk National University
Gagarina av., 72, Dnipropetrovsk, Ukraine, 49050; tel.: 8 (0562) 46 92 52,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF WHITE LABORATORY MICE IN HEALTH AND UNDER SOME PATHOLOGICAL CONDITIONS

Summary

Immunological parameters of laboratory mice in health and under different pathological statuses were investigated. The comparative analysis of immunological parameters of nonpregnant and pregnant mice showed, that statistical decreasing of leucocytes and lymphocytes amount was fixed under physiological pregnancy. The investigation of immunity parameters under pathological statuses (exogenous microbial load, extragenital pathology and antibiotic load) showed mostly the changing of next parameters: full amount of leucocytes, the amount of circulating immune complexes and data of NST-test. The comparative analysis of data received under pathological statuses showed that the most efficient depression caused by extragenital pathology.

Key words: immunity, microbial pressure, pregnancy, extragenital pathology, antibiotics, mice.



Г.В. Коев¹, Е.Д. Бурец¹, С.В. Швец¹, С.А. Бурцева²

¹Молдавский Институт пищевых технологий

²Институт микробиологии и биотехнологии Молдовы
ул. Сармиседжетуса, 20/2, Кишинев, МД 2032, Молдова,
тел.: 8 (0363) 22 55 10 20, e-mail: icsptia@mail.ru

ПРИМЕНЕНИЕ МЕСТНЫХ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ В ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СОЕВОГО БЕЛКА

*Для производства твердого комбинированного сыра с низкой температурой второго нагревания с использованием соевого белка предложена бактериальная закваска на основе местных мезофильных штаммов молочнокислых бактерий с добавлением ароматообразующего штамма *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* из коллекции Института пищевых технологий Молдовы. Полученный сыр не отличается по органолептическим, физико-химическим и микробиологическим показателям от стандартного сыра на основе коровьего молока.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: молочнокислые бактерии, закваска, сыр, соевый белок.

В последнее время в результате развития науки и техники возник качественно новый метод производства пищи, базирующийся на использовании нетрадиционного сырья для выработки продуктов массового и лечебно-профилактического питания. Общепризнанным в настоящее время путем, отражающим новую политику в области рационализации белкового питания населения и рассматриваемым во всем мире в качестве важнейшего элемента в отношении ликвидации дефицита белка в достаточно короткие сроки и устранения качественной неполноценности продуктов питания, является использование новых источников белка. Наиболее перспективны с этой точки зрения, наряду с молочными, белки, получаемые из соевых бобов [1]. Существует достаточно доказательств того, что потребление соевых белковых продуктов положительно отражается на здоровье людей. По данным литературы, соевое молоко — сложная многокомпонентная система, содержащая жизненно необходимые вещества для развития молочнокислых бактерий: белки — 4,0 %, жиры — 1,35 %, углеводы — 3,1 %, среди которых около 1,0 % составляют соевые олигосахариды (стахиоза и рафиноза), витамины группы В (В₁ и В₂), витамин РР [2]. В связи с этим предлагаются новые подходы и разрабатываются новые технологические процессы для производства комбинированных молочных продуктов питания. Создание комбинированных молочных продуктов, в которых часть молока заменена соевым белком, в мировой практике решает одновременно две проблемы: расширение сырьевой базы производства за счет быстро возобновляемого растительного сырья и увеличение ассортимента принципиально новых продуктов. Эти проблемы также актуальны и для Республики Молдова. В Молдавском ИПТ

© Г. В. Коев, Е. Д. Бурец, С. В. Швец, С. А. Бурцева, 2008



ведутся научно-исследовательские работы по разработке технологии производства комбинированных сыров с низкой температурой второго нагревания.

Одним из важнейших элементов технологического процесса при выработке ферментированных молочных продуктов является использование бактериальных заквасок. Качество сыров в значительной степени зависит от свойств применяемых штаммов молочнокислых бактерий, входящих в состав бактериальных заквасок, которые должны: обеспечить выработку молочной кислоты, ароматических веществ и двуокси углерода, протеолиз белков, разложение жира; обладать способностью к выработке бактериоцинов, торможению развития болезнетворной и технически вредной микрофлоры; сохранять повышенную устойчивость к антибиотикам и бактериофагам [3].

Целью наших исследований было создание бактериальной закваски, которая в производстве комбинированного сыра с низкой температурой второго нагревания обеспечила бы необходимый ферментативный процесс и подавила бы в конечном продукте специфический соевый привкус и запах, с сохранением качественных показателей молочного продукта.

Основными задачами проводимых нами исследований были:

- модифицировать созданную ранее нами бактериальную закваску включением в нее дополнительно ароматообразующего штамма;
- использовать новую закваску при производстве комбинированного сыра;
- показать соответствие качества выработанного сыра существующим техническим требованиям.

Материалы и методы

В работе использованы селекционные штаммы *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* из Отраслевой Коллекции местных штаммов молочнокислых организмов Молдавского ИПТ, которые были изолированы из спонтанной микрофлоры местной самоквасной молочной продукции.

Селекция штаммов молочнокислых бактерий, составление комбинаций штаммов для бактериальных заквасок были проведены общепринятым методом, используемым во многих специализированных институтах, в т. ч. России [4], а также на основе инструкций, разработанных в лаборатории по переработке молока и мяса ИПТ.

Разработка технологии производства и выработка лиофилизированной бактериальной закваски проведена согласно требованиям нормативной документации Республики Молдова [5].

Массовая доля влаги сухой закваски определялась по ГОСТу 3626-79.

Восстановление сухой закваски, согласно методам ТУ 07-00411795-079:2005 «Бактериальные закваски»; кислотность восстановленной закваски определялась титриметрическим методом по ГОСТу 3624-92. Определение наличия в закваске диацетила проводилось по креатиновой пробе [4].

Результаты и их обсуждение

В начале исследований для выработки комбинированного сыра была использована созданная в ИПТ закваска, предназначенная для сыров с низкой температурой второго нагревания, выработанных из коровьего молока. Закваска составлена по классическому типу на основе многштаммовой поливидовой комбинации, состо-



ящей из культур *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* [6]. Используемая нами закваска обеспечила технологический процесс выработки комбинированного сыра, но при дегустации готового продукта был отмечен сильный запах и привкус сои, особенно в варианте с 50 % содержанием соевого белка.

Известно, что важнейшими компонентами, определяющими характерный аромат молочнокислых продуктов являются диацетил и ацетоин — продукты жизнедеятельности молочнокислых бактерий [7, 8, 9]. В молочной промышленности для синтеза ароматических веществ наряду с другими используют и штаммы *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* [4, 8]. Поэтому для улучшения вкуса и запаха комбинированного сыра нами были разработаны варианты, которые включают в основную комбинацию, состоящую из штаммов *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*, дополнительный штамм *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* из коллекции ИПТ, характеризующийся слабым кислотообразованием, но отличающийся высокой способностью продуцировать ароматические вещества. Известно, что заквасочная микрофлора осуществляет преобразование основных компонентов молока во вкусовые, ароматические и биологически активные вещества сырной массы, участвует в формировании консистенции, структуры и рисунка сыра, а также подавляет рост опасных для качества сыра и здоровья потребителей микроорганизмов [10]. Наши исследования были направлены на поиски способов подавления специфического соевого запаха в конечном продукте — сыре, для чего и были разработаны новые варианты комбинации с добавлением местного штамма *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* из коллекции нашего института. Были составлены и изучены следующие варианты:

вариант I: основная комбинация + 10 % культуры *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*;

вариант II: основная комбинация + 20 % культуры *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis*.

На основе полученных нами комбинаций выработаны два вида лабораторных заквасок, которые были исследованы по комплексу качественных показателей для заквасок, используемых при производстве сыров с низкой температурой второго нагревания [5].

Установлены следующие характеристики закваски варианта I: сгусток — плотный однородный; титруемая кислотность - 91°Т; при щелочной реакции появление интенсивной розовой окраски через 9 минут, что доказывает активное образование ароматических соединений (диацетил + ацетоин); органолептика — чистый кисломолочный вкус с выраженным ароматом. Закваска варианта II характеризовалась образованием слабого сгустка, что не соответствует общепринятым нормам, т. е. наиболее оптимальной оказалась комбинация первого варианта. На основе этой комбинации была выработана опытная партия лиофилизированной закваски и изучены ее физико-химические и микробиологические свойства (табл. 1).

По данным таблицы видно, что органолептические, физико-химические и микробиологические показатели полученной закваски соответствуют нормативным требованиям, а показатель, указывающий время появления интенсивного розового окрашивания по щелочной пробе, подтверждает значительное содержание ароматических веществ в закваске.



Характеристика бактериальной закваски для комбинированных сыров

Table 1

Bacterial leaven characteristics for combined cheese

Показатели	Характеристика	Норма
Ллиофилизированная закваска		
Внешний вид и консистенция	Таблетка компактная	
Цвет	Белый с кремовым оттенком	
Вкус и запах	Кисломолочный, приятный со специфическим ароматом ферментированного молока	
Продолжительность восстановления	18 часов	Не более 20 часов
Активность	6 часов	Не более 8 часов
Кислотность, через 24 часа культивирования на молоке	89 °Т	Не более 105 °Т
Массовая доля влаги	3,8 %	Не более 5 %
Микроскопический препарат оживленной культуры	Диплококки, цепочки кокков, специфические для <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis</i>	
Количество жизнеспособных молочнокислых бактерий, КОЕ в 1 г закваски	7 x 10 ⁹	Не менее 1,0 x 10 ⁸
Производственная закваска		
Продолжительность образования сгустка (при внесении 2 % культуры)	10 часов	10 – 12 часов
Титруемая кислотность	90 °Т	80 – 90 °Т
Органолептические свойства	Ровный, плотный, колющийся, однородной консистенции; вкус, запах чистый кисломолочный с ароматом	
Образование ароматических веществ (диацетил + ацетон) по щелочной пробе (время появления интенсивного розового окрашивания)	9 минут	Не более 15 минут

Разработанная нами закваска была использована для выработки опытной партии комбинированного твердого сыра с низкой температурой второго нагревания, на базе коровьего молока и соевого белка в соотношениях 70 : 30 и 50 : 50 (табл. 2).

По данным, представленным в таблице, видно, что комбинированный сыр, выработанный на основе коровьего молока и соевого белка в соотношении 70 : 30, по внешнему виду, вкусу, запаху, консистенции, рисунку, цвету не отличается от сыра, выработанного из коровьего молока. В сыре, выработанном на основе коровьего молока и соевого белка в соотношении 50 : 50, присутствует легкий



запах сои, который не ухудшает его вкусовые качества, т. е. разработанная нами бактериальная закваска обеспечила технологический процесс выработки сыра, соответствующий техническим требованиям.

Таблица 2

Сравнительная органолептическая характеристика комбинированного сыра и сыра из коровьего молока (твердых с низкой температурой второго нагревания)

Table 2

Comparative organoleptical characteristics of combined cheese and cow milk cheese (firm cheese with low temperature of the second heating)

Органолептические показатели	Комбинированный сыр из смеси		Сыр из коровьего молока
	50 % коровьего молока: 50 % соевого молока	70 % коровьего молока: 30 % соевого молока	
Внешний вид	Внешний слой без корки, чистый, гладкий без слизи		
Вкус и запах	Слегка кисловатый; чистый, кисло-молочный с легким запахом сои	Слегка кисловатый; чистый, кисло-молочный	
Консистенция	Однородная по всей массе, слегка ломкая на изгибе		
Рисунок	Отсутствует		
Цвет	Бледно-желтый равномерный по всей массе		

Исследования, проведенные нами по общепринятой методике для определения стабильности микробиологических, физико-химических и органолептических показателей полученного комбинированного сыра после 30 дней созревания при температуре (12 ± 2 °С) и последующего хранения в течение 30 дней при температуре (4 ± 2 °С), согласно нормативам для сыра с низкой температурой второго нагревания, выработанного из коровьего молока, показали полное соответствие действующим нормативам. Количество молочнокислых бактерий в 1 г продукта сохранилось на первоначальном уровне.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанная нами закваска на основе местных штаммов молочнокислых бактерий: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, включающая в т. ч. и штамм *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, отличающийся высокой способностью продуцировать ароматические вещества, обеспечивает технологический процесс выработки комбинированного сыра на основе молока и соевого белка в соотношениях 70 : 30 и 50 : 50, соответствующего действующим техническим требованиям для твердых сычужных сыров с низкой температурой второго нагревания.



ЛИТЕРАТУРА

1. Зобкова З. С., Фурсова Т. П. Продукты на основе соевых компонентов для профилактического и диетического питания // Молочная промышленность. — 1999. — № 10. — С. 31-33.
2. Невмиваний С. Л. Розробка біотехнології ферментованих соєпродуктів, Автореферат на здобуття наук. ст. канд. техн. наук, Одесса, 2002. — 18 с.
3. Guzun V., Musteață Gr., Rubțov S., Banu C., Vizireanu C. Industrializarea laăptelui. — Chișinău: Editura „Tehnica-Info”, 2001. — 388 p.
4. Банникова Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. — Москва: Пищевая промышленность, 1975. — 231 с.
5. ТУ 07-00411795-079:2005 «Бактериальные закваски».
6. Банникова Л. А., Королева Н. С., Семенихина В. Ф., Микробиологические основы молочного производства. — Москва: «Агропромиздат», 1987. — 400 с.
7. Rondags E., Halliday E., Marc I. Diacetyl production mechanism by a strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* bv. *diacetylactis*: study of α — acetolactic acid extracellular accumulation under anaerobiosis // Appl. Biochem. And Biotechnol. — 1998. — N 2. — P. 203-212.
8. Monnet C., Aymes F., Carrien G., Diacetyl and α — acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in α — acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity // Appl. And Environ. Microbiol. — 2000. — № 6. — P. 418-423.
9. Серебренникова В. М., Ворوشيца Л. Н., Глазунов А. В. Изучение синтеза α — ацетолактата, предшественника диацетила, периодической культурой *Lactococcus lactis* // Биотехнология.— 2005. — № 3. — С. 13-21.
10. Сорокина Н. П. Выбор и использование бактериальных концентратов для улучшения качества сыров / Сб. материалов Научно-практической конференции «Научно-практические аспекты переработки молока в современных условиях» (Москва, 7-9 дек., 2004) — М.: Изд-во ОНТЦ МП.2004, с. 30-32.

Г. В. Коєв¹, Е. Д. Бурець¹, С. В. Швець¹, С. А. Бурцева²

¹Молдавський Інститут харчових технологій

²Інститут мікробіології і біотехнології АН Молдови
вул. Сарміседжетуса, 20/2, Кишинів, МД 2032, Молдова,
тел.: 8 (0363) 22 55 10 20, e-mail: icsptia@mail. ru

ЗАСТОСУВАННЯ МІСЦЕВИХ ШТАМІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ У ВИРОБНИЦТВІ СИРУ З ВИКОРИСТАННЯМ СОЄВОГО БІЛКА

Реферат

На основі вилучених із спонтанної мікрофлори (місцевої самоквасної молочної продукції) штамів молочнокислих бактерій створено два варіанти закваски з додаванням *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* для поліпшення смаку і запаху комбінованого сиру, отриманого на основі молочного та соєвого білка. Виготовлена ліофілізована закваска (містить 10 % *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*) повною мірою відповідає вимогам виробництва стандартних сирів (на коров'ячому молоці) з низькою температурою другого нагрівання.

К л ю ч о в і с л о в а: молочнокислі бактерії, закваска, сир, соєвий білок.



G. V. Coev¹, E. D. Burets¹, S. V. Shvets¹, S. A. Burtseva²

¹Institute of Food Technology of Moldova

²Academy of sciences of Moldova Institute of Microbiology and Biotechnology,
Sarmisedjetuza str., 20/2, Chishinev, MD 2032, Moldova, tel.: 8 (0363) 22 55 10 20,
e-mail: icsptia@mail.ru

UTILIZATION OF LOCAL LACTIC ACID BACTERIA STRAINS FOR PRODUCTION OF CHEESE WITH USING THE SOY ALBUMEN

Summary

On the base of the lactic acid bacteria strains isolated from spontaneous microflora (local sour milk products) two variants of the leaven. With adding *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* for improvement of the taste and odour of the combined cheese received on the base of milk and soya albumen were created. Lyophilized leaven with 10 % *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis* was completely up to the quality, requirements at production of standard cheese (on cow milk) with low temperature of the second heating.

Key words: lactic acid bacteria, leaven, cheese, soya albumen.



УДК: 579:923

І. Г. Скрипаль

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, ДО3680, Україна, тел.: 8 (044)
526 23 29, e-mail: podgorsky@serv. imv. kiev. ua

МРІЯ Д. К. ЗАБОЛОТНОГО, ЩО ЗДІЙСНИЛАСЯ

31 травня 2008 року виповнилося 80 років від дня заснування академіком Д. К. Заболотним Інституту мікробіології і епідеміології Всеукраїнської академії наук (нині – Інститут мікробіології і вірусології НАН України). У статті коротко окреслюється шлях, пройдений інститутом за ці роки і його досягнення в різні періоди існування.

К л ю ч о в і с л о в а: Інститут мікробіології і вірусології НАН України, історія, досягнення, мікробіологія, вірусологія, біотехнологія.

Швидкі темпи розвитку мікробіологічних досліджень в Україні та наявність висококваліфікованих кадрів дали можливість Данилу Кириловичу Заболотному – видатному вченому і громадському діячеві – створити в 1928 р. в Києві Інститут мікробіології і епідеміології (з 1963 р. – Інститут мікробіології і вірусології НАН України (ІМВ НАНУ) з метою об'єднання наукових сил для розробки провідних теоретичних проблем мікробіології в Україні.

З першого дня існування інституту йому надзвичайно щастило на непересічні особистості й, в першу чергу, поталанило з його організатором і першим директором. Ним став академік Данило Кирилович Заболотний (1866 – 1929), всесвітньовідомий вчений, засновник епідеміології та ряду напрямків у мікробіології, який у побуті був надзвичайно скромною людиною і, будучи вже широко знаним вченим, академіком, членом уряду, вважав себе селянином села Чоботарка (нині село Заболотне, Крижопільського району, Вінницької області). У світі він набув слави «чумогона», бо за його життя на Землі не відбулося майже ні одної епідемії чуми, в епіцентрі якої б він не знаходився зразу ж після її початку.

Д. К. Заболотний переслідував все життя не тільки чуму, а й такі особливо небезпечні хвороби людини, як холеру, дифтерію, дизентерію, сифіліс та інші. Видатний учень першого лауреата Нобелівської премії в галузі медицини Іллі Ілліча Мечникова, якого учні називали «насадителем бактеріології» в Росії, Д. К. Заболотний був не тільки талановитою і сміливою людиною, а й прекрасним організатором науки, що створив до 1928 року декілька науково-дослідних інститутів і кафедр. І от 3 травня 1928 року Д. К. Заболотного було обрано Президентом Всеукраїнської

академії наук, а вже 31 травня 1928 року вийшла постанова уряду про створення в Києві Інституту мікробіології і епідеміології, правонаступником якого сьогодні є ІМВ НАНУ.

Науково-дослідна робота Інституту, аналогів якому в Радянському Союзі на той час ще не було, спрямовувалась на:

- 1) розв'язання теоретичних проблем мікробіології і епідеміології та вишукування засобів ефективної боротьби з інфекціями людини, тварин і рослин;
- 2) вивчення закономірностей розвитку і життєдіяльності мікроорганізмів та поширення їх у природі;
- 3) розробку методів широкого використання мікробіологічних процесів у сільському господарстві та промисловості.

Д. К. Заболотний був директором інституту менше двох років, бо 15 грудня 1929 року він помер через запалення легенів. Але поштовх, який він надав розвитку інституту, принципи науково-дослідної роботи в ньому та відносин між фахівцями його колективу зберігаються і до цього часу.

Заповіти Д. К. Заболотного втілювалися в життя усіма директорами ІМВ НАНУ, які були після нього, та іншими видатними вченими, що працювали тут. За 80 років існування ІМВ НАНУ його директорами після Д. К. Заболотного були лише 8 осіб: Михайло Іванович Штуцер (1930), Микола Васильович Стадніченко (1930 – 1933), чл.-кор. АН УРСР Гнат Омелянович Ручко (1933 – 1937), Петро Юхимович Марусенко (1937 – 1941), академік АН УРСР Віктор Григорович Дроботько (1944 – 1962), чл.-кор. АН УРСР Семен Микитович Московець (1962 – 1971), чл.-кор. АН УРСР Дмитро Григорович Затула (1971 – 1977), з 1977 року і до кінця 2002 року ІМВ НАНУ очолював академік НАН України Валерій Веніамінович Смірнов.

Нині (з 2003 року) інститут очолює академік НАН України Валентин Степанович Підгорський.

Якщо зважати на такі негативні фактори, що відбилися на житті інституту, як сталінські репресії, під час яких загинули М. І. Штуцер, Г. О. Ручко, та Велику Вітчизняну війну, на полях якої, захищаючи Батьківщину, загинули М. В. Стадніченко та П. Ю. Марусенко, то можна стверджувати, що стабільність інституту свідчить про досить досконалий добір керівних кадрів у системі Національної академії наук України і про високий рівень морального клімату всередині колективу ІМВ НАН України на всіх етапах його розвитку.

Принципи відносин у колективі інституту, закладені Д. К. Заболотним (а це чуйність, людяність, висока вимогливість і здатність прийти на допомогу один одному), сприяли тому, що інститут із перших днів існування дуже високо підняв планку рівня своїх досліджень і швидко завоював авторитет серед науково-дослідних закладів свого профілю як у колишньому Радянському Союзі, так і за кордоном.

Завоюванню цього авторитету сприяли і ті обставини, що тут на певних відрізках періоду існування ІМВ НАНУ працювали всесвітньовідомі вчені, такі як академік АН УРСР М. Г. Холодний (1936 – 1938), чл.-кор. УРСР М. М. Підоплічко (1931 – 1975), чл.-кор. АН УРСР В. Й. Білай (1935-1994), академік АН СРСР Б. Л. Ісаченко (1944 – 1948), академік АМН СРСР і чл.-кор. АН УРСР М. М. Сиротинін (1944 – 1948), чл.-кор. АН УРСР Л. Й. Рубенчик (1944 – 1975), академік АН УРСР С. М. Гершензон (1963 – 1968), чл.-кор. НАН України Н. С. Дяченко (1936 – 2003), чл.-кор. НАН України Ю. Р. Малащенко (1931 – 2006).



Сьогодні тут плідно працюють члени-кореспонденти НАН України К. І. Андриюк, Б. П. Мацелюх, І. Г. Скрипаль, Н. К. Коваленко, М. Я. Співак, які разом з іншими науковцями розробляють в цей складний для розвитку науки час відповідні напрями мікробіології і вірусології в нашій країні.

Своїми працями інститут одразу ж завоював місце провідного мікробіологічного закладу в країні з питань бактеріофагії, мінливості мікробів, промислової та сільськогосподарської мікробіології і розробки методів боротьби з інфекціями шляхом застосування вакцин, сироваток, бактеріофагів, хіміопрепаратів, а пізніше — і антибіотиків. Одні з названих препаратів створювалися самостійно співробітниками інституту, а частина — у співдружності з іншими науковими та навчальними закладами.

Великий вклад в пізнання біології багатьох видів патогенних і сапрофітних бактерій (бруцел, туберкульозної палички, бактерій кишкової групи, стрептококів, збудників риносклероми та ін.) вніс В. Г. Дроботько.

Фундаментальні дослідження, що проводилися і проводяться в інституті, та їх майже негайне втілення в практику зробили його авторитетним закладом з багатьох проблем мікробіології.

У першу чергу, це стосується проблеми бактеріофагії, з якої інститут завоював лідерські позиції в країні й став загально визнаним центром з цієї проблеми завдяки дослідженням, виконаним Г. Ю. Ручко, В. Г. Дроботько, Ф. Є. Сергієнко, М. А. Лавриком, Н. С. Новіковою, К. Г. Бельтюковою, В. Т. Смалієм, Г. М. Френкель, М. Л. Непомнящою, Л. Ю. Медвинською, Л. А. Ліберман та іншими.

Великої слави набуло відкриття М. Г. Холодним і К. Г. Бельтюковою впливу фітогормонів на мінливість мікроорганізмів, що стало предтечею відкриття Б. П. Токінім фітонцидів, вчення про які активно розвивалося в нашому інституті в повоєнні роки.

Науку розвивають особистості, на які дуже багатим був і є ІМВ НАНУ. Наприклад, одною з непересічних особистостей був чл. — кор. АН УРСР Микола Макарович Підоплічко, який багато зробив для розвитку вчення про мікроміцети, їх екологію, корисні властивості та шкідливість. Висока загальнобіологічна освіченість, надзвичайна працьовитість і організованість М. М. Підоплічко послужили підґрунтям для того, що вже в довоєнні часи в інституті були видані монографії з мікроміцетів і особливо з тих, що викликають хвороби рослин, які залишилися неперевершеними і до цього часу. Одночасно в інституті була сформована передова школа мікологів.

Така ж школа мікробіологів сформувалася в галузі загальної і ґрунтової мікробіології, спеціалісти з якої згуртувалися навколо М. Д. Богопольського, В. Т. Смалія, О. І. Бершової.

Високий авторитет інституту серед фахівців країни і в її керівних колах сприяв його залученню до виконання завдань особливої державної ваги.

Головним із таких завдань стало розкриття в 1937 році етіології захворювання коней, яке викликало їх масову загибель в західних районах Радянського Союзу, тобто в західних областях України і Білорусії. Це захворювання спостерігалось в країні протягом чотирьох-п'яти років і причина його була невідома. Оскільки коні тоді прирівнювалися до зброї і фактично були стратегічним компонентом в обороні країни, то масова їх загибель зразу ж була трактована як умисний злочин ворогів та шпигунів проти країни. Таке пояснення причин масової загибелі коней автомати-

чно сприяло масовим репресіям проти ветлікарів, інших спеціалістів та керівників сільськогосподарського виробництва. Як писав М. С. Хрущов у своїх спогадах, за короткий час було репресовано тисячі невинних людей, які під тортурами визнавали себе винними. Майже усі «винні» люди були знищені, а хвороба залишалась. Щоб з нею упоратися, було споряджено декілька комплексних експедицій вчених для з'ясування причин захворювання. Експедиції працювали в цейтнотних умовах, тож причин хвороби так і не встановили. Це було оцінено як саботаж, і всі члени експедицій були покарані вслід за ветлікарями як вороги народу.

У таких кризисних обставинах у керівників України та Радянського Союзу (ситуація була на контролі у Й. В. Сталіна) виникла думка про те, щоб доручити співробітникам нашого інституту віднайти причини загибелі коней. До виконання досліджень з цього питання були залучені П. Ю. Марусенко (директор інституту і керівник групи), В. Г. Дроботько (науковий керівник групи) та мікробіологи П. Д. Ятель, Д. Г. Кудлай, Б. Ю. Айзенман, М. Г. Колесник, М. М. Підоплічко, Б. Й. Каган.

Можна тільки уявити, який вирок був би винесений переліченим особам, якби їм, як і попереднім дослідникам, не вдалося виявити причин захворювання. Але кожен із них був висококваліфікованим фахівцем, сумісна відповідальна робота згуртувала їх. Це, а також комплексний підхід до рішення завдання, дали вже у 1938 році позитивні наслідки: причини захворювання були встановлені, а само воно було ліквідовано. 12 лютого 1939 року всі поіменовані вище особи були нагороджені орденами Радянського Союзу. В історії АН УРСР це був перший випадок відзначення її вчених високими урядовими нагородами. За 80 років існування інституту багато його вчених були відзначені орденами, медалями та іншими високими державними нагородами, але перші нагороди залишилися найдорожчими для його колективу. Тим більше, що цими нагородами були відзначені дослідження, які мали велике значення для людства і науки.

З вирішенням такого стратегічного для країни практичного питання одночасно було покладено початок новому напрямку в науці — вченню про аліментарні мікотоксикози, яке ґрунтується на встановленій закономірності, що певні види сапрофітних мікроскопічних грибів є патогенними для тварин і людини завдяки здатності утворювати токсини. Сьогодні це вчення загальновизнане у світі, але з історії якимось випав той факт, що В. Г. Дроботько є його засновником. М. М. Підоплічко і В. Й. Білай є одними з основних розробників, які розвинули це вчення. Вони ще в 1939 році встановили, що і так зване «запорізьке» захворювання коней викликається сапрофітним токсикогенним мікроскопічним грибом.

У 1942 - 1943 роках М. М. Підоплічко і В. Й. Білай встановили етіологію так званої септичної ангіни (причиною якої були токсинуючі мікроскопічні гриби) — смертельної хвороби людей, яка набула на той час значного поширення в Поволжі та на Уралі, куди (в м. Уфа) був евакуйований інститут. Як показали спостереження та дослідження, ця хвороба з'являлася у людей, які харчувалися продуктами, виготовленими із зерна злаків, уражених фузарієвими грибами. Виключення з харчування таких продуктів припинило смертність серед людей. Так було збережено тисячі і тисячі життів наших співвітчизників.

У невеликому повідомленні неможливо охопити всі здобутки співробітників інституту, яких вони досягли в довоєнні та воєнні роки. Але любов до науки підтримувала їх наснагу і в післявоєнні роки, коли інститут у 1944 році повернувся з евакуації



із Зауралля. Вони швидко майже на пустому місці відновили інститут, і з наростаючим темпом почали працювати над вирішенням актуальних для країни завдань.

Важливою проблемою, над вирішенням якої розпочав роботу в повоєнні роки колектив інституту, повернувшись з евакуації, було одержання та вивчення антибіотиків з мікроорганізмів, мікроскопічних грибів і рослин.

Вивчення антибіотиків зародилося ще в 30-і роки, проте свого розквіту в Україні набуло лише після Великої Вітчизняної війни, а завершилося виділенням та впровадженням в клінічну практику мікроциду (М. М. Підоплічко, В. Й. Білай), іманіну, новоіманіну, сальвіну та ін. (В. Г. Дроботько, Б. Ю. Айзенман та ін.). Препарати знайшли широке застосування в медичній і сільськогосподарській практиці. За винайдення антибіотика мікроциду М. М. Підоплічко і В. Й. Білай в 1952 р. були відзначені Державною премією. Для потреб рослинництва розроблено антибіотик аренарин (К. Г. Бельтюкова, О. Я. Рашба), харчової промисловості — лактоцид (Є.І. Квасніков, В.І. Суденко).

Проведені широкі дослідження антимікробних, антивірусних, протипухлинних властивостей бактерій. Вивчено численні сапрофітні види родів *Bacterium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus* та ін.

Особливої уваги надавалося вивченню фізико-хімічних властивостей бактерій, виявленню зв'язку між антибіотикоутворенням, хімічною природою антибіотичних речовин і систематичним положенням деяких груп бактерій. Одержано три антибіотики бактеріального походження, з'ясована хімічна природа найбільш перспективного з них для боротьби з вірусом грипу. Встановлено, що однією з рис механізму його дії є стимуляція ендogenous утворення інтерферона (Б. Ю. Айзенман та ін.).

Згодом під керівництвом В. Г. Дроботька та при участі декількох відділів інституту була винайдена ціла низка антибіотиків із рослин: іманін, новоіманін, аренарин, сальвін та інші. Багато сил і знань для цього доклали Б. Ю. Айзенман, Н. А. Дербенцева, К. Г. Бельтюкова, О. Я. Рашба, А. С. Бондаренко, С.І. Зелепуха та багато інших співробітників інституту.

Інститут не без підстав став Всесоюзним центром по антибіотикам з рослин (фітонцидам) і провів багато всесоюзних конференцій з цієї проблеми.

Вчення про антибіотики розвивається в інституті по цей час, тобто майже 60 років. Але зараз роботи у цьому напрямку виконуються на якісно новому рівні, що дало змогу одержати мікробні антибіотики нового покоління. Такими є бакуціол, батумін (В. В. Смірнов, О. А. Кіпріанова, А. С. Бондаренко та інші), поліміксин Б, олеандоміцин, ландоміцин (Б. П. Мацелюх, А. С. Стенько, Г. М. Стрижкова та інші). Проблема створення нових антимікробних лікарських препаратів, про що мова йшла вище, була розширена в ІМВ НАНУ за рахунок залучення для цього живих культур бактерій. Цей новий підхід, коли мікроби використовуються проти мікробів при лікуванні інфекційних захворювань, набув значного розвитку в інституті і незабаром було створено більше десяти пробіотичних препаратів для лікування дисбактеріозів у людини, тварин і птахів та хвороб рослин. У першу чергу це такі біотерапевтичні препарати на основі спороносних аерофільних бактерій, як СЛ-бактерин, біоспорин, фітоспорин, субалін, ендоспорин, гінеоспорин (В. В. Смірнов, С. Р. Резнік, І. Б. Сорокулова, В. О. Кудрявцев, А. Т. Слабоспицька та інші), лактогеровіт, лактин, стрептосан та харчові препарати геролакт, кефір «Київський», основою яких є молочнокислі бактерії (Є.І. Квасніков, О. О. Нестеренко, В. С. Підгорський, Н. К. Коваленко та співробітники).



Роботи інституту в галузі пробіотиків та харчових продуктів на їх основі були чотири рази відзначені Державними преміями УРСР та України в галузі науки і технологій.

Іншою проблемою, з якої ІМВ НАНУ посів у повоєнні роки провідне місце в Радянському Союзі й займає його до цього часу на просторах СНД, є вивчення здатності мікроорганізмів утворювати глікополімери-полісахариди. Над цим питанням працюють п'ять відділів, тобто майже половина мікробіологічних відділів інституту. За відносно короткий час були розкриті фундаментальні основи утворення і суперсинтезу певних полісахаридів різними родами і видами бактерій.

Розроблені технології одержання окремих промислово важливих продуктів полісахаридів, які, як прогнозується, знайдуть застосування в багатьох галузях промисловості, сільському господарстві та медицині. Одночасно проведено глибокі дослідження структури багатьох глікополімерів, визначено їх біологічну функцію та розроблено на підставі цього удосконалену фенотипову систематику окремих груп бактерій. Ці складні та всеохоплюючі дослідження були проведені завдяки великій праці І. Я. Захарової, Р. І. Гвоздяка, Ю. Р. Малашенка, Г. М. Здоровенко, М. С. Матишевської, Л. Д. Варбанець, О. О. Литвинчук, С. К. Воцелко, Т. О. Грінберг, Т. П. Пиріг, Л. В. Косенко та багатьох інших співробітників.

Бурхливо в повоєнні роки розвивалися дослідження з промислової, загальної та ґрунтової мікробіології. Зазначене було пов'язано з тим, що ці дослідження очолили талановиті дослідники і організатори науки члени-кореспонденти АН УРСР Л. Й. Рубенчик і К. І. Андріюк, які керували відділом загальної і ґрунтової мікробіології протягом майже 50 років.

З приходом Л. Й. Рубенчика в 1944 році до керівництва відділом загальної і ґрунтової мікробіології, розквіту набули дослідження з ґрунтової мікробіології та геохімічної діяльності мікроорганізмів. Ґрунтові мікроорганізми досліджувались на популяційному і ценотичному рівнях з метою виявлення їх взаємовідносин та відносин між ними і вищими рослинами. Цікаві дані були одержані при вивченні процесів і закономірностей формування мікробних угруповань заповідних, богарних та зрошуваних ґрунтів. Відкрито властивість мікробних полісахаридів створювати біопротективний ефект у відношенні до гумінових кислот, що позитивно впливає на гумусовий баланс ґрунту. Розкриті механізми взаємодії мікро- і макросимбіонтів на різних етапах пізнання. Одержано декілька високоефективних штамів бульбочкових бактерій, на основі яких розроблені препарати «нітрагін», «різоторфін» та інші.

Проведені глибокі дослідження екології, поширення та властивостей стрептоміцетів (К. І. Андріюк), їх генетики та здатності утворювати антибіотики й інші біологічно активні речовини (Б. П. Мацелюх).

З 60-х років в інституті розвивається новий напрямок — вивчення літо- і гетеротрофних бактерій та мікроміцетів як факторів біокорозії. Вперше була встановлена біогенна природа корозії підземних металевих і бетонних споруд, основним чинником якої є тіонові та сульфатредуючі бактерії. На підприємствах приладобудівної, оптичної, радіо- і телекомунікаційної та інших галузей промисловості, а також у сховищах культурних цінностей основними факторами пошкодження приладів, книг, картин тощо є мікроскопічні гриби. За вирішення теоретичних питань проблеми та їх практичне втілення В. В. Смірнов, К. І. Андріюк, В. Й. Білай, Л. Й. Рубенчик, Е. З. Коваль і І. О. Козлова в 1983 році були удостоєні премії Ради Міністрів СРСР. Але проблема «Мікробна корозія промислових матеріалів і розробка методів її попередження»



є невичерпною і нескінченою, тому виконання окремих завдань з цієї проблеми здійснюється і сьогодні.

Після 1931 р., коли в інституті були створені умови для застосування мікробіологічних методів дослідження при вивченні мікроскопічних грибів, широко розгорнулися дослідження видового складу мікроміцетів усіх ґрунтів України та грибів, виділених за інших екологічних умов. Вивчено флору й систематику багатьох груп мікроміцетів (описані фітопатогенні гриби, мікрофлора грубих кормів, фузарії та ін.); екологію мікроміцетів, поширення їх у ґрунті, на зерні хлібних злаків, продуктах харчування, окремих видах промислових виробів тощо; поширення в окремих географічних зонах, расовий склад, фізіологію токсиноутворення та біологічні властивості токсинів; мікроміцети ризосфери важливих сільськогосподарських рослин, їх вплив на ріст і продуктивність культурних рослин; антибіотичні властивості окремих таксономічних груп мікроміцетів; ферменти мікроміцетів, характеристику ферментативних властивостей окремих видів, умови їх утворення при культивуванні; фізіологію живлення та біосинтезу біологічно активних речовин у грибів. Завдяки багаторічним систематичним і плідним дослідженням, Україна сьогодні за повнотою вивчення мікофлори ґрунтів є чи не єдиною країною в світі, де на карті грибів немає «білих плям», обійдених мікологічними дослідженнями.

З технічної мікробіології було вивчено багато мікроорганізмів різних таксономічних груп: дріжджі, коренеподібні та молочнокислі бактерії, метан- і метанолакиснуювальні бактерії тощо, проведені глибокі дослідження з проблеми мікробіологічного синтезу білка із вуглеводнів нафти, природного газу, інших видів нехарчової сировини. Створено багато біотехнологій одержання різних препаратів та продуктів харчування (Є.І. Квасніков, В. С. Підгорський, Ю. Р. Малашенко, Н. К. Коваленко).

З 1932 року в інституті розвивається вчення про бактеріози рослин та фітопатогенні бактерії, що їх викликають. Започаткував ці дослідження Г. О. Ручко, а після його загибелі в 1937 році їх продовжила К. Г. Бельтюкова і розвинула їх до такого обсягу і глибини, що інститут став провідною організацією з цієї проблеми в СРСР. З 1971 року і до 2006 року ці дослідження і відділ фітопатогенних бактерій очолював Р.І. Гвоздяк. Нині відділ очолює академік УААН В. П. Патица. Цей відділ став знаним у світі колективом, що різнобічно вивчає фітопатогенні бактерії.

Праця новоорганізованих мікробіологічних підрозділів концентрувалася не тільки на удосконаленні методів інтенсифікації відомих бродильних процесів — спиртового, оцтового, молочнокислого та інших, але й на відшукуванні нових видів мікроорганізмів — продуцентів корисних для народного господарства продуктів: спиртів, органічних кислот, вітамінів, ферментів, гормонів тощо. Вивчалася також явище бактеріофагії як шкідливого фактора в молочній промисловості (нескисання молока при переробці) і були розроблені засоби боротьби з ним.

Встановлена кореляція процесів дихання і бродіння у спиртових рас дріжджів. Вивчений збудник ослизнення хліба (*Bacillus mesentericus*) і запропоновані заходи по боротьбі з ним. Розроблені й запропоновані виробництву методи швидкого визначення кишкової палички в молоці; одержання дієтичного сиру і виготовлення його з нейтралізованого молока; консервації дифузійних соків у цукровій промисловості.

Для боротьби з інфекціями в бродильній промисловості був одержаний антибіотик лактоцид з актиноміцету. Селекціоновано і впроваджено на багатьох вітчизняних і зарубіжних заводах холодостійку расу дріжджів, розроблені рекомендації



по розмноженню їх при виробництві шампанського. Розроблені й впроваджуються в консервне виробництво нові прискорені методи мікробіологічного контролю.

Важливих результатів досягнуто у вивченні закономірностей розвитку асоціативних культур мікроорганізмів на рідких і газоподібних вуглеводнях. Передбачається, що використання «керованих асоціацій», як їх назвали автори, дозволить одержати препарати, повноцінні за білковим і вітамінним складом, і повніше використовувати компоненти сировини.

Одержані цінні результати при вивченні нових груп мікроорганізмів, що викликають перетворення вуглеводнів. Описані бактерії і нокардії, які засвоюють рідкі н-алкани як єдине джерело вуглецевого живлення і фіксують при цьому азот атмосфери в умовах глибинного культивування. Вперше виявлені і спорові аеробні термофільні бактерії, що розмножуються на мінеральному середовищі з парафінами при 50 – 70 °С, а також факультативні анаероби, які мешкають у нафтових свердловинах. Вивчені obligатні метанокислючі бактерії. Описані нові види та різновидності зазначених мікроорганізмів.

Проведені дослідження з фізіології росту мікроорганізмів на рідких н-алканах, природному газі, метиловому спирті, сульфідних лугах паперового виробництва, гідролізатах синьозелених водоростей тощо. Зараз є всі підстави вважати, що проблема одержання кормових і харчових білків з нехарчової сировини в Україні буде вирішена.

Успішно розробляються важливі проблеми генетики актиноміцетів. Проведено систематичне дослідження явища генетичної трансформації в актиноміцетів. Вперше показано видову антигенну специфічність ДНК актиноміцетів, яка може бути використана для таксономії цих мікроорганізмів. Побудована хромосомна карта *Actinomyces olivaceus* V KX, яка матиме не лише практичне, але й теоретичне значення при з'ясуванні шляхів еволюції генетичних структур у різних груп мікроорганізмів (Б. П. Мацелюх).

У 1954 році з ініціативи В. Г. Дроботько в інституті були розпочаті дослідження вірусів рослин, а в 1960 році організовано відділ вірусології, який очолив С. М. Московець. Дослідження з вірусології розвивалися так стрімко, що в 1963 році в інституті був створений під керівництвом С. М. Гершензона сектор вірусології, а інститут було перейменовано в Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного АН УРСР. За час існування сектору вірусології (1963 – 1967) набули всебічного розвитку дослідження вірусів рослин, тварин і мікроорганізмів. Була створена сучасна на той час база для проведення вірусологічних досліджень, виявлені та вивчені віруси — збудники хвороб основних сільськогосподарських рослин на території України, досліджені їх структура, фізико-хімічні та антигенні властивості, штамовий склад, взаємодія вірусів з клітиною. Інтенсивно вивчалися віруси синьо-зелених водоростей та грибів, віруси комах, розроблялися засоби і рекомендації щодо боротьби з вірусними хворобами. Академік НАН України С. М. Гершензон відкрив явище передачі генетичної інформації в зворотному напрямку — від рибонуклеїнової кислоти на дезоксирибонуклеїнову кислоту, механізм якого пізніше був розшифрований американськими дослідниками. Бурхливий розвиток вірусологічних досліджень в інституті створив можливість організувати в 1967 році Сектор молекулярної біології і генетики АН УРСР. На його базі в 1973 році був організований Інститут молекулярної біології і генетики АН УРСР, до складу якого було включено багато вірусологічних відділів, що працювали в ІМВ НАНУ.



В ІМВ АН УРСР залишилися відділи, де вивчаються віруси рослин, водоростей, мікроорганізмів та аденовіруси людини і тварин.

Під керівництвом Н. С. Дяченко проведено комплексне вивчення компонентів аденовірусів і особливостей експресії їх геномів. Встановлена лімфотропність аденовірусів, вперше створена модель змішаної інфекції лімфоцитів аденовірусами, вірусом імунодефіциту людини та вірусом Епштейн-Барра з родини герпесвірусів і з'ясовано, що при цьому спостерігається взаємна інтерференція вірусів.

Для вірусів мікроорганізмів (Я. Г. Кішко) встановлені можливість стабілізації їх лізогенії, попередження фаголізу ними промислово цінних рас мікроорганізмів, модульна структура помірних фагів ервіній і взаємодія останніх з іншими епісомними елементами, бактеріоцинами, криптичними плазмідами та зв'язок з патогенністю. Створені оригінальні технології одержання гама-інтерферонів людини і тварин.

М.І. Менджул зі співробітниками показали, що в процесі репродукції ціанофагів клітина-господар безворотно втрачає свій генетичний апарат, систему регуляції біосинтетичних процесів, репродуктивну здатність та інші життєво важливі функції. Сформований вірус-клітинний комплекс перетворюється на потужний генератор нуклеотидів та амінокислот для необмеженого синтезу вірусних нуклеїнових кислот і білків.

Наймолодшими в інституті є відділи мікоплазмології (керівник — І. Г. Скрипаль), проблем інтерферону та імуномодуляторів (М. Я. Співак), мікробіологічних процесів на твердих поверхнях (І. К. Курдиш), лабораторії екології нафтозабруднених середовищ (Л. М. Шинкаренко) і вторинних метаболітів мікроміцетів (О. М. Зайченко), які теж мають пріоритетні для світової науки досягнення.

У цій короткій статті неможливо охопити всі факти багатющої історії та всі досягнення колективу науковців ІМВ НАНУ, перелічити всіх, хто їх створив.

Але на підставі перелічених досягнень можна констатувати, що мікробіологія змінилася до невпізнанності і стала передовою в республіці серед біологічних наук. Її досягнення є не граничним рубежем, а фундаментом, на якому повинен ґрунтуватися подальший інтенсивний розвиток і розквіт мікробіології для того, щоб ще глибше проникнути у тайни живого мікросвіту і поставити його на службу людству. Тому майбутні роботи українських мікробіологів повинні бути направлені на вирішення головного завдання: поглиблене вивчення біології, фізіології, біохімії, морфології і тонкої структури різних груп мікроорганізмів, виявлення та селекції видів, які можуть мати народногосподарське значення, дослідження мають стати основою нових галузей промисловості.

Вивчення процесів утворення біологічно активних метаболітів слід вести на клітинному, субклітинному та молекулярних рівнях. Такі дослідження дадуть можливість з'ясувати особливості метаболізму мікроорганізмів у зв'язку з синтезом згаданих речовин в залежності від фаз розвитку продуцентів, і на цій основі розробити направлений метод одержання нових антибіотиків, ферментів, гормонів та інших унікальних речовин, встановити їх хімічну природу, будову та біологічну дію.

Значні здобутки колективу інституту в минулому є підґрунтям для його розвитку в майбутньому. Досвід вчених інституту обумовлює необхідність негайного вирішення багатьох теоретичних питань, пов'язаних з розробкою нових біотехнологій і удосконаленням існуючих, захистом і реакцією довкілля, вирішенням проблем, які ставлять перед мікробіологічною і вірусологічною наукою сільське господарство, промисловість і охорона здоров'я.



У зв'язку з цим чільну увагу потрібно приділити дослідженням, метою яких є вивчення механізмів біологічної активності мікроорганізмів і вірусів як основи для розробки новітніх біотехнологій з метою створення необхідних продуцентів і важливих для людини речовин і продуктів.

Враховуючи катастрофічний стан навколишнього середовища в Україні, граничне забруднення ґрунтів, річок та інших водойм радіонуклідами, хімікатами, продуктами господарської діяльності людини, слід негайно розвивати дослідження, орієнтовані на розробку мікробіологічних засобів і способів очищення ґрунтів, стічних вод підприємств та сільських господарств від забруднювачів й одержання при цьому цінних компонентів і металів для подальшого їх використання в різних галузях економіки країни.

Вивчення первинної структури геномів мікроорганізмів і вірусів повинно стати основою для удосконалення систематики і створення нових підходів до контролю їх життєдіяльності. Традиційно мікроорганізми повинні вивчатися як перспективні продуценти антибіотиків, лектинів, полісахаридів тощо. Основою для цього повинна бути Національна колекція мікроорганізмів і вірусів, створена в інституті. Сьогодні в колекції зберігається більше 20 000 штамів і видів мікроорганізмів, багато з яких зникли в природі внаслідок так званого антропогенного навантаження. Вони можуть стати базою для одержання новітніх ліків або харчових препаратів, проведеної молекулярно-біологічних і генно-інженерних досліджень.

Очікується, що будуть розширені роботи з цитології і ультраструктури клітин мікроорганізмів. Особлива увага приділятиметься дослідженням структури клітинної стінки, її зовнішньої мембрани і глікокаліксу з метою пізнання механізмів взаємодії клітин мікроорганізмів з тканинами людини, тварин, рослин і різними поверхнями.

Оскільки Україна має гостру потребу у джерелах енергії, мікробіологи інституту мають допомогти їй у вирішенні цієї проблеми шляхом створення технологій одержання енергії з відновлюваних джерел, стосовно якого в Україні існує велика і багатообіцяюча перспектива.

Вірусологи інституту ще більше концентруватимуть увагу на поглибленому вивченні молекулярних процесів реалізації патогенних потенцій вірусів, механізмів їх латентності та ролі цього явища в патогенезі захворювань, можливості активації латентних вірусів і виникнення нових хвороб у зв'язку з глобальним погіршенням екологічної ситуації й зміною клімату.

Необхідно розширювати дослідження впливу вірусів і продуктів їх окремих генів на лімфоцити різного фенотипу, їх функціональний стан, кооперативні взаємодії з іншими клітинами імуннокомпетентної системи, а також дослідження ролі вірусів у патології не тільки людини, але й тварин і рослин, етіологію захворювань яких не встановлено сьогодні. Для практики будуть розроблені генно-інженерні біотехнології з використанням вірусів та ефективні препарати для діагностики і профілактики вірусних інфекцій.

Отже, мікробіологи і вірусологи інституту в найближчі роки повинні вирішити багато фундаментальних і прикладних питань своєї науки. Проте це можливе лише в умовах державної підтримки їх досліджень. Мікробіологічні дослідження в промислово розвинутих країнах, до яких ще донедавна могла належати й Україна, розвиваються за рахунок такої підтримки. Це США, Німеччина, Франція, Англія та Японія, де такі дослідження за своїм стратегічним значенням стоять на 2–3-му місці серед основних напрямів НДДКР. Україна ж сьогодні в умовах жебрацького фінансування науки неспроможна гідно розвивати новітні галузі мікробіологічної науки, а відтак — і новітні біотехнології. Якщо мікробіологічній науці України терміново на державному рівні



не буде приділено відповідної уваги, це поставить нашу країну в залежність від інших країн у таких питаннях, як виробництво новітніх ліків і, в першу чергу, тих, які необхідні для лікування злоякісних, інфекційних та інших захворювань.

И. Г. Скрыпаль

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д03680, Украина,
тел.: 8 (044) 526 23 29,
e-mail: podgorsky@serv.imv.kiev.ua

МЕЧТА Д. К. ЗАБОЛОТНОГО, КОТОРАЯ ОСУЩЕСТВИЛАСЬ

Реферат

31 мая 2008 года исполнилось 80 лет со дня основания академиком Д. К. Заболотным Института микробиологии и эпидемиологии Всеукраинской академии наук (ныне — Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины). В статье кратко очерчен путь, пройденный институтом за эти годы и его достижения в разные периоды существования.

Ключевые слова: Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, история, достижения, микробиология, вирусология, биотехнология.

I. G. Skrypala

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
academ. Zabolotny str., 154, Kyiv, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 23 29,
e-mail: podgorsky@serv.imv.kiev.ua

D. K. ZABOLOTNY DREAM, WHICH CAME TRUE...

Summary

On May 31, 2008 we marked 80-years anniversary from the day of foundation Institute of Microbiology and Epidemiology of All-Ukrainian Academy of Sciences (nowadays — Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine). It is briefly described in the article the path covered by the institute at these years and its achievements in different periods of its existence.

Key words: Institute of Microbiology and Virology of NASU, history, achievements, Microbiology, Virology, Biotechnology.



УДК: 579:923 Рубенчик (477.74)

В. О. Кузнецов

Центр досліджень з історії освіти, науки та техніки на півдні України
імені В.І. Липського, вул. Новаторів, 5-а, Одеса, 65000, Україна,
тел.: 8 (0482) 37 96 73, e-mail: cuznetsov@meta. ua

ЖИТТЯ ТА НАУКОВО-ПЕДАГОГІЧНА ДІЯЛЬНІСТЬ ЧЛЕНА-КОРЕСПОНДЕНТА АН УРСР Л. Й. РУБЕНЧИКА (03.04.1896 — 14.12.1988)

На підставі вивчення матеріалів Архіву Президії НАН України, Інституту архівознавства НБУ імені В. І. Вернадського АН України, Державного архіву Одеської області, особистих архівів викладачів Одеського університету та літературних джерел, розглянуто основні події у науково-педагогічній діяльності члена-кореспондента АН УРСР Л. Й. Рубенчика.

Ключові слова: історія, мікробіологія, Л. Й. Рубенчик, Одеський університет.



© В. О. Кузнецов, 2008

Рубенчик Лев Йосипович — мікробіолог, член-кореспондент АН УРСР (1939), доктор біологічних наук, професор [2;12;61], лауреат Премії імені Д.К. Заболотного (1973), Премії Ради Міністрів СРСР (1983), Почесний член Всесоюзного мікробіологічного товариства (1975).

Лев Йосипович (Лейб Йоселев) Рубенчик народився 3 квітня 1896 року в Одесі, в родині дрібного підприємця. Його батько, Й.Л. Рубенчик, мав власний будинок на Малій Арнаутській вулиці, неподалік від Привоза. Син Л.Й. Рубенчика — Б.Л. Рубенчик відзначає, що в офіційних документах батько завжди писав, що за походженням він «з міщан», або «зі службовців», тому що правду писати у ті часи було небезпечно [13].

У 1905 році Л.Й. Рубенчик вступив до 2-ї Одеської гімназії, яку закінчив зі Срібною медаллю у 1914 р. «Гімназія дала батькові ґрунтовні знання з мов і математичних наук. Особливі успіхи він мав у французькій, якою володів досконало, не зважаючи на відсутність мовної практики в державі, яка багато років була повністю відмежована від іноземців» [13, с. 4]. Він також володів німецькою і англійською, якими вільно спілкувався і писав наукові праці [48].

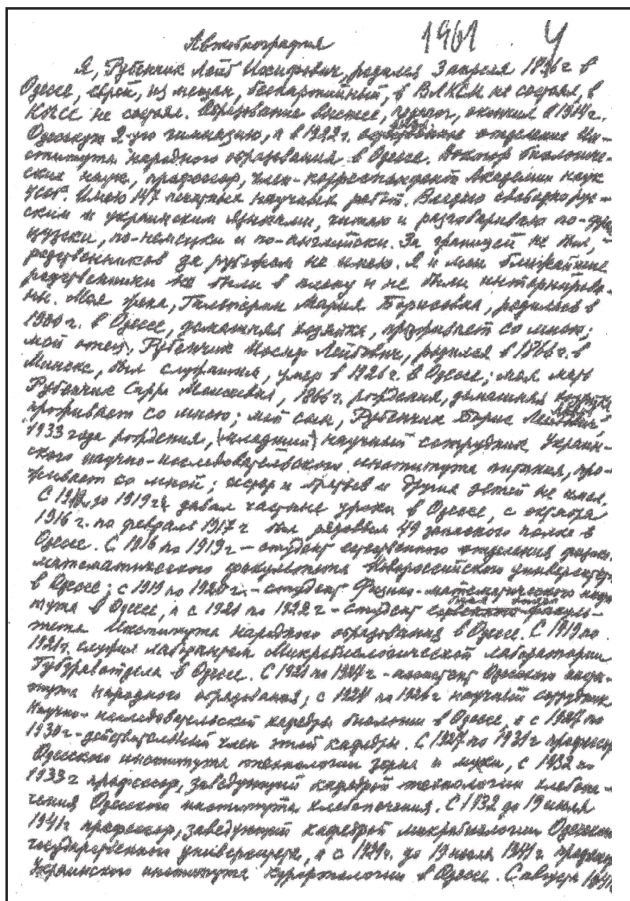


Рис. 1. Сторінка з автобіографії Л. Й. Рубенчика, 1961. Оригінал. (А-4) [52]. Друкується вперше.

Fig. 1. L. J. Rubenchik's autobiography, 1961. The original fragment. (A-4). [52]. First publication.

У 1916 р. вступив до природничого відділення Фізико-математичного факультету Імператорського Новоросійського університету. Студентські роки Л. Й. Рубенчика припали на бурхливий період в історії батьківщини — Перша світова війна, революційні події 1917 року, громадянська війна. У місті панував голод і холод, за таких умов навчальний процес часто переривався. Студентів відволікали на військові заняття. Лев Йосипович пригадував, що «З жовтня 1916 до лютого 1917 був рядовим 49 запасного полку в Одесі» (рис. 1) [52]. Щоб вижити, доводилося самостійно заробляти на проживання, і студент Лев Рубенчик підробляв репетиторством. Тільки під кінець 1919 року університетське життя почало поступово стабілізуватись, але розпочались радянські реформи вищої освіти, які знайшли відбиток в особистих документах: «З 1916 р. перебував студентом природничого відділення фізико-математичного факультету Новоросійського університету, а потім, за ліквідацією останнього, студентом фізико-математичного інституту і студентом агро-біологічного відділення факультету Профосвіти Інституту народної освіти» [64]. Але попри всі соціальні негаразди, університет продовжував працювати. На природничому відділенні читали лекції видатні вчені, заняття яких із захопленням відвідував студент Лев Рубенчик: Б. П. Бабкін, Я. Ю. Бардах, А. Г. Готалов-Готліб, Б. Б. Гриневецький, М. М. Зеленецький, В. Б. Лебедев, Я. М. Лебединський, М. Г. Лігнау, П. Г. Мелікішвілі (Меліков), М. П. Кастерін, П. М. Павлов, Ф. М. Породко, І. Л. Сербінов, І. Я. Точидловський, Г. І. Танфільєв, Д. К. Третьяков, та інші [64].

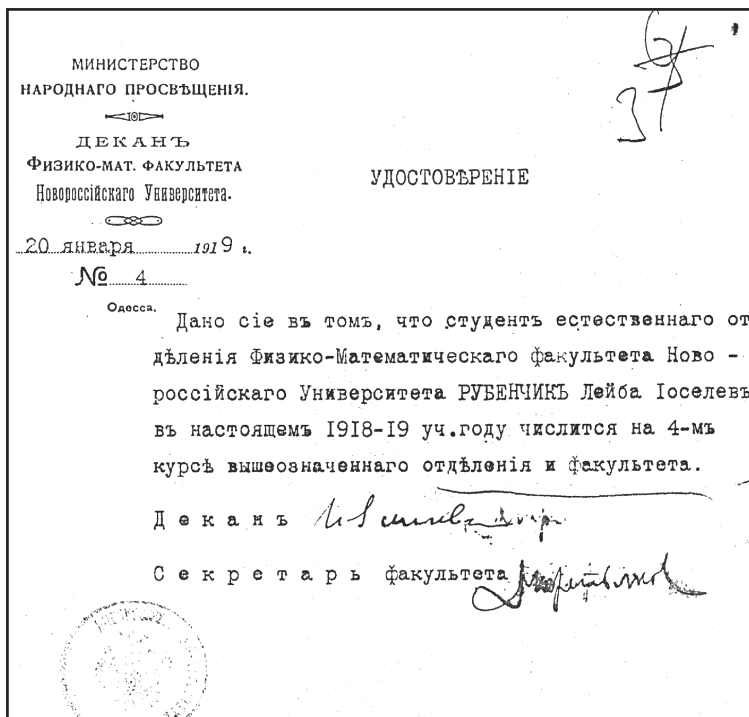


Рис. 2. Посвідчення студента Фізико-математичного факультету Новоросійського університету Рубенчика Л. Й., 1919. Оригінал (180 x 230) [61].

Друкується вперше

Fig 2. L. J. Rubenchik's student certificate. Imperial Novorossiysk University, physico-mathematical department. 1919. The original (180 x 230) [61].

First publication



Під впливом лекцій професора Я. Ю. Бардаха, Л. Й. Рубенчик захоплюється мікробіологією і починає працювати в науковому мікробіологічному гуртку. А. С. Заславський, який разом з Л. Й. Рубенчиком відвідував позааудиторні заняття Я. Ю. Бардаха, так пригадував ті часи: «Хоча розбрат і голод, що були викликані громадянською війною, ще не були ліквідовані, засоби для існування як мікробіологічної, так й інших лабораторій університету майже не відпускалися, лабораторні приміщення не опалювалися, але саме з 1920 р. значно поживвішала робота у мікробіологічній лабораторії. Сюди буквально ринув потік бажаючих працювати (...). В Одесі лютували черевний тиф і холера. Відому роль у розвитку цих епідемій відіграли ті обставини, що поля зрошення, які знезаражували стічні води м. Одеси, фактично не працювали — були зіпсовані каналізаційні споруди і зупинилась, за відсутністю палива, насосна станція (...). Одеський губернський відділ охорони здоров'я доручив мікробіологічній лабораторії університету роботу з вивчення стічних вод та ґрунтів полів зрошення і виділив з цієї метою деякі кошти» [35, с. 2,3]. На базі лабораторії ІНО була створена мікробіологічна лабораторія Санітарно-епідеміологічного підвідділу Губернського відділу охорони здоров'я. Використавши таку можливість, Я. Ю. Бардах зараховує на посаду лаборанта старанного студента — Л. Й. Рубенчика, який працював на ній до закінчення інституту [35;48;63].

Про умови, в яких проводились дослідження, ми дізнаємося із статей Я. Ю. Бардаха [3] і Л. Й. Рубенчика: «Сувора зима 1921-1922 рр. в Одесі і неопалення інститутських лабораторій створили умови, при яких єдиною можливою бактеріологічною роботою було вивчення бактерій, здатних розвиватися за дуже низьких температур» [14, с. 17]. Результати цих досліджень були узагальнені у кваліфікаційній роботі випускника ІНО: «В листопаді місяці 4 дня 1922 року громадянин Рубенчик Лейб Йосифович підлягав іспитові в кваліфікаційній Комісії й оборонив кваліфікаційну працю на тему: «Про шумування мочевини при температурі нижче 0°». На підставі положення про Інститути, затвердженого 19 липня 1927 року ВУЦВК і РНК УРСР, — громадянинуві Рубенчику Лейбові Йосифовичу надається кваліфікація викладавця-спеціаліста природознавчих дисциплін у школах Профосу, ФЗУ та старших групах трудшкіл» [55].

Досліди уробактерій Л. Й. Рубенчик продовжував протягом багатьох років і після закінчення ІНО, і саме ця група мікроорганізмів стала предметом дослідження його докторської дисертації. Характеризуючи цей період його наукової діяльності, академік М. Г. Холодний писав: «Основна тема, що найбільше цікавила його, як дослідника, — це вивчення різних мікробіологічних процесів у тих своєрідних умовах, які можна спостерігати в Одеських лиманах та на полях зрошення. Дослідження цих процесів безперечно має високий науковий інтерес, але являє й великі труднощі експериментального характеру. Л. Й. Рубенчик з надзвичайною енергією взявся до роботи і незабаром дійшов цілої низки цікавих результатів.

Досить згадати про те, що він відкрив чимало нових форм уробактерій, детально вивчив їх з морфологічного та фізіологічного боків, дослідив, як впливають на ці бактерії вуглекислий амоній, — продукт їхньої власної життєдіяльності, та хлорид натрію, що його розчин оточує їх у природних умовах; простежив залежність розкладу карбаміду від різних інших солей, виявив цікаві особливості ферментотворення уробактерій, вплив на них низької температури тощо» [68, арк. 2].

Ще будучи студентом старшого курсу, як свідчать Посвідчення № 1925 Інституту Народної освіти м. Одеси від 20.12.1921 і № 3752 від 23.12.1923 (рис. 3),



Л. Й. Рубенчик почав працювати асистентом Я. Ю. Бардаху по кафедрі мікробіології і залишався на цій посаді до 1928 р. [30; 62].

Ці та ряд інших документів непрямо свідчать про те, що кафедра мікробіології існувала вже в Одеському ІНО. Пошукам офіційних документів, які б підтвердили цей факт, багато уваги приділяла у свій час чл.-кор. АН УРСР В. П. Тульчинська, але як видно з її листів до Л. Й. Рубенчика, вони залишились без позитивних результатів [60].

Розформування в Україні університетів і перетворення їх на інститути народної освіти дуже швидко відбилосся на зниженні рівня розвитку науки, тому з метою відродження наукової роботи і підготовки науковців у 20-ті роки почали створюватись «Науково-дослідчі Катедри», які об'єднували учених різних навчальних закладів для сумісних наукових розробок. «Науково-дослідча Катедра Біології в Одесі, (...)», сформувалась і розгорнула свою діяльність в листопаді 1922 р., не чекаючи на остаточне затвердження Укрголовпрофосу. Це затвердження і офіційне відкриття відбулося лише в квітні 1923 р., (...)» [10, с. 10]. Керівник кафедри професор Ф. М. Породко писав у звіті: «Катедра не має власних лабораторій, її наукова робота ведеться по кабінетах та лабораторіях ІНО й інших Інститутів, що з ними зв'язані члени Катедри педагогічною діяльністю. Невеликих коштів, що призначається Науково-дослідчій Катедрі Біології, не вистачає ані щоб постачати її поточною закордонною літературою, ані щоб поповнювати лабораторне устаткування» [11, с. 12].

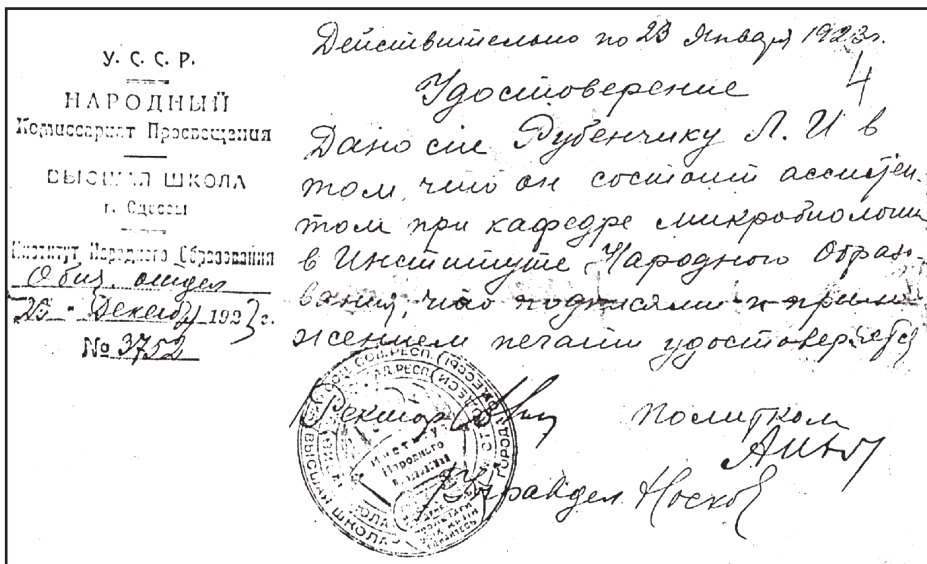


Рис. 3. Посвідчення асистента кафедри мікробіології Одеського ІНО Л. Й. Рубенчика № 3752 від 23.12.1923. Оригінал. (185 x 110) [64]. Друкується вперше

Fig 3. L. J. Rubenchik's assistant certificate N 3752 from 23.12.1923. Odesa INO, the Chair of Microbiology. The original (185 x 110) [64]. First publication

З моменту організації кафедри біології і до кінця 1926 року до її складу входили: Ф. М. Породко (керівник), Я. Ю. Бардах (зав. секції мікробіології), Д. Л. Рубінштейн



і В. Ф. Пастернацька (наукові співробітники), Л. Й. Рубенчик (аспірант секції мікробіології) [10]. У подальшому вона значно розширилась — налічувала більше 20 співробітників, які об'єднувались у 5 секцій: Анатомії та фізіології рослин, Морфології та систематики рослин, Зоотомії, Зоології і Мікробіології. До складу Секції мікробіології входили: завідувач секції — Я. Ю. Бардах, дійсний член — Л. Й. Рубенчик (обраний і затверджений на цій посаді у квітні 1923 р.) і аспіранти: С. З. Хаїт, А. С. Заславський, М. Б. Ройзін, П. М. Гіндіс [10; 11; 57]. Обсяг проблем, над якими працювали мікробіологи окреслено у науковому звіті: «Секція мікробіології проводить дослідження бактеріальної флори й біохімічних процесів в Одеських лиманах і на полях зрошення. Виділено цікаві форми, які живуть тільки в середовищах з великою концентрацією солей. Вивчається кругообіг сірки, шумування мочника й клітковини, амонізування, утворення амінових основ у Хаджибейському та Куяльницькому лиманах. Ця серія робіт ([Я. Ю.] Бардах, [Л. Й.] Рубенчик, [С. З.] Хаїт, [А. С.] Заславський) шукає шляху до синтетичного утворення лікових грязів» [10, с. 11].

У 1926 р. Л. Й. Рубенчик захистив дисертацію на ступінь доктора ботаніки з теми «Исследование над уробактериями Хаджибеевского лимана» в м. Одесі (офіційні опоненти: професор Я. Ю. Бардах, професор В. К. Стефанський, професор В. Л. Єлін) [50]. Високо оцінив докторську дисертацію Л. Й. Рубенчика видатний мікробіолог, професор Б. Л. Ісаченко. У своєму «Відзиві про наукові роботи професора Л. Й. Рубенчика» він пише: «Доктор ботаніки Л. Й. Рубенчик, який почав свою наукову діяльність з 1924 року дослідженнями уробактерій Хаджибеевського лиману, присвятив перші роки своєї наукової діяльності вивченню групи мікроорганізмів, присутність яких у середовищах з високою концентрацією не було до нього констатовано і біологічні особливості не були вивчені.

В результаті досліджень Л. Й. Рубенчика наука збагатилася новими знаннями, що заслужовують уваги, про групу організмів, які розкладають сечовину, при цьому дослідником були описані декілька нових видів бактерій. Це доводить, що Л. Й. Рубенчик володіє методами мікробіологічного дослідження, опанував науковою літературою, є готовим експериментатором і може бути зарахованим до числа наукових працівників, роль яких у розвитку мікробіології буде значна» (рис. 4) [36].

Крім наукової роботи, Л. Й. Рубенчик виконував обов'язки секретаря кафедри, заступника голови Місцевкома, делегата Секції наукових робітників, та члена кваліфікаційної комісії Секції наукових Робітників Робосу [11].

З 31.10.1927 р. Л. Й. Рубенчик працює на посаді професора Одеського інституту технології зерна та борошна (Одеський механіко-технологічний навчально-виробничий комбінат технології зерна і борошна). І паралельно, з 01.01.1932 до 20.02.1933 — керівником кафедри та професором мікробіології навчально-виробничого об'єднання хлібовипікання [29; 31; 33; 48; 56].

З організацією в Одесі Українського інституту курортології (процес його створення тривав два роки, 1928-1930), для вивчення лиманів було організовано великий і потужний сектор природничих наук, до складу якого входили лабораторії: фізико-хімічна (Є. С. Бурксер), мікробіологічна (Л. Й. Рубенчик), гідробіологічна (М. О. Загоровський), геологічна (В. В. Степанов), біохімічна (Л.Є. Розенфельд). Мікробіологічною лабораторією Л. Й. Рубенчик керував до 1939 р. [50; 58]. Тут вивчались такі науково-практичні проблеми: склад мікроорганізмів лиманів у різні періоди їхнього життя; роль різних видів мікроорганізмів і органічних речовин у

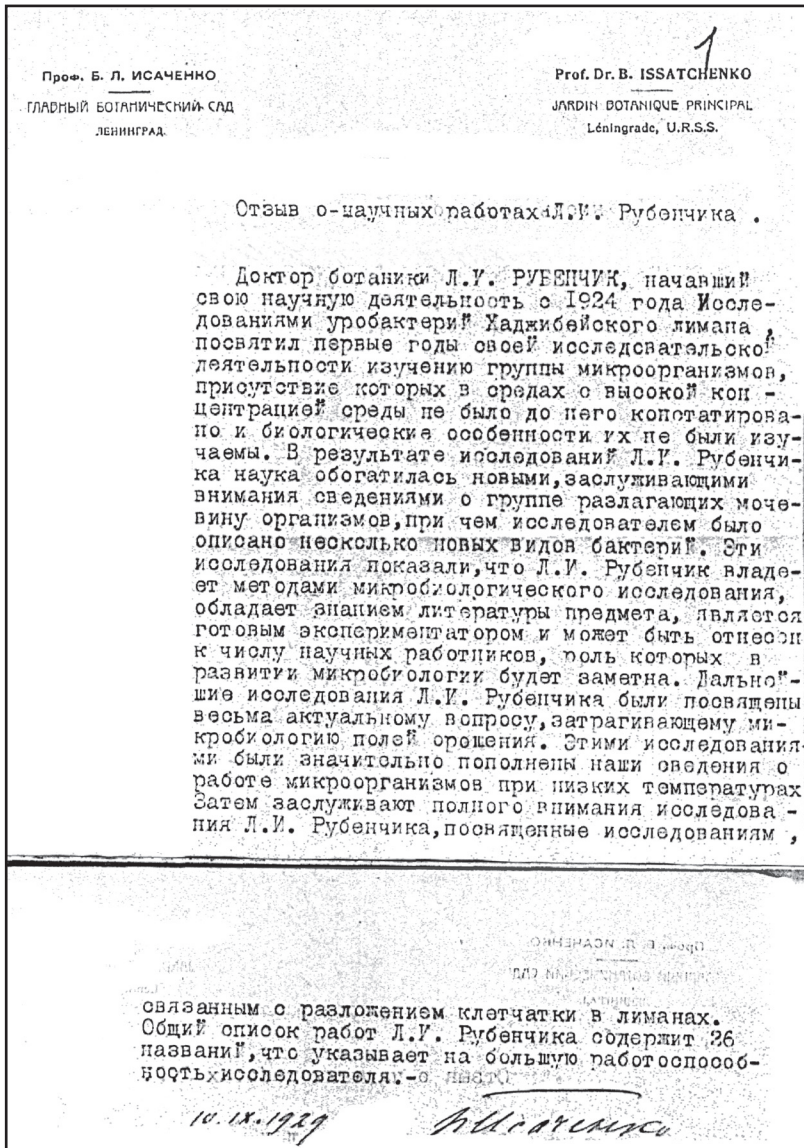


Рис. 4. Фрагменти сторінок Відгуку професора Б. Л. Ісаченка про наукові праці Л. Й. Рубенчика, 1929. Оригінал (175 x 230) [36]. Друкується вперше

Fig 4. Professor B. L. Isachenko's reference of L. J. Rubenchik's scientific work. Fragments. 1929. The original (175 x 230) [36]. First publication

процесах грязеутворення; вплив регенерації грязі на її мікрофлору (особливо на патогенні мікроорганізми); методи стимулювання грязеутворення; методи штучного отримання лікувальної грязі з глини мікробіологічним шляхом [5; 6; 25].

Багаторічні досліді на межі загальної, водної та геологічної мікробіології привели Л. Й. Рубенчика до з'ясування особливостей життєдіяльності різних груп мікроорганізмів у специфічних умовах високого гідростатичного тиску та великої солоності середовища. Велику екологічну зацікавленість викликають знайдені

дослідником облігатні галофіли з високим мінімумом солоності, необхідним для їх розвитку. У цей період Л. Й. Рубенчиком були розкриті природа і генезис лікувальної грязі, що залягає на дні одеських лиманів. Розроблені теоретичні основи і технологія штучного синтезу цієї мікробіогенної породи. Багато уваги приділив Л. Й. Рубенчик вивченню сульфатредукувальних бактерій та їх участі в утворенні сірководню у морях, мінеральних джерелах, пластових водах, нафтових родовищах, ґрунтах.

Після смерті Я. Ю. Бардаха (17.07.1929 р.) перед керівництвом ІНО постало питання про призначення завідувача кафедри мікробіології. Ректор ІНО Т. М. Внуков звернувся з цього приводу за порадою до провідних мікробіологів ВУАН, і вони одноставно рекомендували на цю посаду Л. Й. Рубенчика. Академік М. Г. Холодний писав: «Всі праці Л. Й. Рубенчика відзначаються детальним та сумлінним розробленням теми і свідчать про те, що автор є добре обізнаний з мікробіологічними та біохімічними методами роботи і з науковою літературою за фахом.

Ясність висловлювання, літературність мови дають підставу думати, що й як лектор він матиме успіх.

Гадаю, що в особі Л. Й. Рубенчика, кафедра його учителя Я. Ю. Бардаха матиме енергійного, досвідченого і цілком гідного заступника.

Акад. М. Холодний.

Київ 26.09.1929» (рис. 5) [68].

Відповідь на запит дав також і Президент ВУАН Академік Д. К. Заболотний: «Дорогий Т. М. [Внуков]!

Розвиток секції і катедри мікробіології, зв'язаний з пам'яттю І.І. Мечникова і Я. Ю. Бардаха, основоположників цієї доктрини в Союзі — найкраще можна забезпечити, призначивши керівником одного з найвидатніших молодих співробітників катедри тов. [Л. Й.] Рубенчика, наукові праці якого дають йому право проводити і виконувати з успіхом сучасні завдання» [39].

З 1929 до 1930 рр. Л. Й. Рубенчик працював на посаді професора Інституту Народної Освіти, а з 1 жовтня 1930 у зв'язку з реорганізацією ІНО переведений до Інституту Профосвіти, який у 1933 р. увійшов до складу Одеського державного університету [30]. Л. Й. Рубенчик очолював кафедру мікробіології ОДУ з 1933 р. до 1941 р. [48]. У 1933 р. кваліфікаційною комісією Наркомоса УРСР його затверджено у званні професора (затвердження ВАКом відбулося 23.12.1938 р.) [28].

У цей період співробітниками кафедри вивчалися бактерії-денітрифікатори Одеських лиманів та Одеської затоки [22], вплив мікроорганізмів на бетони гідротехнічних споруд Одеського порту [21; 23], тривали дослідження грязів одеських лиманів [7].

Привертає до себе увагу серія наукових праць Л. Й. Рубенчика, що присвячена ролі мікроорганізмів у корозії металів і бетонів. Ним було доведено, що в анаеробних умовах бактерії викликають корозію з водною деполаризацією, а в аеробних умовах — утворення гальванічних елементів диференціальної аерації. Стосовно бетонів корозійна активність мікроорганізмів звичайно пов'язана з утворенням ними кислот. Проблема мікробної корозії матеріалів залишалася в колі уваги вченого протягом всього життя. За ці досліди і розробку методів попередження мікробної корозії 16 квітня 1983 року Л. Й. Рубенчику присуджена Премія Ради Міністрів СРСР [43].

З 1 жовтня 1930 р. до 19 липня 1941 р. він за сумісництвом очолював лабораторію мікробіології в Одеській філії Зоолого-Біологічного Інституту АН УРСР,



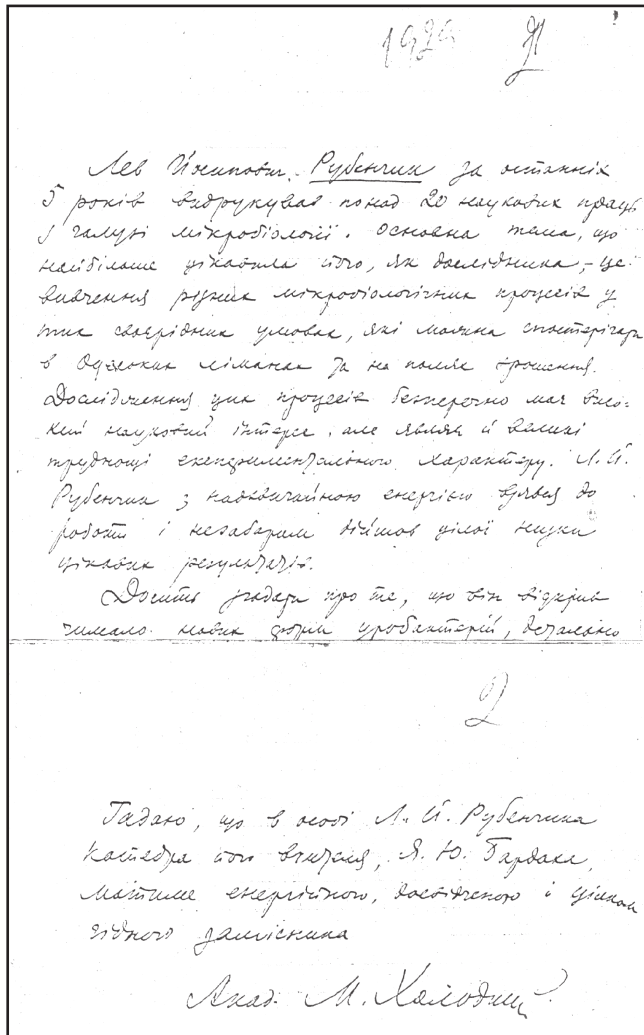


Рис. 5. Фрагменти сторінок з Відгуку М. Г. Холодного про наукові роботи Л. Й Рубенчика, 1929. Оригінал (190 x 300) [67]. Друкується вперше.

Fig 5. N. G. Kholodny's reference of L. J. Rubenik's scientific work. Fragments. The original (190 x 300) [67]. First publication.

який було створено на базі колишніх науково-дослідних кафедр біології та геології, і виконував обов'язки вченого секретаря філії [4; 48]. При філії була заснована аспірантура. Першим аспірантом зі спеціальності «Мікробіологія» зараховано учня Я. Ю. Бардаху — Д. Л. Шаміса. У роки Другої світової війни доцент Д. Л. Шаміс очолював кафедру мікробіології Одеського державного університету в евакуації [1; 8; 9].

У 1938 р. Київський державний університет надав доктору ботаніки Л. Й. Рубенчику ступінь доктора біологічних наук без захисту дисертації (затверджено ВАКом 23.12.1943 р.) [27]. Член-кореспондент АН СРСР, професор Б. Л. Ісаченко у своєму «Відзиві про роботи професора Рубенчика», який він надіслав до Ученої ради, писав: «Професор Л. Й. Рубенчик відомий своїми багаточисельними науковими роботами

з досліджень мікроорганізмів одеських лиманів. Почав працювати в лабораторії покійного проф. [Я. Ю.] Бардаха, який створив підґрунття для заснування кафедри мікробіології в Одеському університеті. Л. Й. Рубенчик перші роботи присвятив дослідженням уробактерій, які він виділив з ропи і грязі лиманів (...).

Великі, практично важливі роботи, були проведені Р [убенчиком] з отримання штучним шляхом лікувальних грязей. Результати цих досліджень, що дали позитивний результат, свідчать про повне вивчення процесу грязеутворення і можливість проводити цей процес у бажаному напрямку. Будучи крупним науковим працівником з 17-річним стажем, який вніс багато нового у вивчення біологічних процесів, пов'язаних з грязеутворенням, оволодів літературою з предмету дослідження, оточив себе підготовленими співробітниками, Л. Й. Рубенчик заслуговує сповна, на мою думку, ступеня доктора наук» [37].

22 лютого 1939 р. Л. Й. Рубенчика обрано членом-кореспондентом АН УРСР за спеціальністю «Мікробіологія» [42; 45]. Йому доручено розробити питання щодо організації при Відділі біологічних наук АН УРСР лабораторії з вивчення мікрофлори солоних водойм [46].

23 квітня 1941 р. Рішенням Президії Академії наук УРСР Інституту мікробіології: «Дозволено реорганізувати відділ ґрунтових мікроорганізмів і організувати відділ Агро-ґрунтової мікробіології та призначено чл.-кор. Л. Й. Рубенчика керівником відділу» [47]. Наказом по Інституту мікробіології АН УРСР Л. Й. Рубенчика з 21 травня призначено завідувачем відділу Агро-ґрунтової мікробіології [40].

Це вимагало від Л. Й. Рубенчика переїзду на проживання до м. Києва. Він завершував читати лекції і приймати іспити у студентів Одеського університету і з серпня місяця планував заступити на нову посаду. Але війна внесла свої корективи.

19 липня 1941 р. Л. Й. Рубенчик евакуювався разом з родиною з прифронтової зони м. Одеси. За його проханням, ректорат Одеського державного університету 12.07.1941 видав йому посвідчення про те, що він є завідувачем кафедри мікробіології і разом з родиною евакуюється з м. Одеси [66]. Син Л. Й. Рубенчика пригадував: «Вранці 19 липня 1941 року наша родина у повному складі, завантаживши валізи на підводу, спустилася під аркою похмурого мосту по вулиці Кангуна до порту. За декілька днів до цього мати з величезним трудом дістала квитки на невеликий теплохід «Дністр». Через два дні ми висадилися у Новоросійську, сіли на потяг і відправилися до м. Саратова (...).

Своєчасний від'їзд врятував нашу родину, але ми опинилися біженцями — без родичів, друзів, або знайомих в інших містах Союзу. Невідомо було, куди тепер податися. Вибір випав на м. Саратов, певно, тому, що це було університетське місто, де батько сподівався знайти роботу» [13, с. 12].

З серпня 1941 р. до вересня 1942 р. Л. Й. Рубенчик керував кафедрою мікробіології і фізіології рослин у Саратовському державному університеті [44;67]. Б. Л. Рубенчик пригадував: «Оселили нас вчотирьох у маленькій кімнатці комунальної квартири за адресою: Радянська, 29. Батько читав лекції в університеті, але його заробітна плата була чисто символічною». [13, с. 13].

Архівні документи свідчать, що перше півріччя 1942/1943 н. р. Л. Й. Рубенчик працював у Саратовському державному університеті (рис. 6), а за сумісництвом, з 1 січня 1942 р., уже був зарахований до Інституту Зообіології АН УРСР, тому вимушений був часто бувати у відрядженнях [38].



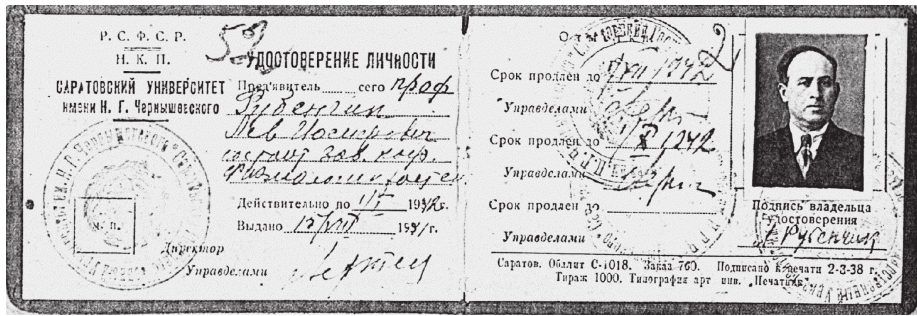


Рис. 6. Посвідчення професора Саратовського державного університету імені М. Г. Чернишевського Л. Й. Рубенчика, 1942. Оригінал (110 x 75) [67]. Друкується вперше.

Fig. 6. L. J. Rubenchik's professor certificate. Saratov State University named after M. G. Chernyshevsky. The original. (110 x 75) [67]. First publication.

Лише у 1942 р. переїхав до Уфі, де в евакуації знаходилася АН УРСР. Він був призначений старшим науковим співробітником інституту Зообіології АН УРСР, і з того часу працював при АН УРСР — спочатку в Уфі, Москві, а потім у Києві [48].

У період евакуації Л. Й. Рубенчик проводив пошуки штамів дріжджів та молочнокислих бактерій. Деякі з виділених ним гомо- та гетероферментативних бактерій були використані на хлібозаводах Башкирії. В архіві Інституту архівознавства НБУ імені В.І. Вернадського АН України зберігся лист від Башкирського тресту «Росголовхліб» до Президії АН УРСР, в якому висловлюється вдячність професору Л. Й. Рубенчику за роботу з виведення чистої культури молочнокислих бактерій, які використовуються у промисловості і надають можливість скоротити час бродіння тіста, і тим самим збільшити потужність хлібопекарських підприємств. Використання молочнокислих бактерій покращує якість хліба, надає йому приємний молочний аромат. Так як середовище, що створюється молочнокислими бактеріями, пагубне для шкідливих бактерій, то краще зберігається тісто, покращується структура пористості, яка стає більш рівномірною [41].

Після повернення АН УРСР до м. Києва і реорганізації Зообіологічного інституту Л. Й. Рубенчика призначено 15 липня 1944 р. завідувачем відділу ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології АН УРСР [58]. А з вересня 1948 р. він очолив відділ Загальної та ґрунтової мікробіології. За сумісництвом, з вересня 1946 до серпня 1951 р. Л. Й. Рубенчик очолював кафедру мікробіології, а з вересня 1951 до серпня 1956 працював професором кафедри антибіотиків і мікробіології Київського державного університету [52].

З перших днів роботи на кафедрі Л. Й. Рубенчик організував діяльність студентського мікробіологічного гуртка, який привабив студентів не тільки старших, але й молодших курсів. Він вважав, що «Цей гурток дозволить підсилити самостійну роботу студентів і відбирати студентів для наступної спеціалізації на мікробіологічній фуркації. Отже, мікробіологічний гурток є важлива ланка в підготовці кадрів і його роботу треба всіляко стимулювати» [33, арк. 1]. Л. Й. Рубенчик запропонував внесення змін до навчального плану університету: «Щодо учбового процесу, то курс загальної мікробіології читається лише для



студентів ботанічного та біохімічного відділів. Але в цьому курсі розглядаються проблеми, важливі для всякого біолога (наприклад, кругообіг речовин у природі, бактеріофагія, фільтрівні віруси, антибіотики тощо). Отже, треба цей курс вести для всіх студентів біофаку (як це зроблено в Одеському університеті)» [33, арк. 1]. Багато зусиль приклав для створення в університеті сучасної мікробіологічної лабораторії і розширенню штатного розкладу кафедри. Накреслив основні напрями наукової роботи кафедри: дослідження ацетоно-бутилової ферментації, яка мала важливе значення для оборонної промисловості; досліди в галузі геологічної діяльності мікробів; вивчення мікробіології ґрунтів.

У післявоєнні роки Л. Й. Рубенчик і його співробітники в Інституті мікробіології АН УРСР протягом ряду років розробляли проблему взаємовідносин ґрунтових мікроорганізмів з вищими рослинами. Вивчали мікробний склад ризосфер різних сільськогосподарських рослин, еколого-фізіологічні особливості їх мікрофлори, утворення нею біологічно активних речовин (вітамінів, гетероауксину, амінокислот), вплив ризосферних мікроорганізмів на обмінні процеси, ріст і продуктивність рослин. Особливу увагу було приділено мікроорганізмам, які фіксують атмосферний азот (азотобактеру, бульбочковим бактеріям, синьо-зеленим водоростям, олігонітрофілам). Низка виділених і вивчених штамів бактерій була втілена у виробництво бактеріальних добрив [34; 53].

До цієї ж проблеми можна віднести вивчення мікроорганізмів, які засвоюють летючі речовини, що виділяються в атмосферу вищими і нижчими рослинами. Було доведено, що повітряне живлення мікроорганізмів має місце не лише у лабораторних дослідах, але й у природних умовах.

12 лютого 1968 р. «Згідно з поданою заявою (...) чл.-кор. АН УРСР доктора біологічних наук, професора Льва Йосиповича Рубенчика [звільнено] з посади керівника відділу загальної та ґрунтової мікробіології» [26]. Але Л. Й. Рубенчик продовжував наукову роботу в інституті і на кафедрі. Одним з перших у Радянському Союзі Л. Й. Рубенчик розпочав розробляти питання у галузі космічної біології. Він досліджував замкнені екологічні системи, у функціонуванні яких велику роль відіграють мікроорганізми [53]. Велику увагу приділяв Л. Й. Рубенчик вивченню індикаторних функцій мікроорганізмів. У грудні 1972 р. Президія АН УРСР за монографію «Микроорганизмы — биологические индикаторы» присудила йому Премію імені Д. К. Заболотного.

Основні результати досліджень Л. Й. Рубенчика узагальнені у 184 наукових працях (з проблем загальної, водної, ґрунтової та технічної мікробіології) у тому числі 6 монографіях [15; 16; 17; 18; 19; 20]. Під керівництвом та за консультуванням Л. Й. Рубенчика підготовлені 38 кандидатів і 7 докторів наук.

Треба відзначити, що, мешкаючи у м. Києві, Л. Й. Рубенчик ніколи не поривав зв'язку з рідним містом. Кожного року він приїздив сюди на відпочинок. У мальовничому місці Одеси, в Аркадії, він мав власну дачу, де полюбляв проводити літні місяці разом з родиною. Протягом усього життя він вів активне листування з дружиною свого учителя Я. Ю. Бардаха — Генрієтою Яківною, а після її смерті з їх сином О. Я. Бардахом. В родинному архіві Бардахів збереглося багато листів від Л. Й. Рубенчика, особливо за ті періоди, коли його допомога була вкрай необхідною [49; 51; 54]. Це, в першу чергу, післявоєнні роки, коли владою створювались перешкоди для повернення родини Бардахів в Одесу після евакуації, а також у 60-ті роки ХХ століття, коли міська влада вирішила позбавити родину власного



будинку, подарованого у 20-ті роки радянською владою Я. Ю. Бардаху за видатні заслуги перед мешканцями міста Одеси [27]. Саме втручання Л. Й. Рубенчика у перебіг справ було визначальним у розв'язанні цих проблем [54].

Жваве листування, як свідчать архівні матеріали, відбувалось між Л. Й. Рубенчиком і завідувачем кафедри мікробіології Одеського державного університету, членом-кореспондентом АН УРСР В. П. Тульчинською. В листах вони обговорювали сучасні проблеми соляноозерної мікробіології та історію розвитку мікробіологічної науки в Україні і Одеському університеті, зокрема [60].

Помер Л. Й. Рубенчик на дев'яностому році життя 14 грудня 1988 р. після недовготривалої хвороби у м. Києві, похований на Байковому кладовищі.

Таким чином, у житті та науково-педагогічній діяльності члена-кореспондента АН УРСР Л. Й. Рубенчика можна виділити три основних періоди:

— Одеський (1896-1941): з дня народження до евакуації з Одеси. У цей період він одержав середню і вищу освіту, відбувалося становлення його як науковця. Основні наукові проблеми, які розв'язував Л. Й. Рубенчик, стосувалися всебічного вивчення уробактерій, а також процесів утворення лікувальної грязі в одеських лиманах, і методи її відновлення і штучного створення. Великої уваги заслуговують його дослідження з впливу мікроорганізмів на корозію бетонів морських гідротехнічних споруд.

— Період евакуації (1941- 1944): робота у Саратовському університеті та у складі АН України в м. Уфі і м. Москві. Цей період характеризується розв'язанням прикладних мікробіологічних проблем харчового виробництва. Паралельно з цим Л. Й. Рубенчик брав участь у комплексних дослідженнях бальнеологічних ресурсів Башкирії.

— Київський період (1944-1988). Л. Й. Рубенчик вивчає взаємовідношення ґрунтових мікроорганізмів з вищими рослинами, закономірності утворення цими мікроорганізмами біологічно активних речовин (гетероауксинів, вітамінів, ферментів). Значне місце у дослідженнях Л. Й. Рубенчика належить розробці наукових основ виробництва та використання бактеріальних добрив, вивченню екології і фізіології азотфіксуючих мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Александрович В. В., Кузнецов В. О., Стоянова М. А. Науково-педагогічна діяльність Давида Лазаревича Шаміса (1902-1972) // Десята конференція молодих істориків освіти, науки і техніки України. 27 травня 2005, м. Київ: Матеріали конференції. — К., 2005. — С. 3-7.
2. Бабий Т. П., Коханова Л. Л., Костюк Г. Г. и др. Биологи: Биографический словарь. К.: Наукова думка, 1984. — 816 с.
3. Бардах Я. Ю. Жизнь микробов ниже нуля. // Журнал научно-исследовательских кафедр в Одессе. № 10-11, Август-октябрь 1924. Одеса: Изд. Одесского губпрофобра, 1924. — С. 1-5.
4. Одеська Філія Зоолого-Біологічного Інституту // Праці ОДНДЗБІ Вип. 1., Одеса, 1932. — С. 3-6
5. Бельський М. С. Очерки по истории грязелечения в Одессе.-[Белгород-Днестровский], Б. и.,1955. -70 с.
6. Брусиловський Є. М. Короткий історичний нарис організації всеукраїнського інституту бальнеології та курортології в Одесі // Бюлетень № 5-6 Всеукраїнського інституту бальнеології та курортології. Одеса, 1932. — С. 8-15.
7. Дітчук З.І. Вплив брильянтової зелені на деякі мікроби лиманної грязі // Труды Одеського Державного університету. Біологія. Том 3 Одеса, 1938. — С. 27 — 34.



8. Кузнецов В. О., Кузнецова Н. В., Пермітіна В. М. Давид Лазаревич Шаміс (1902-1972) // Професори Одеського (Новоросійського) університету: Біогр. Словник. Т. 4: Р-Я. — 2-е вид., доп. — Одеса: Астропринт, 2005.- С. 405-408.
9. Кузнецов В. О., Тоцький В. М. Одеський державний університет імені І. І. Мечникова в період Великої Вітчизняної війни 1941-1945 рр. // Вісник Одеського національного університету, 2005. — Том 10. — Вип. 3. — Біологія. — С. 175-199.
10. Породко Ф. М., Рубінштейн Д. Л. Короткий звіт про склад і роботу науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі за термін з квітня 1923 до 31 грудня 1926 р. / Вісті науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі. Вип. 1. — Одеса, 1929. — С. 10-12.
11. Породко Ф. М., Рубенчик Л. Й. Звіт про склад і роботу Науково-дослідчої Катедри Біології в м. Одесі за термін з 1 січня 1927 до 31 грудня 1927 р. / Вісті науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі. Вип. 1.- Одеса, 1929. — С. 13-23.
12. Професори Одеського (Новоросійського) університету: Біогр. словник. Т. 4. Р-Я / Відп. ред. В. А. Сминтина. — Одеса: Астропринт, 2000. — 544 с.
13. Рубенчик Б. Л. Воспоминания об отце. К 100-летию со дня рождения. — К.: б. и., 1996. — 24 с.
14. Рубенчик Л. И. О брожении мочевины при температуре ниже нуля. // Журнал научно-исследовательских кафедр в Одессе. № 10-11, Август-октябрь 1924. — Одеса: Изд. Одесского губпрофобра, 1924. — С. 17-26.
15. Рубенчик Л. Й. Використання мікроорганізмів для підвищення врожайності сільськогосподарських рослин. — К.: Вид-во АН УРСР, 1945.- 122 с.
16. Рубенчик Л. И. Сульфатредуцирующие бактерии. — М.: Изд-во АН СССР, 1947. — 96 с.
17. Рубенчик Л. И. Микроорганизмы и микробиальные процессы в соляных водоемах. — К.: Изд-во АН УССР, 1948. — 118 с.
18. Рубенчик Л. И. Микроорганизмы как фактор коррозии бетонов и металлов. К.: Изд-во АН УССР, 1950. - 136 с.
19. Рубенчик Л. И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. К.: Изд-во АН УССР, 1960. — 327 с.
20. Рубенчик Л. И. Микроорганизмы — биологические индикаторы. К.: Наукова думка, 1972. — 163 с.
21. Рубенчик Л. Й., Колкер І.І. Спроба мікробіологічного вивчення бетонів гідротехнічних споруд Одеського порту // Труды Одеського державного університету. Біологія. Том 2. — Одеса, 1937. — С. 163-171.
22. Рубенчик Л. Й., Ройзін М. Б., Білянський Ф. М., Шаміс Д. Л. Денітрифікаційні бактерії Одеських лиманів та Одеської затоки // Труды Одеського державного університету. Біологія. Том 2. — Одеса, 1937. — С. 171-209.
23. Рубенчик Л. Й., Колкер І. І. Мікробіологічні досліди бетонів гідротехнічних споруд в Одеському порту // Труды Одеського державного університету. Біологія. Том 3. — Одеса, 1938. — С. 7-17.
24. Рубенчик Л. Й., Колкер І.І. Azotobacter-подібні бактерії в гязі Одеських лиманів // Труды Одеського Державного університету. Біологія. Том 3. — Одеса, 1938. — С. 19-25.
25. Рубенчик Л. И., Гойхерман Д. Г. Микробиологические основы получения лечебной гязи. // Искусственная лечебная гязь и ее терапевтические свойства / Под ред. Д. Б. Маршалковича — К.: Госмедиздат УССР, 1939. — С. 4- 23

Архівні документи

26. Выписка з наказу № 21 по Інституту мікробіології та вірусології імені академіка Д. К. Заболотного АН УРСР від 12 лютого 1968 р. Оригінал. Машинопис. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28.
27. Выписка из протокола №40/130 Малого заседания Президиума ВУЦИК от 18 декабря 1923 г. Оригінал. Машинопис. / Родинний архів Я. Ю. Бардаха.
28. Выписка из протокола № 41/12 заседания ВАК от 23 декабря 1938 г. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 27. — Арк. 7.
29. Довідка. Механико-технологического учебно-производственного комбината технологи зерна и муки имени И. В. Сталина № 21-01 от 29.04. 1931. Оригінал. Рукопис. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 12.



30. Довідка. Одеський інститут професійної освіти № 1438 від 28.04.1931. Копія нотар. Машинопис. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 10 зв.
31. Довідка. Одеський учебно-производственный комбинат хлебопечения № 18/25 от 17.02.1933. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 16.
32. Довідка. Одесский учебно-производственный комбинат хлебопечения № 18/26 от 17.02.1933. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 17.
33. Докладна записка до ректора КДУ професора В. Г. Бондарчука. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 54. — Арк. 1-1 зв.
34. Дроботько В. Г. Отзыв о научных работах члена-корреспондента АН УССР Л. И. Рубенчика / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28. — Арк. 3-5 зв.
35. Заславский А. С. Мои воспоминания о микробиологической лаборатории Одесского Университета (К столетию со дня рождения профессора Я. Ю. Бардаха). Оригінал. Машинопис, 1957. Особистий архів родини Я. Ю. Бардаха.
36. Исаченко Б. Л. Отзыв о научных работах Л. И. Рубенчика.10.09.1929. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28. — Арк. 1-1зв.
37. Исаченко Б. Л. Отзыв о работах профессора Рубенчика. 09. 07. 1937 г. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28. — Арк. 6 — 6 зв.
38. Командировочное удостоверение Саратовського університету № 962 от 14 июля 1942 г. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 28.
39. Лист Президента ВУАН Д. К. Заболотного до ректора Одеського ІНО Т. М. Внукова. Автограф, 1929. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 49. — Арк. 1а.
40. Наказ № 83 по інституту Мікробіології АН УРСР від 21.05.1941. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 22.
41. Письмо управляющего Башкирским Трестом «РГХ» Санникова Президиуму АН УССР. 28.06.1943. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28. — Арк. 8 — 8 зв.
42. Посвідчення АН УРСР № 86 від 22 лютого 1939 р. про обрання Л. Й. Рубенчика членом-кореспондентом АН УРСР. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 30. — Арк. 1-2.
43. Постановление Совета Министров СССР от 16 апреля 1983 г. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 42. — Арк. 1.
44. Приказ по Саратовському Государственному университету № 396-а от 11 августа 1941 г. Оригінал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 24.
45. Протокол загальних зборів АН УРСР № 49 від 22 лютого 1939 р. Про обрання дійсних членів і член-кореспондентів АН УРСР та поновлення О.І. Лейпунського у складі дійсних членів Академії. Архів Президії НАН України. — Ф. 251. — Оп. 1. — Од. зб. 78. — Арк. 1- 6.
46. Протокол № 24 засідання Президії Академії наук УРСР від 25 жовтня 1939 р. / Архів Президії НАН України. — Ф. 251. — Оп. 1. — Од. зб. 75. — Арк. 138-139.
47. Протокол № 13 засідання Президії Академії наук УРСР від 23 квітня 1941 р. / Архів Президії НАН України. — Ф. 251. — Оп. 1. — Од. зб. 88. — Арк. 168-180.
48. Рубенчик Л. И. Автобиография. Машинопись, 1945. — 1. с. / Рукоп. фонд Наукової бібліотеки ОНУ імені І.І. Мечникова. — Біологи: Р-Я.
49. Рубенчик Л. И. Лист до Г. Я. Бардах, 17.11.1946 р. Рукопис. Оригінал / Родинний архів Я. Ю. Бардаха.
50. Рубенчик Л. И. Анкетные данные. Оригінал. Машинопис, 1952. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 33. — Арк. 3.
51. Рубенчик Л. Й. Лист до О. Я. Бардаха, 10.02.1958 р. Рукопис. Оригінал / Родинний архів Я. Ю. Бардаха.



52. Рубенчик Л. И. Автобиография. Оригинал. Рукопис, 23.06. 1961. / ІА НБУ імені В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 33. — Арк. 4-4 зв.
53. Рубенчик Лев Йосифович. 1972. Машинопис. / ІА НБУ імені В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28. — Арк. 26-31.
54. Сапегин А. А., Исаченко Б. Л., Рубенчик Л. И. Письмо Председателю Президиума Верховного Совета УССР тов. Гречухе от 22.03.1946 г. Копія. Машинопис. — 1 с. / Родинний архів Я. Ю. Бардаха.
55. Свідоцтво № 70 від 30 березня 1929 р. про закінчення ІНО і присвоєння кваліфікації Л. Й. Рубенчику. Оригинал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 25. — Арк. 1.
56. Списки наукового складу Катедр Одеських Інститутів. Машинопис, 1928. Оригинал. / Харківський ЦДАОР. — Ф. НКП УССР 166, — Оп. 15. — Од. зб. 492. — Арк. 1.
57. Списки персонального состава научных и научно-исследовательских учреждений Украины. Машинопись. Оригинал. / Харківський ЦДАОР. — Ф. НКП УССР 166, — Оп. 15. — Од. зб. 675. — Арк. 86.
58. Справка Украинского государственного института курортологии и бальнеологии № Л. С. от 25.01.1939 г. Оригинал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 20.
59. Справка Института микробиологии имени академика Д. К. Заболотного АН УССР. 1961. Копія нотар. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 41.
60. Тульчинська В. П. Лист до Л. Й. Рубенчика. 18.11.1957. Оригинал / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 58. — Арк. 1-3 зв.
61. Удостоверение № 4 ИНУ от 20.01.1919. Оригинал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 25. — Арк. 3.
62. Удостоверение ИНО № 1925 от 20.12.1921 Оригинал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 2.
63. Удостоверение Одесского исполкома Совета рабочих и крестьянских Депутатов № 2337 от 14.02.1921. Оригинал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 1.
64. Удостоверение № 3752 Одесского института народного образования от 23 декабря 1923 г. Оригинал. / ІА НБУ імені В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 25. — Арк. 7.
65. Удостоверение № 3754 Одесского института народного образования от 23 декабря 1922 г. Копія. / ІА НБУ імені В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 25. — Арк. 7 зв.
66. Удостоверение Одесского государственного университета № 11 от 12.07.1941 Оригинал. / ІА НБУ імені В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 23.
67. Удостоверение Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского от 15.08.1941 Оригинал. / ІА НБУ імені В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 26. — Арк. 52.
68. Холодный М. Г. [Відзив на наукові роботи Л. Й. Рубенчика]. Київ. 26.09.1929 Оригинал. / ІА НБУ імені В.І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — Од. зб. 28. — Арк. 2-3.

УДК: 579:923 Рубенчик (477.74)

В. А. Кузнецов

Центр исследований по истории образования, науки и техники на юге Украины
имени В. И. Липского, ул Новаторов, 5-а, Одесса, 65000, Украина,
тел.: 8 (0482) 37 96 73, e-mail: cuznetsov@meta. ua

**ЖИЗНЬ И НАУЧНО-ПЕДАГОГИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ
ЧЛЕНА-КОРРЕСПОНДЕНТА АН УССР Л. И. РУБЕНЧИКА
(03.04.1896 – 14.12.1988)**

Реферат

На основе изучения материалов Архива Президиума НАН Украины, Института архивоведения НБУ имени В. И. Вернадского АН Украины, Государственного Архива Одесской области, личных архивов преподавателей Одесского университета и литературных источников рассмотрены основные события научно-педагогической деятельности члена-корреспондента АН УССР Л. И. Рубенчика.

К л ю ч е в ы е с л о в а : история, микробиология, Л. И. Рубенчик, Одесский университет.

V. A. Kuznetsov

South Ukrainian Education, Science and Technology History Research Centre named
after V. I. Lypsky, Novatorov Str., 5-a, Odesa, Ukraine, 65000,
tel.: 8 (0482) 37 96 73, e-mail: cuznetsov@meta. ua

**THE LIFE AND SCIENTIFIC EDUCATIONAL ACTIVITY OF THE
UKR. SSR ACADEMY OF SCIENCES MEMBER L. J. RUBENCHIK
WERE STUDIED (03.04.1896 – 14.12.1988)**

Summary

This investigation was based on the analyses of the Ukrainian Academy of Sciences Presidium archives, the materials of the Archives Studies Institute of Vernadsky NBU of the Ac. Sc. of Ukraine, Odessa regional state archive, personal achieves of Odessa university teachers staff and various literature sources.

Key words: history, microbiology, L. J. Rubenchik, Odesa University.



III ЛІТНЯ ШКОЛА З МОЛЕКУЛЯРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ

Одеса, 12 – 30 травня, 2008 р.

III SUMMER SCHOOL IN MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY Odesa, may 12 – 30, 2008

На базі кафедри мікробіології і вірусології з 12 по 30 травня 2008 року відбулася III Літня школа з молекулярної мікробіології і біотехнології. Учасники Літньої школи знайомилися з сучасними методами, які застосовуються у наукових дослідженнях і в лабораторній практиці, а також прослухали відповідний лекційний курс (www.opi.edu.ua, рубрика “Літні школи”).

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова спільно з Інститутом мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України та за підтримки Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського вже третій рік поспіль проводить Літню школу з молекулярної мікробіології і біотехнології. Чергова, III Літня школа відбулася з 12 по 30 травня 2008 року на базі кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

До навчань у Літній школі були запрошені молоді вчені та аспіранти з університетів та науково-дослідних інститутів України, які є зацікавленими у впровадженні сучасних молекулярно-біологічних методів дослідження. У цьому році Одеський національний університет приймав учасників з Києва, Львова, Харкова, а також – з наукових закладів Одеси.

Заняття проводили наукові співробітники Інституту мікробіології і вірусології НАН України на чолі з завідувачем відділу молекулярної біології бактеріофагів д. б. н. Ф.І. Товкачем та співробітниками кафедри мікробіології і вірусології ОНУ.

Лекційний курс III Літньої школи був присвячений автономним генетичним елементам бактерій – бактеріофагам, плазмідам і транспозонам, а також окремим аспектам біоінформатики. Програма теоретичного курсу обсягом 30 годин включала такі питання:

Молекулярна генетика і молекулярна мікробіологія. Сучасні наукові концепції в молекулярній мікробіології. Біологічний метроном. Теорія нейтральної еволюції. Адаптивні мутації. Прокаріотно-еукаріотна дихотомія. Сучасні схеми класифікації прокаріотних і еукаріотних мікроорганізмів та вірусів. Домени життя.

Первинна послідовність геномів. Методи встановлення первинної послідовності – сіквенс. Бактеріальна геноміка. Топологія цілісних бактеріальних геномів. Ортологи і паралоги. Кластери ортологічних генів (COG). Концепція «найменшого» геному.



Автономні генетичні елементи бактерій. Інсерційні послідовності, транспозони, системи рестрикції-модифікації, плазмиди, бактеріофаги, острівки і острови патогенності. Ієрархія і мобільність автономних генетичних елементів. Автономні генетичні елементи і виникнення нових патогенних бактерій.

Бактеріальні віруси. Сучасна класифікація бактеріофагів. Фаги з хвостовими відростками — порядок *Caudovirales*. Помірні і вірулентні бактеріофаги. Стратегія розвитку каудовірусів. Віруси бактерій і архебактерій. Фаги ентеробактерій і молочнокислих бактерій. Фаготерапія.

Геноміка профагів і островів патогенності. Фагова лізогенна конверсія. Фагові токсини. Концепція «моронів». Острови патогенності і система секреції ІІІ типу.

Дефектні бактеріофаги і бактеріоцини. Роль в міжбактеріальному антагонізмі. Перспективи використання бактеріоцинів — типування бактерій, біоконтроль бактеріальних популяцій і терапія раку.

Геноміка плазмід. Плазмідні детермінанти патогенності. Вектори на основі плазмід. Молекулярна генетика плазмиди рТі — С58 *Agrobacterium tumifaciens*. Трансгенні рослини.

Бактеріальні транспозони, ІS-елементи, інтегрони і генетичні касети. Формування множинної антибіотикостійкості у бактерій. Концепція внутрішньогеномних перебудов — геномний інженірінг.

Екологія бактеріальних вірусів. Поширення і роль в глобальних обмінах речовин. Нові методи в екології бактеріофагів. Світовий океан і віріопланктон.

Поняття про кластерний аналіз. Вимірювання спорідненості об'єктів. Проблема адекватності мір спорідненості та характеристики спорідненості організмів.

Методи кластерного аналізу. Алгоритми прямої класифікації. Визначення кластерів. Алгоритми розрахунку кластерного аналізу, які застосовуються у біології. Критерії якості класифікації.

Поняття нумеричної таксономії. Ієрархічні алгоритми. Застосування кластерного аналізу в нумеричній таксономії і філогенії.

На практичних заняттях слухачі Літньої школи мали змогу оволодіти методами, які застосовуються у наукових дослідженнях і в лабораторній практиці: методами виділення ДНК, титрування фагів, перенесення плазмід у бактеріальні клітини, проведення полімеразної ланцюгової реакції та іншими. У комп'ютерному класі відвідувачі школи знайомилися з основними програмами, які застосовуються для побудови філограм.

Практичний курс навчання обсягом 90 годин охоплював такі питання:

Лабораторне заняття 1. Фаги порядку *Caudovirales*. Бактеріофаги *Escherichia coli*: T7 (родина *Podoviridae*), лямбда (*Syphoviridae*), P1 і T4 (*Myoviridae*). Класифікація. Морфотипи, організація віріонів. Віріонна ДНК.

Титрування фагів. Фагові бляшки (плаки), їх зв'язок з морфотипом, розміром віріонів та природою вірусів.

Препаративне одержання фагових часток. Метод злитного лізису чутливої культури. Концентрування фагових часток методом ПЕГ-преципітації (процедура Ямамото).

Виділення віріонної ДНК. Правила роботи з ДНК.

Рестрикційний аналіз. Ідентифікація бактеріальних вірусів за рестрикційними патернами їх геномів.

Лабораторне заняття 2. Молекулярна генетика помірного коліфага P1. Загальна і спеціалізована P1-трансдукція генетичних маркерів. Плазмідний профаг. Фагова система рестрикції-модифікації EcoP.



Температурна індукція лізогена *E. coli* C600 [P1:: Tn9 (Cmcts 100)].

Одержання та тестування P1-лізогенів.

Плазмідні профілі лізогенів.

Обмеження продуктивного розвитку бактеріофага лямбда в клітинах *E. coli* (P1) за рахунок R/M системи EcoP1.

Лізогенізація фагом P1:: Tn9 клітин *Erwinia carotovora*.

Інкорпорація транспозона Tn9 в криптичну плазмиду pCA25 *E. carotovora*.

Лабораторне заняття 3. Плазмідні профілі бактерій. Форма і розмір позакромосомних кільцевих ДНК.

Особливості виділення плазмід у грамнегативних бактерій із природних екологічних ніш. Лужний метод Kado і Liu.

Ізоляція плазмідного профага P1 та плазмід ентеробактерій F, RP4, pCA25, pCA25:: Tn9. Електрофоретичне розділення плазмідної ДНК. Залежність електрофоретичної рухливості ДНК від її розміру.

Лабораторне заняття 4. Транскон'югація і трансформація. Створення умов для горизонтального перенесення плазмід в бактеріальні клітини. Мобільність плазмід. Плазмідні вектори.

Транскон'югативні плазмиди. Перенесення плазмиди R68.45 із *E. coli* в *E. carotovora*. Селекція реципієнта і контрелекція донора. Частота транскон'югації.

Одержання кальцій-компетентних клітин. Одержання плазмідної ДНК.

Трансформація *E. coli* DH і JM109 голубими плазмидами pUC 18 і pBluescript. Частота трансформації.

Плазмідні профілі транскон'югантів та трансформантів.

Лабораторне заняття 5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — синтез певного фрагменту ДНК *in vitro*. Різновиди ПЛР. ПЛР-діагностика бактеріального раку винограду: виявлення послідовностей Tі-плазмиди патогенних штамів *Rhizobium radiobacter* і *R. vitis*. Метод “біо-ПЛР” у діагностиці хвороб рослин. Правила роботи у ПЛР-лабораторії.

Виділення плазмідної ДНК методом теплового лізису бактеріальних клітин. Реакційні суміші для проведення ПЛР.

Ампліфікація послідовностей Tі-плазмиди штамів *R. radiobacter* і *R. vitis*.

Електрофорез продуктів ПЛР.

Лабораторне заняття 6. Застосування кластерного аналізу при визначенні родинних зв'язків. Побудова філограм за допомогою комп'ютерних програм.

Множинне вирівнювання як попередній етап при аналізі родинних зв'язків.

Основні пакети програм, які застосовуються у філогенії (програми on-line).

Програма з аналізу первинної послідовності і побудова на її основі філограм(пакет MatLab).

На урочистому закритті учасники школи отримали свідоцтва, які вручали проктор з питань науки ОНУ, професор В. О. Іваниця та доктор біологічних наук, зав. відділом молекулярної біології бактеріофагів Ф.І. Товчак.

IV літня школа з молекулярної мікробіології і біотехнології відбудеться в травні 2009 року в Одесі. Електронна адреса для подачі заявок limty@mail.ru

Н. В. Ліманська



МІЖНАРОДНА НАУКОВА КОНФЕРЕНЦІЯ «ФАГОВА БІОЛОГІЯ, ЕКОЛОГІЯ ТА ТЕРАПІЯ»

INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCES HERALD «PHAGE BIOLOGY, ECOLOGY AND THERAPEUTICS»

Конференція відбулася 12 – 15 червня 2008 року в Інституті бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліави (Тбілісі, Грузія), який є одним із провідних наукових центрів з дослідження вірусів прокариот і розробки методів фаготерапії. Цікаво відзначити, що засновник цього інституту Георгій Еліава розпочинав свою освіту в Одеському (Новоросійському) університеті.

У роботі конференції брали участь більше 100 учених із багатьох країн світу: Азербайджану, Бельгії, Великої Британії, Німеччини, Грузії, Єгипту, Іспанії, Норвегії, Польщі, Росії, США, України, Швейцарії.

Відкрив конференцію та виступив з вітальним словом директор Інституту бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліави Реваз Адамія. Від оргкомітету учасників привітала активний популяризатор фаготерапії Elizabeth Kutter (*Evergreen state College, Olympia, USA*).

Конференцію особисто відвідав Президент Грузії М. Саакашвілі та привітав учасників і організаторів з початком її роботи. Він виявив зацікавлення і свою підтримку в проведенні наукових досліджень, розробці та поширенні фаготерапевтичних методів. М. Саакашвілі поділився спогадами про своїх родичів, які стояли біля витоків вивчення бактеріофагів та розробки методів фаготерапії і працювали в Інституті бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліави.

Конференція складалась з чотирьох пленарних та постерної сесій. На першій сесії «Фагова терапія, профілактика та діагностика в медицині, ветеринарії, та сільському господарстві» було представлено вісім доповідей. Ніна Чанішвілі і Мзія Кутателадзе в своїх доповідях висвітлили досвід Інституту бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліави і внесок колишнього директора Інституту, професора Теймураза Чанішвілі, який рік тому пішов із життя, в фагову терапію та зробили загальний огляд міжнародної наукової діяльності інституту. Були заслухані доповіді Peter W. Taylor «Бактеріофаго-похідні деполімерази капсул як терапевтичний інструмент для лікування бактеріальних інфекцій» (*School of Pharmacy, London, UK*), Richard Sharp «Контроль біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* на моделях in vivo та in vitro за допомогою фагів» (*Health Protection Agency, Porton Down, Solisbury, UK*), Louis-Charles Fortier «Можливості фаготерапії у боротьбі з інфекціями *Clostridium difficile*» (*University of Sherbrooke, Quebec, Canada*), Laurent Debarbieux «Модель просвічування мишей для оцінювання фаготерапії при легеневиких інфекціях» (*Department of Microbiology, Institute of Pasteur, Paris*), Adhya S., Sankar «Системи детекції, що базуються на бактеріофагах» (*National Cancer Institute Bethesda, MD, USA*), Alexander Rakin «Фаги в швидкій /*Yersinia pestis*/ діагностиці» (*Max von Pettenkofer-Institute, Munich, Germany*).



Друга сесія носила назву «Фагова геноміка та протеоміка», на ній були заслухані доповіді Harald Brüssow «Секвенс колифага T4 виділеного в Швейцарії та Бангладеш» (*Nestle Research Center, Nutrition and Health Department/Food and Health Microbiology, Lausanne, Switzerland*), Hans-W. Ackermann «Класифікація хвостатих фагів (за допомогою бластерних інструментів)» (*Felix D'Herelle Reference Center, Laval University, Quebec, Canada*), Sylvain Moineau «Динаміка фаго-хазяйської взаємодії» (*Felix D'Herelle Reference Center, Laval University, Quebec, Canada*), Juan E. Suarez «Фаго-індукуючі віруси вагінального гомеостазу: аналіз лізогенного статусу вагінальних лактобацил та характеристика дефектних профагів» (*Department of Microbiology, Institute of Biotechnology, University of Oviedo, Spain*), Migoshnikov K. «Порівняння геноміки та ем-реконструкція Yua-подібних та Kmv-подібних бактеріофагів *Pseudomonas aeruginosa*» (*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Science, Moscow, Russia*).

Третя сесія мала назву «Екологія фагів». На ній було заслухано доповіді Elizabeth Kutter «Приклади фагових інфекцій *E. coli* і *Pseudomonas* при різних умовах оточуючого середовища» (*Olympia State College, Olympia, Washington, USA*), Marina Tediashvili «Екологічна роль бактеріофагів в морських та прісних водних резервуарах у Грузії» (*G. Eliava Institute of Bacteriophage Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia*), Stephen T. Abedon «Еволюційна екологія фагових бляшок» (*Ohio State University, Ohio, USA*).

Окремо на спеціальній сесії була представлена одна з кращих доповідей на цій конференції Давіда Прангішвілі з яскраво ілюстрованим оглядом «Віруси археобактерій» (*Institute of Pasteur, Paris, France*).

На завершення конференції відбувся круглий стіл на тему «Як зробити фаготерапію всесвітньо доступним медичним підходом?». Серед дискусійних питань були розглянуті такі:

- як здолати труднощі в становленні фаготерапії в західному світі?
- як зробити достовірними клінічні та тваринні дослідження?
- які є нові сфери можливого застосування препаратів бактеріофагів?
- які існують регулюючі вимоги для біотехнологічних індустрій в пострадянських та західних країнах?
- які необхідні заходи для приведення до відповідності різних регулюючих вимог?

Т. В. Іваниця



ИНФОРМАЦИОННОЕ СООБЩЕНИЕ ДЛЯ АВТОРОВ

Научный журнал «Микробиология и биотехнология» приглашает Вас к сотрудничеству по вопросам освещения результатов научных исследований в области микробиологии и биотехнологии.

Программные цели издания: освещение результатов научных исследований в области микробиологии и биотехнологии, объектами которых являются прокариотные (бактерии, археобактерии) и эукариотные (микроскопические грибы, микроскопические водоросли, простейшие) микроорганизмы, вирусы.

Тематическая направленность: микробиология, вирусология, иммунология, молекулярная биотехнология, создание и селекция новых штаммов микроорганизмов, микробные препараты, антимикробные средства, биосенсоры, диагностикумы, микробные технологии в сельском хозяйстве, микробные технологии в пищевой промышленности; защита и оздоровление окружающей среды; получение энергоносителей и новых материалов и т. д.

Язык (языки) издания: украинский, русский, английский.

Рубрики журнала: «Обзорные и теоретические статьи», «Экспериментальные работы», «Дискуссии», «Краткие сообщения», «Хроника научной жизни», «Страницы истории», «Юбилеи и даты», «Рецензии», «Книжная полка».

К статье прилагается заключение экспертной комиссии учреждения о возможности публикации работы в открытых средствах массовой информации, рекомендация учреждений, организаций, где выполнялась работа, за подписью руководителя и письменное согласие руководителей учреждений, организаций, где работают соавторы.

Требования к оформлению статей, предоставляемых в редакцию журнала:

Статья должна отвечать тематической направленности журнала и, согласно п.3 Постановления ВАК Украины от 15.01.2003 г. № 7-05/1, содержать такие структурные элементы: постановка проблемы в общем виде и ее связь с важными научными или практическими задачами; анализ последних достижений и публикаций, в которых заложены основы решения данной проблемы и на которые опирается автор; выделение ранее не решенных частей общей проблемы, которым посвящена статья; формулирование целей статьи (постановка задания); изложение основного материала исследования с полным обоснованием научных результатов; выводы по данному исследованию и перспективы дальнейших поисков в данном направлении.

К публикации принимаются статьи (2 экземпляра) объемом не более 10 страниц (с учетом рисунков, таблиц и подписей к ним, аннотации, реферата, списка литературы), обзоры — до 15 страниц, рецензии — до 3 страниц, краткие сообщения — до 2 страниц.

К рукописи прилагается электронный вариант статьи на диске (Word, шрифт Times New Roman, кегль 14, интервал автоматический, не более 30 строк на странице, поля по 2 см).



При написании статьи нужно соблюдать такой план:

- индекс УДК в левом верхнем углу первой страницы;
- фамилия и инициалы автора (авторов) языком оригинала, место работы каждого автора; полный почтовый адрес учреждения (по международным стандартам); телефон, электронный адрес (e-mail). Фамилии авторов и названия учреждений, где они работают, обозначают одним и тем же цифровым индексом (вверху);
- название статьи большими буквами;
- аннотация с указанием новизны результатов исследования (до 200 слов);
- ключевые слова (не более пяти).

Текст статьи должен включать такие составляющие: вступление; материалы и методы; результаты и их обсуждение; выводы; литература.

К каждому экземпляру статьи прилагается аннотация языком оригинала и рефераты на украинском/русском (в зависимости от языка оригинала статьи), и английском языке (каждый реферат на отдельном листе). Перед словом «реферат» нужно написать фамилии и инициалы авторов, названия учреждений, адреса, полное название статьи на соответствующем языке. После текста реферата с абзаца размещаются ключевые слова.

В конце текста статьи указать фамилии, имена и отчества всех авторов, почтовый адрес, телефон, e-mail (для корреспонденции).

Статья должна быть подписана автором (всеми авторами) с указанием даты на последней странице.

Авторы несут полную ответственность за безупречное языковое оформление текста, особенно за правильную научную терминологию (ее следует сверять со специальными терминологическими словарями).

Латинские биологические названия видов, родов даются курсивом на латинице.

Если часто повторяемые в тексте словосочетания автор считает нужным сократить, то аббревиатуры при первом употреблении обозначают в скобках. Например: полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Ссылки на литературу даются в тексте статьи, цифрами в квадратных скобках, согласно порядковому номеру в списке литературы.

Таблицы должны быть компактными, иметь порядковый номер; графы, колонки должны быть выверены логически и графически. Материал таблиц (как и рисунков) должен быть понятным и не дублировать текст статьи. Цифровой материал таблиц должен быть обработан статистически.

Рисунки выполняются в виде четких чертежей (при помощи компьютерного графического редактора в формате TIF, JRG). Оси координат на графиках должны быть обозначены. Рисунки размещаются в тексте статьи и дублируются отдельным файлом на CD.

Подписи, а также пояснения, примечания к рисункам и надписи к таблицам выполняются на языке оригинала и на английском.

Раздел «Результаты и их обсуждение» должен быть написан кратко: нужно четко изложить выявленные эффекты, показать причинно-следственные связи между ними, сравнить полученную информацию с данными литературы, дать ответ на вопросы, поставленные во вступлении.

Список литературы составляется в алфавитно-хронологическом порядке (вначале кириллица, потом латиница) и располагается в конце статьи. Если первый автор в нескольких работах один и тот же, то работы располагаются в хронологи-



ческом порядке. Список ссылок следует пронумеровать, а в тексте ссылаться на соответствующий номер источника литературы (в квадратных скобках).

В ссылке пишут фамилии всех авторов. В экспериментальных работах должно быть не более 15 ссылок на литературные источники.

Патентные документы размещаются в конце списка ссылок.

Образцы ссылок на литературу

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 журнальные статьи

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

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

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

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

На тезисы докладов

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 депонированные научные работы

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 стандарты

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

На авторефераты диссертаций

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

Датой поступления статьи считается день, когда в редколлегию поступил окончательный вариант текста статьи после рецензирования.

После получения корректуры статьи автор должен исправить только ошибки (четко, синими или черными чернилами зачеркнуть неправильный вариант, и рядом на полях написать правильный) и срочно отослать статью в адрес редколлегии, либо передать свои правки по телефону, по электронной почте.

В случае задержки, редакция, придерживаясь графика, оставляет за собой право сдать корректуру в печать (в производство) без авторских правок.

Подпись автора в конце статьи обозначает, что автор передает редакции свои права на издание статьи. Автор гарантирует, что статья оригинальная; ни сама статья, ни рисунки к ней не были опубликованы в других изданиях.

Непринятые статьи не возвращаются.

Редакция принимает к печати на страницах и на обложке журнала платные рекламные объявления биотехнологического и медицинского направлений; производителей лабораторного оборудования, диагностикумов, реактивов и т. д. для научных исследований.



**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.**

Здано до набору 30.06.2008 р. Підписано до друку 27.07.2008 р.
Формат 70X108/16. Друк офсетний. Обл.-вид. арк. 8,25. Ум.-друк. арк. 8,75.
Тираж 300 прим. Зам. № 0606-4.

Віддруковано з готового оригінал-макету:
СПД Карпенков О.І.
(Свідоцтво ОД № 21 від 20.01.2003 р.)
e-mail: odessaihp@breezein.net
Printed in Ukraine