

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Засновано у липні 2006 року

Виходить 4 рази на рік

№ 3(23)
2013

Одеса
2013

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова
Свідоцтво: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

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

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

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс
Редактори: Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

Tel.: +38 (048) 723-28-39,

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

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

© Odesa National Mechnykov
University, 2013

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

І.В. Горайчук, А.П. Герілович, О.С. Солодянкін, В.І. Болотін РОЗРОБКА РЕКОМБІНАНТНОГО ПОЗИТИВНОГО КОНТРОЛЮ ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І ТА ІІ ТИПУ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ПЛР	6
С.Я. Парижак КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ – НАДПРОДУЦЕНТІВ ФОРМАЛЬДЕГІДРЕДУКТАЗИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ <i>HANSENULA POLYMORPHA</i>	14
М.О. Фоміна ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА НІТРОГЕНУ НА ХІМІЧНЕ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КУПРУМУ ЕКТОМІКОРИЗНИМ ГРИБОМ <i>RHIZOPOGON</i> <i>RUBESCENS</i>	23
А.Г. Мерліч, В.О. Іваниця, Н.В. Коротаєва, М.А. Златогурська, Н.Ю. Васильєва, Д.О. Бабенко, Н.В. Ліманська <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ІЗ ЯГІД ВИНОГРАДУ, ЩО КУЛЬТИВУЄТЬСЯ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ	31
И.Н. Курченко, Е.С. Цыганенко СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСА ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ МИКОТОКСИНОВ ШТАММОВ <i>FUSARIUM</i> <i>ROAE</i> (PESK) WOLLENW. РАЗНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП	40
І.В. Кушкевич ДИСИМІЛЯЦІЙНЕ ВІДНОВЛЕННЯ СУЛЬФАТІВ РІЗНИМИ ШТАМАМИ <i>DESULFOVIBRIO</i> SP. КИШЕЧНИКА ЛЮДИНИ	50
М.Б. Горішний, С.П. Гудзь НАГРОМАДЖЕННЯ БІЛКА У КЛІТИНАХ <i>CHLOROBIVUM LIMICOLA</i> ІМВ К-8 ЗА РІЗНИХ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ОРГАНІЧНОГО ЖИВЛЕННЯ	64
А.К. Велигодська, О.В. Федотов ВМІСТ МЕЛАНІНІВ У БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ ПОРЯДКІВ <i>POLYPORALES</i> ТА <i>AGARICALES</i>	72
І.В. Драгвоз, Н.О. Леонова, Д.А. Жукова, Л.В. Авдєєва ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ШТАМА-АНТАГОНІСТА <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> ІМВ В-7404	84
Н.С. Водзінська, Б.М. Галкін, С.В. Водзінський, Т.О. Філіпова АНТИФАГОВА АКТИВНІСТЬ АСИМЕТРИЧНО-ЗАМІЩЕНИХ ПІРИДИЛПОРФІРИНІВ	94
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	104

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

I.V. Goraichuk, A.P. Gerilovych, O.S. Solodianskin, V.I. Bolotin
DEVELOPMENT OF THE RECOMBINANT POSITIVE CONTROLS
OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS 1 AND 2 FOR PCR ASSAY 6

S.Ya. Paryzhak
CONSTRUCTION OF METHYLOTROPHIC YEAST *HANSENULA*
POLYMORPHA STRAINS OVERPRODUCING FORMALDEHYDE
REDUCTASE 14

M.O. Fomina
NITROGEN SOURCE EFFECT ON COPPER SPECIATION WITHIN
ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *RHIZOPOGON RUBESCENS* 23

**A.G. Merlich, V.O. Ivanytsia, N.V. Korotaeva, M.A. Zlatogurska,
N.Yu. Vasylieva, D.O. Babenko, N.V. Limanska**
LACTOBACILLUS PLANTARUM FROM BERRIES OF GRAPE
CULTIVATED IN THE SOUTH OF UKRAINE 31

I.M. Kurchenko, K.S. Tsyganenko
COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF TRICHOTHECENE
MYCOTOXIN COMPLEX OF *FUSARIUM POAE* (PECK) WOLLENW.
THE STRAINS FROM DIFFERENT TROPHIC GROUPS 40

Ivan V. Kushkevych
DISSIMILATORY SULFATE REDUCTION BY VARIOUS
DESULFOVIBRIO SP. STRAINS OF THE HUMAN INTESTINE 50

M.B. Gorishnyi, S.P. Gudz
ACCUMULATION OF PROTEIN IN *CHLOROBIUM LIMICOLA*
IMB K-8 CELLS 64

A.K. Veligodska, O.V. Fedotov
THE TOTAL MELANINS CONTENT OF BASIDIOMYCETES ORDERS
POLYPORALES AND *AGARICALES* 72

I.V. Dragovoz, N.O. Leonova, D.A. Zhukova, L.V. Avdeeva
EXOMETABOLITES PHYTOSTIMULATION ACTIVITY
OF ANTAGONISTIC ACTIVE STRAIN *BACILLUS*
AMYLOLIQUEFACIENS IMV B-7404 84

N.S. Vodzinska, B.M. Galkin, S.V. Vodzinskii, T.O. Filipova
ANTIPHAGE ACTIVITY OF ASYMMETRICALLY-SUBSTITUTED
PYRIDYLPORPHYRINS 94

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS 108

UDC: 619:616.98:577.2

I.V. Goraichuk, A.P. Gerilovych, O.S. Solodiantkin, V.I. Bolotin

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", 83,
Pushkinska str., Kharkiv, 61023, Ukraine,
tel.: +38 (057) 707 20 31, e-mail: goraichuk@ukr.net

DEVELOPMENT OF THE RECOMBINANT POSITIVE CONTROLS OF BOVINE VIRAL DIARRHEA VIRUS 1 AND 2 FOR PCR ASSAY

Aim. The method of amplifying and cloning the E^{ms} gene of Bovine Viral Diarrhea Virus was developed to obtain the positive controls for polymerase chain reaction.

Methods. The strains used in this study were BVDV-1b (Ossloss) and BVDV-2 (Kosice). Viral RNA was extracted by the silica-based extraction method. Using the specific primers, a part of E^{ms} gene was amplified. The PCR product was inserted into the cloning vector pTZ57R/T. Furthermore, *E. coli* DH10B bacteria were transformed to amplify the recombinant plasmid. Recombinant clones were identified by antibiotic selection on agar plate and confirmed by PCR. Moreover, insert of E^{ms} gene was verified by restriction enzyme digestion assay using *EcoRI* and *HindIII*.

Results. It was shown that we had constructed the recombinant plasmids with insertion E^{ms} gene fragment (826 base pair) of BVDV-1 and BVDV-2.

Conclusion. The obtained recombinant plasmids can be used as a positive control for PCR.

Key words: Bovine Viral Diarrhea Virus, PCR, cloning, pTZ57R/T, restriction enzyme digestion analysis.

Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) is a member of the genus *Pestivirus* within the family *Flaviviridae* [8]. BVDV comprises two species, type 1 (BVDV-1) and type 2 (BVDV-2) [12]. Other representatives of this genus are classical swine fever virus and border disease virus of sheep. All four *Pestivirus* species are closely genetically and antigenically related. Whereas cattle are naturally infected with BVDV-1 and BVDV-2, sheep can be infected by both bovine viruses in addition to BDV, and swine can be infected with all four *Pestivirus* species. [2].

The pestiviral genome consists of a single-stranded positive-sense RNA of about 12.3 kb that contains one open reading frame (ORF) coding for a



polyprotein of about 4000 amino acids [3]. The ORF is at both ends flanked by untranslated regions (UTR) [10]. The nucleocapsid protein C and the glycoproteins E^{rns} , E1, and E2 are structural components of the virion [9]. Both E^{rns} and E2 regions are found on virions [14], induce neutralizing antibodies [7], and elicit protective immunity in their natural host [13]. The considerable amount of E^{rns} is also secreted from the infected culture cells.

BVDV has a significant economic impact on the cattle industry due to abortions, production of weak calves, congenital deformities, respiratory infections, thrombocytopenia, persistent infections, and mucosal disease [5]. The strains of BVDV-1 usually cause only mild diarrhea in cattle that were immunized, whereas some strains of BVDV-2 are highly virulent and cause severe thrombocytopenia and hemorrhage or mucosal inflammation illness [6].

Due to the increase of using cellular biotechnology, the risk of viral contamination of their products rises [1]. For today the control methods for sterility, in particular, eliminate viral contamination of animal origin raw materials and ready preparations are important.

In the study of animal origin raw material for the screening of pestiviruses contamination preferable to use the methods in which there are not used the culture of the viruses as a positive control. The aim of this work was to construct a recombinant plasmid vector including insertion of region E^{rns} gene of BVDV type 1 and 2 for further work on the production of recombinant positive control used in the polymerase chain reaction (PCR) diagnostic of BVDV.

Materials and methods

The samples of dried blood on filter papers contained BVDV-1b (strain Ossloss) and BVDV-2 (strain Kosice) was kindly provided by Prof. Stefan Vilcek (The University of veterinary medicine and pharmacy in Kosice, Slovak republic).

Extraction of RNA from dried blood on filter papers was performed using silica-based extraction method [4]. The second strand cDNA synthesis and amplification was applied using «GenePak RT-PCR Core» and «GenePak PCR Core» (Ltd. Lab. Isogene, Russian Federation) accordingly.

The primer sets P1: 5'-AACAAACATGGTTGGTGCAACTGGT-3' (forward primer) and P2: 5'-CTTACACAGACATATTTGCCTAGGTTCCA-3' (reverse primer) designed by D. Sullivan and R. Akkina et al. [11] were used for PCR amplification of E^{rns} gene. The PCR-amplification was performed with temperature program consisting of initial denaturation (94 °C, 2 min) and 35 cycles of denaturation (94 °C, 1 min), primer annealing (55 °C, 1 min) and primer extension (72 °C, 1 min) in an automatic thermalcycler Biometra T3000. A final step of extension at 72 °C for 10 min. 25 µL of the PCR products were evaluated by gel electrophoresis in 1% agarose gel with ethidium bromide (0.1%).



DNA products were purified from gel using «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» (Fermentas, Lithuania). Eluted DNA products were ligated into the plasmid vector pTZ57R/T as recommended by the supplier («InstAclone PCR Cloning Kit», Fermentas, Lithuania). 10 μL of DNA eluted from one PCR reaction mixture was ligated to 3 μL of TA vector at 4 °C overnight with 1 μL T4 ligase.

DH10B *E. coli* cells were used as the host for cloning experiments with pTZ57R/T vector. Stock culture was maintained at -70 °C in 25% glycerol. All culture was grown in LB broth at 37 °C in shaker incubator. In order to insert recombinant vector into the component cells, «InstAclone PCR Cloning Kit» (Fermentas, Lithuania) was used. Transformed *E. coli* of DH10B strain were grown in LB-Ampicillin agar plates at 37 °C.

Transformed bacterial colonies were screened directly for presence of recombinant plasmids by PCR using primers P1/P2 and M13/pUC_F/R. Plasmids DNA were purification from recombinant *E. coli* culture using «Plasmid Miniprep Kit» (GeneJET, Lithuania). cDNA inserts in plasmids were further characterized by restriction endonuclease digestion with restriction endonucleases *EcoRI* and *HindIII* in reaction buffer B2 (Jena Bioscience, Germany). For confirming 2 μL 10x buffer B2, 14 μL dH₂O, 2 μL product and 2 μL of restriction enzymes were mixed and incubated at 37 °C for 16 h. Further the inactivation was conducted by incubating at 65 °C for 20 min. The results were checked by electrophoresis in a 1.5% agarose gel.

Results and discussion

As the first step of our study the viral RNA from 2 samples of dried blood on filter papers was used as a template for cDNA synthesis using reverse transcription followed by specific amplification by the polymerase chain reaction. The PCR product was checked by agarose gel electrophoresis followed extraction from gel (fig. 1). In gel electrophoresis the specific bands were observed at the position corresponding of Erns gene 826 bp in length.

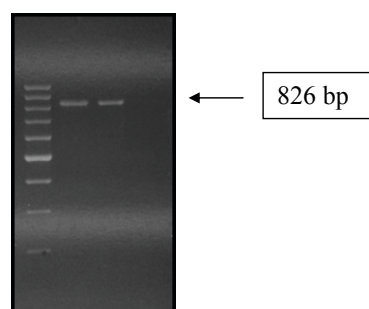


Fig. 1. Electrophoregram of PCR amplified product using the primers P1/P2:
M – the DNA marker
(100 bp DNA Ladder, Ltd. Lab. Isogene, Russian Federation);
1 – BVDV 1; 2 – BVDV 2; 3 – negative control.

The resulting PCR product was inserted into the corresponding site of cloning vector pTZ57R/T. The constructed plasmids pTZ57R/T-VD1 and pTZ57R/T-VD2 (fig. 2) had fragment of insert *E^{rns}* gene and providing resistance to ampicillin beta-lactamase gene (*bla*(Ap^R)), nucleotide complementary to primer M13/pUC sequence provided the selection of bacterial cells containing recombinant plasmids.

Two recombinant plasmids were transformed into the cells of *E. coli* DH10B. Screening of plasmids containing *E. coli* clones was performed in selective medium with adding of ampicillin. For eliminating the artifact DNA structures there were conducted PCR screening of all colonies with acquired resistance to ampicillin.

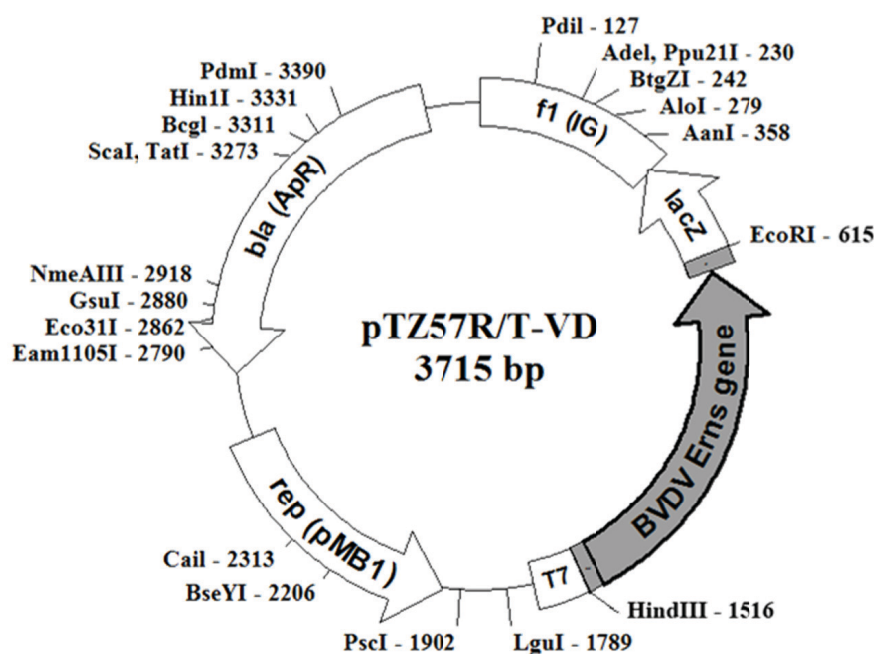


Fig. 2. Restriction site map of the pTZ57R/T cloning vector [15] with insertion of *E^{rns}*

Therefore during amplification of a target gene using the primers P1/P2 and M13/pUC_F/R there were obtained the clones of *E. coli* containing plasmids with predetermined insert (fig. 3).

The presence of target gene in four recombinant clones were further confirmed by restriction enzyme digestion assay using restriction endonuclease enzymes EcoRI and HindIII cut plasmids in relative restriction sites. According to the results of electrophoregram there were observed the presence of two fragments of expected length – 2814 and 901 bp (fig. 4).

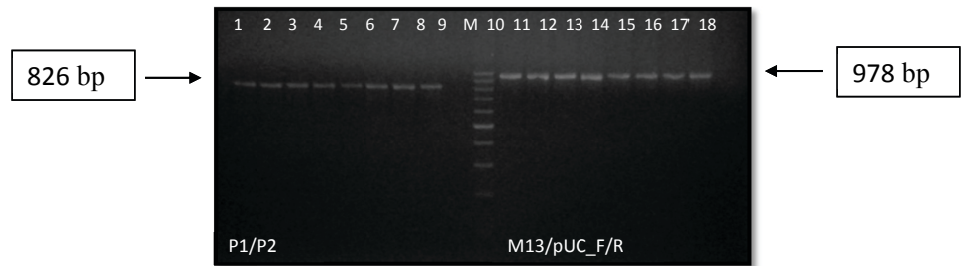


Fig. 3. Electrophoregram of PCR amplified product of target gene using the primers P1/P2 and M13/pUC_F/R:
 1–4, 10–13 – recombinant colonies with insertion of Erns gene from BVDV-1;
 5–8, 14–17 – recombinant colonies with insertion of Erns gene from BVDV-2;
 9, 18 – negative control; M – the DNA marker
 (100 bp DNA Ladder, Ltd. Lab, Isogene, Russian Federation).

The culture of *E. coli* cells including the recombinant plasmids with insertion fragment of the E^{rns} gene was obtained. The plasmids can be used as the positive controls for BVDV detection by PCR method.

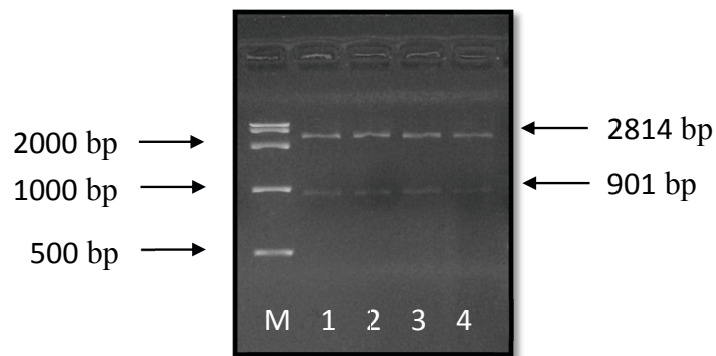


Fig. 4. Electrophoregram of the plasmids pTZ57R/T-VD after restriction enzyme digests:
 1–2 – recombinant colonies with insertion of Erns gene from BVDV-1;
 3–4 – recombinant colonies with insertion of Erns gene from BVDV-2;
 M – the DNA marker (FastRuler High Range DNA Ladder, Fermentas, Lithuania).

The authors express appreciation to Prof. Stefan Vilcek (The University of veterinary medicine and pharmacy in Kosice, Slovak republic) for kindly providing the samples of BVDV-1b (strain Ossloss) and BVDV-2 (strain Kosice).

The authors are grateful to Swiss National Science Foundation for support of this study in the frames of the project SCOPES (NF number IZ730Z0_128050: Epidemiology of BVD in Ukraine: Development of the control program), from 2011 to 2012.

І.В. Горайчук, А.П. Герілович, О.С. Солодянкін, В.І. Болотін

Національний науковий центр «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини», вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023, Україна, тел.: +38 (057) 707 20 31, e-mail: goraichuk@ukr.net

РОЗРОБКА РЕКОМБІНАНТНОГО ПОЗИТИВНОГО КОНТРОЛЮ ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ І ТА ІІ ТИПУ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В ПЛР

Реферат

Мета. Розробка методу ампліфікації та клонування гену E^{rns} вірусу діареї великої рогатої худоби з метою отримання позитивного контролю для полімеразної ланцюгової реакції. **Методи.** У роботі були використані віруси діареї (ВД) ВРХ I типу штаму Ossloss та II типу штаму Kosice. Вірусну РНК екстрагували за допомогою методу афінної сорбції. Ампліфікацію ділянки гену E^{rns} здійснювали з використанням специфічних праймерів. ПЛР-продукт був інтегрований до вектору для клонування рTZ57R/T. Для напрацювання рекомбінантних плазмід проводили трансформацію клітин бактерії *E. coli* DH10B. Плазмідвмісні клони виявляли за допомогою селективного поживного середовища, вставку — методом ПЛР. Наявність вставки гена E^{rns} підтверджували за допомогою рестрикційного аналізу з використанням рестриктаз EcoRI та HindIII. **Результати.** В ході проведених досліджень були сконструйовані рекомбінантні плазмід, які несуть вставку фрагменту гену E^{rns} (826 пар нуклеотидів) збудників ВД ВРХ I та II типів. **Висновки.** Отримані рекомбінантні плазмід можуть використані як позитивний контроль для ПЛР.

Ключові слова: вірусна діарея великої рогатої худоби, ПЛР, клонування, рTZ57R/T, рестрикційний аналіз.

И.В. Горайчук, А.П. Герілович, А.С. Солодянкин, В.И. Болотин

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», ул. Пушкинская, 83, Харьков, 61023, Украина, тел.: +38 (057) 707 20 31, e-mail: goraichuk@ukr.net

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА I И II ТИПА ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ПЦР

Реферат

Цель. Разработка метода амплификации и клонирования гена E^{rns} вируса диареи крупного рогатого скота с целью получения положительного контроля для полимеразной цепной реакции. **Методы.** В работе использованы вирусы диареи (ВД) КРС I типа штамм Ossloss и II типа штамм Kosice. Вирусную РНК экстрагировали с помощью метода аффин-



ной сорбции. Амплификацию участка гена *E^{rns}* осуществляли с использованием специфических праймеров. ПЦР-продукт был интегрирован в вектор для клонирования рTZ57R/T. Для накопления рекомбинантных плазмид проводили трансформацию клеток бактерии *E. coli* DH10B. Плазмидсодержащие клоны выявляли с помощью селективной питательной среды, наличие вставки — методом ПЦР. Присутствие вставки гена *E^{rns}* подтверждали с использованием рестрикционного анализа с помощью рестриктаз *EcoRI* и *HindIII*. **Результаты.** В ходе проведенных исследований сконструированы рекомбинантные плазмиды, содержащие вставки фрагмента гена *E^{rns}* (826 пар нуклеотидов) возбудителей ВД КРС I и II типов. **Выводы.** Полученные рекомбинантные плазмиды могут быть использованы в качестве положительного контроля для ПЦР.

К л ю ч е в ы е с л о в а: вирусная диарея крупного рогатого скота, ПЦР, клонирование, рTZ57R/T, рестрикционный анализ.

REFERENCES

1. *Герілович А.П.* Застосування методу полімеразної ланцюгової реакції в системі контролювання контамінації сторонніми вірусами і мікоплазмами культур клітин та ветеринарних імунобіологічних препаратів // *Ветеринарна біотехнологія*. — 2008. — Бюл. № 13. — С. 333–339.
2. *Baxi M., McRae D., Baxi S. et al.* A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses // *Veterinary Microbiology*. — 2006. — 116. — P. 37–44.
3. *Behera S.P., Mishra N., Vilcek S. et al.* Genetic and antigenic characterization of bovine viral diarrhoea virus type 2 isolated from cattle in India // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* — 2011. — 34, N 2. — P. 189–196.
4. *Boom R., Sol C., Salimans M. et al.* Rapid and simple methods for purification of nucleic acids // *Journal of Clinical Microbiology*. — 1990. — 28, N 3. — P. 495–503.
5. *Booth R.E., Brownlie J.* Establishing a pilot bovine viral diarrhoea virus eradication scheme in Somerset // *Vet. Rec.* — 2012. — 170, N 3. — P. 73–80.
6. *Carman S., van Dreumel T., Ridpath J. et al.* Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995 // *J. Vet. Diagn. Invest.* — 1998. — 10. — P. 27–35.
7. *Donis R.O., Corapi W., Dubovi E.J.* Neutralizing monoclonal antibodies to bovine viral diarrhoea virus bind to the 56K to 58K glycoprotein // *J. Gen. Virol.* — 1988. — 69. — P. 77–86.
8. *Heinz F., Collett M., Purcell R. et al.* Family Flaviviridae. Virus taxonomy // *Abstract of 7th International Committee for the Taxonomy of Viruses, San Diego, USA, 2000.* — P. 859–878.



9. *Krey T., Thiel H.-J., Rumenapf T.* Acid-Resistant Bovine Pestivirus Requires Activation for pH-Triggered Fusion during Entry // *J. Virol.* — 2005. — 79, N 7. — P. 4191–4200.

10. *Meyers G., Thiel H.J.* Molecular characterization of pestiviruses // *Adv. Vir. Res.* — 1996. — 47. — P. 53–118.

11. *Sullivan D.G., Akkina R.K.* A nested polymerase chain reaction assay to differentiate pestiviruses // *Virus Res.* — 1995. — 38, N 3–8. — P. 231–239.

12. *Thiel H.J., Collett M.S., Gould E.A. et al.* Flaviviridae: Virus taxonomy // Abstract of 8th International Committee on Taxonomy of Viruses, Amsterdam, Elsevier-Academic Press. — 2005. — P. 981–998.

13. *Weiland E., Stark R., Haas B. et al.* Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer // *J. Virol.* — 1990. — 64. — P. 3563–3569.

14. *Weiland F., Weiland E., Unger G. et al.* Localization of pestiviral proteins Erns and E2 at the cell surface and on isolated particles // *J. Gen. Virol.* — 1999. — 80. — P. 1157–1165.

15. *Thermo Scientific pTZ57R Plasmid Map* — Access mode: <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/pTZ57R-map.pdf>

Стаття надійшла до редакції 19.06.2013 р.



С.Я. Парижак

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
вул. Пекарська, 69 (Шімзерів, 1), Львів, 79010, Україна,
тел.: +38 (032) 275 49 66, e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ – НАДПРОДУЦЕНТІВ ФОРМАЛЬДЕГІДРЕДУКТАЗИ ТЕРМОТОЛЕРАНТНИХ МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ *HANSENULA* *POLYMORPHA*

Метою даної роботи було отримати рекомбінантні штами термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* надпродуцентів формальдегідредуктази (ФР), які можуть мати біоаналітичне використання. **Методи.** Дріжджі вироцивали на синтетичному середовищі Беркгольдера (СБ) з наступним складом (у г/л): KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; зі стандартною кількістю мікроелементів та 0,05% (в/о) дріжджового екстракту. Джерелом вуглецю слугували 1% глюкоза (в/о) або 1% метанол (по об'єму). Загальні активності ферментів у безклітинних екстрактах визначали спектрофотометрично (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм за швидкістю утворення NADH – для алкогольдегідрогенази (АДГ) чи утилізації NADH – для ФР, при кімнатній (20–25 °С) температурі. Питому активність (ПА) для кожного ферменту (в мкмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ білка) розраховували за формулою: $\text{ПА} = \text{ПА}_{+\text{субстрат}} - \text{ПА}_{-\text{субстрат}}$, яка враховує неспецифічні фонові реакції. **Результати.** Сконструйовано плазмиду експресії p21Sc21, що містить ген *ADH1 Saccharomyces cerevisiae*, під контролем сильного конститутивного промотора гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAP1*) *H. polymorpha*. Дріжджові клітини *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*) трансформували методом електропорації. Відбір інтегрантів проводили за резистентністю до зеоцину. Наявність у геномі трансформантів рекомбінантної плазмиди, що містить ген *ADH1 S. cerevisiae*, перевіряли за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). **Висновки.** Рекомбінантні штами характеризувались в 4–6 разів вищою активністю АДГ та в 2–3 рази вищою активністю ФР в безклітинних екстрактах порівняно з вихідним штамом. Стабільні трансформанти виявились резистентними до підвищених концентрацій формальдегіду (до 10 мМ) у ростовому метанольному середовищі.

Ключові слова: формальдегідредуктаза, метилотрофні дріжджі *Hansenula polymorpha*, формальдегід, генно-інженерне конструювання.



Формальдегід (ФА) є універсальним природним метаболітом живих організмів і водночас дуже токсичною сполукою, у зв'язку з чим вивчення шляхів підтримання концентрації ФА в клітинах на безпечному рівні та детоксикації екзогенного ФА має важливе прикладне значення [7, 10].

Метилотрофні дріжджі можуть служити зручною моделлю для вивчення механізмів утилізації ФА, оскільки здатність до метаболізму одновуглецевих сполук є унікальною рисою цих нижчих еукаріотних організмів [11, 12]. У детоксикації ФА у дріжджів беруть участь певні ізоферменти алкогольдегідрогенази (АДГ). У пекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* відомо 7 структурних генів даного ферменту: *ADH1–ADH7* [3, 6]. Продукт *Adh1p* – цитозольний ізофермент АДГ, який каталізує НАДН-залежне відновлення ацетальдегіду до етанолу і ФА до метанолу без участі глутатіону: $CH_2O + NADH(H^+) \rightarrow CH_3OH + NAD^+$ [5]. Цю реакцію, зворотно до дегідрогеназної, називають у випадку ФА, як субстрату, формальдегідредуктазною. Ізофермент АДГ *Adh1p* у *S. cerevisiae* гомологічний формальдегідредуктазі (ФР) метилотрофних дріжджів [2].

Метою роботи було сконструювати та охарактеризувати продуценти формальдегідредуктази на основі термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам NCYC 495 (*leu1-1*) термотолерантних метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* з колекції Інституту біології клітини НАН України; штам *S. cerevisiae* BY4742 (*MATaleu2-ΔOlys2-ΔOura3-ΔOhis3-ΔI*) люб'язно наданий д-ром Д. Беком (ун-т м. Балтімор, США); *Escherichia coli* DH5α (штам для конструювання та селекції рекомбінантних плазмід *φ80d lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(r_K⁻, m_K⁺), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*).

Плазміди, використані в роботі: pBluescriptIIKS⁺ (2,9 т.п.н.) вектор загального призначення *E. coli* (*ori ColE1, Ap^R, lacZ'*); p21 (7,9 т.п.н.) вектор експресії у *H. polymorpha* з *GAP* промотором та *Zeo^R*, який забезпечує селекцію у дріжджах, сконструйований співробітницею Інституту біології клітини НАН України О. Ішук; pBlSc6 (4 т.п.н.) похідна pBluescriptIIKS⁺ з клонованим геном *ADH1 S. cerevisiae*; p21Sc21 (9,1 т.п.н.) похідна p21 з клонованим геном *ADH1 S. cerevisiae*. Дві останні (pBlSc6 та p21Sc21) було отримано в ході роботи.

Дріжджі вирощували на синтетичному середовищі Беркгольдера (СБ) з наступним мінеральним складом (у г/л): KH_2PO_4 – 1; $(NH_4)_2SO_4$ – 3,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; $CaCl_2$ – 0,1. Залізо вносили у середовище у вигляді солі Мора в концентрації 0,2 мг/л, зі стандартною кількістю мікроелементів та 0,05% (в/о) дріжджового екстракту [2]. Джерелом вуглецю слугували 1% глюкоза (в/о) або 1% метанол (по об'єму). До середовища при необхідності додавали лейцин – до концентрації 40 мг/л. Агаризовані середовища містили 2% агару. Культури дріжджів вирощували у термо-



статах на чашках Петрі при температурі 30 °С. Культивування дріжджів в рідких середовищах здійснювали у пробірках або колбах об'ємом 250 мл на круговому шейкері (200 об/хв) за температури 30 °С (за 37 °С для термотолерантних штамів *H. polymorpha*). Оптичну густину дріжджових культур вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП, і, використовуючи калібрувальну криву, визначали їх суху біомасу в 1 мл середовища.

Безклітинні екстракти для визначення активності ферментів отримували як описано в роботі [1]. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі. Загальні активності ферментів у свіжих безклітинних екстрактах визначали спектрофотометрично (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм за швидкістю утворення НАДН — для АДГ чи утилізації НАДН — для ФР [2]. Питому активність (ПА) для кожного ферменту (в мкмоль · хв⁻¹ · мг⁻¹ білка) розраховували за формулою: $PA = PA_{+субстрат} - PA_{-субстрат}$, яка враховує неспецифічні фонові реакції.

Методи культивування бактерій *E. coli* та молекулярно-генетичні методи описані в [9]. Виділення сумарної ДНК з клітин дріжджів *H. polymorpha* та *S. cerevisiae* проводили за допомогою набору Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ендонуклеази рестрикції та лігазу використовували згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали на ампліфікаторі Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), з використанням Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) відповідно до інструкції виробника. Трансформацію дріжджових клітин проводили методом електропорації [4].

Результати та їх обговорення

Для підвищення виходу ФР із клітин метилотрофних дріжджів, було вирішено провести генно-інженерне конструювання штаму, здатного до надекспресії гена *ADH1*, який кодує ФР. Відомо, що продукт гена *ADH1* *S. cerevisiae* крім дегідрогеназних властивостей, володіє редуктазними, тому нами було вирішено клонувати даний ген для надекспресії у геномі дріжджів *H. polymorpha*. З метою конструювання плазмиди експресії, що містить ген *ADH1*, за допомогою ПЛР, використовуючи сконструйовані праймери (ScFor5' - (ATCATATGTCATCCAGAAACTCAA-3')/ScRev(5' - AGCGGCCGCATG

CCG GTAGAGGTGT-3') і хромосомну ДНК *S. cerevisiae* BY 4742 як матрицю ми ампліфікували відкриту рамку зчитування гена *ADH1* *S. cerevisiae*. Для полегшення ПЛР, хромосомну ДНК розщеплювали ферментом *Xba*I. Отриманий фрагмент величиною 1,2 т.п.н. клонували в плазмиду рBluescriptIIKS⁺ за допомогою T/A клонування. Як результат, отримано плазмиду рBlSc6. На наступному етапі роботи ген *ADH1* *S. cerevisiae*, фланкований сайтами рестрикції *Nde*I і *Not*I, субклонували у плазмиду інтегративного типу р21 під сильний конститутивний промотор



тор гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (*GAP1*) *H. polymorpha*. Плазмід р21 містить доміантний маркер стійкості до зеоцину *Zeo^R*, який забезпечує селекцію у дріжджах та ген *LEU2* *S. cerevisiae* як додатковий селективний маркер для ауксотрофного за лейцином штаму *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Одержану плазмід було названо р21ADH1Sc (рис. 1) [8]. Рестрикційний аналіз її підтвердив, що нами субклоновано фрагмент, який містить ген *ADH1* *S. cerevisiae*.

Для конструювання та ампліфікації плазмід на всіх етапах роботи було використано штам *E. coli* DH5α.

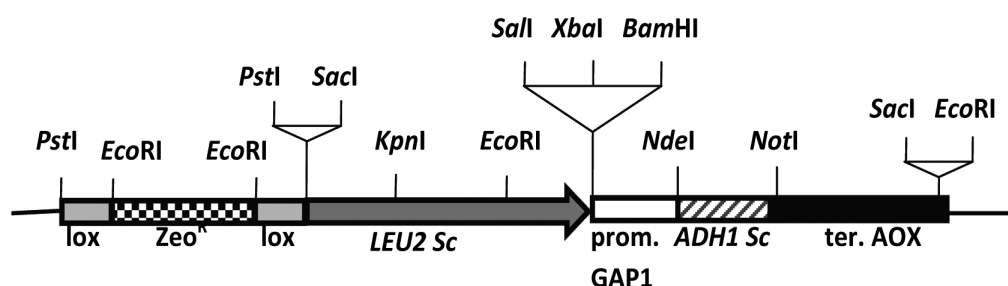


Рис. 1. Лінійна схема плазмід р21Sc21 (9,1 т.п.н.).

Фрагмент ДНК *S. cerevisiae*, що несе ген *LEU2*, позначено товстою сірою стрілкою; *GAP1* промотор *H. polymorpha* позначено незабарвленим відрізком; термінатор *AOX* *H. polymorpha* позначено товстим чорним відрізком; ген *ADH1* *S. cerevisiae* – товстою смугастою лінією; ген резистентності до зеоцину – товстою пунктирною лінією; *loxP* послідовності – товстими світло-сірими відрізками. Сайти рестрикції: *PstI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *NdeI*, *NotI*, *SacI*.

Fig. 1. Linear scheme of plasmid p21Sc21 (9.1 kb).

S. cerevisiae DNA fragment containing gene *LEU2* is marked as a thick grey arrow; promoter *GAP1* *H. polymorpha* gene is marked as a white segment; terminator *AOX* *H. polymorpha* as a thick black line segment; gene *ADH1* *S. cerevisiae* as a thick striped line; gene of resistance to zeocine as a thick dotted line; *loxP* sequences as thick light grey lines. Restriction sites: *PstI*, *EcoRI*, *KpnI*, *SalI*, *XbaI*, *BamHI*, *NdeI*, *NotI*, *SacI*.

Сконструювану плазмід експресії р21ADH1Sc лінеаризували рестриктазою *BamHI* та трансформували за допомогою електропорації у штам *H. polymorpha* NCYC 495 (*leu1-1*). Відбір трансформантів/інтегрантів проводили за резистентністю до зеоцину (за концентрації 150 мкг/мл) та відновленням лейцинової прототрофності. Середня ефективність трансформації становила $1,5 \times 10^3$ (число *Zeo^R*-трансформантів/мкг ДНК).

Відібрані штами стабілізували шляхом культивування в неселективних умовах протягом восьми-десяти генерацій з подальшим перенесенням на середовище з зеоцином. Наявність у геномі трансформантів рекомбінатної плазмід, що містить ген *ADH1* *S. cerevisiae*, тестували за допомогою ПЛР. За використання праймерів ScFor/ScRev і хромосомної ДНК стабільних трансформантів як матриці, отримано фрагмент очікуваної величини (~1,2 т.п.н.) (рис. 2).

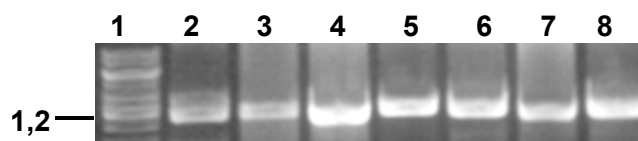


Рис. 2. Електрофореграми ПЛР-аналізу трансформантів штаму *H. polymorpha leu1-1* плазмідом р21Sc21.

Доріжки: 1 – ДНК фага λ розщеплена рестриктазою *PstI* ($\lambda/PstI$) (розмір фрагмента подано в т.п.н.), 2–7 – трансформанти, 8 – позитивний контроль (хромосомна ДНК *S. cerevisiae* BY4742).

Fig. 2. Electrophoresis of the PCR assay of *H. polymorpha leu1-1* transformants with the plasmid р21Sc21.

Lines: 1 – DNA of phage λ digested with *PstI* ($\lambda/PstI$) (the fragment value is expressed in kb), 2–7 are transformants, 8 – positive control (chromosomal DNA of *S. cerevisiae* BY4742).

Інтегранти, що містили цю рекомбінантну конструкцію, вивчали на резистентність до ФА. Дослідили ріст вихідного штаму *H. polymorpha leu1-1* та його трансформантів у ростовому метанольному середовищі з концентраціями ФА 5, 8 та 10 мМ. Виявилось, що при інкубації дріжджів у присутності ФА протягом 3 діб ростова біомаса трансформантів була в 2 рази більшою, ніж вихідного штаму. Найбільша різниця в біомасі спостерігалась при 8 мМ і 10 мМ ФА.

Щоб переконатися, що підвищена резистентність до ФА зумовлена активністю ФР, отримані трансформанти і вихідний штам вирощували на середовищі з 1% глюкозою (Glc) та ФА. У присутності Glc синтез НАД⁺ і глутатіон-залежної формальдегіддегідрогенази, якій належить основна роль у дисиміляції і детоксикації ФА у дріжджів, є репресований, тому детоксикація ФА здійснюється за іншим механізмом. Ймовірно, саме за участю ФР, яка каталізує відновлення ФА до менш токсичного метанолу. Як видно з рис. 3, отримані трансформанти за таких умов вирощування виявилися більш резистентними до ФА.

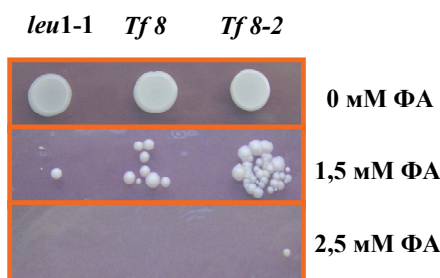


Рис. 3. Резистентність вихідного штаму *H. polymorpha leu1-1* і трансформантів (*Tf 8* та *Tf 8-2*) до ФА при рості на середовищі з 1% Glc (наносили по 4 мкл суспензії з A_{540} 0,27).

Fig. 3. Resistance of parental strain *H. polymorpha leu1-1* and transformants (*Tf 8* and *Tf 8-2*) growing in the medium with 1% Glc (add 4 μ l of suspension with A_{540} 0,27) to FA.

Відібрані рекомбінантні штами характеризувались в 4–6 разів вищою активністю АДГ та в 2–3 рази вищою активністю ФР в безклітинних екстрактах порівняно з реципієнтним штамом *H. polymorpha leu1-1*. Активності АДГ та ФР у інтегрантів зростали синхронно, але не в однаковій мірі (рис. 4).

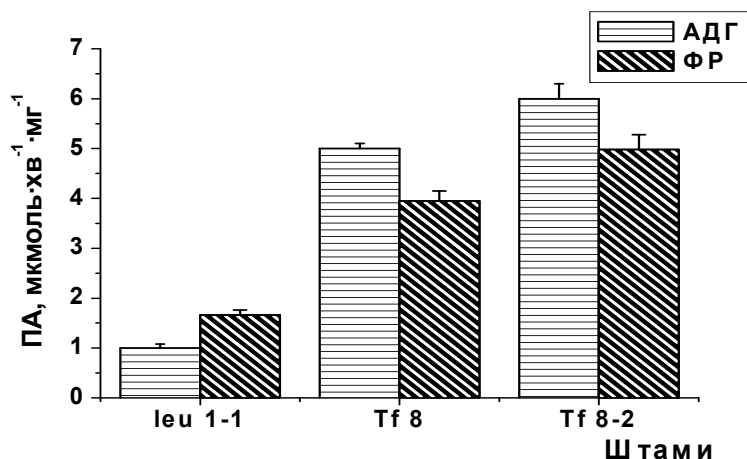


Рис. 4. Питомі активності АДГ і ФР в безклітинних екстрактах штамів *H. polymorpha leu1-1* та його трансформантів *Tf 8*, *Tf 8-2*, вирощених на середовищі з 1% Glc.

Fig. 4. Activities of ADH and FR in the cell-free extracts of *H. polymorpha leu1-1* and its transformants *Tf 8*, *Tf 8-2* strains, grown in the medium with 1% Glc.

У результаті виконання роботи отримано рекомбінантні штами термотолерантних метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* з підвищеною продукцією формальдегідредуктази. Показано, що одержані трансформанти, резистентні до підвищених концентрацій формальдегіду — до 10 мМ. Сконструйовані штами є перспективними організмами для біоремедіації, для використання в цілях аналітичної біотехнології, а також можуть служити джерелом виділення та очистки ФР та АДГ.

Автор висловлює подяку канд. біол. наук Ю.В. Ребцю за допомогу у проведенні експериментальної частини роботи, а також проф. М.В. Гончару за забезпечення фінансової підтримки даної роботи.

УДК 579.222:577.152.1:577.218:661.727.1

С.Я. Парижак

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,
ул. Пекарская, 69 (Шимзеров, 1), Львов, 79010, Украина,
тел.: +38 (032) 275 49 66, e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММОВ – СВЕРХПРОДУЦЕНТОВ ФОРМАЛЬДЕГИДРЕДУКТАЗЫ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *HANSENULA POLYMORPHA*

Реферат

Целью данной работы было получить рекомбинантные штаммы термотолерантных метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* сверхпродуцентов формальдегидредуктазы (ФР), которые могут иметь биоаналитическое использование. **Методы.** Дрожжи выращивали на синтетической среде Беркхольдера следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1; со стандартным содержанием микроэлементов и 0,05% (в/о) дрожжевого экстракта. Источником углерода служили 1% (в/о) глюкоза или 1% метанол (по объему). Активности ферментов в бесклеточных экстрактах определяли спектрофотометрически (Shimadzu-UV-1650) при 340 нм по скорости образования НАДН – для алкогольдегидрогеназы (АДГ) – или его потребления для формальдегидредуктазы (ФР), при комнатной (20–25 °С) температуре. Активность (А) для каждого фермента (в $\mu\text{моль} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка) вычисляли по формуле: $A = A_{+\text{субстрат}} - A_{-\text{субстрат}}$, учитывающей неспецифические фоновые реакции. **Результаты.** Сконструирована плазида экспрессии p21Sc21, содержащая ген ADH1 *Saccharomyces cerevisiae*, под контролем сильного конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAP1) *H. polymorpha*. Дрожжевые клетки *H. polymorpha* NCYC 495 (leu1-1) трансформировали методом электропорации. Отбор интегрантов осуществляли по устойчивости к зеоцину. Наличие в геноме трансформантов рекомбинантной плазмиды, содержащей ген ADH1 *S. cerevisiae*, проверяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). **Выводы.** Рекомбинантные штаммы характеризовались в 4–6 раз высшей активностью алкогольдегидрогеназы (АДГ) и в 2–3 раза высшей активностью формальдегидредуктазы в бесклеточных экстрактах по сравнению с исходным штаммом. Стабильные трансформанты оказались резистентными к повышенным концентрациям формальдегида (до 10 мМ) в ростовой метанольной среде.

Ключевые слова: формальдегидредуктаза, метилотрофные дрожжи *Hansenula polymorpha*, формальдегид, генно-инженерное конструирование.



UDC 579.222:577.152.1:577.218:661.727.1

S.Ya. Paryzhak

Lviv Danylo Halytsky National Medical University,
69, Pekarska str. (1, Shimzeriv str.), Lviv, 79010, Ukraine, tel.: +38 (032)275 49 66,
e-mail: sola_paryzhak@yahoo.com

CONSTRUCTION OF METHYLOTROPHIC YEAST *HANSENULA POLYMORPHA* STRAINS OVERPRODUCING FORMALDEHYDE REDUCTASE

Summary

The aim of the presented work was to obtain recombinant strains of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* overproducing formaldehyde reductase (FR) which could be used bioanalytically. **Methods.** The yeast cells were grown in a synthetic Burkholder medium containing the following (g/l): KH_2PO_4 – 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; CaCl_2 – 0.1; with the standard content of trace elements and 0.05% (wt/vol) yeast extract. 1% (wt/vol) glucose or 1% methanol (vol/vol) served as the sources of carbon. Enzyme activities in the cell-free extracts were determined by spectrophotometry (Shimadzu-UV-1650) at 340 nm by the rates of NADH formation for alcohol dehydrogenase (ADH), or NADH uptake for formaldehyde reductase (FR) at room temperature (20–25 °C). The activity (A) for each enzyme (in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) was calculated by the formula: $A = A_{+\text{substrate}} - A_{-\text{substrate}}$, taking into account the nonspecific background reactions. **Results.** We constructed the expression plasmid p21ADH1Sc contained ADH1 *Saccharomyces cerevisiae* gene under the strong constitutive promoter of the *H. polymorpha glyceralddehyde* 3-phosphate dehydrogenase gene (GAP1). *H. polymorpha* NCYC 495 (leu1-1) yeast cells were transformed by electroporation. Selection of the integrants was carried out in accordance with their resistance to zeocine. Presence of the recombinant plasmid, containing the ADH1 *S. cerevisiae* gene, in genome of transformants was checked using polymerase chain reaction (PCR). **Conclusions.** Recombinant strains were characterized by 4–6 times higher activity of alcohol dehydrogenase (ADH) and 2–3 times higher activity of FR in cell-free extracts, compared to the parental strain. Stable transformants have elevated resistance to formaldehyde (up to 10 mM) in methanol containing medium.

Key words: formaldehyde reductase, methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, formaldehyde, gene-based construction.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Демків О.М., Парижак С.Я., Красовська О.С., Стасик О.В., Гайда Г.З., Сибірний А.А., Гончар М.В. Конструювання штамів — над-продуцентів формальдегіддегідрогенази метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, № 6. — С. 525—530.
2. Демків О.М., Парижак С.Я., Ищук Е.П., Гайда Г.З. Гончар М.В. Активности ферментов катаболізма формальдегіда у рекомбинантних штаммов *Hansenula polymorpha* // Мікробіологія. — 2011. — Т. 80, № 3. — С. 301—307.
3. De Smidt O., du Preez J.C., Albertyn J. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review // FEMS Yeast Res. — 2008. — 8, № 7. — P. 967—978.
4. Faber K.N., Haima P., Harder W., Veenhuis M., Geert A.B. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* // Curr. Genet. — 1994. — 25. — P. 305—310.
5. Grey M., Schmidt M., Brendel M. Overexpression of *ADH1* confers hyper-resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* // Curr. Genet. — 1996. — 29. — P. 437—440.
6. Leskovic V., Trivic S., Pericin D. The three Zinc-containing alcohol dehydrogenases from baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Yeast Res. — 2002. — 2. — P. 481—494.
7. Lu K., Collins L.B., Ru H., Bermudez E., Swenberg J.A. Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia // Toxicol. Sci. — 2010. — 116. — P. 441—451.
8. Paryzhak S., Shchoholeva M., Rebets Y., Gonchar M. Construction of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* strains overproducing formaldehyde reductase // 12th International Congress on Yeasts (Kyiv, 11-15 August, 2008). — Kyiv, 2008. — P. 269.
9. Sambrook J., Russell D.W. Molecular cloning, a laboratory manual. — 3rd ed. — Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, 2001. — 450 p.
10. Tang X., Bai Y., Duong A., Smith M.T., Li L., Zhang L. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects // Environment. International. — 2009. — 35, № 8. — P. 1210—1224.
11. Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism // Chemical Record. — 2005. — 5, № 6. — P. 367—37.
12. Yurimoto H., Oku M., Sakai Y. Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis [Electronic resource] // Int. J. Microbiol. — 2011. — Online article available at: <http://dx.doi.org/10.1155/2011/101298>.

Стаття надійшла до редакції 15.07.2013 р.



M.O. Fomina

Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ. Zabolotny str., Kyiv GSP,
D03143, Ukraine tel.: +38 (044) 526 92 16, e-mail: M.Fomina@ukr.net

NITROGEN SOURCE EFFECT ON COPPER SPECIATION WITHIN ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *RHIZOPOGON RUBESCENS*

Aim. The aim of this work was to study the effects of nitrogen source on the speciation of copper accumulated by fungi and ectomycorrhizas grown in the presence of copper phosphate. **Materials and Methods.** Ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon rubescens* and its symbiotic ectomycorrhizal association with Scots Pine were grown in the presence of copper phosphate at different nitrogen sources: either ammonium or nitrate. The coordination of copper released from copper phosphate and bioaccumulated by fungus and ectomycorrhiza was determined by using synchrotron-based X-ray absorption spectroscopy (XAS). **Results.** XAS data showed that the change of nitrogen source from ammonium to nitrate was shifting copper coordination by mixed oxygen ligands towards oxalate coordination of copper. **Conclusions.** It was found that the conditions of growth of fungi and mycorrhizas may change the nature of ligands available for sequestering toxic metals and coordination of copper within ectomycorrhizal fungus *R. rubescens* and its symbiotic association with pine roots depended on nitrogen source. **Key words:** fungi, ectomycorrhiza, copper phosphate, nitrogen, metal speciation, bioaccumulation, X-ray absorption spectroscopy.

The ability of fungi to create mutualistic symbiotic associations with plant roots (mycorrhizas) has major consequences for the biogeochemical cycling of elements [7, 11, 13]. Mycorrhizal fungi solubilize phosphate and essential metals for the host plant in the course of so called “heterotrophic leaching” as a result of protonation, chelation and metal accumulation by the biomass [1, 5, 13]. It has been previously shown that mycorrhizal fungi were able to solubilize various toxic metal phosphate minerals resulted in releasing mobile toxic metals into environment and their bioaccumulation by fungi and mycorrhizas [2, 4].

Copper is one of the most common pollutants of the terrestrial environments. It has been reported that soluble fraction of copper in sludge-amended soils found almost exclusively in low molecular weight complexes with amino acids, small peptides or polycarboxylic acids is a major contributor to copper mobility and bioavailability threatening lower trophic levels of the food chain. Fungi can play a significant role in copper transformations and



many soil fungi were able to withstand copper toxicity in heavily contaminated soils (500–11.500 mg Cu/kg soil) [3–5]. Nearly 60–70% of tested mycorrhizal fungal cultures tolerated copper phosphate and cuprite with more than half of them being able to solubilize copper phosphate and over 40% of them solubilizing cuprite [4].

Because of the amorphous state or poor crystallinity of metal complexes within biomass and relatively low metal concentrations, the determination of metal speciation in biological systems remains a challenging problem with only a few studies on fungal biomass that mainly clarify the nature of adsorption sites on cell walls [6]. However, synchrotron-based X-ray absorption spectroscopy (XAS) provides the means for studying element complexation in environmental samples varying from biological to mineralogical in nature and is increasingly used to study biological systems giving information about the oxidation state of the target element and its coordination environment, including the number and identity of neighbouring atoms [9, 12].

The aim of this study was to elucidate the effect of nitrogen source on copper speciation by fungal and ectomycorrhizal biomass using X-ray absorption spectroscopy.

Materials and methods

Biomass used in present work was ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon rubescens* B32ö in axenic culture and its ectomycorrhizal associations with Scots pine (*Pinus sylvestris*). Fungus and ectomycorrhiza were exposed to copper phosphate [$\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] at a final metal concentration equivalent to 15mM. Axenic culture of fungus was grown at 23–25 °C in sterile Petri-dish microcosms on top of cellophane membranes on modified Melin-Norkrans medium for mycorrhizal fungi (MMN) [4] and harvested after 2 months.

Formation of ectomycorrhiza was carried out under sterile conditions using a test tube technique in autoclaved (120 °C, 60 min) glass tubes filled with 30 ml vermiculite and peat mixture 5:1 and 10 ml of Ingestad medium [13].

After successful colonization, uniform pine seedlings were carefully taken out from the tubes, washed with sterile water and transferred into sterile square Petri dishes mesocosms. Square Petri dishes were filled with Ingestad agar amended with copper phosphate to a final metal concentration equivalent to 15mM. The roots of mycorrhizal seedlings were placed over sterile cellophane membrane on top of the agar medium. The upper cellophane membrane and an autoclaved piece of foam, soaked in sterile water, were placed on top of the roots to prevent them from desiccation and to fix the position of the root system. The shoot was kept outside by



means of a hole in the side of the plastic dish and sealed around the stem with sterile lanolin.

Mesocosms were incubated for at least 3 months in the growth chamber with $200 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ PAR, at least 60% relative air humidity and at day/night regime of 18/6 h and a temperature of 23/15 °C. In the experiments with axenic fungal cultures and the *R. rubescens*/*P. sylvestris* associations we also used a nitrate-only version of MMN and Ingestad media substituting KNO_3 ($0.8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ and $17.34 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) for $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and NH_4NO_3 , respectively.

Freshly harvested biomass, enclosed in cello tape and quenched in liquid nitrogen, was used for X-ray absorption spectrometry.

XAS investigates atomic local structure and electronic states by measuring absorption of the electromagnetic radiation by electrons as a function of energy, and is usually performed at synchrotron radiation sources (SRS), provided intense and tunable X-ray beams.

X-ray absorption spectra at Cu K-edges were collected on Station 7.1 at the CCLRC Daresbury SRS operating at 2 GeV with average current of 140 mA, using a vertically collimating plane mirror and a sagittally bent focussing Si(111) double crystal monochromator detuned to 80% transmission to minimize harmonic contamination. Sample data were collected with the station operating in fluorescence mode using a 9-element solid state Ge diode detector with high count-rate XPRESS processing electronics. The monochromator was calibrated using a 5 mm Cu foil. The experiments were performed using a liquid nitrogen cooled cryostat. Single scans were collected for the model compounds, and 3–4 scans were collected and summed for each sample. Background-subtracted EXAFS spectra (Extended X-ray Absorption Fine Structure) were analysed in EXCURV98 using full curved wave theory. Fourier transformation of EXAFS spectra were used to obtain an approximate radial distribution function around the central metal (Cu – the absorber atom): the peaks of Fourier transformations can be related to the “shells” of surrounding back scattering atoms characterised by atom type, number of atoms in the shell, the absorber-scatterer distance, and the Debye-Waller factor ($2\sigma^2$). The data were fitted for each sample by defining the theoretical model and comparing the calculated EXAFS spectrum with the experimental data. The shells of backscatterers were added around the absorber and by refining an energy correction E_f (the Fermi energy), the absorber-scatterer distance, and Debye-Waller factor for each shell, a least squares residual (the *R*-factor was minimised). Where appropriate, multiple scattering effects were included in the fits.

Results and discussion

In the present study, all tested samples of fungal and ectomycorrhizal biomass grown in the presence of copper phosphate showed Cu coordination with oxygen ligands (tab. 1). The effect of nitrogen source on the coordination of accumulated copper was examined for both ectomycorrhizal



Table 1. Cu K-edge EXAFS parameters*.

Sample	Scatterers	r / E	2 σ^2 / E ²	Residual
Biomass of axenic <i>R. rubescens</i> exposed to copper phosphate:				
Grown on nitrate MMN agar medium	4 x O	1.96	0.012	29.8
	2 x O	2.31	0.022	
	4 x C	2.72	0.019	
	2 x Cu	3.82	0.039	
Grown on ammonium MMN agar medium	4 x O	1.94	0.013	27.1
	2 x O	2.37	0.037	
Biomass of <i>R. rubescens</i>/<i>P. sylvestris</i> ectomycorrhizas exposed to copper phosphate:				
Grown on nitrate Ingestad agar medium	4 x O	1.99	0.021	27.2
	2 x O	2.39	0.028	
	4 x C	2.78	0.006	
	2 x Cu	3.79	0.028	
Grown on ammonium Ingestad agar medium	4 x O	1.94	0.012	33.7
	2 x O	2.42	0.054	
	2 x Cu	3.79	0.034	

* r is the copper–scatterer distance in Angstroms (± 0.02 E inner shells, ± 0.05 E outer shells). $2\sigma^2$ is the Debye–Waller type factor ($\pm 15\%$ inner shells, $\pm 30\%$ outer shells). Residual is a least squares residual from fitting the spectrum of the model to the experimental data

fungus *R. rubescens* in axenic culture and in its mycorrhizal association with Scots pine (tab. 1, fig. 1). The nitrogen source is a factor that can affect organic acid production by fungi with nitrate considerably increasing oxalate excretion [10, 14]. Biomass of both axenic *R. rubescens* and its ectomycorrhizal association grown on nitrate and copper phosphate gave the best fit to the inner shell with a coordination shell of 4 oxygens bound to the copper at a distance of 1.96 E and two oxygens bound at 2.31 E. This is a typical distortion from perfect octahedral symmetry for a six-coordinate copper (II) centre, and is known as a Jahn-Teller distortion [8]. The EXAFS contributing to two further peaks in the Fourier transform were best fitted with 4 carbons at 2.72 E and 2 coppers at 3.82 E, showing carboxylate coordination close to oxalate (tab. 1, fig. 1 d, h).

If ammonium was used as a nitrogen source, the best fit to the inner shell was with a Jahn-Teller distorted coordination shell of 4 oxygens at 1.94 E and two oxygens at 2.42 E. There was a small outer shell best fitted with two coppers at 3.79 E. However, attempts to fit phosphorus atoms at 3.1 E (phosphate) or carbon atoms at 2.7 E (oxalate/carboxylic acid) did not improve the fit (tab. 1, fig. 1). For other samples of biomass grown on ammonium-containing medium, the fit with carbons was slightly better and more consistent with oxalate coordination than with phosphate, but was not conclusive probably indicating mixed carboxylate/phosphate coordination of copper.



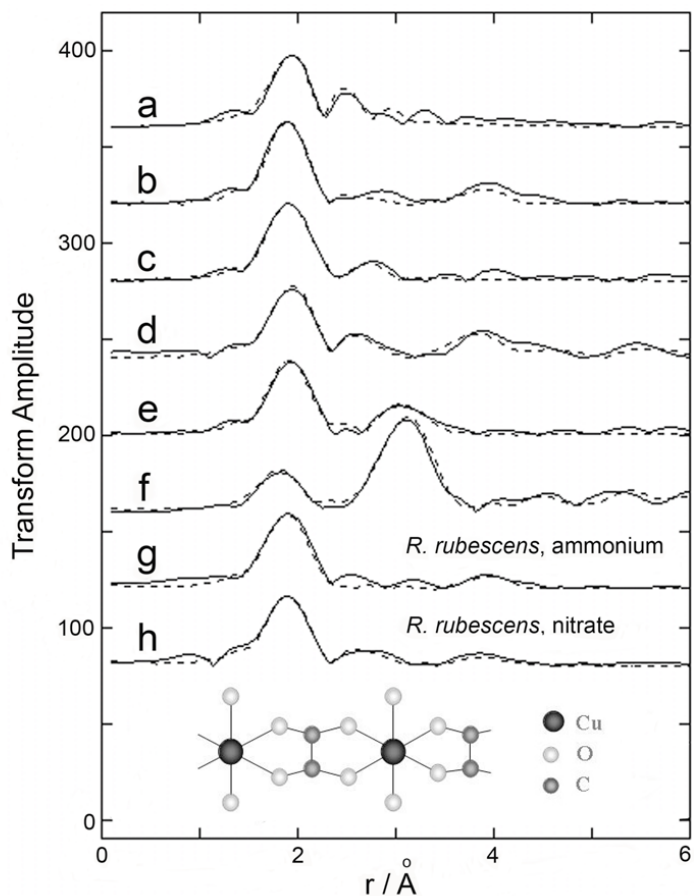


Fig. 1. Copper coordination within fungal biomass: Fourier transforms of Cu K-edge XANES, EXAFS (solid lines) and fits (broken lines) for standard compounds (a) Cu(acetate), (b) Cu(gluconate), (c) Cu(malate), (d) Cu(oxalate), (e) Cu(phosphate), and (f) Cu(I)oxide. Samples are *R. rubescens* exposed to copper phosphate grown on MMN agar medium with (g) ammonium or (h) nitrate. Insert: model of Cu oxalate coordination within biomass of *R. rubescens* grown on media containing nitrate.

Thus, the conditions of growth in both *in vitro* and *ex vitro* may change the nature of ligands provided by fungal and mycorrhizal biomass. The change of nitrogen source from ammonium to nitrate may increase the proportion of oxalate excretion and subsequently shift towards oxalate coordination of toxic metal (copper) within fungal and mycorrhizal biomass.

The author would like to acknowledge the funding of CCLRC Daresbury SRS user grants 40107, 43079, and personally Prof Geoffrey M. Gadd (University of Dundee, UK) for the opportunity to do this work, Prof Hekan Wallander (Lund University, Sweden) for providing the fungal strain and Dr John Charnock (University of Manchester, UK) for his valuable help with EXAFS spectra analysis.

УДК [602:4:631.466:661.63-034.3]:631.416.1

М.О. Фоміна

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 92 16, e-mail: M.Fomina@ukr.net

ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА НІТРОГЕНУ НА ХІМІЧНЕ ЗВ'ЯЗУВАННЯ КУПРУМУ ЕКТОМІКОРИЗНИМ ГРИБОМ *RHIZOPOGON* *RUBESCENS*

Реферат

Мета. Метою цієї роботи було вивчення дії джерела нітрогену на зв'язування купруму, біоакумульованого грибами та ектомікоризою, що були вирощені у присутності фосфату купруму. **Матеріали і методи.** Ектомікоризний гриб *Rhizopogon rubescens* та його симбіотична ектомікоризна асоціація з сосною звичайною були вирощені у присутності фосфату купруму на різних джерелах нітрогену: амонію або нітраті. Координація купруму, звільненого з фосфату купруму та біоакумульованого грибом та ектомікоризою, визначалась з використанням синхротронної рентгено-абсорбційної спектроскопії (ХАС). **Результати.** Дані ХАС показали, що переміна джерела нітрогену з амонію на нітрат змінювала координацію купруму неоднорідними оксиген-вмісними лігандами на оксалатну. **Висновок.** Встановлено, що умови зростання гриба та мікоризи можуть змінювати природу лігандів, наявних для зв'язування токсичних металів. Координація купруму в ектомікоризному грибі *R. rubescens* та в його симбіотичній асоціації з коренями сосни залежала від джерела нітрогену.

Ключові слова: гриби, ектомікориза, фосфат купруму, нітроген, хімічне зв'язування металу, біоаккумуляція, рентгено-абсорбційна спектроскопія.

УДК [602:4:631.466:661.63-034.3]:631.416.1

М.А. Фомина

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154,
Київ ДСП, Д03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 92 16, e-mail: M.Fomina@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА АЗОТА НА ХИМИЧЕСКОЕ СВЯЗЫВАНИЕ МЕДИ ЭКТОМИКОРИЗНЫМ ГРИБОМ *RHIZOPOGON* *RUBESCENS*

Реферат

Цель. Целью данной работы было изучение действия источника азота на связывание меди, биоаккумулированной грибами и эктомикоризой, которые были выращены в присутствии фосфата меди. **Материалы и методы.** Эктомикоризный гриб *Rhizopogon rubescens* и его симбиотичес-



кая эктомикоризная ассоциация с сосной обыкновенной выращивались в присутствии фосфата меди на различных источниках азота: аммонии или нитрате. Координация меди, освобождённой из фосфата меди и биоаккумуляированной грибом и эктомикоризой, определялась с использованием синхротронной рентгено-абсорбционной спектроскопии (XAS). **Результаты.** Данные XAS показали, что перемена источника азота с аммония на нитрат изменяла координацию меди смешанными кислородосодержащими лигандами на оксалатную. **Вывод.** Установлено, что условия роста гриба и микоризы могут изменять природу лигандов, доступных для связывания токсичных металлов. Координация меди в эктомикоризном грибе *R. rubescens* и его симбиотической ассоциации с корнями сосны зависела от источника азота.

Ключевые слова: грибы, эктомикориза, фосфат меди, азот, химическое связывание металла, биоаккумуляция, рентгено-абсорбционная спектроскопия.

REFERENCES

1. *Burford E.P., Fomina M., Gadd G.M.* Fungal involvement in bio-weathering and biotransformation of rocks and minerals // *Mineral. Mag.* — 2003. — 67. — P. 1127–1155.
2. *Fomina M.A., Alexander I.J., Hillier S., Gadd G.M.* Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi // *Geomicrobiol. J.* - 2004. — 21. — P. 351–366.
3. *Fomina M., Burford E.P., Gadd G.M.* Toxic metals and fungal communities // *The Fungal Community. Its Organization and Role in the Ecosystem* / Dighton J., White J.F., Oudemans, P. (eds). — Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2005. — P. 733–758.
4. *Fomina M.A., Alexander I.J., Colpaert J.V., Gadd, G.M.* Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi // *Soil. Biol. Biochem.* — 2005. — 37. — P. 851–866.
5. *Fomina M., Hillier S., Charnock J.M., Melville K., Alexander I.J., Gadd G.M.* Role of oxalic acid over-excretion in toxic metal mineral transformations by *Beauveria caledonica* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — 71. — P. 371–381.
6. *Fourest E., Serre A., Roux J.C.* Contribution of carboxylic groups to heavy metal binding sites in fungal cell walls // *Toxicol. Environ. Chem.* — 1996. — 54. — P. 1–10.
7. *Gadd, G.M., Fomina, M., and Burford, E.P.* Fungal roles and functions in rock, mineral and soil transformations // *Micro-organisms and Earth Systems — Advances in Geomicrobiology* / Gadd G.M., Semple K.T., Lappin-Scott H.M. (eds.). - Cambridge: Cambridge University Press, 2005. — P. 201–232.
8. *Greenwood N.N., Earnshaw A.* Chemistry of the Elements. — Oxford: Pergamon Press, 1984. — 1087 p.



9. *Kemner K.M., O'Loughlin E.J., Kelly S.D., Boyanov M.I.* Synchrotron X-ray investigations of mineral-microbe-metal interactions // *Elements*. – 2005. – 1. – P. 217–221.

10. *Lapeyrie F., Ranger J., Vairelles D.* Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro* // *Can. J. Bot.* – 1991. – 69. – P. 342–346.

11. *Meharg A.A., Cairney J.W.G.* Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments // *Adv. Ecol. Res.* – 2000. – 30. – P. 69–112.

12. *Sarret G., Schroeder W.H., Marcus M.A., Geoffroy N., Manceau A.* Localization and speciation of Zn in mycorrhized roots by μ SXRF and μ EXAFS // *J. Phys. IV France*. – 2003. – 107. – P. 1193–1196.

13. *Smith S.E., Read D.J.* Mycorrhizal Symbiosis. - London: Academic Press, 1997. – 605 p.

14. *Whitelaw M.A., Harden T.J., Helyar K.R.* Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum* // *Soil Biol. Biochem.* – 1999/ – 31. – P. 655–665.

Стаття надійшла до редакції 20.05.2013 р.



UDK 579.25

A.G. Merlich, V.O. Ivanytsia, N.V. Korotaeva, M.A. Zlatogurska,
N.Yu. Vasylieva, D.O. Babenko, N.V. Limanska

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

LACTOBACILLUS PLANTARUM FROM BERRIES OF GRAPE CULTIVATED IN THE SOUTH OF UKRAINE

The **aim** of the investigation was the isolation of *Lactobacillus plantarum* from berries of grape and the study of their genetic diversity. **Materials and Methods.** Lactic acid bacteria were isolated from berries of 14 grape cultivars grown in the south of Ukraine. PCR-assay and RAPD-PCR were used for *L. plantarum* identification and the study of their diversity. The reconstruction of phylogenetic tree of the studied strains was carried out with Matlab 7.0 program. **Results.** Lactobacilli have been isolated from 7 samples of must among 14 of the tested grape cultivars. 80% of the studied strains belonged to *L. plantarum* species. Groups of genetic similarity between *L. plantarum* strains have been revealed. In the phylogenetic tree four clusters of the strains grouped by their similarity were formed. The mentioned results allowed to **conclude** that *L. plantarum* strains from must of grape of different cultivars and territories of grape cultivation could show the genetic similarity. Opposite, some *L. plantarum* strains from one source of origin could demonstrate the genetic diversity.

Key words: lactic acid bacteria, grape must, RAPD-PCR.

Lactic acid bacteria of *Lactobacillus* genus inhabit various biotopes, including plant surfaces, where they survive as the representatives of epiphytic microbiota and can be characterized by the genetic diversity [3; 9; 13; 15]. Insects fed on flowering grape are the important source of berry colonization [6]. Bacteria of *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* genera have been revealed in gut of bees and wasps [11]. *L. plantarum* and *Oenococcus oeni* from the surfaces of grape berries cause malolactic fermentation in wine and in cases of uncontrolled fermentation they are responsible for “grape diseases”. Usually malolactic fermentation begins in two-four weeks after the end of alcohol fermentation [2]. One of the consequences of this process is less acidity that occurs as a result of decarboxylation of malic acid to lactic acid. The controlled process of malolactic fermentation is desirable in wine-making, especially for acid wines, because it gives them

© A.G. Merlich, V.O. Ivanytsia, N.V. Korotaeva, M.A. Zlatogurska, N.Yu. Vasylieva,
D.O. Babenko, N.V. Limanska, 2013



more soft taste. For controlled malolactic fermentation, bacteria *Oenococcus oeni* are used as starter cultures. In case of using lactobacilli, there is a risk of their rapid growth resulting in non-desirable taste of wine [7].

The aim of the investigation was the isolation of *Lactobacillus plantarum* from grape must and the study of their genetic diversity.

Materials and Methods

Must from berries of 14 grape cultivars grown in the south of Ukraine in 2011-2012 (Pinot noir, Chardonnay, Riesling, Cardinal, Kishmish, Moldova, Dnistrovskiy rozhevyi, Kesh, Vostorg, Odesa souvenir, Lidia, Isabella, Cabernet Sauvignon and Muscat Hamburg) was incubated under the room temperature (18–20 °C) for the natural fermentation process. The isolation of lactobacilli from grape must was carried out on 2–28th days of fermentation. The quantity of lactobacilli (CFU/ml) in must was evaluated by inoculating MRS agar with serial dilutions of must, incubation at 30 °C and counting the grown colonies [8]. All the inoculations have been carried out in 5 repeats.

The colonies with the typical for lactic acid bacteria morphology have been selected for the standard tests revealing their belonging to *Lactobacillus* genus. The next identification of *Lactobacillus plantarum* was carried out by the polymerase chain reaction (PCR) [5]. DNA was isolated by the heat lysis method in modification of Szegedi and Bottka (2002) [14]. PCR mixture contained 0.8 µl of Mg⁺⁺ (50 mM, AmpliSens, Russia), 2.0 µl of dNTP (4 mM each, SibEnzyme, Russia), 1.0 µl of each primer (10 pmol), and 0.4 µl of Taq-polymerase (5 U/µl) (Primetech, Belorussia) in a standard PCR buffer (10x) (Taq-polymerase buffer, SibEnzyme, Russia).

The genus specific primers LbLMA-1/R-161 to the sequence of 16S rRNA: 5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3' and 5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT TCA-3' were used [5]. For identification of *Lactobacillus plantarum* species the specific primers to gene *recA* of *L. plantarum* – planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3') and pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') were used [15]. The parameters of amplification were the next: 94 °C – 3 min for the initial denaturation, after 30 cycles at 94 °C – 30 s, 55 °C – 10 s, 72 °C – 30 s, and final elongation at 72°C for 5 min [5]. PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel using TBE buffer with ethidium bromide (AmpliSens, Russia). Markers of molecular weight – pUC19 DNA/MspI 110, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 b.p.; Lambda DNA/EcoRI+HindIII 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 b.p. (Fermentas, Lithuania) were used.

The control strains *L. plantarum* UCM B-2709 and *L. plantarum* UCM B-2694 from the Collection of Microorganisms of Zabolotny Institute of Microbiology and Virology were kindly provided by Professor Kovalenko N.K.

RAPD-PCR were carried out with *L. plantarum* strains isolated from must and from the control reference strains *L. plantarum* UCM B-2709 and *L. plantarum* UCM B-2694.



The mixture for RAPD-PCR contained the next components: 1.0 μl of a primer M13 (10 pmol), 0.8 μl of Mg^{++} (50 mM, AmpliSens, Russia), 2.0 μl of dNTP (4 mM of each, SibEnzyme, Russia), and 0.4 μl of Taq-polymerase (5 U/ μl) (Primetech, Belorussia) in a standart PCR-buffer (10x) (Taq-polymerase buffer, SibEnzyme, Russia). Amplification was carried by the parameters described in Ben Omar et al. (2008). PCR-products were analyzed in 1% agarose gel using TAE buffer (40 V, 4 hours). Gels were photographed with GelDoc system (BioRad, USA).

The reconstruction of phylogenetic tree of the studied strains was carried out with Matlab 7.0 program. Cluster analysis based on Spearman's correlation coefficient for measuring the distance between the objects and the method of Ward for constructing a hierarchical tree of binary clusters were used.

Results and Discussion

Lactobacilli were isolated from 7 samples of must among 14 tested grape cultivars. The quantity of lactobacilli increased at the end of the 4th week of fermentation (Table 1).

Table 1

Concentration of bacteria from *Lactobacillus* genus in grape must

Grape cultivar	Year of investigation	Place of grapevine cultivation	Day of must fermentation	Concentration of lactobacilli, CFU/ml
Chardonnay	2011	Odesa	2	$(4,3 \pm 2,8) \times 10^3$
			3	$(4,5 \pm 1,4) \times 10^3$
			28	$(2,3 \pm 1,6) \times 10^4$
Lidia	2011	Odesa	2	$(2,3 \pm 1,8) \times 10^3$
			3	$(4,3 \pm 1,7) \times 10^4$
	2012	Odesa	4	$(1,2 \pm 0,5) \times 10^5$
Pinot noir	2011	Odesa	2	$(2,4 \pm 1,6) \times 10^4$
			3	$(4,2 \pm 2,6) \times 10^4$
			28	$(4,3 \pm 1,6) \times 10^4$
Isabella	2011	Odesa	3	$(4,8 \pm 2,6) \times 10^4$
Moldova	2011	Odesa	3	$(4,3 \pm 2,3) \times 10^2$
Dnistrovskiyi rozhevyi	2012	Kiliya district, Odesa region	12	$(3,7 \pm 3,6) \times 10^5$
Cardinal	2012	Odesa	12	$(4,1 \pm 1,2) \times 10^5$



As it is known from the literature, after some period of time individual for every certain wine material, cells survived after ethanol fermentation, start to multiply. Non desirable multiplication of such microorganisms could happen in vines with pH higher than 3.5 [2]. Under the conditions of low pH, lactic acid bacteria die rapidly, but when pH is higher than 3.5, they can continue to multiply and in concentrations 10^6 – 10^8 cause the spoilage of wines [2, 4]. In our experiment, fermentation of wine was uncontrolled and carried out under the conditions that favor the proliferation of lactic acid bacteria in must (temperature 18–20 °C, absence of anaerobic conditions necessary for ethanol fermentation).

The isolated strains of lactobacilli were first identified by morphological and biochemical properties. After, PCR-assay with bacterial DNA was carried out. Amplification product of 250 b.p. size was synthesized in the samples of DNA from all the tested strains, and this result revealed presence of 16S rRNA fragment specific for the bacteria of *Lactobacillus* genus. PCR with primers planF/pREV [15] resulted in amplicons 318 b.p. in size in case of 80% of the tested *Lactobacillus* strains that confirmed their belonging to the species *L. plantarum*.

It is known that in the beginning of ethanol fermentation in grape must *L. plantarum* and *L. casei* are mostly occurred [16]. Besides, the representatives of such species as *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. curvatus* and *L. buchneri* can also be revealed in must [13].

Totally 23 strains of lactic acid bacteria have been isolated from grape must during the investigations; they were identified and studied. In 2011, strains *L. plantarum* ONU 12, 311, 312 and 313 were isolated from must of Pinot noir cultivated in Odesa. In 2012, strains *L. plantarum* ONU 341–350 were isolated from grape of Lidia cultivar grown in Odesa. From berries of Cardinal cultivar (Odesa) strains *L. plantarum* ONU 332–336 and ONU 339, 340 were isolated, and must of Dnistrovskiy rozhevyyi cultivated in Kiliya district of Odesa region was the source of the strains *L. plantarum* ONU 337, 338.

The results of RAPD-PCR showed presence of groups of genetic similarity and diversity between the strains of *L. plantarum*. As it could be seen from the electrophoretic analysis, amplification products with DNA of the strains isolated from one source (grapevine of Lidia cultivar) were very similar (fig. 1).

The results of cluster analysis based on Spearman's correlation coefficient and the method of Ward used for evaluation the similarity between the studied lactic acid are presented in fig. 2.

As it could be seen from the presented data, all the strains formed 4 basic clusters grouped by the level of their similarity.

Basing on the obtained data, it can be said that the maximal similarity showed the strains *L. plantarum* ONU 338 and *L. plantarum* ONU 340 forming cluster G3 (the percentage of similarity between the strains –



65.0%) although these strains were isolated from different sources. Strain *L. plantarum* ONU 338 was isolated from grape of Dnistrovskiy rozhevyi cultivar grown in Kiliya district of Odesa region, and strain *L. plantarum* ONU 340 – from grape of Cardinal cultivar from Odesa. This allowed us to conclude that the genetic similarity of the strains not always coincided with the territory of grape origin.

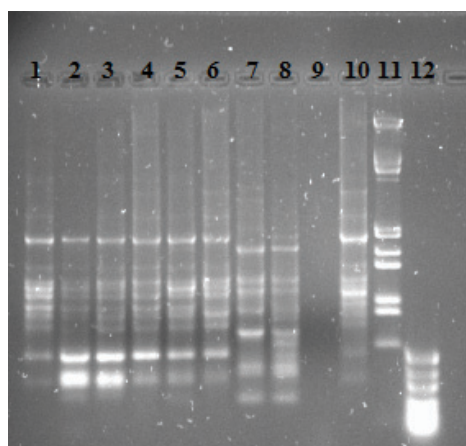


Fig. 1. The electrophoretic analysis of amplicons resulted from RAPD-PCR
1–8,10 – amplicons of RAPD-PCR with DNA from *L. plantarum* ONU 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349 and 350, respectively; 11, 12 – the markers of molecular weight.

Cluster G1 was formed by the strains from wine material of one cultivar and place of cultivation (Lidia, Odesa) (fig. 2). These are the strains *L. plantarum* ONU 341, 344, 345, 343, 342, 346 and 350. Three more strains from the same origin were arranged to other clusters. Strains *L. plantarum* ONU 347 and 348 together with the strains *L. plantarum* ONU 335 and ONU 334 isolated from wine material of Cardinal cultivar (Odesa) formed the separate cluster G4 with the similarity between the strains from 48.0 to 52.0%.

Strain *L. plantarum* ONU 349 also isolated from must of Lidia cultivar (Odesa) showed the similarity to the strains forming subcluster G2.4 in a cluster G2. Thus, among the strains *L. plantarum* from must of Lidia cultivar grown in Odesa three groups of genetic diversity were revealed.

Cluster **G2** joined the biggest amount of the studied strains with different levels of similarity forming subclusters G2.1, G2.2, G2.3 and G2.4 (fig. 2). Thus, to subcluster G2.1 strains *L. plantarum* ONU 313 and 312 from wine material of Pinot noir (Odesa) and strains *L. plantarum* ONU 332 and 339 from Cardinal cultivar (Odesa) were arranged. Percentage of similarity among the strains in this subcluster was relatively high (from 49.0 to 52.0%). Strains *L. plantarum* ONU 333 and 336 also isolated from must of Cardinal cultivar (Odesa) formed subcluster **G2.2** with the percentage of similarity between the strains 50.0%. Subcluster G2.4 joined the

strains *L. plantarum* ONU 12 and 311 (Pinot noir, Odesa), *L. plantarum* ONU 349 (Lidia, Odesa) and *L. plantarum* ONU 337 (Dnistrovskiy rozhevyi, Kiliya district, Odesa region). Similarity between the strains in this case was evaluated as 36.0%.

Such grouping of the strains one more confirmed that the genetic similarity of the strains was not always related to the territorial origin. The control strains *L. plantarum* UCM B-2694 and *L. plantarum* UCM B-2709 were ranged to the same cluster G2 (subcluster G2.3), and the level of similarity between them was established as 49.0% (fig. 2).

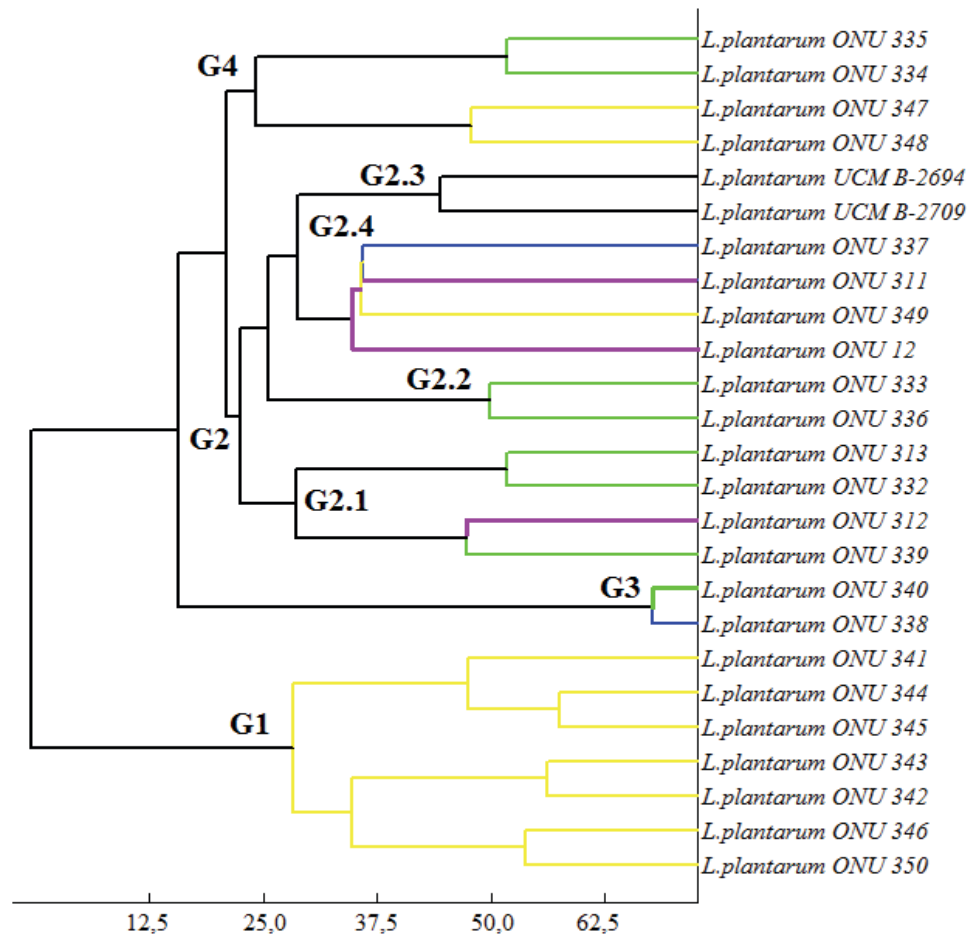


Fig. 2. The results of RAPD-PCR analysis with the primer M13 presented as the phylogenetic reconstruction and grouped by cluster analysis based on Spearman's correlation coefficient and method of Ward (Matlab 7.0).

Cultivars of grapevine are marked in colors:

- Lidia cultivar, Odesa
 - Pinot noir, Odesa
- Cardinal, Odesa
 - Dnistrovskiy rozhevyi, Kiliya district, Odesa region



Besides this, it is needed to be mentioned that the year of isolation of lactobacilli didn't influence the topology of cluster formation. For instance, strains *L. plantarum* ONU 313 and 311 were isolated from wine material of Pinot noir (Odesa) in 2011, but according to their genetic properties they were ranged into different subclusters of the cluster G2 (fig. 2).

Genetic diversity of the strains is a common feature of *L. plantarum* [9]. Thus, it is known that the strains inside the species *L. plantarum* can differ in presence of various genes responsible for bacteriocin productions and in their variations [10]. Besides, the strains of *L. plantarum* can also be characterized by the spectrum of antimicrobial activity [1]. The investigators have shown the presence of 7 genetic groups and 18 subgroups in oenological *L. plantarum* strains from one geographical territory (Spain) [12].

In our case the results of RAPD-PCR with the primer M13 have demonstrated the preferential genetic similarity among the strains of *L. plantarum* isolated from the certain sample of grape must, but the strains from grape collected in distant territories could also be similar. At the same time, some *L. plantarum* strains from one source of origin could demonstrate the genetic diversity.

УДК 579.25

А.Г. Мерліч, В.О. Іваниця, Н.В. Коротаєва, М.А. Златогурська,
Н.Ю. Васильєва, Д.О. Бабенко, Н.В. Ліманська

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

***LACTOBACILLUS PLANTARUM* ІЗ ЯГІД ВИНОГРАДУ, ЯКИЙ КУЛЬТИВУЄТЬСЯ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ**

Реферат

Метою дослідження було виділення бактерій *Lactobacillus plantarum* із ягід винограду та вивчення їх генетичної різноманітності. **Матеріали і методи.** Молочнокислі бактерії були виділені з ягід 14 сортів винограду, який культивувався на півдні України. Для ідентифікації *L. plantarum* та вивчення різноманітності штамів застосовували класичний метод ПЛР та RAPD-ПЛР. Для реконструкції філогенетичного дерева досліджених штамів було використано програму Matlab 7.0. **Результати.** Бактерії роду *Lactobacillus* були виділені з 7 проб виноградного суслу серед 14 протестованих сортів винограду. 80% досліджених штамів лактобацил належали до виду *L. plantarum*. Виявлено групи генетичної схожості між штамми *L. plantarum*. На філогенетичному дереві штамми формували чотири кластери, згруповані за ступенем їх подібності. Вказані результати дозволили зробити **висновок** про те, що генетично подібними могли бути штамми *L. plantarum*, виділені з виноградного суслу різних сортів та місцевостей



культивування винограду. У той же час штами *L. plantarum* з однакового джерела походження могли виявляти генетичну різноманітність.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, *Lactobacillus plantarum*, виноградне сусло, RAPD-ПЛР.

А.Г. Мерлич, В.А. Иваница, Н.В. Коротаева, М.А. Златогурская,
Н.Ю. Васильева, Д.А. Бабенко, Н.В. Лиманская

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

ЛАКТОБАЦИЛЛУС ПЛАНТАРУМ ИЗ ЯГОД ВИНОГРАДА, КУЛЬТИВИРУЕМОГО НА ЮГЕ УКРАИНЫ

Реферат

Целью исследования было выделение *Lactobacillus plantarum* из ягод винограда и изучение их генетического разнообразия. **Материалы и методы.** Молочнокислые бактерии были выделены из ягод 14 сортов винограда, выращенного на юге Украины. Для идентификации *L. plantarum* и изучения их разнообразия была использована полимеразная цепная реакция и RAPD-ПЦР. Реконструкция филогенетического дерева была проведена при помощи программы Matlab 7.0. **Результаты.** Лактобациллы были выделены в 7 пробах сусла из 14 протестированных сортов винограда. 80% изученных штаммов принадлежали к виду *L. plantarum*. Были выявлены группы генетического сходства между штаммами *L. plantarum*. На филогенетическом дереве штаммы образовывали четыре кластера, сгруппированных в соответствии с их подобием. Указанные результаты позволили сделать **вывод** о том, что штаммы *L. plantarum* из сусла винограда различных сортов и территорий культивирования винограда могли проявлять генетическое сходство. Напротив, некоторые штаммы *L. plantarum* из одного источника происхождения могли демонстрировать генетическое разнообразие.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, виноградное сусло, RAPD-PCR.

LITERATURE

1. Ben Omar N., Abriouel H., Keleke S., Sánchez Valenzuela A., Martínez-Cacameró M., Lucas López R., Ortega E., Gólviz A. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from potato, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons // International Journal of Food Microbiology. — 2008. — V. 127 — P. 18–25.
2. Bou M., Brown N., Costello P., Degre R. Malolactic fermentation in wine. — Lallemand Inc. — Montreal, 2005. — p. 204.



3. Dellaglio F., Bottazzi V., Vescovo M. Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1975. — Vol. 25. — P. 160–172.
4. du Toit M., Pretorius S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal — a review // J. Enol. Vitic. — 2000. — Vol. 21. — P. 74–96.
5. Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // FEMS Microbiology Letters. — 2002. — Vol. 214. — P. 217–275.
6. Fleet G.H. Yeast interaction and wine flavour // Int. J. Food Microbiol. — 2003. — Vol. 86. — P. 11–22.
7. Liu S.-Q. Malolactic fermentation in wine — beyond deacidification // J. Appl. Microbiol. — 2002. — Vol. 92. — P. 589–601.
8. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. — 1960. — Vol. 23. — P. 130–135.
9. Molenaar D., Bringel F., Schuren F.H., de Vos W.M., Siezen R.J., Kleerebezem M. Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays // J. Bacteriol. — 2005. — Vol. 187. — P. 6119–6127.
10. Morteza S.M., Hooi L.F., Thean Ch.L., Raha A.R., Teck Ch.L. Novel Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* Strains and Their Differentiation by Sequence Analysis of 16S rDNA, 16S-23S and 23S-5S Intergenic Spacer Regions and Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis // Food Technol. Biotechnol. — 2010. — V. 48. — P. 476–483.
11. Oh Y., Varmanen P., Han X.Y., Bennett G., Xu Z., Lu T., Palva A. *Lactobacillus plantarum* for oral peptide delivery // Oral Microbiol Immunol. — 2007. — Vol. 22. — P. 140–144.
12. Saenz Y., Rojo-Bezares B., Navarro L., Diez L., Somalo S., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. Genetic diversity of the pln locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains // Int J Food Microbiology. — 2009. — Vol. 134. — P. 176–183.
13. Sung Sook Bae. Investigation of bacteria associated with Australian wine grapes using cultural and molecular methods // Thesis for PhD degree. — Sydney, Australia. — 2005. — P. 211.
14. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. — 2002. — Vol. 41, № 1. — P. 37–42.
15. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers // Appl. Environm. Microbiol. — 2001. — Vol. 67. — P. 3450–3454.
16. Wibowo D., Eschenbroch R., Davis D., Fleet G., Lu T. Occurrence of growth of lactic acid bacteria in wine: a review // Am. J. Enol. Vitic. — 1993. — Vol. 36. — P. 302–313.

Стаття надійшла до редакції 24.08.2013 р.



УДК 582.282

И.Н. Курченко, Е.С. Цыганенко

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСА ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ МИКОТОКСИНОВ ШТАММОВ *FUSARIUM ROAE* (РЕСК) WOLLENW. РАЗНЫХ ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП

Целью исследования было сравнительное изучение способности к синтезу токсинов трихотеценовой природы у 15 штаммов *Fusarium roae* различных трофических групп: 5 почвенных, 5 фитопатогенных и 5 эндофитных штаммов. **Методы.** В работе использованы стандартные методы выделения и идентификации микотоксинов, тонкослойная хроматография. **Результаты.** Т-2 токсин выявлен у 4 почвенных, 3 фитопатогенных и 2 эндофитных штаммов *F. roae*. Установлено, что в целом его содержание максимально у почвенных штаммов и достигает $188,8 \pm 32,2$ мкг/л, ниже – у фитопатогенных и еще ниже – у эндофитных штаммов. Содержание НТ-2 токсина и Т-2 тетраола выше у почвенных, чем у фитопатогенных и эндофитных штаммов, а Т-2 триола – выше у фитопатогенов, чем у почвенных штаммов. Т-2 триол выявлен лишь у одного из эндофитных штаммов. Неосоляниол продуцируют 3 почвенных и 2 фитопатогенных штамма, однако не синтезируют эндофитные штаммы. **Выводы.** Таким образом, показано, что эндофиты *F. roae* продуцируют значительно меньше трихотеценовых микотоксинов, чем штаммы этого вида из других трофических групп. Эта физиологическая особенность, по-видимому, позволяет им мутуалистически сосуществовать с растениями.

Ключевые слова: *Fusarium roae*, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 тетраол, Т-2 триол, неосоляниол.

Вид *Fusarium roae* (Pesch) Wollenw. обычно распространен в регионах с умеренным климатом. Он является возбудителем корневых и стеблевых гнилей разных культур, а также входит в комплекс фитопатогенов, вызывающих фузариозы зерновых [4, 5, 9].

Известно, что грибы рода *Fusarium* продуцируют ряд биологически активных веществ, в том числе и микотоксинов преимущественно трихотеценовой природы [4, 5, 7]. Трихотеценовые микотоксины – широко распространенная и изученная группа метаболитов грибов, с которой связано и проявление фитопатогенных свойств этого гриба [9]. Наи-

© И.Н. Курченко, Е.С. Цыганенко, 2013



более характерными для *F. roae* являются неосоляниол, ниваленол, диацетоксисцирпенол, моноацетилсцирпенол, сцирпенол, фузаренон-Х, Т-2, НТ-2 и ацетил Т-2 токсины, фузарин С, бутенолид, ауофузарин [4, 7, 9]. Внимание исследователей было сосредоточено в основном на изучении спектра токсинов фитопатогенных видов рода *Fusarium*, которые поражали зерно, а его употребление в качестве корма приводило к тяжелым токсикозам животных и человека, а также видов, которые сохранялись в почве как потенциальные источники инфекции растений [4, 5, 9]. Сравнительное изучение способности к образованию токсинов штаммами *F. roae*, выделенными из разных трофических групп, до настоящего времени не проводилось. Микотоксины являются одним из факторов патогенности микроскопических грибов, поэтому важное значение имеет определение роли этих веществ в сосуществовании растений и микроскопических грибов.

Целью данной работы было сравнительное изучение способности к образованию ряда токсинов трихотеценовой природы у почвенных, фитопатогенных и эндофитных штаммов *F. roae*.

Материалы и методы

Объектами исследования были выделенные из разных местообитаний 15 штаммов *F. roae*, которые поддерживаются в коллекции культур микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины. Почвенные штаммы *F. roae* были выделены из лесной почвы в Киевской обл.: 50660, 50699 из почвы под липой, 50700, 50702 из почвы под ивой, 50705 из почвы под орешником. Фитопатогенные штаммы были изолированы также в Киевской обл.: 50674, 50673, 50675 из зерна пшеницы, 50697 из семян эхинацеи, 50701 из стеблей льна. Эндофиты выделяли из разных органов болотных растений: 50685 из корней клюквы, Житомирская обл., 50686 из листьев сабельника, Ровенская обл., 50688 из листьев клюквы, Житомирская обл., 50689 из стеблей сабельника, Ровенская обл., 50692 из корней тростника, Ровенская обл.

Посевным материалом служила стандартизованная (1×10^6 конидий/мл) суспензия 10-дневной культуры каждого из штаммов *F. roae*, которую вносили в количестве 10% к объему среды культивирования. Грибы выращивали в колбах Эрленмейера объемом 0,75 л, которые содержали 0,1 л стандартной среды Чапека. Культивирование осуществляли в стационарных условиях при температуре 27 ± 1 °С в течение 21 суток [1]. Биомассу грибов с культуральной жидкостью фильтровали через бумажные фильтры («синяя лента») с последующим пропусканием через мембранные фильтры «Millipore» (Германия) с диаметром пор 0,4 мкм [1, 3].

Культуральные фильтраты трижды в течение 15 мин экстрагировали хлороформом в соотношении 1 : 5 для получения препаратов микоток-



синов. Полученные экстракты объединяли и упаривали под сниженным давлением с использованием роторного испарителя «Rotadest» (Венгрия) при температуре 45 °С. Полученный маслянистый осадок предварительно очищали от неполярных липидных (трехкратная экстракция н-гексаном), белковых (осаждение 10%-ным раствором уксуснокислого свинца) и пигментных примесей (на колонке «БАУ-1» с активированным углем и подвижной фазой — метанолом) [3]. Для устранения остаточной влаги фильтрат пропускали через колонку с безводным сульфатом натрия и упаривали на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетона и полученный раствор микотоксинов разделяли методом хроматографирования.

На пластину «Silufol» (Чехия) размером 15 × 15 см наносили различные количества стандартных растворов Т-2 токсина, НТ-2 токсина, Т-2 триола, Т-2 тетраола и неосоляниола (1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкг) и раствор смеси микотоксинов в объемах 5 и 10 мл. Разгонку осуществляли в хроматографической камере, используя систему растворителей хлороформ : метанол (97 : 3) [3]. После разгонки пластины просушивали в токе воздуха и помещали на 30 мин в сушильный шкаф при температуре 120 °С. Визуализацию пятен микотоксинов осуществляли с помощью 3%-ного раствора 4-(*p*-нитробензил)пиридина в ацетоне [10] с последующим опрыскиванием концентрированным раствором аммиака.

Количественную оценку содержания отдельных микотоксинов проводили путем сравнения интенсивности окраски пятен опытного и стандартного образцов [3, 10, 12].

Полученные результаты были обработаны статистически (средние значения, ошибки средних, средние квадратичные отклонения для $n=9$ при уровне значимости $P \geq 0,95$), проанализированы с применением пакета STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel. Для определения различий между средними значениями был использован критерий Стьюдента для $n=9$ $t_{0,95}=2,262$.

Результаты и обсуждение

В предварительных исследованиях при помощи хроматографического анализа показано, что спектр определяемых микотоксинов изученных штаммов *F. roae* представлен Т-2, НТ-2 токсинами, Т-2 триолом, Т-2 тетраолом и неосоляниолом. При этом установлены различия как на уровне отдельных штаммов, так и в пределах разных трофических групп.

В дальнейших исследованиях установлено, что в целом содержание базового Т-2 токсина было максимальным у почвенных штаммов и достигало $188,8 \pm 32,2$ мкг/л (табл.). Штамм *F. roae* 50660 образовывал следовые количества этого токсина, а штамм 50700 — достоверно меньшие количества $84,9 \pm 11,4$ мкг/л (значения критерия Стьюдента составили $t_{0,95} = 3,19$ и $t_{0,95} = 3,04$, что было больше табличного значения $t_{0,95} = 2,262$). Содержание НТ-2 токсина у штаммов из почвы варьировало от



28,3±3,9 до 186,6±22,1 мкг/л. Максимальное содержание НТ-2 токсина у штамма 50660 достоверно отличалось от таковых штаммов 50699, 50700, 50702, 50705 этой группы ($t_{0,95} = 6,27; 5,8; 7,05$ и $4,76$ соответственно). Т-2 триол обнаружен у трех штаммов, его содержание у штамма 50699 (24,8±6,2 мкг/л) было достоверно выше, чем у 50700 и 50705 ($t_{0,95} = 3,59; 2,84$).

Максимальное содержание Т-2 тетраола отмечено у почвенного штамма 50660 — 204,5±14,9 мкг/л, что достоверно выше, чем у штаммов 50699, 50700, 50702, 50705 ($t_{0,95} = 2,47; 2,52; 10,57$ и $11,98$), у штаммов 50699 и 50700 — в 1,4–1,6 раза ниже ($t_{0,95} = 5,6; 6,37; 3,97$ и $4,49$) и в 6,9 и 10,5 раз ниже у штаммов 50702 и 50705 соответственно.

Наличие неосоляниола установлено у трех из пяти почвенных штаммов. Различия в его содержании между штаммами было не достоверным.

Т-2 токсин выявлен у трех из пяти изученных фитопатогенных штаммов *F. roae*, его содержание значительно ниже, чем у штаммов, выделенных из почвы (табл.). Содержание НТ-2 токсина значительно больше у штамма 50674 (142,7±13,4 мкг/л), чем у штаммов 50673 и 50675, несмотря на то, что все они выделены из зерна пшеницы ($t_{0,95} = 9,52$ и $9,27$). Оно также выше, чем у штаммов 50697 и 50701, выделенных из семян эхинацеи и стебля льна соответственно ($t_{0,95} = 4,46$ и $6,14$). Следует отметить, что эти штаммы также достоверно различались по содержанию НТ-2 токсина ($t_{0,95} = 5,83; 8,47; 5,47$ и $8,16$). Как и почвенные штаммы, Т-2 триол образовывали три фитопатогенных штамма, а его содержание у штамма 50673, изолированного из зерна пшеницы, составляло 39,6±9,1 мкг/л, что в 2,2–2,8 раза выше, чем у двух других ($t_{0,95} = 2,28$ и $2,59$).

Содержание Т-2 тетраола у фитопатогенных штаммов *F. roae*, как и в случае почвенных, значительно варьировало. Так, максимальный уровень этого токсина, как и НТ-2 токсина, характерен для штамма 50674 (191,8±16,2 мкг/л). Его содержание ниже у штамма 50675, а также значительно (в 11,5 раза) ниже у штамма 50673 ($t_{0,95} = 10,7$) и в 2,3 раза ниже — у штамма 50697 ($t_{0,95} = 4,7$). Наличие неосоляниола отмечено лишь у двух фитопатогенных штаммов. Содержание этого токсина достоверно выше в 2,4 раза ($t_{0,95} = 6,39$) у штамма 50673, чем у 50697 (табл.).

Наличие Т-2 токсина отмечено у 2 из 5 эндофитных штаммов *F. roae* (табл.). Следует подчеркнуть, что его содержание у эндофитов практически такое же, как у фитопатогенов и значительно ниже, чем у почвенных штаммов. Все изученные штаммы эндофитов образовывали НТ-2 токсин. Максимальное его содержание характерно для штамма 50686 — эндофита из листа сабельника (100,6±11,1 мкг/л), несколько ниже — у штаммов 50685 (корень клюквы) и 50689 (лист сабельника). У эндофитного штамма 50688, выделенного из листа клюквы ($t_{0,95} = 3,45$), и штамма 50692 — из корня тростника ($t_{0,95} = 7,37$), содержание НТ-2 токсина достоверно ниже (табл.).



Содержание микотоксинов (мкг/л) в культуральных фильтратах штаммов *Fusarium poae*Mycotoxin content ($\mu\text{g/l}$) in the culture filtrates of *Fusarium poae* strains

Штамм <i>F. poae</i>	T-2 токсин	HT-2 токсин	T-2 триол	T-2 тетраол	Неосоляниол
Почвенные					
50660	следы	186,6 \pm 22,1	—	204,5 \pm 14,9	—
50699	112,4 \pm 19,6	42,6 \pm 6,3	24,8 \pm 6,2	144,4 \pm 19,2	43,9 \pm 12,9
50700	84,9 \pm 11,4	40,0 \pm 12,3	8,6 \pm 0,8	131,8 \pm 24,7	28,2 \pm 4,4
50702	157,3 \pm 19,6	28,3 \pm 3,9	—	29,6 \pm 7,2	40,1 \pm 6,2
50705	188,8 \pm 32,2	66,1 \pm 12,3	6,9 \pm 1,1	19,4 \pm 4,1	—
Фитопатогены					
50674	следы	142,7 \pm 13,4	—	191,8 \pm 16,2	—
50673	36,6 \pm 8,4	12,8 \pm 2,6	39,6 \pm 9,1	16,7 \pm 2,3	29,8 \pm 2,3
50675	29,6 \pm 9,9	17,3 \pm 1,8	—	145,8 \pm 23,6	—
50697	следы	69,7 \pm 9,4	18,3 \pm 2,1	83,4 \pm 16,4	12,6 \pm 1,4
50701	14,4 \pm 7,7	56,1 \pm 4,4	14,2 \pm 3,7	—	—
Эндоефиты					
50685	следы	81,3 \pm 5,8	—	188,7 \pm 17,3	—
50686	следы	100,6 \pm 11,1	—	119,3 \pm 23,4	—
50688	16,4 \pm 1,7	54,2 \pm 7,6	—	93,2 \pm 19,7	—
50689	следы	79,5 \pm 6,9	19,2 \pm 2,4	110,2 \pm 27,2	—
50692	28,7 \pm 7,2	16,9 \pm 2,4	—	32,7 \pm 3,1	—

Примечание: «—» — токсин не обнаружен; «следы» — следовые количества T-2 токсина обнаруживаются после нанесения на пластину не менее 20 мкл анализируемой смеси.

Изученные эндоефитные штаммы не синтезировали неосоляниол, а наличие T-2 триола зафиксировано лишь у одного из штаммов, причем его содержание ниже, чем у почвенных штаммов и фитопатогенов (табл.). Содержание T-2 тетраола максимально у штамма-эндоефита 50685 и достигало 188,7 \pm 17,3 мкг/л, что превышало в 1,6–2 раза показатели штаммов 50686, 50688 и 50689 ($t_{0,95} = 2,38; 3,64$ и $2,44$, соответственно) и в 5,8 раза — для 50692 ($t_{0,95} = 8,88$). Причем штамм 50692 образовывал достоверно меньше этого токсина по сравнению с другими изученными эндоефитами (табл.).



Известно, что штаммы *F. poae* имеют низкий токсигенный потенциал, образуя 80 мкг/л диацетоксисцирпенола и 240 мкг/л Т-2 токсина [4]. Для изученных штаммов *F. poae* характерно незначительное содержание трихотеценов по сравнению с другими видами рода *Fusarium*. Так, для штамма *F. solani* М-1-1 установлено, что максимум образования им Т-2 токсина и неосоляниола в условиях глубинного культивирования наблюдается на 5-е сутки и достигает 20 и 7 мг/л, соответственно [11]. При этом содержание этих токсинов увеличивается с возрастанием концентрации глюкозы в среде. Так, при концентрации глюкозы 1% в среде оно составляет 13,5 мг/л Т-2 токсина и 2,25 мг/л неосоляниола, а при концентрации глюкозы 5% содержание токсинов увеличивается до 35 и 7,5 мг/л, соответственно. Такие уровни образования Т-2 токсина штаммом *F. solani* на один — три порядка превышают полученные нами величины для *F. poae*, а в случае неосоляниола его незначительное содержание обнаружено у 5 из 15 изученных нами штаммов, а эндофиты вообще не синтезировали этот микотоксин.

Интересно проследить динамику содержания Т-2 токсина и других его метаболитов у представителей разных трофических групп. Обращает на себя внимание низкое, а иногда и следовое содержание Т-2 токсина у отдельных штаммов: почвенного 50660 и фитопатогенов 50674, 50675. Эта закономерность в большей степени выражена у эндофитов (за исключением штамма 50692). Как правило, следовые количества этого токсина коррелируют с высоким содержанием НТ-2 токсина и Т-2 тетраола — основных метаболитов базового микотоксина [7, 12], что показано и нами. Этот факт может свидетельствовать о высокой активности ферментов, метаболизирующих Т-2 токсин в менее токсичные вещества и может рассматриваться как защитный механизм штаммов-продуцентов от собственных токсичных веществ. Некоторые исследователи объясняют этим способность грибов к образованию близких по структуре семейств вторичных метаболитов, существенно различающихся по биологической активности [6].

Содержание Т-2 триола выше у фитопатогенных штаммов, а среди эндофитов этот токсин обнаруживался лишь у одного штамма. Неосоляниол, который не так часто обнаруживается у штаммов *F. poae* [5, 9], в наших исследованиях выявлен у 3 из 5 почвенных штаммов, 2 из 5 — фитопатогенных и вовсе не выявлен у эндофитных.

Нами установлено, что содержание исследованных трихотеценовых токсинов, за исключением Т-2 триола, выше у исследованных почвенных штаммов, чем у фитопатогенов и эндофитов. Этот факт можно объяснить биологическими особенностями грибов рода *Fusarium*, которые не являются облигатными биотрофами, а чаще обитают в почве как сапрофиты или являются факультативными паразитами [5, 6, 9]. В частности вид *F. poae* выделяется из разных типов почв и входит в состав комплекса видов, вызывающих фузариоз колоса. Поэтому, по-видимому, для слабых



патогенов биологически целесообразным является не «убить» растение-хозяин сразу с помощью высоко активных ферментов и токсинов, а обеспечить себе длительное существование в живом растении, используя, к примеру, механизм трансформации более токсичного Т-2 токсина в его менее токсичные производные. Почвенные изоляты выполняют функцию редуцентов и разлагают растительные и другие остатки, однако в данном случае возрастает конкуренция за источники питания с другими микро-сапротрофами, что в конечном итоге может приводить к образованию грибом спектра токсичных метаболитов [2]. С этим экологическим фактом согласуются полученные нами данные, подтверждающие более высокую токсичность почвенных штаммов *F. roae*. К сожалению, отсутствуют данные относительно образования эндофитными штаммами *F. roae* микотоксинов трихотеценовой природы. Наши данные свидетельствуют о том, что потенциально эндофитные штаммы *F. roae* могут синтезировать трихотеценовые микотоксины, характерные для рода *Fusarium* в целом. Однако их содержание и качественный состав у этой трофической группы меньше, чем у фитопатогенных и почвенных штаммов. Такая физиологическая особенность может обеспечивать мутуалистическое сосуществование эндофитов с растениями. Следует иметь в виду, что при нарушении этого сбалансированного взаимодействия вследствие действия биотических или абиотических факторов может усиливаться негативное влияние эндофитов на растение [8].

В результате сравнительного изучения способности к образованию ряда токсинов трихотеценовой природы у почвенных, фитопатогенных и эндофитных штаммов *F. roae* Т-2 токсин выявлен у 4 почвенных, 3 фитопатогенных и 2 эндофитных штаммов *F. roae*. В целом его содержание максимально у почвенных штаммов и достигает $188,8 \pm 32,2$ мкг/л (табл.), ниже — у фитопатогенных и еще ниже — у эндофитных штаммов. Содержание Т-2 токсина, НТ-2 токсина и Т-2 тетраола было выше у почвенных, чем у фитопатогенных и эндофитных штаммов. Содержание Т-2 триола выше у фитопатогенов, чем у почвенных штаммов. У эндофитов этот токсин был отмечен лишь у одного штамма. Неосоляниол обнаружен у трех почвенных и двух фитопатогенных штаммов и не синтезировался эндофитами. Эндофиты синтезируют *F. roae* значительно меньше трихотеценовых микотоксинов, чем штаммы этого вида из других трофических групп, что позволяет им мутуалистически сосуществовать с растениями.



І.М. Курченко, К.С. Циганенко

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна, тел.: +38(044) 526 11 89, e-mail:
irinakurchenko@ukr.net

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСУ ТРИХОТЕЦЕНОВИХ МІКОТОКСИНІВ ШТАМІВ *FUSARIUM* *POAE* (PECK) WOLLENW. РІЗНИХ ТРОФІЧНИХ ГРУП

Реферат

Метою досліджень було порівняльне вивчення здатності до синтезу токсинів трихотеценової природи у 15 штамів *Fusarium poae* різних трофічних груп: 5 ґрунтових, 5 фітопатогенних та 5 ендofітних штамів. **Методи.** В роботі використані стандартні методи виділення та ідентифікації мікотоксинів, тонкошарова хроматографія. **Результати.** Т-2 токсин виявлено у 4 ґрунтових, 3 фітопатогенних та 2 ендofітних штамів *F. poae*. Встановлено, що в цілому його вміст максимальний у ґрунтових штамів і досягає $188,8 \pm 32,2$ мкг/л, нижче — у фітопатогенних і ще нижче — у ендofітних штамів. Вміст НТ-2 токсину і Т-2 тетраолу вище у ґрунтових, ніж у фітопатогенних і ендofітних штамів, а Т-2 тріолу — вищим у фітопатогенів, ніж у ґрунтових штамів. Т-2 тріол виявлено лише у одного з ендofітів. Неосоляніол продукують 3 ґрунтових і 2 фітопатогенних штами, і не синтезують ендofітні. **Висновки.** Таким чином, показано, що ендofіти *F. poae* продукують значно менше трихотеценових мікотоксинів, ніж штами цього виду з інших трофічних груп. Ця фізіологічна особливість, можливо, дозволяє їм мутуалістично співіснувати з рослинами.

Ключові слова: *Fusarium poae*, Т-2 токсин, НТ-2 токсин, Т-2 тетраол, Т-2 тріол, неосоляніол.

I.M. Kurchenko, K.S. Tsyganenko

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

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF TRICHOHECENE MYCOTOXIN COMPLEX OF *FUSARIUM POAE* (PECK) WOLLENW. THE STRAINS FROM DIFFERENT TROPHIC GROUPS

Summary

Aim. The main goal of our investigation was a comparative study of the ability to synthesize trichothecene toxins by 15 strains of *Fusarium*



poae from different trophic groups: 5 soil strains, 5 plant pathogenic and 5 endophytic strains. **Methods.** The standard methods of isolation and identification of mycotoxins were used. **Results.** It was established that T-2 toxin was detected for 4 soil strains, 3 plant pathogenic and 2 endophytic strains. It was shown that its content was maximal for soil strains and reached $188.8 \pm 32.2 \mu\text{g/l}$, was lower for plant pathogenic ones and the lowest for endophytic strains. The content of HT-2 toxin and T-2 tetraol was higher for soil strains than plant pathogenic and endophytic ones, and T-2 triol – higher for plant pathogens than soil strains. T-2 triol was observed only for one endophytic strain. Neosolaniol is produced by 3 soil and 2 plant pathogenic strains, but not synthesized by endophytes. **Conclusions.** Thus, it was established that endophytes *F. poae* produce significantly less trichothecene mycotoxins than the strains of this species from other trophic groups. This physiological peculiarity allows them apparently to be in a mutualism with the plants.

Key words: *Fusarium poae*, T-2 toxin, HT-2 toxin, T-2 tetraol, T-2 triol, neosolaniol.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Методы экспериментальной микологии:* Справочник. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
2. *Одум Ю.* Экология: в 2-х т. Пер. с англ. — М.: Мир, Т. 1. — 1986. — 328 с., Т. 2. — 1986. — 376 с.
3. *Оценка загрязнения пищевых продуктов микотоксинами.* Сборник учебно-методических материалов под редакцией В.А. Тутельяна. — Т. 3. — М.: Центр Международных Проектов ГКНТ, 1985. — 299 с.
4. *Bočarov-Stančić A.S., Lević J.T., Stanković S.Z., Krnjaja V.S., Kovačević T.M., Tančić S.L.* The toxigenic potential of *Fusarium poae* originated from wheat // Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci. — 2007. — № 113. — P. 113–123.
5. *Domsch K.H., Gams W., Anderson T.-H.* Compendium of soil fungi / Second edition. — Eching: IHW-Verlag, 2007. — 672 p.
6. *Maggon K.K., Gupta S.K., Venkatasubramanian T.A.* Biosynthesis of aflatoxins // Bacteriol. Rev. — 1977. — 41, № 4. — P. 822–855.
7. *Medina A., Magan N.* Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries // Food Microbiology. — 2011. — 28, № 3. — P. 392–398.
8. *Partida-Martínez L.P., Heil M.* The microbe-free plant: fact or artifact? // Front. Plant Sci. — 2011. — 100, № 2. — P. 1–16.
9. *Stenglein S.A.* *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention // J. Plant Pathol. — 2009. — 91, № 1. — P. 25–36.
10. *Takitani S., Asabe Y., Kato T., Suzuki M., Ueno Y.* Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4-(p-nitrobenzyl)pyridine



on silica gel thin-layer chromatograms // J. Chromatogr. — 1979. — 172, № 3. — P. 335–342.

11. *Ueno Y., Sawano M., Ishii K.* Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture // Appl. Microbiol. — 1975. — 30, № 1. — P. 4–9.

12. *Vanek Z., Cudlin J., Blumauerova M.* Physiology and pathophysiology of the production of excessive metabolites // Prague: Inst. Microbiol. CSAV, 1981. — 135 p.

Стаття надійшла до редакції 24.06.2013 р.



УДК: 579.846.2:22

Ivan V. Kushkevych

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno,
Palackeho 1/3, CZ-61242 Brno, Czech Republic, tel.: +420732215046,
e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

DISSIMILATORY SULFATE REDUCTION BY VARIOUS *DESULFOVIBRIO* SP. STRAINS OF THE HUMAN INTESTINE

The aim of this research was to study the dissimilatory sulfate reduction process by various Desulfovibrio sp. strains of the human intestine, such as bacterial growth, sulfate- and lactate usage, production of sulfide and acetate by the strains, and carry out cluster and correlation analyses of this process. Methods. Microbiology methods of the study for bacterial strains cultivation and photometric methods for determination of bacterial biomass and hydrogen sulfide concentration were used, sulfate ions concentration was determined by turbidimetric method, lactate concentration was carried out by lactate dehydrogenase. Acetate ions accumulation by the strains was determined by titration. Using the experimental data, the methods of statistical analysis have been also used. Results. The various Desulfovibrio sp. strains accumulated different biomass for ten days of cultivation in modified K्रावтсов-Sorokin's medium. The highest biomass (up to 3.89 g/l) was accumulated by Desulfovibrio sp. strain Vib-7 on the sixth day of cultivation. Clustering of bacterial growth parameters has showed the greatest similarity between strains Desulfovibrio sp. strain Vib-7 and Desulfovibrio sp. strain Vib-9. After using all of the sulfate and lactate from the medium, the bacteria stopped growing and the stationary growth phase began. Clustering of the parameters of sulfate usage has showed that strains Desulfovibrio sp. Vib-1 and Desulfovibrio sp. Vib-2 were combined in one cluster, and the strains Desulfovibrio sp. Vib-7 and Desulfovibrio sp. Vib-9 were in another cluster. The strong correlation between all parameters of dissimilatory sulfate reduction (growth, reduction of sulfate, accumulation of sulfide, use of lactate and accumulation of acetate) by the Desulfovibrio sp. strains has been determined. Thus, the obtained results may be promising for further study, in particular for creating ulcerative colitis models, prediction and prevention of human inflammatory bowel disease.

Key words: sulfate-reducing bacteria, Desulfovibrio, intestinal microbiocenosis, inflammatory bowel diseases.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) of the intestine use different nutrient substances that a human consumes. Human intestinal microbiocenosis is formed by the hundreds of bacterial species and subspecies [2, 4, 5, 9, 17].

© Ivan V. Kushkevych, 2013



It is thought that SRB combined with other infections can cause a variety of diseases including cholecystitis, brain abscesses and abdominal cavity, ulcerative enterocolitis, etc. [5, 10; 13]. The species of *Desulfovibrio* genus are often isolated among all SRB during illness. Bacteria of *Desulfovibrio* genus are also isolated during both mono- and polymicrobial infections of the gastrointestinal tract [6, 7, 14, 15].

It is of vital importance to obtain new strains of SRB from different people while studying the growth of the bacterial strains and the process of dissimilatory sulfate reduction by SRB. The hydrogen sulfide and acetate production by the bacterial strains should also be studied in order to clarify the etiological role of these bacteria in the development of various diseases. The data on the concentration of hydrogen sulfide and acetate produced by the strains, are supposed to help in establishing and assessing a toxicity effect of hydrogen sulfide and acetate on the epithelial cells of the human intestine. Such studies might help in predicting the possibility of appearance of the diseases. It is very important for clinical diagnosis of bowel diseases to get more details on their etiology.

The aim of this research was to study the dissimilatory sulfate reduction process by various *Desulfovibrio* sp. strains of the human intestine, such as bacterial growth, sulfate- and lactate usage, production of sulfide and acetate by the strains, and carry out the cluster and correlation analyses of this process.

Material and methods

The object of the study was sulfate-reducing bacteria of various *Desulfovibrio* sp. strains (SRB Vib-1, SRB Vib-2, SRB Vib-3, SRB Vib-4, SRB Vib-5, SRB Vib-6, SRB Vib-7, SRB Vib-8, SRB Vib-9, SRB Vib-10) obtained from the human large intestine [11].

The bacterial strains were grown in modified Kravtsov-Sorokin's liquid nutrition medium of such composition (g/l): Na_2SO_4 – 0.5; KH_2PO_4 – 0.3; K_2HPO_4 – 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.2; NH_4Cl – 1.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.06; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$ – 2.0; yeast extract – 1.0; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.004; sodium citrate $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.3. Before bacteria seeding in the medium, 0.05 ml/l of sterile solution of $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1%) was added. To provide pH 7.2 of medium, sterile 10N solution of NaOH (0.9 ml/l) was used. The medium was heated in boiling water for 30 min in order to obtain an oxygen-free medium, and cooled to 25 °C. The bacteria were grown for 10 days at 35 °C under anaerobic conditions. The tube was brim-filled with medium and closed by a rubber plug to provide anaerobic conditions.

Accumulation of biomass by various strains of sulfate-reducing bacteria in liquid medium (the medium was without Mohr's salt) was determined by the turbidity of a dilute suspension of cells by the photometric method.



The sulfate ion concentration in the medium was determined by the turbidymetric method after it had been precipitated by barium chloride. To stabilize the suspension, glycerol was used [8].

Hydrogen sulfide in the culture medium was photometrically determined using a spectrophotometer ($\lambda=665$ nm, cuvette with optical path 30 mm). The reaction mixture had the following composition: zinc citrate (27.3 mM) – 10 ml; distilled water – 1.98 ml; p-aminodimethylaniline solution (5.5 mM) – 4 ml, and 20 μ l of test solution. After 5 min, 1 ml of ferric chloride (0.125 M) was added and methylene blue formation was observed. The concentration of hydrogen sulfide was established by a calibration curve.

Determination of lactate concentration was carried out through a dehydrogenation reaction of lactate by lactate dehydrogenase in the presence of NAD^+ , with formation of pyruvate and NADH. For determination of lactate content the following reagents were used: hydrazine–glycine buffer pH 9.0 (glycine – 0.1 M solution containing 0.1 M hydrazine); NAD^+ – 0.03 M solution, pH 6.0; lactate dehydrogenase solution (protein content was about 2 mg/ml). The samples of glycine and hydrazine were dissolved in a small amount of distilled water, pH of 9.0 was maintained by 2 N NaOH solution, then the mixture was diluted by distilled water to 100 ml. Solutions of NAD^+ and lactate dehydrogenase were kept on ice. The content of the tubes was thoroughly mixed and placed inside a thermostat at $+25^\circ\text{C}$ for 60 min. After incubation, the samples were cooled and then the optical density of the samples was measured at 340 nm. The quantity of the lactic acid was subsequently calculated [19].

Accumulation of acetate ions by the bacteria cultures during their growth in the medium was determined by titration [1].

The correlation analysis of the parameters was carried using packet Excel program. The main result of correlation is called Pearson's correlation coefficient (r) [3] was calculated using Excel program.

Using the experimental data, the basic statistical parameters (M – mean, m – standard error, $M\pm m$) have been calculated. For the estimation of the reliability between the statistical characteristics, the Student's t -test was used. The difference was reliable when $p>0.95$ [12]. The statistical processing of the results was performed using packet Excel and Origin computer programs. The cluster analysis of parameters of the sulfate reduction was performed using Statistica 6.0 program (Complete Linkage).

Results and Discussion

The results of this research show that all isolated strains were growing actively using sulfate as an electron acceptor and accumulating hydrogen sulfide in the medium. These bacterial strains used lactate as the electron donor; the lactate was actively incompletely oxidized by the bacteria to acetate. The strains of SRB have been accumulating different biomass for ten days of cultivation. The different growth rates of the various strains of



SRB in the modified Kravtsov-Sorokin's medium have been studied. The studied SRB with varying intensity used sulfate and lactate, and produced hydrogen sulfide and acetate. The intense growth of these bacteria depended on the use of sulfate and lactate, and the accumulation of hydrogen sulfide and acetate.

Having used all the sulfate and lactate in the medium, the bacteria stopped growing and the stationary growth phase began. Among all of the isolated bacteria the highest biomass (up to 3.89 g/l) was accumulated by *Desulfovibrio sp.* strain Vib-7 on the sixth day of cultivation. The lowest biomass (up to 3.41 g/l) among vibrios strains was accumulated by *Desulfovibrio sp.* strain Vib-10 on the eighth day of cultivation (fig. 1A).

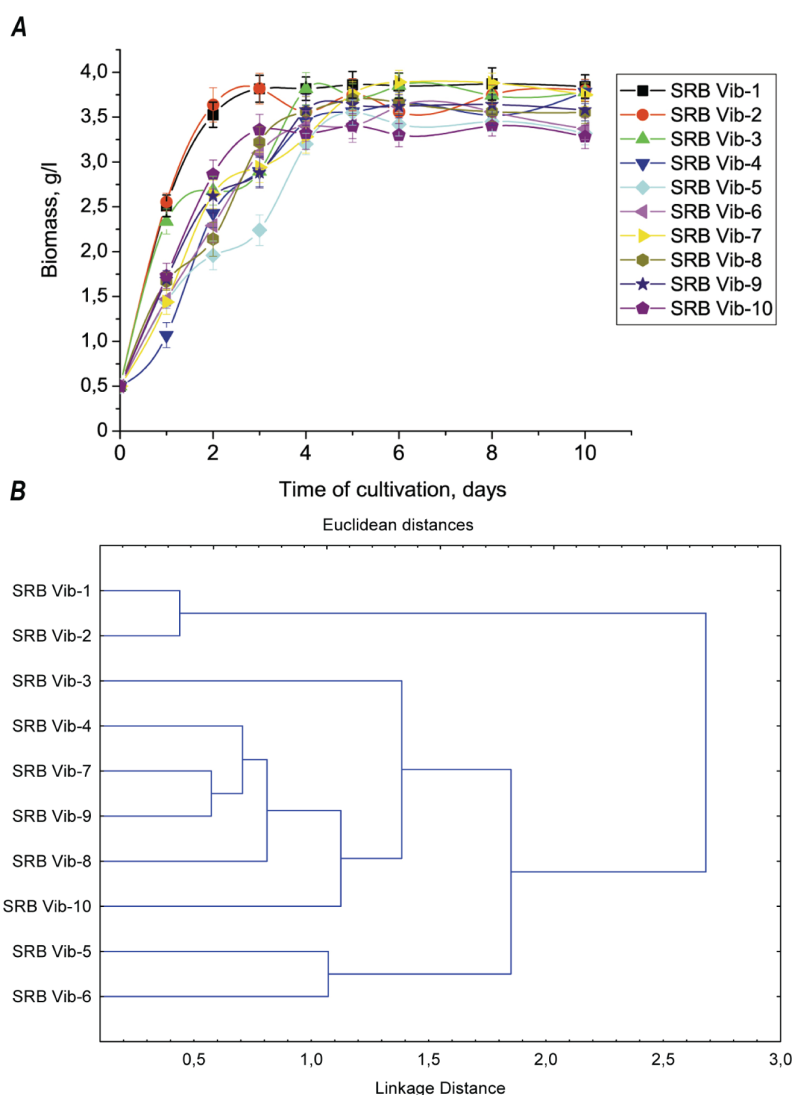


Fig. 1. Growth of the various *Desulfovibrio sp.* strains of the human intestine (A) and dendrogram showing the result of the clustering parameters (B)

As a result of the clustering of the growth parameters there were formed three independent clusters. The dendrogram shows the greatest similarity between strains *Desulfovibrio* sp. strain Vib-7 and *Desulfovibrio* sp. strain Vib-9 by the tested parameter (fig. 1B). The strains *Desulfovibrio* sp. Vib-1 and *Desulfovibrio* sp. Vib-2 as well as *Desulfovibrio* sp. Vib-5 and *Desulfovibrio* sp. Vib-6 are the most varied by tested parameter compared with strains *Desulfovibrio* sp. Vib-7 and *Desulfovibrio* sp. Vib-9, and they form two separate isolated clusters.

The studied bacterial strains of *Desulfovibrio* sp. actively reduced the sulfate ions and the bacteria used these ions as an electron acceptor. The intensity and the time of sulfate reduction was different in each of the strains. All of the studied strains fully used sulfate on the sixth day of cultivation (fig. 2A).

The parameters of intensity of utilization sulfate by the studied strains are the most similar to each other, allowing combining them in the clusters.

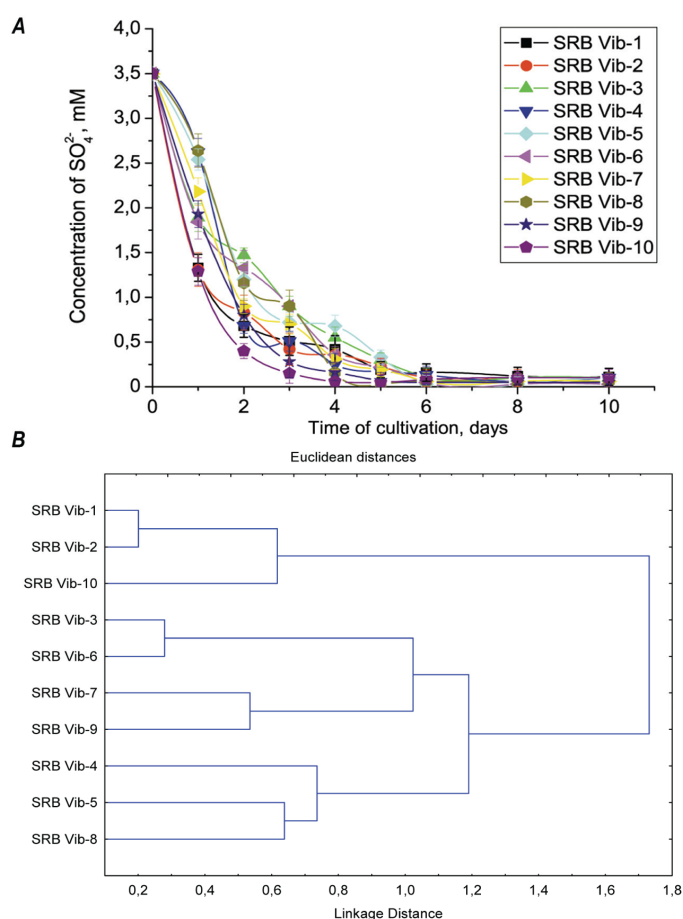


Fig. 2. Sulfate usage by various *Desulfovibrio* sp. strains of the human intestine (A) and the dendrogram showing the result of the clustering parameters (B)



In this case, there is also the formation of three clusters, combining of strains *Desulfovibrio sp. Vib-1* and *Desulfovibrio sp. Vib-2* in one cluster, and the strains *Desulfovibrio sp. Vib-7* and *Desulfovibrio sp. Vib-9* in another cluster (fig. 2B). However, if in this series of the experiments strains *Desulfovibrio sp. Vib-1* and *Desulfovibrio sp. Vib-2* still formed stable isolated cluster then the strain *Desulfovibrio sp. Vib-5* was more similar to the strain *Desulfovibrio sp. Vib-8*, which was not observed in the previous series of experiments.

The highest concentration of hydrogen sulfide (up to 3.23 mM) among the studied strains was produced by bacterial *Desulfovibrio sp.* strain Vib-7 on the eighth day of cultivation; while the bacteria used about 98% of sulfate in the medium, compared to the initial concentration of sulfate. *Desulfovibrio sp.* strain Vib-8 produced hydrogen sulfide in the lowest concentration (up to 2.67 mM) on the sixth day of cultivation compared to all of the studied strains. Under these conditions about 97% of sulfate ions were used in the medium compared to its initial concentration (fig. 3A).

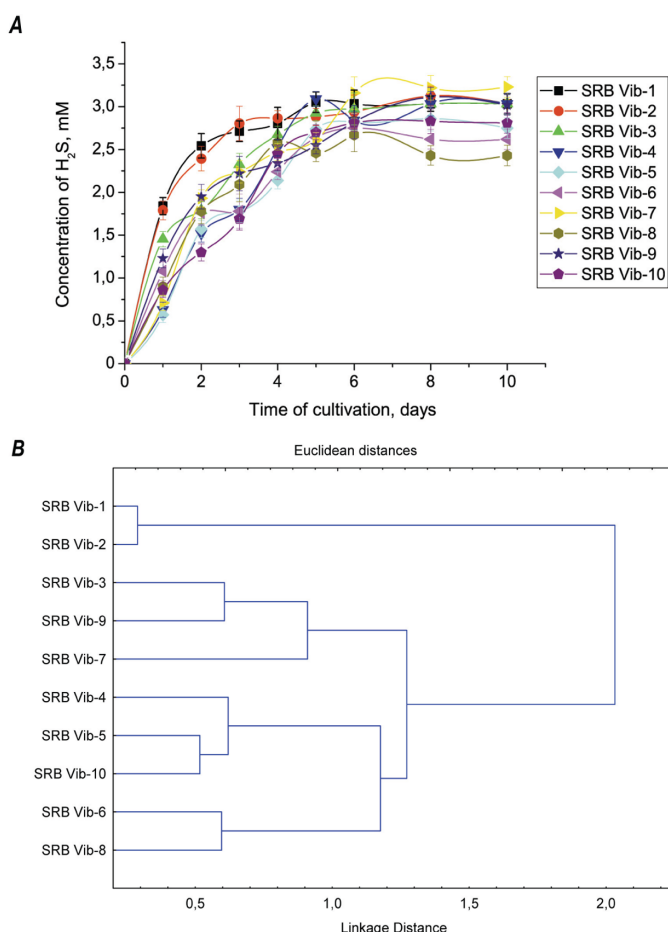


Fig. 3. Production of hydrogen sulfide by the various *Desulfovibrio sp.* strains of the human intestine (A) and the dendrogram showing the result of the clustering parameters (B)

The results clustering of quantitative formation of hydrogen sulfide have shown that *Desulfovibrio* sp. strain Vib-9 with *Desulfovibrio* sp. strain Vib-3, and *Desulfovibrio* sp. strain Vib-7 form one cluster, and the strains *Desulfovibrio* sp. Vib-5 with *Desulfovibrio* sp. Vib-10, and *Desulfovibrio* sp. Vib-4 form the second cluster, as well as *Desulfovibrio* sp. strain Vib-6 and *Desulfovibrio* sp. Vib-8 form the third cluster. *Desulfovibrio* sp. strain Vib-1 and *Desulfovibrio* sp. strain Vib-2 were formed into one stable cluster as in the previous series of the experiments.

An important indicator of the bacterial growth was the presence of organic compounds in the medium. These compounds may simultaneously be a carbon source and an electron donor in the process of dissimilatory sulfate reduction [2, 9, 10].

The results of the studies have showed that the presence of lactate and sulfate in the medium stimulates growth of the studied sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. various strains. Lactate is an electron donor during dissimilatory sulfate reduction. All studied strains used lactate fully on the sixth day of cultivation, while there were used about 99% of lactate for the dissimilation of sulfate (fig. 4A).

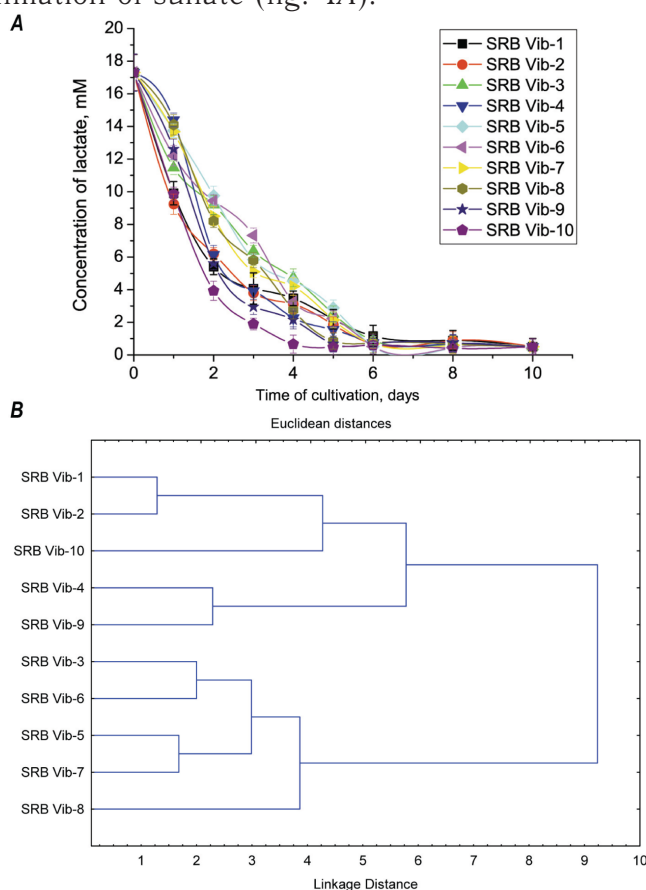


Fig. 4. Lactate usage by the various *Desulfovibrio* sp. strains of the human intestine (A) and the dendrogram showing the result of the clustering parameters (B)



The clustering of the parameters of lactate usage by the studied strains has showed that the strains *Desulfovibrio sp.* Vib-1 with *Desulfovibrio sp.* Vib-9 and *Desulfovibrio sp.* Vib-10, as well as *Desulfovibrio sp.* Vib-4 with *Desulfovibrio sp.* Vib-9 form cluster. Moreover, the *Desulfovibrio sp.* strain Vib-3 with *Desulfovibrio sp.* strain Vib-6 and *Desulfovibrio sp.* strain Vib-7 with *Desulfovibrio sp.* strain Vib-5 as well as *Desulfovibrio sp.* strain Vib-8 form another cluster. In this case, there are formed a clear division into two isolated cluster on the dendrogram (fig. 4B).

Among all of the studied strains, *Desulfovibrio sp.* strain Vib-7 produced the highest concentration of acetate ions (up to 15.87 mM) on the fifth day of cultivation; while the bacteria used about 97% of lactate in the medium, compared to its initial concentration of lactate. The *Desulfovibrio sp.* strain Vib-5 produced the lowest concentration (up to 14.36 mM) on the eighth day of cultivation, compared with the vibrio-shaped strains. Under these conditions, the strain used about 98% of lactate in the medium, compared to its initial concentration (fig. 5A).

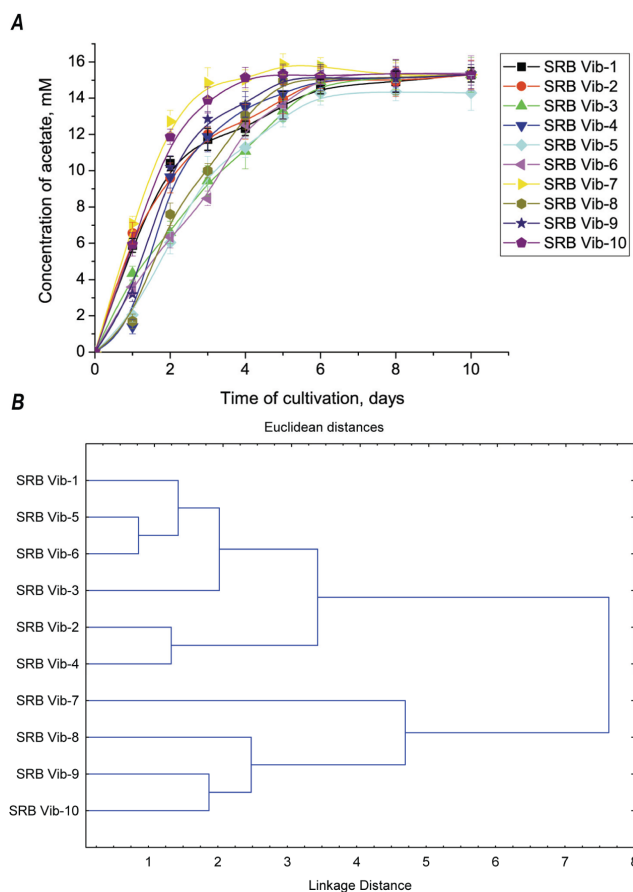


Fig. 5. Acetate production by the various *Desulfovibrio sp.* strains of the human intestine (A) and the dendrogram showing the result of the clustering parameters (B)

The results of the cluster analysis of the parameters of the acetate production by the strains have showed the formation of two separate clusters on the dendrogram (fig. 5B). Bacterial strains *Desulfovibrio* sp. Vib-2 with *Desulfovibrio* sp. Vib-4, *Desulfovibrio* sp. strain Vib-6 with *Desulfovibrio* sp. strain Vib-5 and *Desulfovibrio* sp. Vib-3 as well as *Desulfovibrio* sp. Vib-1 form one cluster. The *Desulfovibrio* sp. strain Vib-7 and *Desulfovibrio* sp. strain Vib-8 as well as *Desulfovibrio* sp. strain Vib-9 with *Desulfovibrio* sp. strain Vib-10 form another cluster on the dendrogram by this parameters.

Thus, the results of the studies established that the various studied isolated bacterial *Desulfovibrio* sp. strains performed dissimilatory sulfate reduction intensively. The increased level of sulfates in the intestine can lead to intensive development of *Desulfovibrio* sp. strains and the increase in sulfide and acetate concentrations. Hydrogen sulfide is the main product of metabolism of these strains and can be accumulated in significant quantities in the intestine. Increased sulfide and acetate concentrations can lead to the inhibition of digestive processes in the human intestine. Hydrogen sulfide can also cause cytotoxic and potential carcinogenic effects and the development of intestinal diseases [4, 9, 10, 16, 18]. It is known that hydrogen sulfide affects butyrate oxidation processes and, consequently, can cause damage to the integrity of the epithelial barrier cells and inflammation of the colon epithelium [13, 14, 15]. It is known from the literature that *Desulfovibrio* sp. bacteria cause bloody diarrhea, weight loss and anorexia in animals and human. Under these conditions, epithelial hyperplasia, abscesses and inflammatory infiltrates can occur [10, 14, 18].

The correlation coefficients (r) between the parameters of dissimilatory sulfate reduction by the *Desulfovibrio* sp. strains were defined (Table). Between biomass and sulfate ($r = -0.975$); biomass and lactate ($r = -0.974$); sulfate and sulfide ($r = -0.97$); sulfate and acetate ($r = -0.844$); lactate and acetate ($r = -0.97$); and lactate and sulfide ($r = -0.976$) a strong inversely negative correlation has been estimated.

Between biomass and sulfide ($r = +0.969$); biomass and acetate ($r = +0.85$); lactate and sulfate ($r = +0.982$); acetate and sulfide ($r = +0.894$) a strong positive correlation has been estimated.

The correlation coefficient ranges from -1.0 to +1.0. The closer r is to +1 or -1, more closely the two variables are related. If r is close to 0, it means there is no relationship between the variables. If r is positive, it means that as one variable gets larger the other gets larger. If r is negative it means that as one gets larger, the other gets smaller (often called an «inverse» correlation). While the correlation coefficients are normally reported as $r =$ (a value between -1 and +1), squaring them makes then easier to understand. The values between 0.7 and 1.0 (-0.7 and -1.0) indicate a strong positive (negative) linear relationship via a firm linear rule [3].



Correlation coefficients (r) between dissimilatory sulfate reduction parameters by the various *Desulfovibrio sp.* strains

SRB Vib-1					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.991	0.993	-0.969	0.671
Sulfate	-0.991	1	-0.999	0.979	-0.729
Sulfide	0.993	-0.999	1	-0.983	0.731
Lactate	-0.969	0.979	-0.983	1	-0.832
Acetate	0.671	-0.729	0.731	-0.832	1
SRB Vib-2					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.977	0.98	-0.941	0.698
Sulfate	-0.977	1	-0.997	0.983	-0.803
Sulfide	0.98	-0.997	1	-0.984	0.808
Lactate	-0.941	0.983	-0.984	1	-0.89
Acetate	0.698	-0.803	0.808	-0.89	1
SRB Vib-3					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.986	0.988	-0.957	0.864
Sulfate	-0.986	1	-0.999	0.987	-0.897
Sulfide	0.988	-0.999	1	-0.985	0.896
Lactate	-0.957	0.987	-0.985	1	-0.95
Acetate	0.864	-0.897	0.896	-0.95	1
SRB Vib-4					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.978	0.98	-0.996	0.9
Sulfate	-0.978	1	-0.938	0.99	-0.825
Sulfide	0.98	-0.938	1	-0.97	0.939
Lactate	-0.996	0.99	-0.97	1	-0.889
Acetate	0.9	-0.825	0.939	-0.889	1
SRB Vib-5					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.954	0.98	-0.969	0.891
Sulfate	-0.954	1	-0.982	0.979	-0.848
Sulfide	0.98	-0.982	1	-0.988	0.916
Lactate	-0.969	0.979	-0.988	1	-0.921
Acetate	0.891	-0.848	0.916	-0.921	1
SRB Vib-6					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.943	0.932	-0.957	0.871
Sulfate	-0.943	1	-0.99	0.978	-0.88
Sulfide	0.932	-0.99	1	-0.981	0.899
Lactate	-0.957	0.978	-0.981	1	-0.947
Acetate	0.871	-0.88	0.899	-0.947	1
SRB Vib-7					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.988	0.988	-0.993	0.867
Sulfate	-0.988	1	-0.975	0.972	-0.81
Sulfide	0.988	-0.975	1	-0.993	0.9
Lactate	-0.993	0.972	-0.993	1	-0.897
Acetate	0.867	-0.81	0.9	-0.897	1
SRB Vib-8					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.976	0.981	-0.975	0.934
Sulfate	-0.976	1	-0.99	0.991	-0.934
Sulfide	0.981	-0.99	1	-0.972	0.912
Lactate	-0.975	0.991	-0.972	1	-0.966
Acetate	0.934	-0.934	0.912	-0.966	1
SRB Vib-9					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.983	0.972	-0.988	0.924
Sulfate	-0.983	1	-0.968	0.987	-0.883
Sulfide	0.972	-0.968	1	-0.972	0.948
Lactate	-0.988	0.987	-0.972	1	-0.924
Acetate	0.924	-0.883	0.948	-0.924	1
SRB Vib-10					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.978	0.9	-0.996	0.886
Sulfate	-0.978	1	-0.862	0.979	-0.827
Sulfide	0.9	-0.862	1	-0.93	0.99
Lactate	-0.996	0.979	-0.93	1	-0.91
Acetate	0.886	-0.827	0.99	-0.91	1

Total correlation coefficients for all SRB Vib-1-10 bacterial strains					
	Biomass	Sulfate	Sulfide	Lactate	Acetate
Biomass	1	-0.975	0.969	-0.974	0.85
Sulfate	-0.975	1	-0.97	0.982	-0.844
Sulfide	0.969	-0.97	1	-0.976	0.894
Lactate	-0.974	0.982	-0.976	1	-0.912
Acetate	0.85	-0.844	0.894	-0.912	1



Taking into consideration all of the obtained results: the studies of bacterial *Desulfovibrio* sp. strains growth in the medium, their sulfate and lactate usage, the production of hydrogen sulfide and acetate by the strains, and cluster and correlation analyses of the parameters of the growth by the various *Desulfovibrio* sp. strains, the isolated bacteria may cause various human intestinal diseases and inflammatory bowel processes. Therefore these bacteria are quite interesting and promising for further studies.

Thus, the intense growth of various *Desulfovibrio* sp. strains perhaps depends on the use of sulfate and lactate and the accumulation of hydrogen sulfide and acetate. Having used all of the sulfate and lactate in the medium, the bacteria stopped growing and the stationary growth phase began. Among all of the isolated bacterial strains the highest biomass (up to 3.89 g/l) was accumulated by the *Desulfovibrio* sp. strain Vib-7. Clustering of bacterial growth parameters has showed the greatest similarity between strains *Desulfovibrio* sp. strain Vib-7 and *Desulfovibrio* sp. strain Vib-9 by the tested parameter.

The studied bacterial strains of *Desulfovibrio* genus actively reduce sulfate ions and use these ions as an electron acceptor. The strains used sulfate fully on the sixth day of cultivation. Clustering of the parameters of sulfate usage has showed that the strains *Desulfovibrio* sp. Vib-1 and *Desulfovibrio* sp. Vib-2 were combined in one cluster, and the strains *Desulfovibrio* sp. Vib-7 and *Desulfovibrio* sp. Vib-9 were in another cluster. The highest concentrations of hydrogen sulfide (up to 3.23 mM) and acetate ions (up to 15.87 mM) among all the studied strains were produced by the bacteria *Desulfovibrio* sp. strain Vib-7. The strong correlation between parameters of dissimilatory sulfate reduction by the *Desulfovibrio* sp. various strains has been estimated.

I.V. Кушкевич

Університет ветеринарних та фармацевтичних наук Брно,
Palackeho 1/3, CZ-61242 Брно, Чеська Республіка, тел: +420732215046,
e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

ДИСИМІЛЯЦІЙНЕ ВІДНОВЛЕННЯ СУЛЬФАТІВ РІЗНИМИ ШТАМАМИ *DESULFOVIBRIO* SP. КИШЕЧНИКА ЛЮДИНИ

Реферат

Метою даного дослідження було вивчити процес дисиміляційного відновлення сульфату різними штамми *Desulfovibrio* sp. кишечника людини, зокрема ріст бактерій, використання ними сульфату і лактату, утворення гідроген сульфіду і ацетату, а також виконати кластерний та кореляційний аналіз цього процесу. **Методи.** Мікробіологічні методи досліджень використані під час культивування штамів бактерій,



фотометричні для визначення бактеріальної біомаси та концентрації гідроген сульфід; концентрацію іонів сульфату визначено турбідометричним методом, а кількість лактату встановлено за лактатдегідрогеназою. Продукування штамми ацетат іонів визначено методом титрування. На основі експериментальних даних також проведено статистичний аналіз отриманих результатів. **Результати.** Різні штамми *Desulfovibrio sp.* накопичували різну біомасу упродовж 10 днів культивування у модифікованому середовищі Кравцова-Сорокіна. Найбільшу біомасу (до 3,89 г/л) накопичували бактерії *Desulfovibrio sp.* штам Vib-7 на шостий день культивування. Кластеризація параметрів бактеріального росту показала найбільшу подібність між штамми *Desulfovibrio sp.* штам Vib-7 і *Desulfovibrio sp.* штам Vib-9. Використавши сульфат і лактат середовища, бактерії переставали рости і виходили на стаціонарну фазу росту. Кластеризація параметрів використання сульфату показала, що штамми *Desulfovibrio sp.* Vib-1 і *Desulfovibrio sp.* Vib-2 були об'єднані в один кластер, а штамми *Desulfovibrio sp.* Vib-7 і *Desulfovibrio sp.* Vib-9 були віднесені до іншого кластеру. Встановлено високий ступінь кореляції між параметрами дисиміляційного відновлення сульфатів (ростом, відновленням сульфату, нагромадженням сірководню, використанням лактату і утворенням ацетату) штамми *Desulfovibrio sp.* Отже, отримані результати можуть бути перспективними для подальших досліджень, зокрема для створення моделей виразкових колітів, прогнозування і попередження запальних захворювань кишечника людини.

Ключові слова: сульфатвідновлювальні бактерії, *Desulfovibrio*, мікробіоценоз кишечника, запальні захворювання кишечника.

И.В. Кушкевич

Университет ветеринарных и фармацевтических наук Брно,
Palaskeho 1/3, CZ-61242 Брно, Чешская Республика, тел: +420732215046,
e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

ДИССИМИЛЯТИВНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ СУЛЬФАТОВ РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ *DESULFOVIBRIO SP.* КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА

Реферат

Целью данного исследования было изучить процесс диссимиляционного восстановления сульфата разными штаммами *Desulfovibrio sp.* кишечника человека, в частности рост бактерий, использование ими сульфата и лактата, накопление гидроген сульфида и ацетата, а также провести кластерный и корреляционный анализ этого процесса. **Методы.** Микробиологические методы исследований использованы при культивировании штаммов бактерий, фотометрические для



определения бактериальной биомассы и концентрации гидроген сульфида; концентрацию ионов сульфата определено турбидометрическим методом, а количество лактата установлено по лактатдегидрогеназе. Продуцирование штаммами ацетат ионов определено методом титрования. На основе экспериментальных данных также проведен статистический анализ полученных результатов. **Результаты.** Различные штаммы *Desulfovibrio* sp. накапливали различную биомассу в течение 10 дней культивирования в модифицированной среде Кравцова-Сорокина. Наибольшую биомассу (до 3,89 г/л) накапливали бактерии *Desulfovibrio* sp. штамм Vib-7 на шестой день культивирования. Кластеризация параметров бактериального роста показала наибольшее сходство между штаммами *Desulfovibrio* sp. штамм Vib-7 и *Desulfovibrio* sp. штамм Vib-9. Используя сульфат и лактат со среды, бактерии прекращали расти и выходили на стационарную фазу роста. Кластеризация параметров использования сульфата показала, что штаммы *Desulfovibrio* sp. Vib-1 и *Desulfovibrio* sp. Vib-2 были объединены в один кластер, а штаммы *Desulfovibrio* sp. Vib-7 и *Desulfovibrio* sp. Vib-9 были отнесены к другому кластеру. Установлена высокая корреляционная зависимость между параметрами диссимиляционного восстановления сульфатов (ростом, восстановлением сульфата, накоплением сероводорода, использованием лактата и образованием ацетата) штаммами *Desulfovibrio* sp. Таким образом, полученные результаты могут быть перспективными для дальнейших исследований, в частности для создания моделей язвенных колитов, прогнозирования и предупреждения воспалительных заболеваний кишечника человека.

Ключевые слова: сульфат-восстановительные бактерии, *Desulfovibrio*, микробиоценоз кишечника, воспалительные заболевания кишечника.

REFERENCES

1. Babko A.K., Pyatnitsky I.V. Quantitative analysis. — Kyiv: High School. — 1974. — 243 p.
2. Barton L.L., Hamilton W.A. Sulphate-reducing Bacteria. Environmental and Engineered. — Cambridge University Press. — 2007. — 553 p.
3. Chen P.Y., Popovich P.M. Correlation: Parametric and Nonparametric Measures. — Sage University Papers Series on Quantitative Applications in the Social Sciences. — 2002. — 104 P.
4. Cummings J.H., Macfarlane G.T., Macfarlane S. Intestinal Bacteria and Ulcerative Colitis // Curr Issues Intest Microbiol. — 2003. — 4. — P. 9–20.
5. Gibson G.R., Cummings J.H., Macfarlane G.T. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of health subjects and patients with ulcerative colitis // FEMS Microbiol Ecol. — 1991. — 86. — P. 103–112.



6. Gibson G.R., Macfarlane G.T., Cummings J.H. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine // Gut. — 1993a. — 34. — P. 437–439.
7. Gibson G.R., Macfarlane S., Macfarlane G.T. Metabolic interactions involving sulphate-reducing and methanogenic bacteria in the human large intestine // FEMS Microbiol Ecol. — 1993b. — 12. — P. 117–125.
8. Kolmert A., Wikstrom P., Hallberg K.B. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures // Journal of Microbiological Methods. — 2000. — 41. — P. 179–184.
9. Kushkevych I.V. Sulfate-reducing bacteria of the human intestine. I. Dissimilatory sulfate reduction // Sci Int Jour Biological studies/Studia Biologica. — 2012a. — 6(1). — P. 149–180.
10. Kushkevych I.V. Sulfate-reducing bacteria of the human intestine. II. The role in the diseases development // Sci Int Jour Biological studies/Studia Biologica. — 2012b. — 6(2). — P. 221–250.
11. Kushkevych I.V., Moroz O.M. Growth of various strains of sulfate-reducing bacteria of human large intestine // Sci. Int. Jour. Biol. studies/Studia Biologica. — 2012. — 6(3). — P. 107–116.
12. Lakin G.F. Biometry. — Moscow High School. — 1990. — 352 p.
13. Loubinoux J., Bronowicji J.P., Pereira I.A. et al. Sulphate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory diseases // FEMS Microbiol Ecol. — 2002. — 40. — P. 107–112.
14. Loubinoux J., Mory F., Pereira I.A., Le Faou A.E. Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* // Jour Clin Microbiol. — 2000. — 38. — P. 931–934.
15. Macfarlane S., Dillon J.F. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract // Jour Appl Microbiol. — 2007. — 102. — P. 1187–1196.
16. Pitcher M.C., Cummings J.H. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? // Gut. — 1996. — 39. — P. 1–4.
17. Postgate J.R. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. — Cambridge: Cambridge Univ. Press. — 1984. — 199 p.
18. Rowan F.E., Docherty N.G., Coffey J.C., O'Connell P.R. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis // British Journal of Surgery. — 2009. — 96. — P. 151–158.
19. Vlizlo V.V., Fedoruk R.S., Makar I.A. et al. Physiological and biochemical methods of researches in biology, stockbreeding and veterinary medicine. — Handbook Institute of Animal Biology. Third Edition: revised and enlarged Lviv. — 2004. — 402 p.

Стаття надійшла до редакції 19.06.2013 р.



УДК 579.811.41:579.238.79

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів,
79005, Україна, тел.: +38 067 492 76 81, e-mail: m_gorishnyi @ukr.net

НАГРОМАДЖЕННЯ БІЛКА У КЛІТИНАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8 ЗА РІЗНИХ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ОРГАНІЧНОГО ЖИВЛЕННЯ

Мета досліджень – встановити особливості нагромадження білка у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 залежно від мінерального та органічного типу живлення мікроорганізмів. **Методи.** В роботі використані загальноприйняті мікробіологічні методи досліджень, стандартний метод визначення концентрації білка за методом Лоурі, біохімічний метод визначення концентрації глюкози за допомогою аналітичного набору “Діаглюк-2”, проведена статистична обробка даних. **Результати.** Встановлено, що стимулюючий ефект на процеси нагромадження білкових молекул в клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 виявляє внесення L-глутаміну, L-глутамату, L-аспартату та α -кетоглутарату. Досліджено, що голодування по катіонах Fe^{2+} за умов відсутності катіонів амонію в середовищі культивування призводить до пригнічення процесів нагромадження біомаси та білка у клітинах досліджуваного штаму. Встановлено, що в анаеробних умовах зелені сіркові бактерії *C. limicola* ІМВ К-8 ефективно здійснюють азотфіксацію, як за умов темряви так і при освітленні.

Ключові слова: *C. limicola* ІМВ К-8, L-глутамін, L-глутамат, L-аспартат, глюкоза, глікоген.

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії родини *Chlorobiaceae* є облигатними анаеробами які використовують діоксид карбону як основне джерело вуглецю. Представники *Chlorobiaceae* суттєво відрізняються за здатністю метаболізувати різні джерела нітрогену. Зелені сіркові бактерії *C. limicola* ІМВ К-8 ефективно нагромаджують біомасу збагачену вуглеводами [1, 2] та іншими полімерними молекулами на дешевих мінеральних субстратах [7, 8]. Перетворення амінного нітрогену в клітинах зелених сіркобактерій *C. limicola* ІМВ К-8 та механізми його регуляції досліджені недостатньо. Раніше нами було встановлено, що за умов культивування зелені сіркові бактерії можуть нагромаджувати значні кількості органічного карбону [1, 2], що може бути використано у біотехнологічних цілях.

Натомість метою цієї роботи було дослідити особливості нагромадження білка у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 за різних умов мінерального та органічного живлення.

© М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, 2013



Матеріали і методи

Дослідження були проведені з використанням культури зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 [2]. Бактерії культивували у рідкому середовищі GSB протягом 8–10 діб при температурі 27–29 °С. Біомасу бактерій визначали фотоелектроколориметрично [1, 2]. Вміст глюкози у неклітинних екстрактах визначали ферментативно за допомогою аналітичного набору “Діаглюк-2” [2]. Концентрацію глікогену розраховували за глюкозою після проведення кислотного гідролізу [5]. Концентрацію білка визначали методом Лоурі [5]. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням програми “Origin 6.0”. Вибір тактики статистичного опрацювання і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [4] за рівня достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

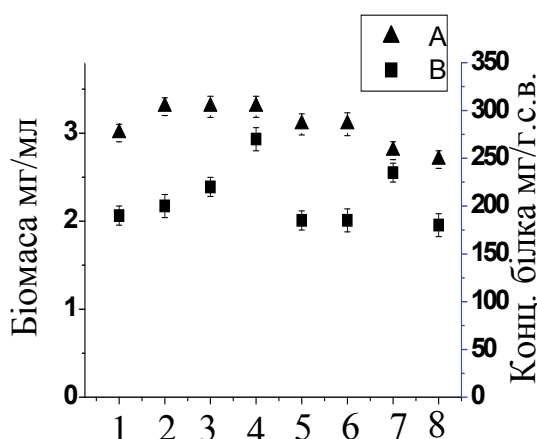
Згідно отриманих результатів [2] штам зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 використовує для нагромадження біомаси лише певний спектр амінокислот: L-глутамат, L-аспартат, L-пролін, L-триптофан, L-глутаміну і L-аспарагін (в концентрації 0,1%). Інші амінокислоти не стимулюють ріст штаму, або інколи навіть його пригнічують.

Проведено визначення впливу вищевказаних амінокислот на процеси нагромадження білка в клітинах досліджуваного штаму (рис. 1). Слід зазначити, що стимулюючий ефект спричиняло внесення таких амінокислот: L-глутаміну, L-глутамату та L-аспартату, проте найвищий рівень білка спостерігали у паралелі, що містила одночасно L-глутамін, L-глутамат і L-аспартат (250 мг/г.с.в., що на 25% вище ніж у контролі).

Рис. 1. Вплив органічних екзогенних субстратів на біосинтез білка у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8.

A – біомаса, B – білок: 1 – (контроль – к), 2 – (к + L-глутамат), 3 – (к + L-аспартат), 4 – (к + L-глутамін + L-глутамат + L-аспартат), 5 – (к + L-пролін), 6 – (к + L-триптофан), 7 – (к + L-глутамін), 8 – (к + L-аспарагін).

Fig. 1. Effect of exogenous organic substrates upon protein biosynthesis in the cells of *C. limicola* ІМВ К-8. A – biomass, B – protein 1 – (control – c), 2 – (c + L-glutamate), 3 – (c + L-aspartate), 4 – (c + L-glutamine + L-glutamate + L-aspartate), 5 – (c + L-proline), 6 – (c + L-tryptophane), 7 – (c + L-glutamine), 8 – (c + L-asparagine).



Також нами була перевірена можливість вирощування досліджуваного штаму на різних органічних джерелах карбону, які стимулювали нагромадження біомаси [2] з подальшим визначенням білка в клітинах зелених сіркових бактерій (рис. 2).

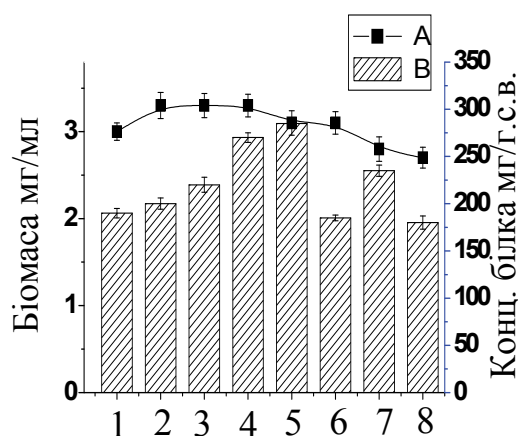


Рис. 2. Вплив органічних екзогенних субстратів на біосинтез білка у клітинах *C. limicola* IMB K-8.

A – біомаса, B – білок: 1 – (контроль – к), 2 – (к + ацетат), 3 – (к + піруват), 4 – (к + оксалоацетат), 5 – (к + α-кетоглутарат), 6 – (к + цитрат), 7 – (к + L-сукцинат), 8 – (к + фумарат).

Fig. 2. Effect of exogenous organic substrates upon protein biosynthesis in the cells of *C. limicola* IMB K-8.

A – biomass, B – protein: 1 – (control – c), 2 – (c + acetate), 3 – (c + pyruvate), 4 – (c + oxaloacetate), 5 – (c + α-ketoglutarate), 6 – (c + citrate), 7 – (c + L-succinate), 8 – (c + fumarate).

В результаті проведеної роботи встановлено, що найвищий стимулюючий ефект на процеси нагромадження білка виявляв α-кетоглутарат. Слід зазначити, що за цих умов культивування спостерігалось зростання кількості білка до 270 мг/г.с.в., що на 30–35% більше порівняно з мінеральним середовищем GSB (контроль).

Для встановлення співвідношення у нагромадженні відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8 ендогенних вуглеводів та білка, клітини одночасно вирощували за умов зростання кількості ендогенних вуглеводів, на модифікованому середовищі GSB: ацетат 0,1% + піруват 0,1% + ізоцитрат 0,05% + α-кетоглутарат 0,05% + 50% нітрогенне + 50% фосфорне голодування + 50% мінеральне голодування + 80% CO₂ без внесення NO₃⁻ [1, 2] з подальшим визначенням концентрації ендогенних вуглеводів та білка (рис. 3).

Слід зазначити, що за оптимальних умов органічного та неорганічного живлення *C. limicola* IMB K-8, нам вдалось нагромадити біомасу у якій концентрація глікогену становила 240–250 мг/г.с.в. при одночасному зниженні концентрації білка до 80–100 мг/г.с.в. Отримані результати можуть бути корисними при біотехнологічному використанні цього штаму.



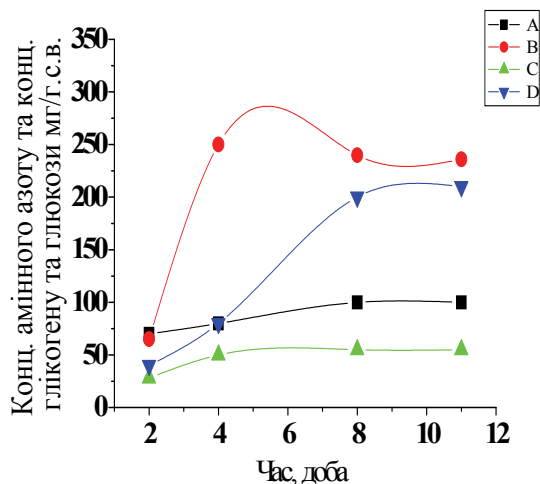


Рис. 3. Нагромадження білкових молекул, глюкози та глікогену у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8.

А — дослідний зразок (концентрація білка), В — дослідний зразок (концентрація глікогену). С — нагромадження глікогену за умов контролю (мінеральне GSB), D — концентрація білка за умов контролю (мінеральне GSB).

Fig. 3. Accumulation of protein molecules, glucose and glycogen in the cells of *C. limicola* IMB K-8.

A — prototype (protein concentration), B — prototype (the concentration of glycogen), C — accumulated glycogen in control (mineral GSB), D — protein concentration in control (mineral GSB).

Також було проведено досліджень із відмитими клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 за умов внесення інгібітора гліюконеогенезу моноїод ацетату в інкубаційну суміш та наявності в різних паралелях проміжних метаболітів циклу Арнона (фумарату, малату, сукцинату, цитрату та α -кетоглутарату). Через 48 годин інкубації встановили кількісні зміни білка в клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 (рис. 4).

Слід зазначити що внесення моноїод ацетату в інкубаційну суміш *C. limicola* ІМВ К-8 (рис. 4 паралель номер 6) призводило до зростання концентрації білка на 50% порівняно з контролем. Інші органічні джерела карбону стимулювали нагромадження білка за цих умов у менших кількостях. Стимулюючий ефект моноїод ацетату на процеси нагромадження білка можна, очевидно, пояснити інгібуванням гліюконеогенезу.

Згідно з літературними даними [4, 5, 6] переважна більшість прокаріотних нітрогеназ належить до трьох основних типів, у яких коферментна частина включає таку комбінацію мінеральних елементів — ферум-молібден перший тип, ферум-ванадій другий тип і ферум-ферум третій тип [5, 6]. Для штаму *C. limicola* ІМВ К-8 було проведено дослідження закономірностей нагромадження біомаси та білкових молекул на мінеральному середовищі GSB, без внесення джерела нітрогену NH_4^+ та одночасної відсутності Fe^{2+} , V і Mo у різних паралелях.

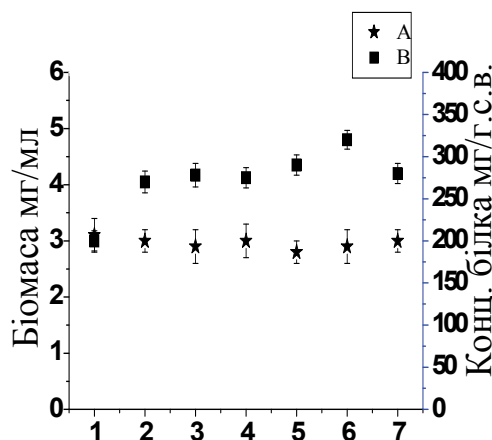


Рис. 4. Вплив моноїод ацетату на процеси нагромадження білка *C. limicola* IMB K-8.

A – біомаса, B – білок: 1 – (контроль – к), 2 – (к + L-глутамін + L-глутамат + L-аспартат – 3L), 3 – (контроль + 3L + моноїод ацетат), 4 – (к + 3L + моноїод ацетат + оксалоацетат), 5 – (к + 3L + моноїод ацетат + сукцинат), 6 – (к + 3L + моноїод ацетат + α-кетоглутарат), 7 – (к + 3L + моноїод ацетат + цитрат).

Fig. 4. Effect of monoiodine acetate on the processes of accumulation of protein in the cells *C. limicola* IMB K-8.

A – biomass, B – protein: 1 – (control – c), 2 – (control + L-glutamine + L-glutamate + L-aspartate – 3L), 3 – (c + 3L + monoiodine acetate), 4 – (c + 3L + oxaloacetate + monoiodine acetate), 5 – (c + 3L + monoiodine acetate + succinate), 6 – (c + 3L + monoiodine acetate + α-ketoglutarate), 7 – (c + 3L + monoiodine acetate citrate).

Слід зазначити, що за цих умов культивування використовували виключно воду першого класу для приготування середовища GSB (рис. 5).

Встановлено, що за умов внесення Fe^{2+} спостерігається ріст культури та нагромадження білка, навіть за відсутності джерела нітрогену NH_4^+ в середовищі культивування. Слід зазначити, що ідентичні показники біомаси спостерігалися і за відсутності, навіть одночасної Mo і V . Натомість одночасна відсутність катіонів Fe^{2+} та NH_4^+ в середовищі культивування призводила до загибелі мікроорганізмів. Отримані результати дають можливість припустити, що, очевидно, у клітинах *C. limicola* IMB K-8 домінуючим є третій тип нітрогеназного комплексу – ферум-ферум залежна форма, інгібуючий ефект на яку спричиняє, і/або внесення NH_4^+ , і/або відсутність Fe^{2+} в середовищі культивування.

Дослідженнями [3, 5] встановлено, що не усі штами зелених сіркових бактерій здатні до анаеробної азотфіксації як при освітленні так і у темряві. Для перевірки цих властивостей проведено такі дослідження. Відмиті клітини *C. limicola* IMB K-8 з логарифмічної фази були поміщені в інкубаційну суміш яка не містила джерела нітрогену, як за умов освітлення так і в темряві. Після 48 годин інкубації було проведено визначення біо-

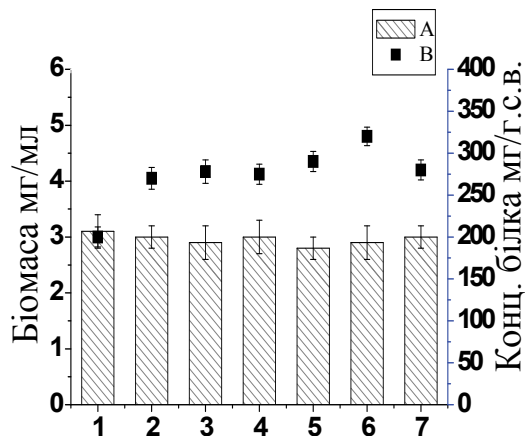


Рис. 5. Вплив різного типу мінерального живлення на утворення біомаси зеленими сірковими бактеріями та нагромадження білка.

A – біомаса, B – білок: 1 – (контроль – мінеральне GSB), 2 – (контроль – $\text{NH}_4^+ - \text{Fe}^{2+}$), 3 – (контроль – $\text{NH}_4^+ - \text{Mo} + \text{Fe}^{2+}$), 4 – (контроль – $\text{NH}_4^+ - \text{V} + \text{Fe}^{2+}$), 5 – (контроль – $\text{NH}_4^+ - \text{V} - \text{Mo} + \text{Fe}^{2+}$), 6 – (контроль – $\text{NH}_4^+ + \text{V} + \text{Mo} + \text{Fe}^{2+}$)

Fig. 5. Effect of different types of mineral nutrition on the formation of biomass by green sulfur bacteria and accumulation of proteins.

A – biomass, B – protein: 1 – (control – mineral GSB), 2 – (control – $\text{NH}_4^+ - \text{Fe}^{2+}$), 3 – (control – $\text{NH}_4^+ - \text{Mo} + \text{Fe}^{2+}$) 4 – (control – $\text{NH}_4^+ - \text{V} + \text{Fe}^{2+}$), 5 – (control – $\text{NH}_4^+ - \text{V} - \text{Mo} + \text{Fe}^{2+}$), 6 – (control – $\text{NH}_4^+ + \text{V} + \text{Mo} + \text{Fe}^{2+}$).

маси та концентрації білка (рис. 6). Встановлено, що концентрація білка знаходилася практично на одному рівні, як за умов освітлення так і за умов темряви. Проте за умов темряви біомаса знизилася на 30% (рис. 6)

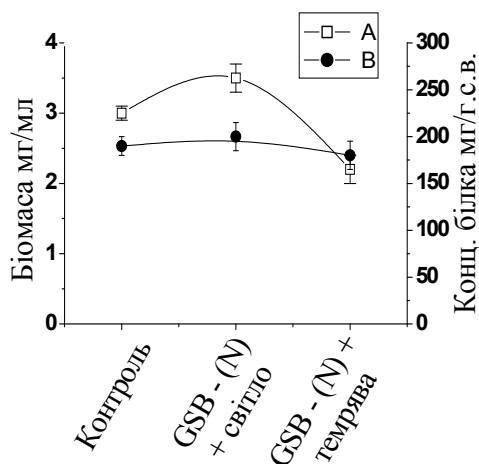


Рис. 6. Вплив освітлення та темряви на процеси нагромадження білка у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8. А – біомаса, В – білок.

Fig. 6. Effect of light and darkness on the processes of accumulation of protein in the cells *C. limicola* ІМВ К-8. A – biomass, B – protein.

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що зелені сіркові бактерії *C. limicola* ІМВ К-8 ефективно здійснюють азотфіксацію в анаеробних умовах, як за умов темряви так і при освітленні. Досліджено, що, очевидно, домінуючою формою нітрогеназного комплексу у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 є ферум-ферум залежна форма. Також встановлено, що стимулюючий ефект на процеси нагромадження білка у клітинах зелених сіркобактерій виявляє одночасне внесення низькомолекулярних інтермедіатів L-глутамату, L-глутаміну, L-аспартату та α -кетоглутарату в інкубаційну суміш за умов наявності інгібітора глюконеогенезу моноїод ацетату.

M.B. Gorishnyi, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevskoho str., Lviv, 79005, Ukraine,
tel.: +38067492 76 81, e-mail: m_gorishniy@ukr.net

ACCUMULATION OF PROTEIN IN *CHLOROBBIUM* *LIMICOLA* ІМВ К-8 CELLS

Summary

The purpose of research — to investigate certain features of protein accumulation in *C. limicola* ІМВ К-8 cells, depending on the type of mineral and organic nutrition. **Methods.** The paper used conventional microbiological methods of research, the standard method for determining the protein concentration by the method of Lowry, biochemical method for determining glucose concentration using analytical set “Diagluk-2”, statistical analysis of data is performed. **Results.** Stimulating effect on the processes of accumulation of protein molecules in *C. limicola* ІМВ К-8 cells has L-glutamine, L-glutamate, L-aspartate and α -ketoglutarate. Fasting on Fe^{2+} ions in the absence of ammonium ions in the culture medium caused inhibition of the processes of biomass and protein accumulation in the cells of the test strain. It is shown that green sulfur bacteria *C. limicola* ІМВ К-8 efficiently perform nitrogen fixation under anaerobic conditions, both in the terms of darkness and light.

Key words: *C. limicola* ІМВ К-8, L-glutamine, L-glutamate, L-aspartate, glucose, glycogen.

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, ул. Грушевського, 4, Львів,
79005, Україна, тел.: +38067492 76 81, e-mail: m_gorishniy@ukr.net

НАКОПЛЕНИЕ БЕЛКА В КЛЕТКАХ *CHLOROBBIUM LIMICOLA* ІМВ К-8

Реферат

Цель исследований — изучить особенности накопления белка в клетках *C. limicola* ІМВ К-8 в зависимости от минерального и органи-



ческого типа питания микроорганизмов. **Методы.** В работе использованы общепринятые микробиологические методы исследований, стандартный метод определения концентрации белка по методу Лоури, биохимический метод определения концентрации глюкозы с помощью аналитического набора «Диаглюк-2», проведена статистическая обработка данных. **Результаты.** Установлено, что стимулирующее влияние на процессы накопления белковых молекул в клетках *C. limicola* ІМВ К-8 оказывает L-глутамин, L-глутамат, L-аспартат и *α*-кетоглутарат. Исследования голодания по катионам Fe²⁺ в отсутствие катионов аммония в культуральной среде вызывает ингибирование процессов накопления биомассы и белка в клетках исследуемого штамма. Установлено, что зеленые серные бактерии *C. limicola* ІМВ К-8 эффективно выполняют фиксацию азота в анаэробных условиях, как при освещении так и в темноте.

Ключевые слова: *C. limicola* ІМВ К-8, L-глутамин, L-глутамат, L-аспартат, глюкоза, гликоген.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 // «Український біохімічний журнал» — 2009. — № 5. Т 81. — С. 26–33.
2. Гудзь С. П., Горішний М. Б., Гнатуш С. О. Бактеріальний фотосинтез — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2011. — 180 с.
3. Современная микробиология / Под. ред. Й. Ленгера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля — М.: Наука, 2005. — 449 с.
4. Лапач С.И. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С.И., Чубенко А.В., Бабич П.Н. — К.: Морион, 2001. — 408с.
5. Blankenship M. T. Madigan C. E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. — Boston: Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 1997.
6. Castenholz R. W., Pierson B. K. The prokaryotes. — New York: Springer, 1978.
7. Sireveg R., Buchanan B. Mechanisms of CO₂ fixation in bacterial photosynthesis studied by carbon isotope fractionation technique // Arch. Microbiol. — 1977. — Vol. 16, N 112. — P. 35–38.
8. Mas J., Gemerden H. Storage products in purple and green sulfur bacteria. In: Anoxygenic photosynthetic — D.: Kluwer Acad. Pub. (Netherlands), 1995.

Стаття надійшла до редакції 5.09.2013 р.



УДК 579.222: 547.979.8

А.К. Велигодська, О.В. Федотов

Донецький національний університет,
вул. Університетська, 24, Донецьк, 83000, Україна,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

ВМІСТ МЕЛАНІНІВ У БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ ПОРЯДКІВ *POLYPORALES* ТА *AGARICALES*

Метою роботи було вивчення загального вмісту меланінів у карпофорах, міцелії і культуральному фільтраті деяких видів базидіоміцетів. **Методи.** Екстракцію меланінів з мікологічного матеріалу проводили шляхом його лужного гідролізу 2 N розчином NaOH у співвідношенні 1:10 з подальшим осадженням концентрованою HCl. Осад, що утворився після додавання соляної кислоти розчиняли в 5 мл 2 N розчину NaOH. Загальний вміст пігменту визначали спектрофотометричним методом та розраховували за допомогою калібрувальної кривої (за пірокатехіном). Вміст меланіну в культуральному фільтраті визначали прямим фотоколориметруванням. **Результати.** Визначено загальний вміст меланінів у карпофорах 50 видів базидіоміцетів, з яких 27 належать до порядку *Polyporales* та 23 – порядку *Agaricales*. Найвищий вміст меланінів виявлено в карпофорах видів *Ganoderma applanatum*, *Fomitopsis pinicola*, *Inonotus obliquus* та *Lentinus edodes*. Виділено в міцеліальну культуру 30 штамів 10 видів базидіальних грибів, для яких визначена динаміка росту та накопичення меланінів в міцелії та культуральному фільтраті при культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі. **Висновок.** Серед 50 видів базидіоміцетів найбільший вміст меланінів виявлено у представників поліпоральних видів – *Ganoderma applanatum*, *Fomitopsis pinicola* та *Inonotus obliquus* і агарикальних видів – *Fistulina hepatica* та *Lentinus edodes*. Встановлено, що найбільш активні види *Fomes fomentarius* та *Lentinus edodes* – перспективні для подальших досліджень з метою оптимізації умов культивування для отримання меланінів міцеліального походження.

Ключові слова: базидіоміцети, карпофори, меланіни, міцелій, культуральний фільтрат

Одним з універсальних процесів, що протікає в клітині є перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) – ланцюгове окиснення ненасичених жирних кислот за участю молекулярного кисню, що забезпечує розширене утворення вільних радикалів [1, 6]. Відомо, що активація цих процесів у відповідь на дію різноманітних факторів є одним з адаптаційних механізмів і спрямована на збільшення проникності клітинної мембрани, полегшення роботи мембранних білків. Однак, виходячи за певні межі, ці зрушення

© А.К. Велигодська, О.В. Федотов, 2013



набувають самостійного патогенетичного значення. Рівень протікання процесів ПОЛ контролюється антиоксидантною системою організму, до якої відносяться меланіни [1, 8]. Це група високомолекулярних органічних пігментів, що утворюються при окисній полімеризації фенолів і широко розповсюджені в живій природі [4, 5]. Меланіни проявляють радіо- і фотопротекторну, антиканцерогенну та іншу дії [8]. Отже, вони відіграють істотну роль у формуванні стресостійкості та адаптації організмів до факторів середовища [2, 11]. Встановлено, що порівняно з штучно синтезованими, природні пігменти менш токсичні та більш ефективні при застосуванні [11, 14]. Як наслідок, висока затребуваність та вартість меланінів зумовлює пошук потенційних джерел їх отримання, у тому числі, серед грибів [8, 11].

Комплексне вивчення здатності до синтезу меланінів мікологічних об'єктів почалося наприкінці ХХ ст. і торкається, переважно, нижчих грибів родів *Aspergillus*, *Daldinia*, *Saccharomyces* та *Phycomyces* [8]. Досліджено вміст меланінів в плодових тілах вищих базидіальних грибів видів *Lentinula edodes*, *Inonotus obliquus*, *Phellinus robustus*, *Ganoderma applanatum*, *Fomes fomentarius* і ін. [3, 11, 14]. Однак, наявні дані дають недостатньо сформоване уявлення про кількісний вміст меланінів в плодових тілах, міцелії та культуральному фільтраті базидіоміцетів, що обумовлює необхідність подальших скринінгових робіт у цьому напрямку.

Виходячи з вищезазначеного, метою роботи було вивчення загального вмісту меланінів у карпофорах, міцелії і культуральному фільтраті деяких видів базидіоміцетів.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були карпофори 50 видів макроміцетів, з яких 27 належать до порядку *Polyporales* та 23 — порядку *Agaricales*, а також міцелій та культуральний фільтрат 30 штамів 10 видів відділу *Basidiomycetes* (табл. 1). В роботі використовували штами *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill. (Т-10, Ff-09, Ff-1201); *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. (Ls-08, Ls-09, Ls-0912); *Fistulina hepatica* Schff. ex Fr. (Fh-08, Fh-18); *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. (F-03, F-06, F-1, F-202); *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Hk-35, P-004, P-01, P-039, P-107, P-192, P-208); *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (Sc-10, Sc-1101, Sc-1102); *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. (Th-11), *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryv. (Tb-11), *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Gl-1, Gl-2, Gl-11) та *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler (Le-2, Le-4, Le-10) [10]. Ці штами були виділені в чисту культуру з дикорослих плодових тіл (ПТ) базидіоміцетів, зібраних в різних місцевостях Донецької області. Систематичне положення досліджених базидіоміцетів встановлено згідно визначника [13].

З метою вивчення вмісту меланінів, зібрані карпофори промивали, висушували та подрібнювали до розміру часток $0,1 \pm 0,01$ мм. Дослідні



штами культивували в 50 мл глюкозо-пептонного середовища (г/ л): глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,05; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 [13] (рН 6,5) поверхнево в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл впродовж 6, 9 та 12 діб за температури 27,5 °С [3, 7]. Інокулюмом слугували 10-ти добові міцеліальні культури штамів, вирощені на сусло-агарі. Після закінчення терміну культивування, отримували культуральний фільтрат (КФ) і міцелій шляхом фільтрування культуральної рідини при 5 ± 1 °С. Міцелій висушували на фільтрувальному папері до постійної ваги і охолоджували до $1 \pm 0,5$ °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання в охолодженій ступці. В подальших дослідженнях використовували подрібнені карпофори (ПК), гомогенізований міцелій (МГ) та КФ. Біомасу ПК та міцелію визначали ваговим методом після висушування до постійної ваги [7].

Меланіни екстрагували шляхом його лужного гідролізу 2 N розчином NaOH у співвідношенні 1:10 з подальшим осадженням концентрованою HCl. Осад, що утворився після додавання соляної кислоти розчиняли в 5 мл 2 N розчину NaOH. Загальний вміст пігменту визначали спектрофотометричним методом та розраховували за допомогою калібрувальної кривої (за пірокатехіном) [5]. Вміст меланіну в культуральному фільтраті визначали прямим фотоколориметруванням КФ [5].

Меланінові пігменти ідентифікували за допомогою якісних реакцій з KMnO_4 ; розчини пігментів — в 0,1 N NaOH у присутності 10% H_2O_2 [5].

Дослідження проводили у трикратній повторності. Статистичне опрацювання проводили з використанням програм *Microsoft Excel* та пакету програм [9] для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів з визначенням параметричних критеріїв, однорідності та значущості. З метою визначення рівня кореляції між вмістом меланінів у міцелії та КФ одновікових культур визначали лінійний коефіцієнт кореляції. Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Достовірність даних та різниці між ними оцінювали за критерієм Стьюдента за рівнем значущості $p \leq 0,05$ [9].

Результати та обговорення

Дослідження проводили в два етапи, на першому з яких визначали загальний вміст меланінів у 225 карпофорах 27 видів поліпоральних та у 220 карпофорах 23 видів агарикальних базидіоміцетів. Узагальнені результати цього дослідження представлені в табл. 1, 2.

Як видно з табл. 1, 2 загальний вміст меланінів у зразках карпофорів коливається як у грибів одного виду (наприклад, дикорослих та культивованих базидіоміцетів *F. velutipes* та *P. ostreatus*), так і різних видів грибів, що підтверджує отримані дані для інших видів базидіоміцетів [8, 12].

За вмістом меланінів в карпофорах поліпоральні базидіоміцети можна розподілити на три групи (табл. 1).



Таблиця 1

Вміст меланінів у карпофорах базидіоміцетів порядку *Polyporales*

Table 1

Total content of melanins in basidiocarps of *Polyporales*

Вид	Кількість карпофорів	Вміст меланінів, мг/г
<i>Amyloporia lenis</i>	9	0
<i>Auricularia auricula-judae</i>	12	0,55 ± 0,03
<i>Chaetoporus ambiguus</i>	3	0,62 ± 0,02
<i>Daedalea quercina</i>	6	0
<i>Fibuloporia mollusca</i>	9	0,20 ± 0,00
<i>Fomes fomentarius</i>	9	44,21 ± 1,17
<i>Fomitopsis pinicola</i>	12	63,24 ± 2,04
<i>Ganoderma applanatum</i>	9	53,47 ± 1,03
<i>Ganoderma lucidum</i>	9	4,74 ± 0,12
<i>Heterobasidion annosum</i>	12	0
<i>Hydnum ochraceum</i>	3	1,15 ± 0,05
<i>Inonotus obliquus</i>	15	83,77 ± 0,22
<i>Irpex lacteus</i>	6	0,20 ± 0,01
<i>Laeticorticium roseum</i>	12	1,38 ± 0,10
<i>Laetiporus sulphureus</i>	9	6,28 ± 0,12
<i>Phellinus igniarius</i>	12	14,24 ± 1,51
<i>Phellinus pomaceus</i>	9	2,16 ± 0,04
<i>Piptoporus betulinus</i>	6	1,47 ± 0,01
<i>Polyporus squamosus</i>	12	2,92 ± 0,01
<i>Sparassis crispa</i>	6	0,45 ± 0,05
<i>Trametes campestris</i>	6	1,84 ± 0,02
<i>Trametes squalens</i>	3	1,61 ± 0,01
<i>Trametes versicolor</i>	6	9,45 ± 0,15
<i>Trametes zonatus</i>	15	8,43 ± 0,04
<i>Tyromyces lacteus</i>	6	0,26 ± 0,01
<i>Tyromyces revolutus</i>	9	0,93 ± 0,01
<i>Tyromyces undosus</i>	3	1,46 ± 0,01

Примітка: досліджено карпофори дикорослих грибів.



Вміст меланінів у карпофорах базидіоміцетів порядку *Agaricales*Total content of melanins in basidiocarps of *Agaricales*

Вид	Кількість карпофорів	Вміст меланінів, мг/г
<i>Agaricus arvensis</i> *	5	1,73 ± 0,05
<i>Agaricus bisporus</i> **	9	1,86 ± 0,08
<i>Agaricus campestris</i> *	5	1,00 ± 0,01
<i>Agrocybe cylindracea</i> **	9	1,42 ± 0,01
<i>Coprinus comatus</i> *	15	3,20 ± 0,01
<i>Coprinus micaceus</i> *	15	3,00 ± 0,01
<i>Fistulina hepatica</i> *	9	9,34 ± 0,17
<i>Flammulina velutipes</i> *	27	6,51 ± 0,13
<i>Flammulina velutipes</i> **	3	0,95 ± 0,01
<i>Kuehneromyces mutabilis</i> *	9	2,16 ± 0,09
<i>Lentinus edodes</i> **	9	24,67 ± 0,21
<i>Lyophyllum connatum</i> *	3	0,90 ± 0,02
<i>Lyophyllum loricatum</i> *	3	1,88 ± 0,16
<i>Marasmius oreades</i> *	3	0,91 ± 0,03
<i>Pholiota aurivella</i> *	21	0
<i>Pholiota squarrosa</i> *	3	0
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> **	3	0
<i>Pleurotus eryngii</i> **	6	0,45 ± 0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> *	34	2,78 ± 0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i> **	3	0,93 ± 0,02
<i>Pleurotus ostreatus</i> var. Florida **	3	0,30 ± 0,00
<i>Stropharia aeruginosa</i> *	6	1,67 ± 0,03
<i>Stropharia rugosoannulata</i> **	5	1,15 ± 0,02
<i>Schizophyllum commune</i> *	5	1,71 ± 0,12
<i>Tricholoma flavovirens</i> *	5	3,60 ± 1,19
<i>Tricholoma sejunctum</i> *	5	0,90 ± 0,01

Примітка: “ * ” — дикорослі гриби, “ ** ” — комерційні гриби.



У першу групу входять 23% досліджених базидіоміцетів, що мають незначний вміст меланінів в карпофорах, рівень якого знаходиться в межах від 0,20 мг/г у *I. lacteus* до 0,93 мг/г у *T. revolutus*. До другої групи відноситься 50% видів з вмістом меланінів від 1,15 мг/г у *H. ochraceum* до 9,45 мг/г у *T. versicolor*. Найбільший вміст меланінів виявлено в карпофорах *G. applanatum*, *F. pinicola* та *I. obliquus*, що складає 53,47; 63,24 та 83,77 мг/г, відповідно. У карпофорах трьох видів поліпорових базидіоміцетів, а саме — *D. quercina*, *H. annosum* та *A. lenis* меланіни не виявлено.

Більшість агарикальних грибів порівняно з поліпоровими мають значно нижчий загальний вміст меланінів (табл. 2). Так, 30% грибів досліджених видів має вміст меланінів в межах від 0,30 мг/г у *P. ostreatus* var. *Florida* до 0,95 мг/г у *F. velutipes*. До групи з помірним вмістом меланінів від 1,0 мг/г у *A. campestris* до 6,51 мг/г у *F. velutipes* можна віднести 14 видів. Найвищий загальний вміст меланінів від 9,34 до 24,67 мг/г, зафіксовано в карпофорах *F. hepatica* та *L. edodes*, відповідно. Однак, максимальний рівень вмісту меланінів у агарикоміцету *L. edodes* у 3,4 рази нижчий за вміст цих речовин у карпофорах трутовика *I. obliquus*. Для порівняння зазначимо, що середній вміст меланінів у біомасі *Saccharomyces neoformans* var. *nighcans*, запропонованого для отримання цього пігменту, складає 20–31 мг/г біомаси [8].

Отже, найвищий вміст меланінів виявлено в карпофорах базидіоміцетів поліпоральних видів *G. applanatum*, *F. pinicola*, *I. obliquus* і агарикальних видів *F. hepatica* та *L. edodes*.

Встановлено, що за культивування на ГПС всі досліджувані штами досягають максимуму накопичення біомаси на 12-ту добу росту (табл. 3). Найпродуктивнішими є штами *S. commune* Sc-1101 і Sc-10 та штам *F. velutipes* F-202. Найнижчі значення накопичення біомаси зафіксовані для штамів *P. ostreatus* P-192 та *F. fomentarius* Ff-09.

Встановлено, що більшість штамів (96%) здатні до поступового накопичення меланінів в міцелії та близько 50% штамів — в культуральній рідині. Вміст меланінів в КФ значно нижчий ніж в міцелії. Це можна пояснити роллю меланінів у клітині та особливостями осмотрофного живлення грибних організмів, оскільки вони беруть участь в адаптогенних реакціях на зміни умов середовища та нейтралізації вільних радикалів [1, 8, 14]. Отже, виконуючи специфічні функції в грибному організмі, ці сполуки синтезуються та накопичуються в місцях локалізації зазначених процесів.

Для всіх штамів порядку *Polyporales* характерним є найбільше накопичення меланінів в міцелії на 12 добу росту. Максимальний вміст меланінів в міцелії зафіксовано для виду штаму *F. fomentarius* T-19 — 3,02 мг/г. Щодо вмісту меланінів у КФ, то для більшості штамів максимальний вміст цих речовин зафіксовано на 12-ту, а для штаму *F. fomentarius* T-10 — на 9-ту добу культивування. Найбільше меланінів у КФ накопичує штам *F. fomentarius* Ff-1201 (0,21 мг/мл). Меланін не виявлено в КФ протягом всього терміну культивування штамів *T. hirsuta* Th-11 та *T. biforme* Tb-11.



Динаміка накопичення біомаси (г/л) штамами базидіоміцетів

Table 3

Dynamic of accumulation of absolute dry biomass (g/l) of the strains of Basidiomycetes

Штам	6 діб	9 діб	12 діб
Порядок <i>Polyporales</i>			
<i>G. lucidum</i> Gl-1	0,69 ± 0,07	1,65 ± 0,01	2,34 ± 0,04
<i>G. lucidum</i> Gl-2	0,71 ± 0,01	1,91 ± 0,08	2,74 ± 0,19
<i>G. lucidum</i> Gl-11	0,58 ± 0,04	1,34 ± 0,05	2,01 ± 0,21
<i>F. fomentarius</i> Ff-09	0,21 ± 0,01	0,56 ± 0,06	1,46 ± 0,10
<i>F. fomentarius</i> T-10	0,32 ± 0,02	0,77 ± 0,02	2,07 ± 0,06
<i>F. fomentarius</i> Ff-1201	1,14 ± 0,05	2,33 ± 0,08	3,21 ± 0,03
<i>L. sulphureus</i> Ls-08	0,34 ± 0,09	0,97 ± 0,03	1,56 ± 0,12
<i>L. sulphureus</i> Ls-09	0,24 ± 0,02	0,65 ± 0,04	1,24 ± 0,08
<i>L. sulphureus</i> Ls-0912	0,56 ± 0,05	1,13 ± 0,03	1,98 ± 0,03
<i>T. hirsuta</i> Th-11	1,77 ± 0,04	2,89 ± 0,14	3,77 ± 0,15
<i>T. biforme</i> Tb-11	1,28 ± 0,01	1,72 ± 0,06	3,44 ± 0,11
Порядок <i>Agaricales</i>			
<i>F. hepatica</i> Fh-08	0,72 ± 0,04	1,23 ± 0,02	3,45 ± 0,24
<i>F. hepatica</i> Fh-09	0,85 ± 0,06	1,41 ± 0,10	3,14 ± 0,16
<i>S. commune</i> Sc-10	3,18 ± 0,07	5,62 ± 0,04	6,48 ± 0,42
<i>S. commune</i> Sc-1101	3,56 ± 0,03	5,46 ± 0,02	7,1 ± 0,28
<i>S. commune</i> Sc-1102	2,88 ± 0,02	4,3 ± 0,03	4,52 ± 0,18
<i>F. velutipes</i> F-1	0,67 ± 0,05	2,56 ± 0,03	3,71 ± 0,06
<i>F. velutipes</i> F-06	0,42 ± 0,02	2,76 ± 0,06	3,88 ± 0,04
<i>F. velutipes</i> F-03	1,06 ± 0,06	2,91 ± 0,03	5,56 ± 0,07
<i>F. velutipes</i> F-202	0,95 ± 0,03	2,43 ± 0,02	6,12 ± 0,35
<i>P. ostreatus</i> P-004	1,13 ± 0,01	3,12 ± 0,18	5,55 ± 0,26
<i>P. ostreatus</i> P-107	0,87 ± 0,04	1,99 ± 0,06	4,66 ± 0,31
<i>P. ostreatus</i> P-105	0,53 ± 0,07	1,02 ± 0,07	1,13 ± 0,08
<i>P. ostreatus</i> Hk-35	0,45 ± 0,02	2,35 ± 0,04	3,67 ± 0,14
<i>P. ostreatus</i> P-01	0,55 ± 0,05	2,12 ± 0,07	4,06 ± 0,17
<i>P. ostreatus</i> P-208	0,96 ± 0,02	2,68 ± 0,03	5,13 ± 0,50
<i>P. ostreatus</i> P-039	0,34 ± 0,01	1,98 ± 0,07	3,54 ± 0,10
<i>P. ostreatus</i> P-192	0,28 ± 0,03	0,67 ± 0,11	1,22 ± 0,18
<i>L. edodes</i> Le-10	0,44 ± 0,02	1,03 ± 0,13	2,14 ± 0,13
<i>L. edodes</i> Le-2	0,59 ± 0,03	0,95 ± 0,16	1,73 ± 0,14
<i>L. edodes</i> Le-4	0,61 ± 0,02	1,11 ± 0,03	1,91 ± 0,05



Загальний вміст меланінів у міцелії та КФ деяких штамів базидіоміцетів представлено у табл. 4, 5.

Таблиця 4

Вміст меланінів в міцелії (мг/г) та культуральному фільтраті (мг/мл) штамів базидіоміцетів порядку *Polyporales*

Table 4

Dynamic of melanins accumulation of mycelium (mg/g) and culture filtrate (mg/ml) of *Polyporales* strains

Штам	Міцелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>G. lucidum</i> Gl-1	0,22 ± 0,03	0,96 ± 0,06	1,55 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02
<i>G. lucidum</i> Gl-2	0,19 ± 0,05	1,11 ± 0,01	1,41 ± 0,03	0	0	0,12 ± 0,01
<i>G. lucidum</i> Gl-11	0,25 ± 0,04	1,08 ± 0,02	1,49 ± 0,04	0	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,02
<i>F. fomentarius</i> Ff-09	0,78 ± 0,07	1,63 ± 0,12	2,18 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,02
<i>F. fomentarius</i> Ff-1201	1,09 ± 0,52	1,86 ± 0,23	2,98 ± 0,34	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,21 ± 0,04
<i>F. fomentarius</i> T-10	1,15 ± 0,14	1,45 ± 0,10	3,02 ± 0,25	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,02
<i>L. sulphureus</i> Ls-08	0,26 ± 0,03	0,47 ± 0,07	0,63 ± 0,03	0	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
<i>L. sulphureus</i> Ls-09	0,13 ± 0,01	0,28 ± 0,09	0,41 ± 0,04	0	0	0,03 ± 0,01
<i>L. sulphureus</i> Ls-0912	0,22 ± 0,05	0,27 ± 0,01	0,66 ± 0,08	0	0	0,04 ± 0,01
<i>T. hirsuta</i> Th-11	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0	0	0
<i>T. biforme</i> Tb-11	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0	0	0

Аналіз даних загального вмісту меланінів у культурах агарикальних грибів показав, що для більшості штамів (95%) найвищий вміст цих речовин в міцелії припадає на 12-ту добу культивування. Винятком є штам *F. hepatica* Fh-18, де такий максимум спостерігається вже на 9-ту добу росту. Серед досліджених штамів найбільший вміст меланінів зафіксовано для штамів *L. edodes* Le-2 і Le-10, який коливається в межах від 4,66 до 4,88 мг/г і в 1,5 рази більше цього показника для штаму *F. fomentarius* T-10. Меланіни в КФ не виявлено для 47% досліджених штамів агарикальних грибів. Серед штамів, що накопичують меланіни в КФ, слід відмітити *L. edodes* Le-4 з найвищим вмістом цих речовин у 0,37 мг/мл на 12-ту добу культивування. У попередніх дослідженнях для переважної більшості досліджених штамів базидіоміцетів також показано підвищений вміст антиокисних оксиредуктаз [5, 12].



Таблиця 5

Вміст меланінів в міцелії (мг/г) та культуральному фільтраті (мг/мл) штамів базидіоміцетів порядку *Agaricales*

Table 5

Dynamic of melanins accumulation of mycelium (mg/g) and culture filtrate (mg/ml) of *Agaricales* strains

Штам	Міцелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>F. hepatica</i> Fh-08	0,14 ± 0,02	0,29 ± 0,02	0,33 ± 0,09	0	0	0,08 ± 0,03
<i>F. hepatica</i> Fh-18	0,11 ± 0,02	0,24 ± 0,05	0,18 ± 0,10	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,12 ± 0,03
<i>F. velutipes</i> F-03	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0	0	0,14±0,03
<i>F. velutipes</i> F-06	0,34 ± 0,02	0,41 ± 0,09	0,56 ± 0,11	0	0,06±0,03	0,12±0,07
<i>F. velutipes</i> F-1	0,19 ± 0,04	0,25 ± 0,01	0,35 ± 0,05	0	0	0
<i>F. velutipes</i> F-202	0,56 ± 0,14	0,65 ± 0,09	0,98 ± 0,11	0	0,07±0,01	0,13±0,01
<i>P. ostreatus</i> Hk-35	0,09 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0	0	0,08 ± 0,03
<i>P. ostreatus</i> P-01	0,14 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0	0	0
<i>P. ostreatus</i> P-039	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0	0	0
<i>P. ostreatus</i> P-105	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0	0	0
<i>P. ostreatus</i> P-107	0,13 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,25 ± 0,06	0	0	0,07 ± 0,03
<i>P. ostreatus</i> P-192	0,06 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0	0	0
<i>P. ostreatus</i> P-208	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,31 ± 0,12	0	0,08±0,01	0,11±0,04
<i>P. ostreatus</i> P-004	0,08 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,22 ± 0,12	0	0	0
<i>S. commune</i> Sc-10	0,11 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0	0	0
<i>S. commune</i> Sc-1101	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0	0	0
<i>S. commune</i> Sc-1102	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0	0	0
<i>L. edodes</i> Le-2	1,31 ± 0,13	2,65 ± 0,11	4,88 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,29 ± 0,04
<i>L. edodes</i> Le-4	0,86 ± 0,03	1,22 ± 0,14	3,16 ± 0,25	0	0,21 ± 0,07	0,37 ± 0,09
<i>L. edodes</i> Le-10	1,55 ± 0,03	2,06 ± 0,08	4,66 ± 0,34	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01



Таким чином, встановлено, що більшість досліджених штамів здатні до накопичення цих речовин в міцелії та близько половини — в КФ, де вміст меланінів значно нижчий за такий в міцелії. Серед 50 видів базидіомицетів найбільший вміст меланінів виявлено у представників поліпоральних видів — *Ganoderma applanatum*, *Fomitopsis pinicola* та *Inonotus obliquus* і агарикальних видів — *Fistulina hepatica* та *Lentinus edodes*. Для подальших досліджень з оптимізації умов культивування і отримання меланінів міцеліального походження відібрано штами *F. fomentarius* T-10 та *L. edodes* Le-2 і Le-10.

А.К. Велигодская, О.В. Федотов

Донецкий национальный университет,
ул. Университетская, 24, Донецк, 83000, Украина,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

СОДЕРЖАНИЕ МЕЛАНИНОВ В БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБАХ ПОРЯДКОВ *POLYPORALES* И *AGARICALES*

Реферат

Целью работы было изучение общего содержания меланинов в карпофорах, мицелии и культуральном фильтрате некоторых видов базидиомицетов. **Методы.** Экстракцию меланинов из микологического материала проводили путем его щелочного гидролиза 2 N раствором NaOH в соотношении 1:10 с последующим осаждением концентрированной HCl. Осадок после добавления соляной кислоты растворяли в 5 мл 2 N раствора NaOH. Общее содержание пигментов определяли спектрофотометрическим методом и рассчитывали с помощью калибровочной кривой (по пирокатехину). Содержание меланина в культуральном фильтрате определяли прямым фотоколориметрированием. **Результаты.** Определено общее содержание меланина в карпофорах 50 видов базидиомицетов, из которых 27 относятся к порядку *Polyporales* и 23 — к порядку *Agaricales*. Проведено сравнительный анализ полученных данных на основе чего выделены карпофоры видов *Ganoderma applanatum*, *Fomitopsis pinicola*, *Inonotus obliquus* и *Lentinus edodes*, которые имеют высокое общее содержание меланинов. Выделено в мицелиальную культуру 30 штаммов 10 видов базидиальных грибов, для которых определена динамика роста и накопления меланинов в мицелии и культуральном фильтрате при культивировании на глюкозо-пептонной среде. **Вывод.** Из 50 видов базидиомицетов наибольшее содержание меланинов выявлено у представителей полипоральных видов — *Ganoderma applanatum*, *Fomitopsis pinicola* и *Inonotus obliquus* и агарикальных видов — *Fistulina hepatica* и *Lentinus edodes*. Отобраны штаммы видов *Fomes fomentarius* и *Lentinus edodes* — перспективные для дальнейших исследований с целью оптими-



зации условий культивирования для получения меланинов мицелиального происхождения.

Ключевые слова: меланины, базидиомицеты, карпофоры, мицелий, культуральный фильтрат.

A.K. Veligodska, O.V. Fedotov

Donetsk National University, 46, Shchorsa str., Donetsk, 83000, Ukraine,
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

THE TOTAL MELANINS CONTENT OF BASIDIOMYCETES ORDERS *POLYPORALES* AND *AGARICALES*

Summary

The **aim** of the study was to investigate the total content of melanin in carpophorus, mycelia and culture filtrate species of Basidiomycetes. **Methods.** Extraction of melanin mycological material carried by its alkali hydrolysis 2 N NaOH solution in the ratio of 1:10, followed by precipitation with concentrated HCl. The precipitate after the addition of hydrochloric acid dissolved in 5 ml of 2 N solution of NaOH. The total pigment content was determined by spectrophotometric method and were calculated using a calibration curve (by pyrocatechol). The melanin content in the culture filtrate was determined by the direct colorimetry CF. **Results.** The total melanin content in fruiting bodies of 50 species of *Basidiomycetes*, 27 of which are belonging to order *Polyporales* and 23 to order *Agaricales* was investigated. The comparative analysis on the basis of the obtained data showed the highest total melanin content in *Ganoderma applanatum*, *Fistulina hepatica* and *Laetiporus sulfureus* carpophorus. Dynamics of growth and carotenoid synthesis in mycelium and cultural filtrate of 30 strains of 10 basidiomycetes species isolated in mycelial culture was studied on glucose-peptone medium. **Conclusion.** Selected strains of *Fomes fomentarius* and *Lentinus edodes* are promising for further studies to optimize the culture conditions for mycelial melanin origin.

Key words: melanins, basidiomycetes, carpophores, mycelium, cultural filtrate.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В.А. Механизмы стресса и перекисное окисление липидов // Успехи современной биологии. — 1991. — Т. 111, Вып. 6. — С. 923–932.
2. Беккер Э.Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1988. — 230 с.



3. Бухало А.С. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре / А.С. Бухало, В.Г. Бабицкая, Н.А. Бисько, С.П. Вассер, И.А. Дудка, Н.Ю. Митропольская, О.Б. Михайлова, А.М. Негрейко, Н.Л. Поединок, Э.Ф. Соломко. — К.: — Альтерпрес, 2011. — 212 с.
4. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
5. Ветчинкина Е.П. Динамика образования гликопротеинов и высокомолекулярных фенолов грибом *Lentinus edodes* в условиях глубокого культивирования / Е.П. Ветчинкина, В.Е. Никитина, В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба, Т.А. Пучкова, Д.А. Смирнов, О.В. Осадчая // Самарская Лука. 2008. — Т. 17, № 2(24). — С. 367–372.
6. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Сорос. образоват. журн. — 2000. — № 12. — С. 13–19.
7. Государственная Фармакопея СССР. — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.
8. Жданова Н.Н. Экстремальная экология грибов в природе и эксперименте. / Н.Н. Жданова, А.И. Василевская // К.: Наукова думка, 1982. — 168 с.
9. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
10. Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів — основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіомицетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету. — Донецьк: ДонНУ, 2012. — С. 209–213.
11. Babitskaya V.G. The Nature of Melanin Pigments of Several Micro- and Macromycetes / V.G. Babitskaya, V.V. Shcherba // Applied Biochemistry and Microbiology — Applied Biochemistry and Microbiology — May 2002, — Volume 38, — Issue 3, — P. 247–251.
12. Fedotov O.V. Antioxidizing activity of mycelium of mushroom stocks *Pleurotus* (Fr.) Kumm. and *Flammulina* (Curt.: Fr.) Sing. // International journal of medicinal mushrooms, 2001. — Vol. 3, № 2–3. — P. 143.
13. Kirk P.M. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers. — Wallingford, CAB International, 2001. — 655 p.
14. Velišek J. Biosynthesis of food constituents: natural pigment / J. Velišek, J. Davídek, K. Cejpek // Food Sci., 2007. — Vol. 25. — P. 291–315.

Стаття надійшла до редакції 12.03.2013 р.



УДК 579.852.1:631.811.98

І.В. Драговоз, Н.О. Леонова, Д.А. Жукова, Л.В. Авдеєва

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ МСП, 03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: igordragovoz@ukr.net

ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ШТАМА-АНТАГОНІСТА BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS IMB B-7404

Мета. Виявлення спектру екзометаболітів фітогормональної природи штама-антагоніста *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7404, що визначають його фітостимулювальну активність. **Методи.** Вміст фітогормонів визначали методами спектроденситометричної тонкошарової хроматографії та газової хроматографії. **Результати.** Встановлено, що фітостимулювальна активність екзометаболітів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 зумовлена присутністю в їх складі трьох класів гормонів-стимуляторів (ауксинів, цитокінінів, гіберелінів). Показана здатність штаму синтезувати фітогормони-інгібітори: абсцизову кислоту і етилен. **Висновки.** Рівень і спектр фітогормонів, що синтезуються штамом *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404, відповідає особливостям його біології, а саме – сапробіонтному способу існування. Синтез індоліл-3-оцтової кислоти відіграє важливу фізіологічну роль у формуванні асоціативних взаємовідношень штаму з рослинами у ризосфері.

Ключові слова: *B. amyloliquefaciens*, екзометаболіти, фітогормони, фізіологічна роль, фітостимулювальна активність.

Відомо, що більшість природних ризосферних мікроорганізмів здатні до синтезу фітогормональних сполук для формування взаємовідношень з рослиною [14]. Створення ефективних біопрепаратів для рослинництва на основі живих культур мікроорганізмів передбачає вивчення асоціативних зв'язків між бактеріями та рослиною. Такий тип взаємодії опосередковується екзометаболітами мікроорганізмів з фітостимулювальною активністю. Аеробні спороутворювальні бактерії роду *Bacillus* є типовими представниками ґрунтової мікробіоти, серед яких є як ендofітні, так і вільноіснуючі види. Бацили вважаються перспективними агентами біоконтролю, оскільки здатні до високого антагонізму щодо багатьох грибних і бактеріальних фітопатогенів за рахунок синтезу широкого спектру вторинних метаболітів з вираженими бактерицидними та фунгіцидними

© І.В. Драговоз, Н.О. Леонова, Д.А. Жукова, Л.В. Авдеєва, 2013



властивостями [15]. Серед вторинних метаболітів бактерій роду *Bacillus* слід відзначити не лише антибактеріальні та антифунгальні речовини, а й сполуки, що характеризуються фітостимулювальною активністю. Це, в свою чергу, зумовлює доцільність використання штамів бацил у створенні високоефективних біопрепаратів широкого спектру дії для рослинництва. Раніше нами було показано можливість та доцільність використання штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-7404 у складі композиції біопрепарату для зернових культур з метою пригнічення хвороб, збудниками яких є *Fusarium graminearum* і *Cochliobolus sativus* (неопубліковані дані).

В зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідити виявлення спектру екзометаболітів фітогормональної природи штама-антагоніста *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404, що визначають його фітостимулювальну активність.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404 з колекції відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Культивування проводили в періодичних умовах в колбах ємністю 750 мл при 200 об/хв та 37 °С впродовж 18–24 год на рідкому поживному синтетичному середовищі [1]. Середовище засівали 18-годинною культурою бацил в експоненційній фазі росту. Рідку культуру штаму *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404 центрифугували 30 хв при 15000g і температурі 4 °С. Культуральну рідину використовували для аналізу на загальну фітостимулювальну активність екзометаболітів, для специфічного біотестування та для якісного і кількісного визначення фітогормонів фізико-хімічними методами.

Для рулонного методу використовували насіння озимої пшениці сорту Альбатрос одеський. З цією метою на поліетиленові смуги розміром 35x15 см розкладали по 33 насінин, відступаючи від верхнього краю 5 см. Зверху на насіння накладали смужку зволоженого фільтрувального паперу шириною 10–12 см. Скручували в рулон і ставили в склянки з відстояною водопровідною водою та двома розведеннями культуральної рідини *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404 (1:65 та 1:100), підібраними експериментальним шляхом. Морфометричні виміри проростків проводили на 7-му добу. Результати враховували за наростанням надземної та кореневої маси та виражали у відсотках відносно контролю. Повторність дослідів трикратна.

Для дослідження індукції ризогенезу використовували двотижневі живці квасолі сорту Лопата. Варіантами досліду були експериментально підібрані розведення культуральної рідини штаму *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404 1:50, 1:75, 1:100. За контроль слугували відстояна водопровідна вода та препарат-еталон — індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) у концентрації 10^{-5} М [5]. Основні показники фізіологічної активності дослі-



джуваних розчинів: кількість коренів, маса коренів та довжина ділянки, що утворювала корені.

Позаклітинні фітогормони виділяли з культуральної рідини штаму *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404 методом перерозподілу фітогормонів у двох фазах розчинників, що не змішуються між собою [2]. Отримані екстракти (випарені та перерозчинені в етанолі) використовували для специфічного біотестування (ауксинова, цитокинінова та гіберелова активності) і подальшого хроматографічного аналізу фітогормонів.

Для визначення ауксинової активності застосовували відрізки колеоптилів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський. Варіантами досліду були розведення екстрактів культуральної рідини *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 1:200, 1:300 та 1:400. За контроль слугували препарат-еталон — ІОК (10^{-5} М) та відстояна водопровідна вода.

Визначення цитокинінової активності проводили на етиольованих семи-добових сім'ядольних листках огірка сорту Фенікс. Використовували такі розведення етанольного екстракту — 1:200, 1:300 1:400, 1:500 та 1:600. Контролі — препарат-еталон бензиламінопурина (БАП) у концентраціях 10^{-4} М та 10^{-5} М та відстояна водопровідна вода.

Для визначення гіберелової активності використовували гіпокотилі огірка сорту Фенікс за методикою Браєна і Леммінга в модифікації Агністикової [3]. Досліджували розведення гіберелового етанольного екстракту культуральної рідини, а саме 1:200, 1:300 1:400, 1:500 та 1:600. Контролі — препарат-еталон — гіберелова кислота (ГК_3) в концентрації 10^{-5} М та відстояна водопровідна вода.

Отримані етанольні екстракти культуральної рідини *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404 використовували для проведення якісного і кількісного аналізу фітогормональних сполук методом тонкошарової хроматографії [4]. Кількісне визначення ауксинів, цитокинінів та абсцизової кислоти (АБК) проводили за допомогою сканувального спектроденситометра «Сорбфіл» (Росія). Кількість синтезованих позаклітинних фітогормонів розраховували у мікрограмах на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Синтез етилену визначали методом газової хроматографії [10]. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі «Хром-5» (Чехія) з полум'яно-іонізаційним детектором (тверда фаза — β - β 'оксидопропіонітрил). Кількість етилену розраховували за калібрувальним графіком, побудованим згідно розведень етилену і виражали у молях за годину на 1 г АСБ продуцента. Експерименти проводили у 5-ти кратній аналітичній повторності.

Для оцінки достовірності експериментальних даних, представлених в роботі, використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховуючи середнє арифметичне ($X_{\text{ср}}$) і середнє квадратичне відхилення ($S_{\text{ср}}$) за рівня значущості $<0,05$. Аналіз проводили із застосуванням пакета комп'ютерних програм *STATISTICA 6.0* і *Microsoft Excel*.



Результати і обговорення

З метою визначення природи ростової активності штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 досліджено загальний рівень активності його екзометаболітів. При цьому за допомогою рулонного методу у всіх варіантах досліду було виявлено стимуляцію наростання біомаси як коренів, так і пагонів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський (табл. 1).

Таблиця 1

Загальна рістстимулювальна активність екзометаболітів
B. amyloliquefaciens IMB B-7404

Table 1

General growth stimulated activity of *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404

Варіант досліду	Середня маса коренів рослини, г	% до контролю	Середня маса пагона, г	% до контролю	Середня маса проростка, г	% до контролю
Контроль (вода)	0,037±0,006	100	0,076±0,01	100	0,113±0,02	100
Культуральна рідина, 1:65	0,060±0,01	162	0,092±0,01	121	0,152±0,01	135
Культуральна рідина, 1:100	0,052±0,01	140	0,100±0,02	131	0,152±0,02	135

Найбільший фітостимулювальний ефект відмічено для розведення культуральної рідини 1:65. Маса коренів збільшувалася на 62% порівняно з контролем, а маса паростків — на 21%. Корені пшениці були чутливішими до дії екзометаболітів штаму, що є цілком закономірним. Проте загальний приріст біомаси паростків не показав залежності від концентрації культуральної рідини, так як маса паростків пшениці збільшувалася на 34,5% порівняно з контролем в обох варіантах розведень.

Приріст сирової біомаси коренів і паростків свідчить про наявність фітостимулювальних сполук у культуральній рідині. Відомо, що існує 3 класи фітогормонів-стимуляторів, але використання рулонного методу не дає можливості визначити природу фітогормональної активності (ауксинову, цитокінінову, гіберелову). Тому, подальше дослідження фітостимулювальної активності екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 проводилося за допомогою специфічних біотестів.



Отримані результати показали стимулювальний вплив екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 на ризогенез квасолі сорту Лопата (рис. 1). Препарат-еталон (ІОК, 10^{-5} М) підвищував як середню кількість коренів – на 95%, так і на 41,7% приріст біомаси коренів відносно контролю. Аналогічна тенденція стимуляції ризогенезу спостерігалася при дослідженні розведення культуральної рідини 1:50 – відбувалося збільшення кількості коренів і приріст їх біомаси на 13% і 133%, відповідно, тоді як застосування більших розведень (1:75 та 1:100) призводило до зменшення кількості утворених коренів, проте їх біомаса зростала порівняно з контролем на 37% (1:100).

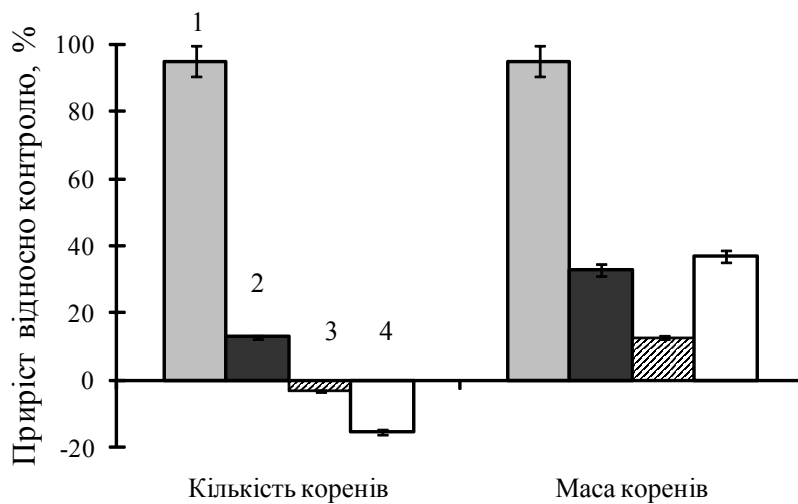


Рис. 1. Вплив культуральної рідини *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 на ризогенез живців квасолі сорту Лопата

1 – ІОК у концентрації 10^{-5} М; 2 – розведення 1:50; 3 – розведення 1:75; 4 – розведення 1:100

Fig. 1. Influence of cultural liquid *B. amyloliquefaciens* IMV B-7404 rhizogenesis on bean cultivar "Lopata"

1 – IAA, 10^{-5} M; 2 – 1:50 dilution; 3 – 1:75 dilution; 4 – 1:100 dilution

Отримані результати свідчать про наявність фітостимулювальних речовин ауксинової природи серед екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404. Це дозволяє зробити припущення щодо наявності інших регуляторів негормональної природи у культуральній рідині досліджуваного штаму, зокрема, вітаміну К, синтез якого є характерним для сапробіонтів роду *Bacillus* [13].

Специфічну біологічну активність екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 (ауксинової, цитокінінової та гіберелової) визначали за допомогою біотестування, що дозволяє оцінити присутність певних класів фітогормональних сполук за їх фізіологічною

дією. Біотестування проводили з використанням відповідних етанольних екстрактів, отриманих з культуральної рідини досліджуваного штаму.

При вивченні ауксинової активності було показано приріст довжини колеоптилів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський з вираженою концентраційною залежністю (рис. 2), що свідчить про наявність у культуральній рідині штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 порівняно високої кількості гормональних сполук ауксинової природи. Так, зафіксовано приріст колеоптилів на 9–15,8% залежно від розведення етанольного екстракту, тоді як препарат-еталон (ІОК, 10^{-5} М) стимулював приріст на 32,4% щодо контролю (вода).

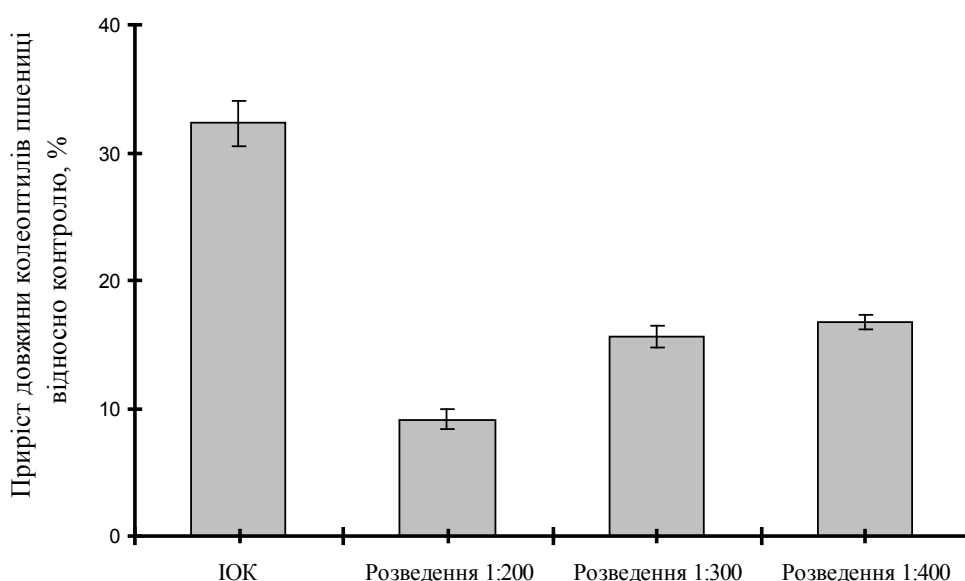


Рис. 2. Добовий приріст довжини відрізків колеоптилів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський за дії екстрактів культуральної рідини *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404

Fig. 2. Daily growth of winter wheat coleoptels (cultivar Albatros odesskiy) under the extract influence of cultural liquid *B. amyloliquefaciens* IMV B-7404

Дослідження специфічної цитокінінової активності показало, що екзометаболіти не проявляли вираженого фітостимулювального ефекту, опосередкованого наявністю цитокінінів. У гібереловому тесті встановлено аналогічну до ауксинової активності концентраційну залежність розведень екстракту культуральної рідини.

Таким чином, методами специфічного біотестування показано присутність серед екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 усіх класів гормонів-стимуляторів. Отримані результати підтверджують дані літератури щодо синтезу відомих класів гормонів-стимуляторів ґрунтовими мікроорганізмами, здатними до асоціативних зв'язків з рослинами [8].

Наступним етапом роботи було проведення фізико-хімічного аналізу фітогормональних сполук. Встановлено, що штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 притаманний середній рівень синтезу ауксинів, зокрема, фізіологічно-активної форми — ІОК — 122,51 мкг/г АСБ, тоді як рівень синтезу цитокінінів виявився досить низьким — 11,05 мкг/г АСБ (табл. 2). Окрім гормонів-стимуляторів, серед екзометаболітів штаму були виявлені гормональні сполуки інгібувальної дії: АБК (2,43 мкг/г АСБ) та етилен (10,4 нмоль/год • г АСБ).

Таблиця 2

Вміст фітогормонів у культуральній рідині *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404

Table 2

Phytohormones content in cultural liquid *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404

Фітогормони		мкг/г абсолютно сухої біомаси	
Ауксини	Індоліл-3-карбоксальдегід	10,28	Σ 132,79
	Індоліл-3-оцтова кислота	122,51	
Цитокініни	Зеатин	9,22	Σ 11,05
	Ізопентеніл-аденін	1,83	
Абсцизова кислота		2,43	
Етилен, нмоль/год • г АСБ		10,4	

Відомо, що синтез фітогормональних речовин розглядають як важливий чинник взаємодії PGPR-бактерій (plant growth promoting rhizobacteria) з рослиною, що позитивно впливає на її ріст і розвиток [11]. Зокрема, встановлено, що синтез фізіологічно активних форм ауксинів притаманний більшості ґрунтових мікроорганізмів, що мають асоціативні зв'язки з рослиною. Молекули ауксинів виступають в ролі сигнальних молекул під час мікробно-рослинної взаємодії [7]. Саме рівень синтезу ауксинів сапробіонтами використовують як селективний маркер для PGPR-бактерій [9]. З іншого боку показано, що навіть низький рівень синтезу ІОК асоціативними бактеріями здатен стимулювати системну стійкість рослини за рахунок прискорення проходження рослинами чутливих до інфекції фаз розвитку [8].

Штам *B. amyloliquefaciens* IMB B-7404 є вільноіснуючим ризосферним ґрунтовим мікроорганізмом і низький рівень синтезу цитокінінів відповідає способу існування даного штаму, оскільки відомо, що саме синтез цитокінінів пов'язаний з ендofітним або симбіотичним способом існування, а їх рівень прямо корелює з ефективністю симбіозу між бактеріями і рослиною [6, 14].



Окрім гормонів-стимуляторів для даного штаму є характерним синтез двох класів фітогормонів з інгібувальною дією — АБК та етилену. Наявність серед екзометаболітів АБК можна розглядати як додатковий фактор формування асоціативних зв'язків штаму з рослиною, оскільки АБК ризосферних мікроорганізмів відіграє роль медіатора мікробно-рослинної взаємодії [6]. З іншого боку, екзогенна АБК діє на рослину як хімічний індуктор резистентності до збудників хвороб, зокрема до *Phytophthora* та *Magnaporthe grisea*, а також виступає в ролі гормонального регулятора стійкості до абіотичних стресів, зокрема, до холоду та посухи [12]. Вважається, що етилен також опосередковує формування асоціативних зв'язків між рослиною та мікроорганізмами [6]. Так, етилен відомий як фітогормон-інгібітор, проте за малих концентрацій він здатен і до стимуляції росту рослини. Окрім того, етилен розглядається як гормон стресу і його потрапляння в рослину при взаємодії з асоціативними бактеріями, ймовірно, може впливати на підвищення стійкості рослини до абіотичних чинників [8].

Таким чином, кількісно та якісно визначено спектр екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7404, що зумовлюють його фітостимулювальну активність. Показано, що штам здатен до синтезу трьох класів гормонів-стимуляторів (ауксинів, цитокінінів, гіберелінів) та двох класів фітогормонів з інгібувальною дією, а саме АБК та етилену. Останні, ймовірно, можуть відігравати роль медіаторних молекул при взаємодії мікроорганізмів з рослиною та додаткових чинників стійкості до абіотичних чинників довкілля. Серед гормонів-стимуляторів відзначено відносно високий рівень синтезу ауксинів, зокрема, ІОК, що свідчить про її важливу фізіологічну роль у формуванні асоціативних взаємовідношень штаму з рослиною в ризосфері.

И.В. Драговоз, Н.О. Леонова, Д.А. Жукова, Л.В. Авдеева

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: igordragovoz@ukr.net

**ФИТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ
ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ШТАМА-АНТАГОНИСТА
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS ИМВ В-7404**

Реферат

Цель. Выявление спектра экзометаболитов фитогормональной природы штамма-антагониста *Bacillus amyloliquefaciens* ИМВ В-7404, определяющих его фитостимулирующую активность. **Методы.** Содержание фитогормонов определяли методами спектроденситометрической



тонкослойной хроматографии и газовой хроматографии. **Результаты.** Установлено, что фитостимулирующая активность экзометаболитов *B. amyloliquefaciens* ИМВ В- 7404 обусловлена присутствием в их составе трех классов гормонов-стимуляторов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов). Показана способность штамма синтезировать фитогормоны-ингибиторы: абсцизовую кислоту и этилен. **Выводы.** Уровень и спектр фитогормонов, синтезируемых штаммом *B. amyloliquefaciens* ИМВ В-7404, соответствует особенностям его биологии, а именно — сапробионтному способу существования. Синтез индолил-3-уксусной кислоты играет важную физиологическую роль в формировании ассоциативных взаимоотношений штамма с растениями в ризосфере.

Ключевые слова: *B. amyloliquefaciens*, экзометаболиты, фитогормоны, физиологическая роль, фитостимулирующая активность

I.V. Dragovoz, N.O. Leonova, D.A. Zhukova, L.V. Avdeeva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Zabolotny St., Kyiv, Ukraine, MSP 03680, e-mail: igordragovoz@ukr.net

EXOMETABOLITES PHYTOSTIMULATION ACTIVITY OF ANTAGONISTIC ACTIVE STRAIN *BACILLUS* *AMYLOLIQUEFACIENS* IMV B-7404

Summary

Aim. The research of phytohormonal natural exometabolites by strain-antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* IMV B-7404, which determines its phytostimulating activity. **Methods.** General growth activity, induction of rhizogenesis, specific biological testing, spectrum densitometric thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, gas chromatography. **Results.** Exometabolites phytostimulating activity of *B. amyloliquefaciens* IMV B-7404 is occurred due presence in its content of three classes of plant hormones-stimulators: auxins, cytokinins and gibberellins. The ability of the strain to synthesize phytohormones-inhibitors such as abscisic acid and ethylene has been shown. **Conclusions.** The level and range of phytohormones synthesized by strain *B. amyloliquefaciens* IMV B-7404 support the peculiarities of it's biology, namely saprobiontic mode of existence. Synthesis of indolyl-3-acetic acid plays an important physiological role in the formation of associative relationships between strains in the plants rhizosphere.

Key words: *B. amyloliquefaciens*, exometabolites, phytohormones, physiological role, phytostimulation activity.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Авдеева Л.В., Осадчая А.И., Хархота М.А.* Композиционное соотношение пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* и пребиотиков для синбиотического препарата // *Мікробіотехн. і біотехн.* — 2012. — №4. — С. 18–24.
2. *Методические* рекомендации по определению фитогормонов. — Киев: Ин-т ботаники АН УССР. — 1988. — 78 с.
3. *Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н.* Гормоны растений гиббереллины. — М.: Наука, — 1973. — 270 с.
4. *Савинский С.В., Драгатов И.В., Педченко В.К.* Определение содержания индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот в одной растительной пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Физиол. и биох. культ. раст.* — 1991. — т. 23, №6. — С. 611–619.
5. *Турецкая Р.Х.* Метод определения активности веществ, стимулирующих корнеобразование // *Методы определения регуляторов роста и гербицидов.* — М.: Наука. — 1966. — С. 15–19.
6. *Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.* Гормоны и гормоноподобные соединения микроорганизмов // *Приклад. биохим. и микробиол.* — 2006. — т. 42, № 3. — С. 261–268.
7. *Ambreen A., Shahida H.* Auxin-producing *Bacillus sp.*: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum* // *Pure Appl. Chem.* — 2010. — 82, № 1. — P. 313–319.
8. *Berg G.* Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2009. — 84. — P. 11–18.
9. *Khalid A., Arshad M., Zahir Z.A.* Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat // *J. Appl. Microbiol.* — 2004. — 96. — P. 473–480.
10. *Kurchii B.A.* Acetylcholine and ethylene: do they share similar receptors and biological action // *Ukr. Bioorganica Acta.* — 2009.— N 1. — P. 36–44.
11. *Maheshwari D.K.* Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. — 2012. — P. 169–184.
12. *Mauch-Mani B., Mauch F.* The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions // *Cur. Opin. Plant Biol.* — 2005. — № 8. — P. 409–414.
13. *Sato T., Yamada Y., Ohtani Yu., Mitsui N., Murasawa H., Araki Sh.* Production of menaquinone (Vitamin K₂) by *Bacillus subtilis* // *J. Biosci. Bioengin.* — 2001. — 91, № 1. — P. 16–20.
14. *Spena A., Estruch J.J., Schell J.* On microbes and plants: New insights in phytohormonal research// *Cur. Opin. Biotech.* — V. 3. — 1992. — P. 159–163.
15. *Whipps J.M.* Microbial interaction and biocontrol in the rhizosphere // *J. Experim. Bot.* — 2001. — V. 52. — P. 487–511.

Стаття надійшла до редакції 07.08.2013 р.



УДК 616.98: 578.812.1

Н.С. Водзінська, Б.М. Галкін, С.В. Водзінський, Т.О. Філіпова

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

АНТИФАГОВА АКТИВНІСТЬ АСИМЕТРИЧНО-ЗАМІЩЕНИХ ПІРИДИЛПОРФІРИНІВ

Мета. Вивчення антивірусних властивостей нових синтетичних асиметрично-заміщених порфіринів з використанням бактеріофагів як модельних вірусів. **Матеріали та методи.** У роботі вивчено здатність вільної основи 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірина та її комплексу з цинком інгібувати активність стафілококового фага, фага T4 та фага T7. Бактеріофаги інкубували у присутності досліджуваних сполук у темнових умовах та при опроміненні видимим світлом, після чого їх титрували за методом подвійних агарових шарів. Кінцеві концентрації порфіринів склали 0,1; 1 та 10 мкМ. Спектри поглинання порфіринів записували після інкубації з фаговою суспензією за допомогою спектрофотометра «Spekol-10» та оцифровували. **Результати.** Показано, що найчутливішим до дії сполук є стафілококовий бактеріофаг, активність якого пригнічувалася вільною основою порфірину на 68% у темнових умовах, та на 80% при фотоактивації. Цинковий комплекс порфірину повністю інактивував цей фаг, як у темнових умовах так і при опроміненні. Бактеріофаг T4 був чутливішим до дії досліджуваних сполук за темнових умов. Так, за темнових умов зниження активності фага у присутності вільної основи порфірину досягало 68%, а цинкового комплексу – 88%, в той час за фотоактивації – 24% та 35%, відповідно. Бактеріофаг T7 навпаки був чутливішим до дії фотоактивованих порфіринів. Зниження його активності у темнових умовах вільною основою порфірину досягало 21%, а цинковим комплексом – 16%, тоді як за опромінення – 28% та 53%, відповідно. Спектроскопічні дослідження показали, що досліджувані порфірини зв'язуються з фагами. **Висновки.** Синтетичні асиметрично-заміщені порфірини пригнічують активність досліджуваних бактеріофагів завдяки формуванню комплексів з фаговими частками.

Ключові слова: антифагова активність, асиметрично-заміщені порфірини, бактеріофаги.

Контроль над вірусними інфекціями є однією з найважливіших проблем сучасної науки. На сьогоднішній день переважна більшість вірусних інфекцій по суті не має засобів етіотропної терапії. Залишається не ви-

© Н.С. Водзінська, Б.М. Галкін, С.В. Водзінський, Т.О. Філіпова, 2013



рішенням також питання хіміотерапії вірусних хвороб рослин та тварин. У пошуку нових препаратів для застосування у сільському господарстві особливу роль відіграє їх екологічна безпечність. До того ж усі виробництва, що засновані на великомасштабних бактеріальних ферментаціях зазнають шкоди від вірусів бактерій — бактеріофагів, боротьба з якими є однією з актуальних задач сучасної біотехнології [7].

Використовувати порфірини як антивірусні агенти було запропоновано, перш за все, для стерилізації крові та її компонентів. Фотосенсибілізація з допомогою порфіринів виявилася ефективною проти вільних вірусів, внутрішньоклітинних вірусів, вірустрасформованих клітин та вірусних контамінантів у крові [8]. Деякі похідні порфіринів здатні інактивувати специфічні вірусні мішені, у тому числі ретровірусну зворотню транскриптазу і протеазу ВІЛ-1 [9, 10]. На прикладі бактеріофага Т7 як модельного вірусу без суперкапсиду була показана можливість використання катіонних порфіринів для усунення вірусів з рідкого середовища [5].

Взагалі, бактеріофаги часто використовують як моделі патогенних вірусів, оскільки вони не шкідливі та не потребують спеціальних дослідницьких умов, а результати досліджень з бактеріофагами доступні вже через декілька годин після зараження. Їх з успіхом використовували як моделі вірусів при оцінюванні ефективності бар'єрних матеріалів, для перевірки ефективності очищення питної води, для оцінювання віруліцидних сполук, для визначення чутливості вірусів до дезінфектантів [2, 3, 6].

З огляду на зазначене вище метою даної роботи було вивчення антивірусних властивостей нових синтетичних асиметрично-заміщених порфіринів з використанням бактеріофагів як модельних вірусів.

Матеріали та методи

Вивчалась антифагова активність вільної основи 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірина та її комплексу з цинком, синтезованих у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова.

Антифагова дія досліджуваних сполук перевірялася на модельних системах *S. aureus* — полівалентний стафілококовий бактеріофаг, *E. coli* — бактеріофаги Т4 та Т7.

Штам бактерії *Staphylococcus aureus* ATCC 2592 отриманий з музею кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Штам бактерії *E. coli* В та бактеріофаг Т4 люб'язно надані завідувачем кафедри вірусології Київського національного університету імені Т.Г. Шевченка, д.б.н. Поліщуком В.П.; бактеріофаг Т7 — завідувачем відділу молекулярної біології бактеріофагів ІМВ НАНУ, д.б.н. Товкачем Ф.І. Культивування бактерій *S. aureus* проводили на МПБ, бактерії *E. coli* — на середовищі LB. Щільні середовища містили 1,4% агар-агару, напіврідкі — 0,7% агар-агару. Зберігали культури мікроорганізмів та



бактеріофаги за температури 4 °С. Концентрування фагів проводили за методом Ямомото [11].

Для визначення темного впливу порфірину на бактеріофаг фагову суспензію розливали у стерильні пробірки по 1 мл з розведення, при якому бактеріофаг утворював на бактеріальному газоні 50–70 негативних колоній. До фагової суспензії додавали порфірини таким чином, щоб кінцева концентрація сполук у пробірках складала 0,1; 1 та 10 мкМ. Вибір саме цих концентрацій базується на попередніх даних про відсутність антибактеріальної дії досліджуваних сполук за концентрації 10 мкМ і нижче. За контроль брали фагові суспензії без додавання досліджуваних речовин. Після цього пробірки інкубували у холодильнику за температури 4 °С протягом 24 год. Після закінчення терміну інкубації бактеріофаги титрували за методом подвійних агарових шарів [1].

Для визначення фотоіндукованого впливу порфіринів на бактеріофаг фагову суміш одразу ж після додавання сполук піддавали опроміненню лампою розжарювання денного світла потужністю 500 Вт протягом 20 хв. Інтенсивність опромінення складала 40 J/см² [10]. За контроль брали фагову суспензію без додавання досліджуваних речовин. Одразу ж після опромінення проводили титрування бактеріофага за методом подвійних агарових шарів. Облік результатів проводили через 24 год, підраховуючи кількість негативних колоній на бактеріальному газоні у досліді та контролі.

Для спектроскопічних досліджень використовували 10 мкМ розчини порфіринів. У дослідні пробірки вносили відповідні бактеріофаги до кінцевої концентрації 5×10^5 БУО/мл, а у пробірки, що слугували контролем, додавали відповідний об'єм фізіологічного розчину. Пробірки витримували 30 хв у темному місці. Спектри поглинання записували за допомогою спектрофотометра «Spekol-10». Отримані дані були оцифровані за допомогою програм Grafula та Origin Pro 8.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження показали, що високу темнову активність вільної основи досліджуваного порфірину щодо стафілококового фага та фага Т4. За найвищої концентрації порфірину зниження активності фагів досягало 68%. Найменша його концентрація пригнічувала інфекційність стафілококового фага на 35% та фага Т4 — на 15%. По відношенню до цих фагів має місце чітка залежність активності сполуки від її концентрації. Щодо фага Т7 такої залежності не виявлено. Максимальне зниження його активності (на 21%) відбувалося за концентрації 1 мкМ.

Тенденція впливу цинкового комплексу досліджуваного порфірину на фаги була однаковою. Найактивнішою виявилася концентрація 10 мкМ, за якої активність стафілококового фага пригнічувалася повністю, активність фага Т4 знижувалася на 88%, а фага Т7 — на 16%. Найменш ефективною була концентрація 1 мкМ, за якої активність



стафілококового фага знижувалася на 47%, а фага Т4 та Т7 — на 22% та 7%, відповідно (рис. 1).

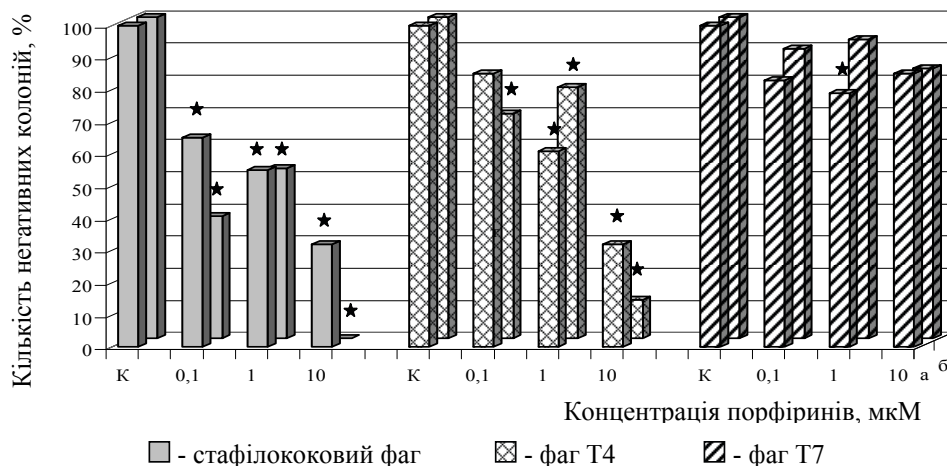


Рис. 1. Вплив вільної основи асиметрично-заміщеного піридилпорфірину (а) та її комплексу з цинком (б) на інфекційну активність бактеріофагів за темнових умов. Примітка: К — контроль, * — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Influence upon asymmetrically substituted pyridylporphyrin free base (a) and zinc complex (b) bacteriophage activity under the dark conditions. Note: K — control, * — significantly different from control

Таким чином, за ступенем чутливості до темної дії асиметрично-заміщених порфіринів фаги можна розташувати у такому порядку: стафілококовий фаг > фаг Т4 > фаг Т7. Вищу активність у темнових умовах встановлено для металокомплексу порфірину.

За фотоактивації вільної основи досліджуваного порфірину пригнічення активності стафілококового фага прямо залежало від її концентрації і становило 31–80%. Аналогічні результати отримано і при визначенні фотодинамічної інактивації вірусів в присутності катіонних порфіринів. Вважається, що пропорційно до зростання концентрації фотосенсибілізаторів підвищується утворення синглетного кисню, який пошкоджує структурні компоненти вірусів [12]. При опроміненні за присутності цього порфірину зниження активності фага Т4 не перевищувало 24%. Фотоінактивація фага Т7 під дією вільної основи була у межах 16–28%. Фотоактивованій цинковий комплекс досліджуваного порфірину повністю пригнічував активність стафілококового фага за концентрації 10 мкМ. Зниження активності цього фагу складало за концентрації 0,1 мкМ 41%, а за концентрації 1 мкМ — 19% (рис. 2).

При опроміненні фагів Т4 та Т7 у присутності 10 мкМ даного металокомплексу їх інфекційність знижувалася на 35% та 53%, а за найменшої концентрації — на 12% та 8%, відповідно. Отже, фаг Т4 є більш чутливим до темної дії сполук.

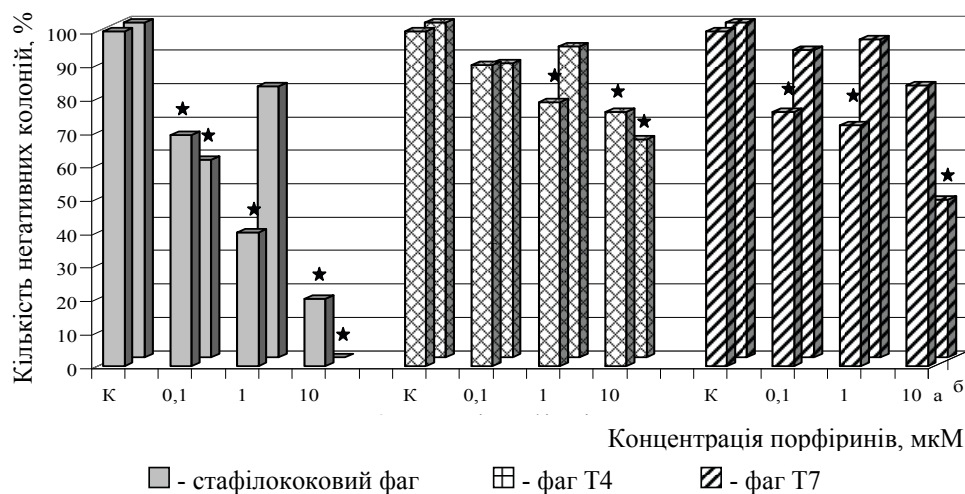


Рис. 2. Вплив вільної основи асиметрично-заміщеного піридилпорфірину (а) та її комплексу з цинком (б) на інфекційну активність бактеріофагів за умов фотоактивації.

Примітка: К — контроль, * — різниця достовірна порівняно з контролем

Fig. 2. Influence upon asymmetrically substituted pyridylporphyrin free base (a) and zinc complex (b) on bacteriophage activity after photoactivation.

Note: K — control, * — significantly different from control

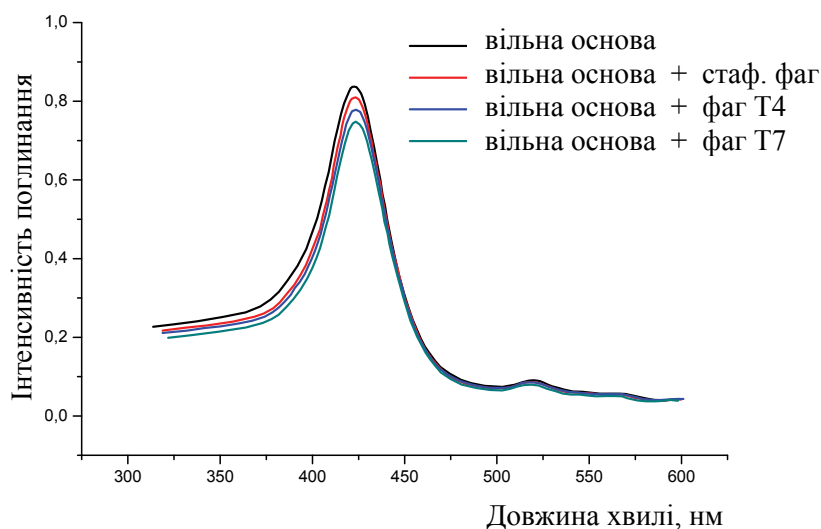
Відомо, що порфірини здатні формувати різноманітні комплекси з ДНК. Результати досліджень [4] показують, що вони зв'язуються з ДНК незалежно від того чи є полінуклеотид частиною нуклеопротеїнового комплексу чи ні. Використовуючи спектроскопічні методи дослідження можна визначити наявність та характер зв'язування порфіринів з нуклеїновою кислотою або нуклеопротеїновим комплексом, яким є фагова частка. Для порфіринів у складі комплексів найбільш характерними змінами є зрушення смуги Соре до більших довжин хвиль, яка супроводжується гіпохромним або гіперхромним ефектом (тобто зменшення або збільшення екстинкції) [14].

Встановлено, що за взаємодії фагів із досліджуваними порфіринами відбуваються певні зміни їх спектральних характеристик. Максимум смуги Соре вільної основи у присутності фагів зрушувався на 0,7 нм, та в усіх випадках спостерігався гіпохромний ефект: 3,3 % для стафілококового фага, 7% — для фага Т4 та 10,7% — для фага Т7 (рис. 3).

Значний зсув у червоний бік спектру смуги Соре цинкового комплексу — на 12 нм — спостерігався у присутності стафілококового фага та фага Т4, причому інтенсивність поглинання світла порфірином за присутності першого фага не змінювалася, а за присутності другого знижувалася на 2,3%. Найбільший гіпохромізм — 11,4% — спостерігався за взаємодії сполуки з фагом Т7, але при цьому відбувався незначний (на 1,5 нм) зсув смуги Соре порфірина.



А



Б

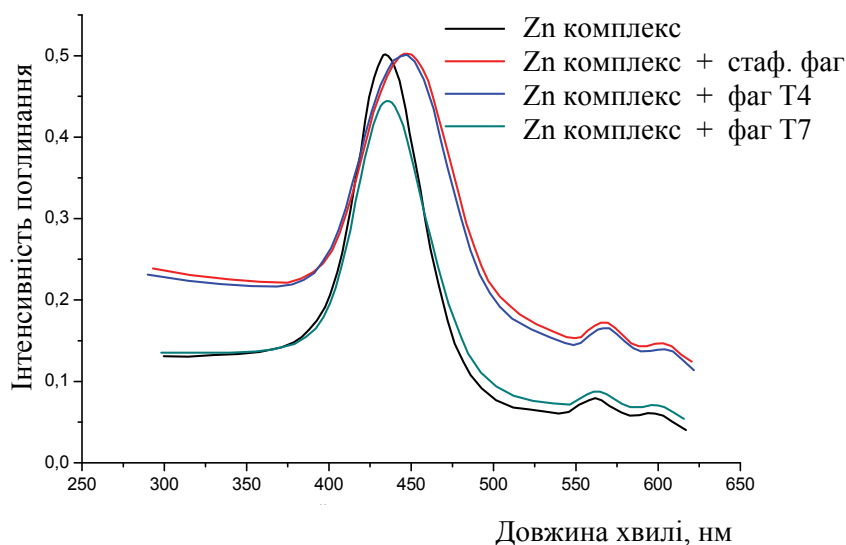


Рис. 3. Спектри поглинання вільної основи асиметрично-заміщеного піридилпорфірину (А) та її комплексу з цинком (Б) у присутності бактеріофагів.

Fig. 3. Asymmetrically substituted pyridylporphyrin free base (A) and zinc complex (B) absorption spectra in presence of bacteriophages.

Таким чином, результати спектроскопічних досліджень свідчать про зв'язування порфіринів з фагами. За даними літератури відомо, що форми зв'язування, а саме інтеркаляція та зовнішнє неінтеркалятивне зв'язування, як з ізолюваною ДНК, так і з ДНК всередині фагового капсида, схожі [14]. Встановлено, що в ізолюваній ДНК і фагових частках

розподіл та співвідношення форм зв'язування аналогічні, але доступність сайтів зв'язування залежить від структури ДНК.

Структура протейнового комплексу також відіграє важливу роль у взаємодії порфіринів з нуклеопротейном, навіть якщо нема прямого зв'язування порфірину з білками [13]. Цим можна пояснити різницю у чутливості фагів до дії сполук, оскільки усі досліджувані фаги належать до різних родин та мають різну морфологічну будову. Однак зв'язування з порфірином не завжди впливає на структуру капсиду або на взаємодію ДНК з білком у фаговій частці [4].

На відміну від темнових ефектів порфіринів за фотоактивації цих сполук суттєво змінюється структура білків нуклеопротейнового комплексу. Слід зазначити, що зв'язування порфірину з фаговою часткою не є необхідною умовою ефективної фотосенсибілізуючої дії. Це можна пояснити тим, що молекули вільних порфіринів більш активно утворюють синглетний кисень [12].

Таким чином, проведені дослідження показали, що найбільш чутливим до темного та фотоіндукованого впливу порфіринів є стафілококовий бактеріофаг, в той час як фаг Т7 виявляє високу стійкість до дії цих сполук. Зв'язування вільної основи 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірину з досліджуваними фагами супроводжується гіпохромним ефектом, який для цинкового комплексу виявлено лише за присутності фага Т7. Для стафілококового та Т4 фагів виявлено батохромний ефект — зсув смуги Соре металокомплексу у червоний бік спектру.

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

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

АНТИФАГОВАЯ АКТИВНОСТЬ АСИММЕТРИЧНО-ЗАМЕЩЕННЫХ ПИРИДИЛПОРФИРИНОВ

Реферат

Цель. Изучение антивирусных свойств новых синтетических асимметрично-замещенных порфиринов с использованием бактериофагов в качестве модельных вирусов. **Материалы и методы.** В работе изучалась способность свободного основания 5,10,15-три(Н-метил-4-пиридил)-20-(н-нонил)порфирина и его комплекса с цинком ингибировать активность стафилококкового фага, фага Т4 и фага Т7. Бактериофаги инкубировали в присутствии исследуемых соединений в темновых условиях и при облучении видимым светом, после чего их титровали методом двойных агаровых



слоев. Конечные концентрации порфиринов составляли 0,1 мкМ, 1 мкМ и 10 мкМ. Спектры поглощения порфиринов записывали после инкубации с фаговой суспензией с помощью спектрофотометра «Spekol-10» и оцифровывали. **Результаты.** Показано, что наиболее чувствительным к действию соединений оказался стафилококковый бактериофаг активность которого подавлялась свободным основанием исследуемого порфирина на 68% в темновых условиях, и на 80% при фотоактивации. Цинковый комплекс порфирина полностью инактивировал этот фаг, как в темновых условиях так и при облучении. Бактериофаг Т4 был более чувствительным к действию соединений при темновых условиях. Так, в темновых условиях снижение активности фага в присутствии свободного основания порфирина достигало 68%, а цинкового комплекса — 88%, тогда как при фотоактивации — 24% и 35%, соответственно. Бактериофаг Т7 наоборот был более чувствительным к действию фотоактивированных соединений. Снижение его активности в темновых условиях свободным основанием исследуемого порфирина достигало 21%, а цинковым комплексом — 16%, тогда как при облучении — 28% и 53%, соответственно. Спектроскопические исследования показали, что исследуемые порфирины связываются с фагами. **Выводы.** Синтетические асимметрично-замещенные порфирины угнетают активность исследуемых бактериофагов благодаря формированию комплексов с фаговыми частицами.

Ключевые слова: антифаговая активность, асимметрично-замещенные порфирины, бактериофаги.

N.S. Vodzinska, B.M. Galkin, S.V. Vodzinskii, T.O. Filipova

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

ANTIPHAGE ACTIVITY OF ASYMMETRICALLY-SUBSTITUTED PYRIDYLPORPHYRINS

Summary

Aim. Study of the new synthetic asymmetrically-substituted porphyrins antiviral properties with the use of bacteriophages as model viruses. **Materials and methods.** In this work the ability of 5,10,15-tri(N-methyl-4-pyridyl)-20-(n-nonyl) porphyrin free base and its zinc complex to inhibit staphylococcal phage, phage T4 and T7 activity had been studied. Bacteriophages were incubated in presence of studied porphyrins in the dark and during irradiation, and then plated using the standard double-layer method. Final porphyrin concentrations were 0,1 M, 1 M and 10 M. Porphyrin absorption spectra were recorded after incubation with phage



suspension with spectrophotometer "Spekol-10" and then were digitized. **Results.** It was shown, that staphylococcal phage is more sensible to the porphyrin action. Porphyrin free base suppress its activity on 68% in the dark and 80% after photoactivation. Phage inactivation with porphyrin zinc complex reached up to 100% in the dark and after irradiation. Phage T4 is more sensible to the porphyrins action in the dark. Decrease of the phage activity in the dark reached up to 68% in presence of porphyrin free base, and 88% in presence of porphyrin zinc complex, and 24% and 35%, respectively, after photoactivation. Inversely, phage T7 is more sensible to the photoactivated compounds action. Decrease of its activity in the dark reached up 21% in presence of porphyrin free base, and 16% in presence of porphyrin zinc complex, and 28% and 53%, respectively, after irradiation. Spectroscopic studies show that studied porphyrins bind to the phage nucleoproteins. **Conclusion.** Synthetic asymmetrically-substituted porphyrins affect the studied bacteriophage activity due to complex formation with phage particles.

Key words: antiphage activity, asymmetrically-substituted porphyrins, bacteriophages.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике: Пер. с англ. — М.: Мир, 1976. — 436 с.
2. *Aranha-Creado H., Brandwein H.* Application of bacteriophages as surrogates for mammalian viruses: a case for use in filter validation based on precedents and current practices in medical and environmental virology // PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. — 1999. — V. 53, № 2. — P. 75–82.
3. *Bienek C., MacKay L., Scott G., Jones A., Lomas R., Kearney J. N., Galea G.* Development of a bacteriophage model system to investigate virus inactivation methods used in the treatment of bone allografts // Cell and Tissue Banking. — 2007. — V. 8 (2). — P. 115–124.
4. *Csik G., Egyeki M., Herenyi L., Majer Z., Toth K.* Role of structure-proteins in the porphyrin-DNA interaction // J. Photochem. & Photobiol. B: Biology. — 2009. — V. 96. — P. 207–215.
5. *Gábor F., Szolnoki J., Tyth K., Fekete A., Maillard P., Csik G.* Photoinduced inactivation of T7 phage sensitized by symmetrically and asymmetrically substituted tetraphenyl porphyrin: comparison of efficiency and mechanism of action // Photochem. Photobiol. — 2001. — V. 73, № 3. — P. 304–311.
6. *Jones M., Bellamy K., Alcock R., Hudson R.* The use of bacteriophage MS2 and a model system to evaluate virucidal hand disinfectants // Journal of Hospital Infection. — 1991. — V. 17. — P. 279–285.
7. *Los M., Czyz A., Sell E., Wegrzyn A., Neubauer P., Wegrzyn G.* Bacteriophage contamination: is there a simple method to reduce its del-



eterious effects in laboratory cultures and biotechnological factories? // *J. Appl. Genet.* — 2004. — Vol. 45, № 1. — P. 111–120.

8. *Matthews J.L., Sogandares-Bernal F., Judy M., Gulliya K., Newman J., Chanh T., Merengo-Rowe A.* Inactivation of viruses with photoactive compounds // *Blood Cells.* — 1992. — V. 18. — P. 75–89.

9. *Staudinger R., Abraham N.G., Levere R.D., Kappas A.* Inhibition of human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase by heme and synthetic heme analogs // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* — 2002. — V. 46, № 12. — P. 3917–3925.

10. *Vzorov A.N., Dixon D.W., Trommel J.S., Marzilli L.G., Compans R.W.* Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by porphyrins // *Antimicrobial Agents Chemother.* — 2002. — V. 46. — P. 3917–3925.

11. *Yamamoto K.R., Alberts B.M., Benzinger R.* Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification // *J. Virology.* — 1970. — V. 40. — P. 734–744.

12. *Zupan K., Egyeki M., Toth K., Fekete A., Herenyi L., Mydos K., Csik G.* Comparison of the efficiency and the specificity of DNA-bound and free cationic porphyrin in photodynamic virus inactivation // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* — 2008. — V. 90. — P. 105–112.

13. *Zupan K., Herenyi L., Toth K., Egyeki M., Csik G.* Binding of cationic porphyrin to isolated DNA and nucleoprotein complex: quantitative analysis of binding forms under various experimental conditions // *Biochemistry.* — 2005. — V. 44, № 45. — P. 15000–15006.

14. *Zupan K., Herenyi L., Toth K., Majer Z., Csik G.* Binding of cationic porphyrin to isolated and encapsidated viral DNA analyzed by comprehensive spectroscopic methods // *Biochemistry.* — 2004. — V. 43, № 28. — P. 9151–9159.

Стаття надійшла до редакції 01.08.2013 р.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-05/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання цілей статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 8 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди — до 15 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

— індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;



— прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);

- назва статті великими літерами;
- анотація із зазначенням новизни дослідження (200—250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

Текст статті має включати такі складові:

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного граfiчного редактора у форматі Word, TIF, JPG). Осі



координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті та дублюються окремим файлом на CD.

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

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки (чітко, синьою або чорною ручкою неправильно закреслити, а поряд з цим на полі написати правильний варіант) і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



Instructions for the authors

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

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

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

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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



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

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

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

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

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

Books

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

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

Journals

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

Theses of reports

Deposited scientific works

Standards

Thesis abstracts

Online Resources

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

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

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

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



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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



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

Макет В.Г. Вітвицька
Зам. № 749. Тираж 100 прим.

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