

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

№ 4(24)
2013

Одеса
ОНУ
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), 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. Немятовський (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, України)

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.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](http://mbt.onu.edu.ua)

© Odesa National Mechnykov
University, 2013

З М І С Т
О Г Л Я Д О В І Т А Т Е О Р Е Т И Ч Н І С Т А Т Т І

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко ПРЕБІОТИКИ ВУГЛЕВОДНОЇ ПРИРОДИ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ	6
---	---

А.Ю. Фесенко, В.К. Позур ПОЛІОМІЄЛІТ: ПЕРЕШКОДИ НА ШЛЯХУ ЕРАДИКАЦІЇ	24
---	----

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

Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, Є.Ю. Пахомова, Т.О. Філіпова ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ АУТОІНДУКТОРІВ QUORUM SENSING НА СИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	38
---	----

Н.М. Матвієнко, Л.П. Бучацький, О.М. Дерябін ЗАСТОСУВАННЯ ЗВОРОТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>)	46
--	----

Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун, В.П. Поліщук МОНІТОРИНГ ВІРУСУ МОЗАЇКИ КАВУНА 2 У АГРОЦЕНОЗАХ КИЇВСЬКОЇ ТА ПОЛТАВСЬКОЇ ОБЛАСТЕЙ.....	55
---	----

С.С. Степанов, О.К. Золотарьова ФОТОСИНТЕЗ, ДИХАННЯ ТА РІСТ МІКРОВОДОРОСТІ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> В ПРИСУТНОСТІ ЕТАНОЛУ	63
---	----

Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп, А.Є. Бухтіяров, Г.В. Лісютін, І.В. Пузирьова, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця НАФТООКИСНЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>	72
---	----

С.О. Гнатуш, С.В. Лаврик ХАРАКТЕРИСТИКА ПУРПУРОВИХ НЕСІРКОВИХ БАКТЕРІЙ <i>RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS</i> З ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ (УКРАЇНА).....	81
--	----

Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк ОСОБЛИВОСТІ КОРОЗІЙНО АКТИВНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ ФЕРОСФЕРИ ГАЗОПРОВОДУ, ПРОКЛАДЕНОГО У ПІЩАНОМУ ҐРУНТІ	90
---	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	99
---	----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko THE CARBOHYDRATE PREBIOTICS AND PROSPECTS OF THEIR USE.....	6
---	---

A.Yu. Fesenko, V.K. Pozur POLIO: OBSTACLES TO ERADICATION	24
---	----

EXPERIMENTAL WORKS

Muchlis Abedalabas, N.B. Galkin, E.Yu. Pachomova, T.O. Filipova INFLUENCE OF THE EXOGENOUS QUORUM SENSING AUTOINDUCERS ON <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS.....	38
--	----

N.M. Matvienko, L.P. Buchatsky, O.M. Deryabin APPLICATION OF THE REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF THE INFECTIOUS PANCREATIC NECROSIS VIRUS OF RAINBOW TROUT (<i>ONCORHYNCHUS MYKISS</i>).....	46
---	----

T.O. Rudnieva, T.P. Shevchenko, V.O. Tsvigun, V.P. Polishchuk MONITORING OF WATERMELON MOSAIC VIRUS 2 IN AGRIECOSYSTEMS OF KYIV AND POLTAVA REGIONS	55
--	----

S.S. Stepanov, E.K. Zolotareva PHOTOSYNTHESIS, RESPIRATION AND GROWTH RATE OF <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> ON EXOGENIC ETHANOL APPLICATION	63
--	----

T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva, I.P. Konup, A.E. Bukhtiarov, G.V. Lisiutin, I.V. Puzyreva, O.G. Gorshkova, V.O. Ivanytsia OIL OXIDATIVE ACTIVITY OF SOME STRAINS OF BACTERIA OF <i>PSEUDOMONAS GENUS</i>	72
---	----

S.O. Hnatysh, S.V. Lavryk CHARACTERISTIC OF NON-SULFUR PURPLE BACTERIA <i>RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS</i> FROM LAKE JAVORIVSKE (UKRAINE).....	81
--	----

N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, A.P. Tretiak FEATURES OF CORROSION ACTIVITY OF MICROBIAL COMMUNITIES OF GAS-PIPELINE FERROSPHERE LAID IN SANDY SOIL.....	90
--	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS.....	103
-----------------------------------	-----

УДК 57.083.1+57.082.13+576.8.095.38

О.А. Полтавская, Н.К. Коваленко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д03680, Украина,
тел.: +38(044) 526 23 29, e-mail: poltavska@ukr.net

ПРЕБИОТИКИ УГЛЕВОДНОЙ ПРИРОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В последние годы большое внимание уделяется биологически активным добавкам — «пребиотикам», избирательно стимулирующим рост и метаболическую активность пробиотических микроорганизмов тем самым оказывая общее благотворное действие на макроорганизм в целом. Данный обзор освещает современное состояние вопроса о пребиотиках углеводной природы, их влияние на состояние макроорганизма. В работе нашли своё отражение те виды пребиотических препаратов, которые получили официальное признание на основании предклинических и клинических исследований. Показано, что в настоящее время «пребиотическое» направление в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности интенсивно развивается. В современной стратегии коррекции дисбактериоза кишечника ведущая роль отводится препаратам-пребиотикам. В то же время, до сих пор остаются нерешенными вопросы научного обоснования разработки пребиотиков, что ограничивает возможность их интенсивного производства и использования.

Ключевые слова: пребиотики, пробиотики, нормобиота кишечника.

Согласно современным данным, кишечник является основным местом колонизации более 400 видов микроорганизмов [30].

Основными представителями микробиоты кишечника человека в норме являются бифидобактерии, бактероиды, лактобациллы, кишечная палочка, энтерококки, которые составляют 99% от всего пула кишечных микроорганизмов. Среди них важную роль в организме человека играют лактобактерии и бифидобактерии [22]. В результате многочисленных исследований *in vitro* и *in vivo* показано, что лактобактерии и бифидобактерии участвуют в регуляции процесса пищеварения, синтезируют



витамины, снижают уровень холестерина и концентрацию аминов в крови, действуют как иммуномодуляторы, обладают противоопухолевой активностью, способствуют расщеплению атеросклеротических бляшек и очищению стенок сосудов [55].

В последние годы большое внимание уделяется биологически активным добавкам, которые избирательно стимулируют рост и метаболическую активность пробиотических микроорганизмов. Они получили название «пребиотики». Термин предложен в середине 1990-х гг. Gibson G.R. и Roberfroid M.B. [22]. Согласно этой концепции, «пребиотики» — это физиологически функциональные пищевые ингредиенты, которые при систематическом употреблении в составе пищевых продуктов обеспечивают благоприятное воздействие на организм человека за счет избирательной стимуляции роста и /или повышения биологической активности нормальной микробиоты кишечника. Пребиотик не должен подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами, адсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта и должен являться питательным субстратом для бифидо- и лактобактерий, заселяющих толстый кишечник человека. Благодаря селективной стимуляции роста нормальной микробиоты, пребиотики активизируют метаболические процессы в макроорганизме, способствуя проявлению антагонизма по отношению к патогенной и условно патогенной микробиоте.

Исходно к пребиотикам относили, главным образом, неперевариваемые в кишечнике низкомолекулярные углеводы. Однако последующие многочисленные исследования показали, что пребиотический эффект присущ многим соединениям [39]. Так, в настоящее время большинство пребиотиков, обладающих способностью стимулировать рост бифидобактерий, относятся к нейтральным сахарам. Различают также белковые и витаминные пребиотики, менее популярные, по сравнению с углеводными.

Область научных исследований пребиотических веществ в последние несколько лет значительно расширилась. Список субстанций, обладающих пребиотическим эффектом, постоянно пополняется.

Целью данной работы было изложить современное состояние вопроса о пребиотиках углеводной природы, которые получили официальное признание на основании предклинических и клинических исследований, и их влиянии на состояние макроорганизма.

Лактулоза — наиболее известный пребиотик, который практически не разлагается ферментами макроорганизма и не всасывается в тонком кишечнике. Лишь около 0,25–2,0% её усваивается в неизменном виде. Лактулоза широко известна во всём мире как слабительный препарат. В двойном слепом, плацебо-контролируемом рандомизированном исследовании Kokke F.T. et al. показали положительный эффект после применения лактулозы при запорах у детей [33]. Аналогичные данные



получили Van der Spoel J.I. et al. В испытаниях с участием взрослых пациентов [58]. Этот дисахарид хорошо зарекомендовал себя в США как высокоэффективный препарат при комплексном лечении заболеваний печени. Изучен механизм его действия [2]. Показано улучшение качества жизни и когнитивных функций у пациентов с циррозом печени и печеночной энцефалопатией [60]. По данным Cummings J.H., лактулоза эффективна при заболеваниях мочевыводящих путей, желчнокаменной болезни, гиперхолестеринемии и др. [14]. В последнее время лактулозу все шире используют для производства лекарственных средств, пищевых и функциональных продуктов питания.

Лактитол (лактит) — это углеводородный спирт (4-О-альфа-D-галактопиранозил-D-глюцитол). Лактитол обладает меньшей, чем лактулоза, выраженностью побочных эффектов в организме человека (метеоризм, вздутие, флатуленция). Его используют в слабительных препаратах в качестве основного компонента, а также в комплексе с другими компонентами [4].

Ballongue J. et al. показали эффект лактулозы и лактитола на 36 здоровых добровольцах в сравнении с плацебо [4]. Установлено, что лактулоза приводит к более выраженным изменениям микробиоценоза по сравнению с лактитолом: увеличивается количество представителей нормальной микробиоты, снижается содержание гнилостных микроорганизмов. Кроме того, наблюдалось снижение активности проканцерогенных ферментов (азоредуктазы, 7 альфа-дегидроксилазы, β -глюкуронидазы, нитратредуктазы и уреазы; значительно увеличивается содержание короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях и снижается содержание фенола, крезола, индола и скатола [3].

Инулин — наиболее изученный и наиболее широко используемый в пищевой промышленности пребиотик. Он является фруктозаном и при его полном гидролизе образуется фруктоза. Состоит инулин из одной молекулы α -глюкозы и разного количества молекул фруктозы, соединенных между собой β -(2-1) связью. Существует несколько типов инулинов, которые различаются длиной полимерной цепи: низкомолекулярный инулин (средняя степень полимеризации 10-20) и высокомолекулярный инулин (средняя степень полимеризации 20-60). Чем выше средняя степень полимеризации, тем выше биологическая активность инулина [31].

Олигофруктоза (ОФ) относится к производным инулина и представляет собой смесь олигосахаридов, состоящих из глюкозы и нескольких остатков фруктозы, связанных друг с другом β -(2-1) гликозидной связью. Общее число фруктозных единиц в молекуле олигофруктозы в целом колеблется между 2 и 8.

Инулин и ОФ применяются при лечении воспалительных кишечных расстройствах, раке, при нарушениях кальциевого обмена в организме, в педиатрии, при лечении ожирения. Эффективность их применения подтверждена клиническими исследованиями [31]. Кроме того, инулин и ОФ



способствуют стимуляции иммунной системы макроорганизма. В опытах на лабораторных животных показано, что употребление этих сахаров стимулирует фагоцитарную активность макрофагов [31].

β -Галактоолигосахара (β -ГОС) представляют собой сложные углеводы животного происхождения, присутствующие в женском молоке. Они являются классическим «бифидус-фактором», стимулирующим рост бифидобактерий. Состоят из молекул галактозы и глюкозы и представляют собой структуру с длиной цепи от 3 до 10 молекул сахаров, причем в ее молекулярном строении преобладает галактоза [35].

В последние годы появились сообщения о проведении клинических исследований β -ГОС с участием не только детей, но и взрослых. Так, Shadid R. et al. показали, что прием β -ГОС женщинами, находящимися в третьем триместре беременности, стимулирует пролиферацию нормальной микрофлоры матери и новорожденного, но в то же время не оказывает влияния на стимуляцию иммунитета плода [50].

Интересен тот факт, что влияние β -ГОС на рост микроорганизмов зависит от способа его получения. В клинических исследованиях [16] доказано, что использование в качестве добавки к пище β -ГОС, полученных с применением β -галактозидазы пробиотического штамма *B. bifidum*, значительно сильнее влияет на увеличение количества бифидобактерий кишечника, чем β -ГОС, полученных с использованием промышленных β -галактозидаз.

Vulevic J. et al. показали, что использование β -ГОС здоровыми людьми пожилого возраста стимулирует рост нормальной кишечной микрофлоры и иммунный ответ. Показано, что β -ГОС имеет потенциал в качестве терапевтического средства при синдроме раздраженной кишки [59]. Silk D.B. et al. показали бифидогенный эффект и перспективность применения β -ГОС в лечении синдрома раздраженной кишки [52].

Изомальтулоза (палатиноза) — (6-О- α -D-глюкопиранозид-D-фруктоза) используется в качестве пребиотика в начале 2000-х гг. [29]. Наряду с существующими данными о способности изомальтулозы оказывать пребиотический эффект *in vitro* [1], появились сообщения об эффективном ее применении как пребиотической добавки в рационе питания людей, страдающих сердечнососудистыми заболеваниями, атеросклерозом, нарушением обмена веществ [5, 57, 68]. Кроме того, в экспериментах на животных показано, что употребление изомальтулозы в сульфатированной форме оказывает противоопухолевый эффект [65].

Нерастворимый крахмал (НК) — это модифицированный вид крахмала с повышенной ферментативной устойчивостью, который стабилен в кислой среде и при высоких температурах [41]. Содержание амилозы в НК достигает 60–70%, тогда как ее содержание в обычном крахмале — всего 30%, что обеспечивает его устойчивость к амилолизису. НК разделяют на 5 классов [55].



Он широко используется при создании продуктов функционального питания. Его пребиотические свойства изучены достаточно хорошо [4], однако данных о влиянии на организм человека недостаточно. В экспериментах на животных показано, что употребление НК способствует регенерации слизистой оболочки кишечника, уменьшает риск возникновения опухолей разной этиологии [36], улучшает гликемический контроль [51], уменьшает риск возникновения ишемической травмы печени [43], стимулирует иммунный ответ [55].

Ксилоолигосахариды (КОС) — это смесь дисахаридов и трисахаридов, состоящих из 2–8 молекул ксилозы, соединенных β -1,4-гликозидной связью [68]. По сравнению с вышеописанными пребиотиками, КОС менее изучены. В настоящее время существуют сведения об эффективности КОС при желудочно-кишечных патологиях [46,53]. Они эффективны при поддержании уровня железа в печени [32], предотвращают адгезию патогенных микроорганизмов (*in vitro*) [17], способны стимулировать иммунную систему путем синтеза интерферона и образования макрофагов и Т-лимфоцитов [70]. Применение КОС также перспективно в животноводстве и птицеводстве [69].

Олигосахариды сои (ОС) представлены, в основном, двумя углеводами: раффинозой и стахиозой. Раффиноза (α -D-галактопиранозил-(1-6)- α -D-глюкопиранозил-(1-5)- β -D-фруктофуранозид) — трисахарид, содержащий по одной молекуле D-галактозы, D-глюкозы и D-фруктозы. Стахиоза (маннеотетроза, дигалактозилсахароза) состоит из остатков двух молекул галактозы, молекулы глюкозы и молекулы фруктозы.

Результаты исследований ОС, в основном получены *in vitro* или на животных. Так, Faber T.A. et al. На модели бройлерных цыплят, инфицированных *Eimeria acervulina*, показали, что употребление ОС способствовало увеличению потребления корма, быстрому набору веса, а также увеличению продукции дуоденальных цитокинов [19]. Xie S. et al. установили, что потребление ОС крысами способствует предотвращению у них атеросклероза путем нормализации уровня липидов в крови, регуляции вазоактивных веществ и защиты от окислительного стресса [66]. Piastowska-Ciesielska A.W. et al. наблюдали увеличение плотности костей у крыс [47]. В клинических исследованиях Cha Y.S. et al. На добровольцах с избыточным весом, потреблявших 9,9 г ферментированной соевой пасты, наблюдалось снижение веса и содержания висцерального жира [7].

Маннан-олигосахариды (МОС) — углеводы, содержащие маннан — полимер маннозы. МОС широко используют как БАДы в птицеводстве и свиноводстве [12,19].

Исследования последних лет показали, что этот олигосахарид также обладает пребиотическими свойствами. Установлено, что добавление МОС в основной корм свиней способствует стимуляции иммунного ответа [9], улучшает пищеварение и положительно влияет на рост поросят



[44]. Добавление МОС в рацион питания птицы способствует улучшению эпителиального барьера энтероцитов [10].

Гуммиарабика (ГА) — это пищевые волокна из смолы акации. Молекула ГА представляет собой высокомолекулярный гетерополисахарид (около 350–850 kDa), содержащий остатки галактозы, рамнозы, глюкуроновой кислоты, арабинозы, до 3% белков, а также калий, кальций, магний. Пребиотические свойства ГА обнаружены Calame W. et al. В исследовании с участием здоровых женщин [6]. Авторы показали, что ГА эффективен как пребиотик при 10-ти граммах суточного употребления. В ходе исследования не наблюдалось значительного побочного действия, а эффективность ГА была выше, чем при употреблении инулина.

Полидекстроза (ПД) — полисахарид, состоящий из остатков глюкозы, используется как пищевая добавка, для которой не предусмотрена определенная суточная дозировка. ПД — универсальный ингредиент. Его применяют и как наполнитель, и как источник растворимых пищевых волокон с пребиотическим действием.

ПД положительно влияет на нормальную микробиоту и в целом на макроорганизм [27, 28]. Costabile A. et al. установили, что при употреблении ПД улучшается пищеварение, снижается дискомфорт в области живота [13]. В то же время Hengst C. et al. указывают, что употребление ПД взрослыми здоровыми людьми в той же дозе способствует лишь снижению рН содержимого кишечника и значительному уменьшению количества желчных кислот и нейтральных стиролов. Кроме того, авторы не отмечали никаких изменений в работе кишечника, в составе нормальной микробиоты и концентрации короткоцепочечных жирных кислот [26]. Witaicenis A. et al. показали на модели колита у крыс, что при приеме ПД имеет место противовоспалительный эффект, способствующий снижению миелопероксидазной активности, содержания глутатиона. Кроме того, ПД препятствует распространению очага поражения [64].

Арабиноксилан-олигосахариды (АКОС) — олигосахариды, являющиеся производными арабиноксилана, гидролиз которого приводит к формированию АКОС, характеризующихся средней степенью полимеризации и средней степенью замещения арабинозы.

Neyrinck A.M. et al. На модели лабораторных мышей показали, что АКОС обладает выраженными пребиотическими свойствами: проявляет бифидогенный эффект, который сопровождается улучшением функций кишечного барьера и снижением циркулирующих воспалительных маркеров [41,42].

Geraylou Z. et al. На модели сибирского осетра (*Acipenser baerii*) изучили влияние АКОС с различной степенью полимеризации (АКОС-32-0,30 и АКОС-3-0,25) на состав нормальной микробиоты и иммунный ответ макроорганизма [21]. Показано, что оба типа АКОС нормализуют состав микробиоты и способствуют повышению выживаемости осетров. Авторы отмечают, что степень положительного эффекта АКОС на здо-



ровые осетровых рыб зависит от степени полимеризации данного олигосахарида.

Cloetens L. et al. провели рандомизированное плацебо-контролируемое перекрестное исследование на здоровых волонтерах, принимавших по 10 г АКОС или плацебо ежедневно в течение 3-х недель. Показано, что АКОС проявляет бифидогенный эффект [11]. Ежедневное употребление здоровыми волонтерами 180 г пшенично-ржаного хлеба с добавлением АКОС положительно влияет на состав нормальной микробиоты (бифидогенный эффект) и на пищеварение в целом [15,61].

Grootaert C. et al. провели сравнительные исследования АКОС и инулина в качестве стимуляторов микробиоты кишечника. Установлено, что расщепление инулина происходит в восходящем отделе толстой кишки, в то время как АКОС усваивается в подвздошной ее части. Кроме того, показано, что инулин способствует изменению микробного метаболизма путем коррекции состава микробного сообщества. В то же время, АКОС воздействует на микробный метаболизм путем «включения» АКОС-расщепляющих ферментов, при этом практически не влияет на состав кишечной микробиоты [23].

Арабиногалактан (АГ) — полисахарид, состоящий из молекул арабинозы и галактозы. В природе существует 2 класса АГ — растительного и микробного происхождения. В основе АГ — высокоразветвленная молекула с 3,6-галактановым остовом. Боковые цепи состоят из комбинации галактозы с цепочками 3, 4, 6-; 2, 3, 6-; 3, 6-; 3, 4-; и 3-связанных β -галактозных и β -арабиногалактозных остатков. Соотношение галактоза:арабиногалактоза приблизительно 6:1. Также могут присутствовать следовые количества глюкуроновой кислоты. АГ часто связаны с белками (арабиногалактановые белки), которые выполняют роль межклеточных сигнальных молекул [56].

Наибольшее содержание АГ отмечено в растениях рода лиственничных (*Larix occidentalis*). АГ является пищевой добавкой Е-409 (стабилизатором). Yang L.C. et al. На моделях мышей линии BALB /C и крыс показали, что водный экстракт АГ, полученный из цветков *Anoectochilus formosanus* (*Orchidaceae*), снижает рН кишечного содержимого, повышает содержание свободного кальция в химусе и сыворотке крови и уже на 3-й день приема в дозе 20 мг /кг способствует стимуляции роста бифидобактерий и лактобацилл кишечника, но подавляет рост *Clostridium perfringens* и не влияет на жизнеспособность бактерий рода *Escherichia* [67]. В исследованиях Udani J.K. et al. показано, что АГ обладает иммуномодулирующим эффектом. Волонтеры, вакцинированные ранее против *Streptococcus pneumoniae*, и принимавшие 4,5 г АГ в сутки в течение 72 дней, имели значительно более высокий уровень IgG, по сравнению с принимавшими плацебо. В то же время, авторы не отмечали влияния АГ на уровень IgA слюны, на количество белых кровяных телец, вос-



палительных цитокинов и комплемента. У пациентов не было отмечено никаких побочных реакций на приём АГ [56].

Морские водоросли являются одним из наиболее богатых природных ресурсов по содержанию биологически активных веществ. Вещества, выделенные из водорослей, проявляют различную биологическую активность: антимикробную, противовирусную, антиоксидантную, противовоспалительную, антикоагулянтную, апоптолитическую активности [8, 45]. В то же время их пребиотические свойства практически не изучены. В настоящее время наиболее перспективными глюканами водорослей считаются ламинарин, фукоидан и альгинат.

Ламинарин — низкомолекулярный полисахарид, содержащийся в основном в бурых водорослях. Ламинарин относится к семейству 1-3- β -D-глюканов и имеет линейную структуру с невысокой степенью ветвления. Он состоит из (1,3)- β -D-глюкопиранозных остатков, в которых присутствуют несколько 6-О-ответвлений в главной цепи и несколько β -(1,6)-межцепочечных связей, однако структура ламинарина зависит от вида природного источника [38].

Фукоидан (фукан, фукозан, фукана сульфат) — водорастворимый полисахарид с разветвленной структурой, содержащий в основном L-фукозу и сульфатированные эфиры, а также маннозу, галактозу, глюкозу, ксилозу, уроновые кислоты и даже ацетильные группы и протеины. Фукоидан содержится в бурых водорослях и теле некоторых морских беспозвоночных (устрицы, морской огурец) [37].

McDonnell P. et al. изучили влияние ламинарина и фукоидана, отдельно и в комплексе, на общее состояние животных и их нормальную микробиоту. Показано, что у поросят, употреблявших ламинарин, наблюдалась стимуляция роста и нормализация микробиоценоза кишечника [40].

Альгинат — высокомолекулярный полисахарид бурых водорослей, представляющий собой линейный гетерополисахарид, состоящий из остатков β -1,4-D-маннуровой кислоты и α -L-гулуриновой кислоты [63].

В исследованиях Lynch M.B. et al. [38] показано, что ламинарин и фукоидан способствуют увеличению количества бактерий родов *Bifidobacterium* ($P < 0,01$), *Enterobacterium* ($P < 0,05$) и *Lactobacillus* в толстом кишечнике свиней. Выявлено, что у животных, потреблявших ламинарин, наблюдалось снижение содержания энтеробактерий. Авторы высказывают предположение о перспективе использования ламинарина и фукоидана в качестве пребиотической кормовой добавки в свиноводстве.

Wang Y. et al. показали, что альгинатные олигосахариды, полученные в результате ферментативного гидролиза альгината, стимулируют рост *B. bifidum* ATCC 29521 и *B. longum* SMU 27001. В исследованиях *in vivo* показано, что альгинатные олигосахариды способны избирательно стимулировать рост нормальной микробиоты кишечника крыс, а также способствуют уменьшению количества энтеробактерий и энтерококков. Авторы отмечают отсутствие побочных эффектов, что свидетельствует



о возможном включении альгинатных олигосахаридов в группу пребиотических препаратов [63].

Пектиновые олигосахарды (ПОС) — производные пектина, который является обязательным компонентом всех зеленых растений, входит в состав многих фруктов и овощей, некоторых водорослей. ПОС широко используются в качестве загустителей и биологически активных добавок.

Piemontese P. et al. показали положительное пребиотическое влияние ПОС, используемых в рационе питания детей. Все антропометрические и физиологические показатели младенцев (8–52 недели) значительно отличались от контрольных групп [48]. Fanago S. et al. также показали, что ПОС, добавленные в детское питание в концентрации 20%, хорошо переносятся детьми, однако не оказывали видимого эффекта на кишечную микробиоту [20].

Nishimura N. et al. В экспериментах на крысах линии Спраг-Дули показали, что употребление пектина (5% от суточного корма) в течение 7 дней способствует повышению содержания H_2 в толстом кишечнике, снижению активности аланин- и аспартат- аминотрансферазы, а также соотношения окисленный глутатион:общий глутатион. В то же время соотношение в печени восстановленный глутатион:общий глутатион и восстановленный глутатион:окисленный глутатион значительно возросло. Эти данные свидетельствуют о способности пектина облегчать ишемическую травму печени [43].

Таким образом, в настоящее время «пребиотическое» направление в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности интенсивно развивается. Появляются новые поколения пребиотических препаратов, а также открывается пребиотический эффект уже давно существующих на рынке нутриентов углеводной природы. Современная стратегия коррекции дисбактериоза кишечника может быть сформулирована, как «стимуляция размножения собственной нормобиоты хозяина путем естественного восстановления симбиотического равновесия в системе «хозяин-микробиота», где ведущая роль отводится препаратам-пребиотикам.

Современные данные молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что микроорганизмы, и представители нормобиоты в частности, имеют богатый ферментативный аппарат, обеспечивающий усвоение широкого спектра сложных углеводов. У некоторых видов микроорганизмов он может составлять до 10% всего генома [55]. Ввиду этого, поиск и изучение веществ, обладающих пребиотическим эффектом, исследование их влияния на макроорганизм, ставит на новый уровень представление о функциональном питании.

В настоящее время все больше привлекает внимание разработка синбиотических препаратов, которые представляют собой комплекс пробиотиков и пребиотиков [49]. Немногочисленные исследования свидетельствуют о том, что синбиотики благотворно влияют на здоровье человека и избирательно стимулируют рост и активацию метаболизма



индигенных микроорганизмов. Добавление пребиотиков в продукты питания и создание синбиотических препаратов способствует жизнестойкости пробиотических бактерий и увеличению количества полезных для человека микроорганизмов. Они стимулируют рост и функциональную активность как пробиотических микроорганизмов, поступающих с продуктами питания, так и индигенной нормальной микрофлоры. Синбиотические препараты способствуют проявлению иммуногенных свойств полезных микроорганизмов за счет увеличения продукции ими бактериальных метаболитов с иммуномодулирующими свойствами (пептидогликаны, липополисахариды, тейхоевые кислоты).

В последние годы предложено еще одно направление применения пребиотических субстанций — микро- и нанокапсулирование — новая технология выпуска медицинских препаратов основанная на использовании «систем умных переносчиков» («smart carrier systems»), способных контролировать доставку и дозировку по времени биоактивного материала, обеспечивая более оптимальную дозировку препарата и минимизацию побочных эффектов [25]. В этом плане пребиотики являются идеальными ингредиентами для капсулирования пероральных препаратов, в том числе и пробиотиков, ввиду их безвредности для макроорганизма, с одной стороны, и природной способности защищать инкапсулированное вещество в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, с другой [25, 62].

Несмотря на позитивный эффект пребиотических веществ, а также широкие перспективы их использования, до сих пор остаются нерешенными вопросы научного обоснования разработки пребиотиков, что ограничивает возможность их интенсивного производства и использования. Это связано с тем, что на данный момент большинство исследований, касающихся пребиотиков, ограничены лишь экспериментами *in vitro*. В то же время, для подтверждения позитивного эффекта на нормальную микрофлору и на макроорганизм в целом необходимо проведение рандомизированных предклинических и клинических исследований с высоким уровнем достоверности.

В научной литературе практически отсутствуют сведения о безопасности применения новых пребиотиков, в том числе, для людей разных возрастных групп. Проведение подобных исследований крайне необходимо, поскольку существуют единичные сведения об их небезопасности [29].

Необходимо отметить, что многие клинические исследования включают в себя использование целого комплекса олигосахаридов, что делает невозможным определение роли отдельно взятого пребиотика в оказываемом эффекте [24].

При создании препарата-пребиотика необходимо учитывать, что строение молекулы одного и того же поли- или олигосахарида может варьировать (степень полимеризации, степень и тип ветвления и т.п.), и этот факт имеет большое значение для эффективной утилизации данного пребиотика микроорганизмами [34].



Анализ литературы показывает, что в будущем применение препаратов-пробиотиков будет возрастать, а само направление пребиотической терапии будет развиваться. Будут разрабатываться новые пребиотические субстанции, а их использование станет более специфичным, с учетом заболевания, возрастной группы пациентов и т.п.

O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko

Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotnogo str., Kyiv, D03680, Ukraine,
tel.: +380445262329, e-mail: poltavska@ukr.net

THE CARBOHYDRATE PREBIOTICS AND PROSPECTS OF THEIR USE

Summary

Recently much attention is paid to the biologically active additives — «prebiotics», which selectively stimulate the growth and metabolic activity of probiotic microorganisms beneficially effecting on the whole macroorganism. This review highlights the current state of the question of the carbohydrate prebiotics and their effects on the macroorganism. The work reflects only those types of prebiotic products that have received an official recognition on the base of preclinical and clinical studies. It is shown that nowadays «prebiotic» trend in medicine, veterinary medicine and the food industry is developing intensively. In the modern strategy of intestinal dysbiosis correction prebiotics play a leading role. At the same time, there are many unresolved questions concerning the scientific study of prebiotics' elaboration, which limit the possibility of their intensive production and use.

Key words: prebiotics, probiotics, normal intestinal microbiota.

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, Д03680, Україна,
тел.: +38(044) 526 23 29, e-mail: poltavska@ukr.net

ПРЕБІОТИКИ ВУГЛЕВОДНОЇ ПРИРОДИ І ПЕРСПЕКТИВИ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

Реферат

В останні роки велика увага приділяється біологічно активним добавкам — «пребіотикам», що вибірково стимулюють ріст і метаболічну активність пробіотичних мікроорганізмів, і тим самим здійснюють за-



гальну позитивну дію на макроорганізм в цілому. Даний огляд висвітлює сучасний стан питання про пребіотики вуглеводної природи, їх вплив на стан макроорганізму. У роботі знайшли своє відображення лише ті види пребіотичних препаратів, які отримали офіційне визнання на підставі доклінічних і клінічних досліджень. Показано, що в даний час «пребіотичний» напрям у медицині, ветеринарії та харчовій промисловості інтенсивно розвивається. У сучасній стратегії корекції дисбактеріозу кишечника провідна роль відводиться препаратам — пребіотикам. Водночас, досі залишаються невирішеними питання наукового обґрунтування розробки пребіотиків, що обмежує можливість їх інтенсивного виробництва і використання.

Ключові слова: пребіотики, пробіотики, нормобіота кишечника.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божко О.Ю., Шуваева Г.П., Корнеева О.С. Изучение пребиотических свойств заменителя сахара изомальтулозы в условиях *in vitro* // Соврем. пробл. наукобраз.-2011.-№5.-<http://www.science-education.ru/99-4920.0421100037\0282>
2. Agrawal A., Sharma B.C., Sharma P., Sarin S.K. Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: an open-label, randomized controlled trial of lactulose, probiotics, and no therapy // Am. J. Gastroenterol. — 2012. — 107, № 7. — P. 1043–1050.
3. Ballongue J., Schumann C., Quignon P. Effects of Lactulose and Lactitol on Colonic Microflora and Enzymatic Activity. // Scand.J.Gastroenterol.—1997.— № 32, Suppl. 222.— P. 41–44.
4. Bird A.R., Conlon M.A., Christophersen C.T., Topping D.L. Resistant starch, large bowel fermentation and a broader perspective of prebiotics and probiotics // Benef. Microbes. — 2010. — 1, № 4. — P. 423–431.
5. Bracken R.M., Page R., Gray B., Kilduff L.P., West D.J., Stephens J.W., Bain S.C. Isomaltulose improves glycemia and maintains run performance in type 1 diabetes // Med. Sci. Sports Exerc. — 2012. — 44, № 5. — P. 800–808.
6. Calame W., Weseler A.R., Viebke C., Flynn C., Siemensma A.D. Gum arabic establishes prebiotic functionality in healthy human volunteers in a dose-dependent manner // Br. J. Nutr. — 2008. — 100, № 6. — P. 1269–1275.
7. Cha Y.S., Yang J.A., Back H.I., Kim S.R., Kim M.G., Jung S.J., Song W.O., Chae S.W. Visceral fat and body weight are reduced in overweight adults by the supplementation of Doenjang, a fermented soybean paste // Nutr. Res. Pract. — 2012. — 6, № 6. — P. 520–526.
8. Chandini S.K., Ganesan P., Bhaskar N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India // Food Chem. — 2008. — № 107. — P. 707–713.



9. *Che T.M., Johnson R.W., Kelley K.W., Dawson K.A., Moran C.A., Pettigrew J.E.* Effects of mannan oligosaccharide on cytokine secretions by porcine alveolar macrophages and serum cytokine concentrations in nursery pigs // *J. Anim. Sci.*-2012. — 90, № 2. — P. 657–668.
10. *Cheled-Shoval S.L., Amit-Romach E., Barbakov M., Uni Z.* The effect of *in ovo* administration of mannan oligosaccharide on small intestine development during the pre- and posthatch periods in chickens // *Poult. Sci.* — 2011. — 90, № 10. — P. 2301–2310.
11. *Cloetens L., Broekaert W.F., Delaedt Y., Ollevier F., Courtin C.M., Delcour J.A., Rutgeerts P., Verbeke K.* Tolerance of arabinoxylan-oligosaccharides and their prebiotic activity in healthy subjects: a randomised, placebo-controlled cross-over study // *Br. J. Nutr.* — 2010. — 103, № 5. — P. 703–713.
12. *Corrigan A., Horgan K., Clipson N., Murphy R.A.* Effect of dietary prebiotic (mannan oligosaccharide) supplementation on the caecal bacterial community structure of turkeys // *Microb. Ecol.* — 2012. — 64, № 3. — P. 826–836.
13. *Costabile A., Fava F., Ruytiq H., Forssten S.D., Olli K., Klievink J., Rowland I.R., Ouwehand A.C., Rastall R.A., Gibson G.R., Walton G.E.* Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects // *Br. J. Nutr.* — 2012. — 108, № 3. — P. 471–481.
14. *Cummings J.H., Mac Farlane G.T.* Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism // *Clinical nutrition.* — 1997. — 16, № 1. — P. 3–11.
15. *Damen B., Cloetens L., Broekaert W.F., Franzois I., Lescroart O., Trogh I., Arnaut F., Welling G.W., Wijffels J., Delcour J.A., Verbeke K., Courtin C.M.* Consumption of breads containing in situ-produced arabinoxylan oligosaccharides alters gastrointestinal effects in healthy volunteers // *J. Nutr.* — 2012. — 142, № 3. — P. 470–477.
16. *Depeint F., Tzortzis G., Vulevic J., Panson K., Gibson G.R.* Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2008. — 87, № 3. — P. 785–791.
17. *Ebersbach T., Andersen J.B., Bergstrom A., Hutkins R.W., Licht T.R.* Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes in vitro // *Res. Microbiol.* — 2012. — 163, № 1. — P. 22–27.
18. *Faber T.A., Dilger R.N., Iakiviak M., Hopkins A.C., Price N.P., Fahey G.C. Jr.* Ingestion of a novel galactoglucomannan oligosaccharide-arabinoxylan (GGMO-AX) complex affected growth performance and fermentative and immunological characteristics of broiler chicks challenged



with *Salmonella typhimurium* // *Poult. Sci.* — 2012. — 91, № 9. — P. 2241–2254.

19. *Faber T.A., Dilger R.N., Hopkins A.C., Price N.P., Fahey G.C.* Effects of oligosaccharides in a soybean meal-based diet on fermentative and immune responses in broiler chicks challenged with *Eimeria acervulina* // *Poult. Sci.* — 2012. — 91, № 12. — P. 3132–3140.

20. *Fanaro S., Jelinek J., Stahl B., Boehm G., Kock R., Vigi V.* Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2005. — 41, № 2. — P. 186–190.

21. *Geraylou Z., Souffreau C., Rurangwa E., D'Hondt S., Callewaert L., Courtin C.M., Delcour J.A., Buyse J., Ollevier F.* Effects of arabinoxylan-oligosaccharides (AXOS) on juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) performance, immune responses and gastrointestinal microbial community // *Fish Shellfish Immunol.* — 2012. — 33, № 4. — P. 718–724.

22. *Gibson G.R., Roberfroid M.B.* Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // *J. Nutr.* — 1995. — 125. — P. 1401–1412.

23. *Grootaert C., Van den Abbeele P., Marzorati M., Broekaert W.F., Courtin C.M., Delcour J.A., Verstraete W., Van de Wiele T.* Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2009. — 69, № 2. — P. 231–242.

24. *Grøber C., van Stuijvenberg M., Mosca F., Moro G., Chirico G., Braegger C.P., Riedler J., Boehm G., Wahn U.; MIPS 1 Working Group.* Reduced occurrence of early atopic dermatitis because of immunoactive prebiotics among low-atopy-risk infants // *J. Allergy Clin. Immunol.* — 2010. — 126, № 4. — P. 791–797.

25. *Heidarpour F., Mohammadabadi M.R., Zaidul I.S.M., Maherani B., Saari N., Hamid A.A., Abas F., Manap M.Y.A., Mozafari M.R.* Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective // *Pharmazie.* — 2011. — № 66. — P. 319–324.

26. *Hengst C., Ptok S., Roessler A., Fechner A., Jahreis G.* Effects of polydextrose supplementation on different faecal parameters in healthy volunteers // *Int. J. Food Sci. Nutr.* — 2009. — 60, Suppl. 5. — P. 96–105.

27. *Herfel T.M., Jacobi S.K., Lin X., Walker D.C., Jouni Z.E., Odle J.* Safety evaluation of polydextrose in infant formula using a suckling piglet model // *Food Chem. Toxicol.* — 2009. — 47, № 7. — P. 1530–1537.

28. *Herfel T.M., Jacobi S.K., Lin X., Fellner V., Walker D.C., Jouni Z.E., Odle J.* Polydextrose enrichment of infant formula demonstrates prebiotic characteristics by altering intestinal microbiota, organic acid concentrations, and cytokine expression in suckling piglets // *J. Nutr.* — 2011. — 141, № 12. — P. 2139–2145.



29. *Jacobasch G., Dongowski G., Florian S., Möller-Schmehl K., Raab B., Schmiedl D.* Pectin does not inhibit intestinal carcinogenesis in APC-deficient Min ⁺/+ mice // *J. Agric. Food Chem.* — 2008. — 56, № 4. — 1501–1510.
30. *Jochym K., Kapusniak J., Barczynska R., Slizewska K.* New starch preparations resistant to enzymatic digestion // *J. Sci. Food. Agric.* — 2012. — 92, № 4. — P. 886–891.
31. *Kelly G.* Inulin-type prebiotics: a review. (Part 2) // *Altern. Med. Rev.* — 2009. — 14, № 1. — P. 36–55.
32. *Kobayashi Y., Ohbuchi T., Fukuda T., Wakasugi E., Yasui R., Hamada M., Yokoyama M., Kuwahata M., Kido Y.* Acidic xylooligosaccharide preserves hepatic iron storage level in adult female rats fed a low-iron diet // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* — 2011. — 57, № 4. — P. 292–297.
33. *Kokke F.T., Scholtens P.A., Alles M.S., Decates T.S., Fiselier T.J., Tolboom J.J., Kimpen J.L., Benninga M.A.* A dietary fiber mixture versus lactulose in the treatment of childhood constipation: a double-blind randomized controlled trial // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2008. — № 47(5). — P. 592–597.
34. *Lahtinen S.J., Knoblock K., Drakoularakou A., Jacob M., Stowell J., Gibson G.R., Ouwehand A.C.* Effect of molecule branching and glycosidic linkage on the degradation of polydextrose by gut microbiota // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2010. — 74, № 10. — P. 2016–2021.
35. *Lamsal B.P.* Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides // *J. Sci. Food Agric.* — 2012. — 92, № 10. — P. 2020–2028.
36. *Le Leu R.K., Hu Y., Brown I.L., Woodman R.J., Young G.P.* Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats // *Carcinogenesis.* — 2010. — 31, № 2. — P. 246–251.
37. *Li B., Lu F., Wei X., Zhao R.* Fucoidan: Structure and Bioactivity // *Molecules* 2008. — 13. — P. 1671–1695.
38. *Lynch M.B., Sweeney T., Callan J.J., O'Sullivan J.T., O'Doherty J.V.* The effect of dietary Laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilization, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs // *J. Sci. Food Agric.* — 2010. — № 90. — P. 430–437.
39. *Marzorati M., Verhelst A., Luta G., Sinnott R., Verstraete W., Van de Wiele T., Possemiers S.* *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements // *Int. J. Food Microbiol.* — 2010. — 139, № 3. — P. 168–176.
40. *McDonnell P., Figat, S., O'Doherty J.V.* The effect of dietary laminarin and fucoidan in the diet of the weanling piglet on performance,



selected fecal microbial populations and volatile fatty acid concentrations // *Animal*. — 2010. — № 4. — P. 579–585.

41. *Neyrinck A.M., Possemiers S., Druart C., Van de Wiele T., De Backer F., Cani P.D., Larondelle Y., Delzenne N.M.* Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides /Prevotella in diet-induced obese mice // *PLoS One*. — 2011. — 6, № 6. — P. 1–12(e20944).

42. *Neyrinck A.M., Van H e V.F., Piront N., De Backer F., Toussaint O., Cani P.D., Delzenne N.M.* Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice // *Nutr. Diabetes*. — 2012. — № 2, e28. — P. 1–9.

43. *Nishimura N., Tanabe H., Sasaki Y., Makita Y., Ohata M., Yokoyama S., Asano M., Yamamoto T., Kiriya S.* Pectin and high-amylose maize starch increase caecal hydrogen production and relieve hepatic ischaemia-reperfusion injury in rats // *Br. J. Nutr.* — 2012. — 107, № 4. — P. 485–492.

44. *Nochta I., Halas V., Tossenberger J., Babinszky L.* Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on the apparent ileal digestibility of nutrients, N-balance and growth performance of weaned piglets // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. — 2010. — 94, № 6. — P. 747–756.

45. *O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P., Duggan P., Lawlor P.G., Hughes H., Gardiner G.E.* Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications // *Mar. Drugs*. — 2010. — № 8. — P. 2038–2064.

46. *Passariello A., Terrin G., Cecere G., Micillo M., De Marco G., Di Costanzo M., Cosenza L., Leone L., Nocerino R., Canani R.B.* Randomised clinical trial: efficacy of a new synbiotic formulation containing *Lactobacillus paracasei* B21060 plus arabinogalactan and xilooligosaccharides in children with acute diarrhoea // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 2012. — 35, № 7. — P. 782–788.

47. *Piastowska-Ciesielska A.W., Gralak M.A.* Influence of a low dose of dietary soybean on bone properties and mineral status in young rats // *Biofactors*. — 2010. — 36, № 6. — P. 451–458.

48. *Piemontese P., Giann  M.L., Braegger C.P., Chirico G., Gr ber C., Riedler J., Arslanoglu S., van Stuijvenberg M., Boehm G., Jelinek J., Roggero P.; MIPS 1 Working Group.* Tolerance and safety evaluation in a large cohort of healthy infants fed an innovative prebiotic formula: a randomized controlled trial // *PLoS One*. — 2011. — 6, № 11. — P. 1–9.

49. *Rafter J., Caderni G., Clune Y., Hughes R., Karlsson P.C., Klinder A., O'Riordan M., O'Sullivan G.C., Pool-Zobel B., Rechkemmer G., Roller M., Rowland I., Salvadori M., Thijs H., Van Loo J., Watzl B., Collins J.K.*



Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2007. — 85, № 2. — P. 488–496.

50. *Shadid R., Haarman M., Knol J., Theis W., Beermann C., Rjosk-Dendorfer D., Schendel D.J., Koletzko B.V., Krauss-Etschmann S.* Effects of galactooligosaccharide and long-chain fructooligosaccharide supplementation during pregnancy on maternal and neonatal microbiota and immunity — a randomized, double-blind, placebo-controlled study // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2007. — 86, № 5. — P. 426–437.

51. *Shen L., Keenan M.J., Raggio A., Williams C., Martin R.J.* Dietary-resistant starch improves maternal glycemic control in Goto-Kakizaki rat // *Mol. Nutr. Food Res.* — 2011. — 55, № 10. — P. 1499–1508.

52. *Silk D.B., Davis A., Vulevic J., Tzortzis G., Gibson G.R.* Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome // *Aliment. Pharmacol. Ther.* — 2009. — 29, № 5. — P. 508–518.

53. *Tateyama I., Hashii K., Johno I., Iino T., Hirai K., Suwa Y., Kiso Y.* Effect of xylooligosaccharide intake on severe constipation in pregnant women // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* — 2005. — 51, № 6. — P. 445–448.

54. *Tenorio M.D., Espinosa-Martos I., Prestamo G., Ruperez P.* Soybean whey enhance mineral balance and caecal fermentation in rats // *Eur. J. Nutr.* — 2010. — 49, № 3. — P. 155–163.

55. *Therapeutic Microbiology: Probiotics and related strategies* / Edited by J. Versalovic and M. Wilson. — Washington; DC: ASM Press, 2008. — 420 p.

56. *Udani J.K., Singh B.B., Barrett M.L., Singh V.J.* Proprietary arabinogalactan extract increases antibody response to the pneumonia vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study in healthy volunteers // *Nutr. Journ.* — 2010. — 9, № 32. — P. 1–7.

57. *van Can J.G., van Loon L.J., Brouns F., Blaak E.E.* Reduced glycaemic and insulinaemic responses following trehalose and isomaltulose ingestion: implications for postprandial substrate use in impaired glucose-tolerant subjects // *Br. J. Nutr.* — 2012. — 108, № 7. — P. 1210–1217.

58. *van der Spoel J.I., Oudemans-van Straaten H.M., Kuiper M.A., van Roon E.N., Zandstra D.F., van der Voort P.H.* Laxation of critically ill patients with lactulose or polyethylene glycol: a two-center randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Crit. Care Med.* — 2007. — 35, № 12. — P. 2726–2731.

59. *Vulevic J., Drakoularakou A., Yaqoob P., Tzortzis G., Gibson G.R.* Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2008. — 88, № 5. — P. 1438–1446.

60. *Wakim-Fleming J.* Hepatic encephalopathy: Suspect it early in patients with cirrhosis // *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* — 2011. — 78. — P. 597–605.



61. *Walton G.E., Lu C., Trogh I., Arnaut F., Gibson G.R.* A randomised, double-blind, placebo controlled cross-over study to determine the gastrointestinal effects of consumption of arabinoxylan-oligosaccharides enriched bread in healthy volunteers // *Nutr. J.*-2012. — 11, № 36. — P. 1–11.

62. *Wang X., Li X., Chen L., Xie F., Yu L., Li B.* Preparation and characterization of octenyl succinate starch as a delivery carrier for bioactive food components // *Food Chem.* — 2011. — № 126. — P. 1218–1225.

63. *Wang Y., Han F., Hu B., Li J., Yu W.* *In vivo* prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate // *Nutrition Research.* — 2006. — 26. — P. 597–603.

64. *Witaicenis A., Fruet A.C., Salem L., Di Stasi L.C.* Dietary polydextrose prevents inflammatory bowel disease in trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis // *J. Med. Food.* — 2010. — 13, № 6. — P. 1391–1396.

65. *Xiao C.L., Tao Z.H., Guo L., Li W.W., Wan J.L., Sun H.C., Wang L., Tang Z.Y., Fan J., Wu W.Z.* Isomalto oligosaccharide sulfate inhibits tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice // *BMC Cancer.* — 2011. — 11, № 150. — P. 1–11.

66. *Xie S., Zhu J., Zhang Y., Shi K., Shi Y., Ma X.* Effects of soya oligosaccharides and soya oligopeptides on lipid metabolism in hyperlipidaemic rats // *Br. J. Nutr.* — 2012. — 108, № 4. — P. 603–10.

67. *Yang L.C., Lin W.C., Lu T.J.* Characterization and prebiotic activity of aqueous extract and indigestible polysaccharide from *Anoectochilus formosanus* // *J. Agric. Food Chem.* — 2012. — 60, № 35. — P. 8590–8599.

68. *Yen C.H., Tseng Y.H., Kuo Y.W., Lee M.C., Chen H.L.* Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people — a placebo-controlled, diet-controlled trial // *Nutrition.* — 2011. — 27, № 4. — P. 445–450.

69. *Zhou E., Pan X.* Application study of xylo-oligosaccharide in layer production // *Modern Appl. Sci.* — 2009. — Vol. 3, № 1. — P. 103–107.

70. *Int. Patent WO 2, 005, 039, 597.* Immunomodulating oligosaccharides, and therapeutic use thereof. Stahl B., M'Rabet L., Vos A.P. — Publ. 2005.

Стаття надійшла до редакції 01.10.2013 р.



А.Ю. Фесенко, В.К. Позур

ННЦ Інститут біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка,
03022, Київ, вул. Академіка Глушкова, 2, тел.: +38 (044) 275 02 97,
e-mail: fesna2007@rambler.ru

ПОЛІОМІЄЛІТ: ПЕРЕШКОДИ НА ШЛЯХУ ЕРАДИКАЦІЇ

Огляд присвячений ситуації з поліомієліту в Україні та країнах світу. Протягом багатьох років проблема поліомієліту лишається актуальною. На сьогоднішній день циркуляція «диких» штамів вірусу поліомієліту продовжується в трьох ендемічних країнах Азії та Африки. Завдяки постійному зростанню міграційних процесів існує загроза завозу «диких» поліовірусів до країн, вільних від циркуляції цього вірусу. Продемонстрований низький рівень охоплення вакцинацією дітей в Україні, що призводить до збільшення прошарку населення, сприйнятливо до захворювання. Показано зростання кількості випадків вакцин-асоційованого паралітичного поліомієліту переважно в розвинених країнах, що зумовлено посиленням системи епідеміологічного нагляду за поліомієлітом з одного боку і збільшенням кількості осіб з імунodefіцитними станами — з іншого. Наведений механізм утворення вірусних ревертантів із можливим зворотнім набуттям ними нейровірулентних властивостей, а також утворення міжтипових вірусних рекомбінантів. В огляді наведені основні завдання ВООЗ, спрямовані на боротьбу з поліомієлітом, кінцевою метою яких є повна ерадикація цього захворювання.

Ключові слова: поліомієліт, вакцинація, вірус поліомієліту вакцинного походження, в'ялий дитячий параліч.

Поліомієліт, як хвороба, відомий з часів античності, але тільки останні сто років історії медицини встановлений збудник хвороби — поліовірус. Цей патогенний ентеровірус став причиною масового захворювання людства протягом новітньої історії.

Біологія поліовірусів

Віруси поліомієліту належать до роду *Enterovirus* родини *Picornaviridae*. Поліовіруси передаються від людини до людини переважно фекально-оральним шляхом за рахунок виділення з випорожненнями та глотковим секретом від хворої людини. На сьогодні рецептори до вірусів поліомієліту виявлені лише на клітинах людини та людиноподібних приматів кількох видів [1, 2, 3]. Життєвий цикл вірусу відбувається в межах цитоплазми



інфікованої клітини і починається з контакту віріону з рецептором вірусу поліомієліту (PVR) на поверхні клітини (рис. 1).

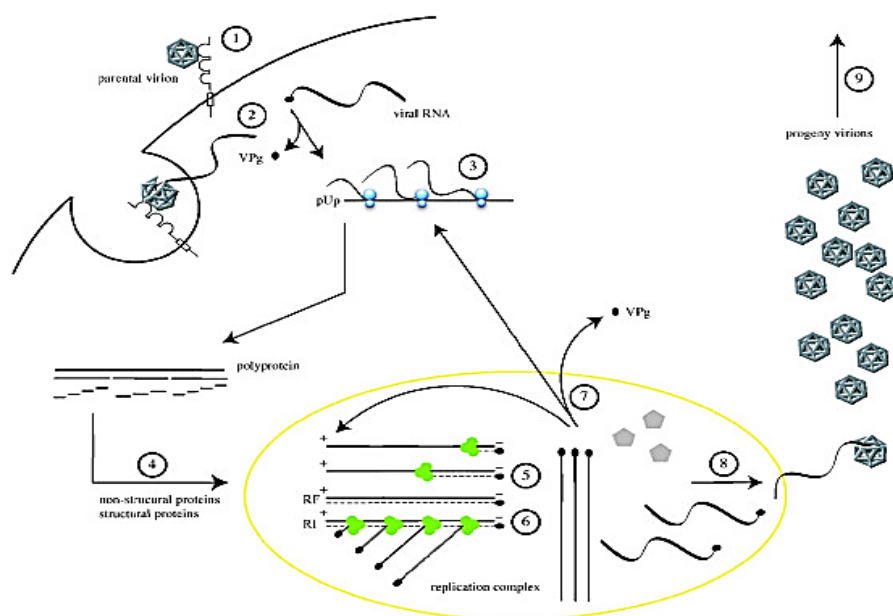


Рис. 1. Життєвий цикл вірусу поліомієліту [4]

1 — зв'язування вірусу поліомієліту з поверхневою молекулою CD155. 2 — розпаковка вірусної РНК, зумовлена дестабілізацією вірусного капсиду. 3 — трансляція вірусної РНК. 4 — процесинг вірусних структурних та неструктурних білків. 5 — синтез негативного ланцюга РНК та утворення дволанцюгової нитки РНК. 7 — трансляція. 8 — упаковка ново синтезованої РНК. 9 — лізис інфікованої клітини та вивільнення віріонів.

Fig. 1. Poliovirus lifecycle [4]

1 — binding of poliovirus to the cell surface macromolecule CD155. 2 — uncoating of the viral RNA is mediated by receptor-dependent destabilization of the virus capsid. 3 — translation of the viral RNA. 4 — proteolytic processing of the viral polyprotein yields mature structural and non-structural proteins. 5 — positive-sense RNA serves as template for complementary negative-strand synthesis, thereby producing a double-stranded RNA. 6 — initiation of many positive strands from a single negative strand RNA. 7 — translation. 8 — positive-sense RNA molecules associate with capsid precursors to undergo encapsidation. 9 — lysis of the infected cell and release of infectious progeny virions.

Рецептор CD155 імуноглобулінової природи складається з трьох позаклітинних Ig-подібних доменів, трансмембранного домену та С-кінцевого цитоплазматичного домену (рис. 2). Після інфікування відбувається розселення вірусу та реплікація у кишковому тракті, що може призвести до потрапляння вірусу в кров та розвитку вірусемії [5].

За рахунок вірусемії відбувається дисемінація збудника в лімфатичні вузли та внутрішні органи. Ураження центральної нервової системи призводить до незворотних порушень мотонейронів сірої речовини передніх рогів спинного мозку та ядер рухових черепно-мозкових нервів.

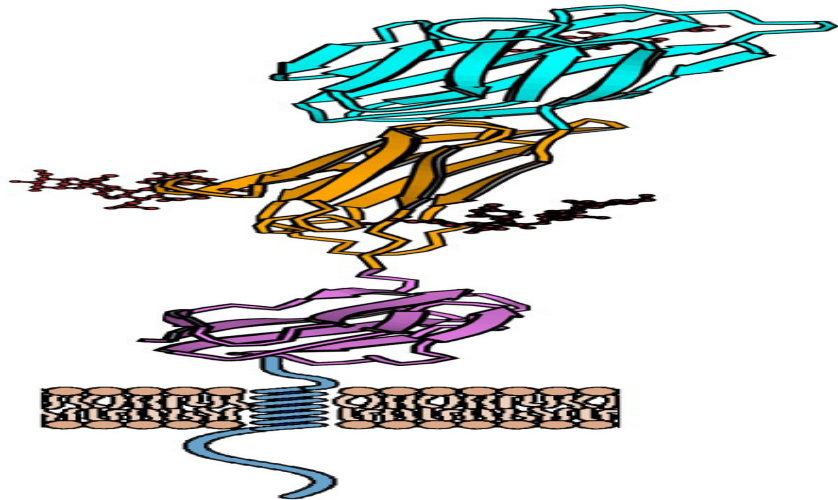


Рис. 2. Рецептор до вірусу поліомієліту — трансмембранний глікопротеїн суперродини імунoglobulinів [3]

1 — позаклітинні Ig-подібні домени. 2 — трансмембранний домен. 3 — С-кінцевий цитоплазматичний домен

Fig. 1. Poliovirus receptor is a transmembrane glycoprotein in the immunoglobulin superfamily [3]

1 — extracellular Ig-like domains. 2 — transmembrane domain. 3 — C-terminal cytoplasmic domain

Залежно від масштабу розповсюдження вірусу в організмі хворого та рівня ураження центральної нервової системи клінічні прояви захворювання можуть варіювати [6]. Окремі випадки паралітичного поліомієліту призводять до інвалідизації, втрати працездатності хворого та необхідності у пожиттєвому лікуванні та догляді, що пов'язано з відповідними витратами. Тому, на сьогоднішній день вакцинопрофілактика залишається найефективнішим методом попередження захворювання та боротьби з поширенням вірусу поліомієліту.

Епідемії поліомієліту спалахнули наприкінці XIX століття в багатьох Європейських країнах та Північній Америці, після чого поліомієліт набув глобального статусу із щорічними епідеміями. Існує кілька цікавих гіпотез щодо причин глобального розповсюдження поліомієліту та виникнення епідемічних спалахів серед населення різних країн. Одна з гіпотез припускає, що із покращенням соціально-побутових та санітарно-гігієнічних умов проживання збільшився вік людини, яка вперше контактує з вірусом. У передепідемічний період ентеровірусні інфекції були настільки

розповсюдженими, що інфікування дитини відбувалося у перші 6–12 місяців життя. Однак ці діти були захищені від вірусів антитілами, що містяться у молоці матері. Звичайно, сироваткові антитіла не захищали шлунково-кишковий тракт від інфікування вірусом, однак материнські антитіла запобігали потраплянню збудника в кров та ураженню центральної нервової системи з подальшим розвитком паралічу. Таким чином, діти набували активного імунітету за підтримки пасивного захисту материнських гуморальних антитіл. Із покращенням санітарного стану умов проживання дітей, первинний контакт дитячого організму з вірусом почав відбуватися пізніше, на другому році життя, коли значно знижувався рівень материнських захисних антитіл, тим самим відкриваючи вірусу доступ до центральної нервової системи. Відповідно до цієї гіпотези, випадки раннього захворювання реєструються переважно у дітей другого року життя. Захворювання відоме як дитячий параліч. На підтримку гіпотези також свідчать такі факти: найбільш ранні випадки захворювання на поліомієліт були зареєстровані в країнах із високим рівнем гігієни та санітарії; паралельно з поступовим поширенням поліомієліту збільшується віковий розподіл відповідно до збільшення віку первинного інфікування людини.

Таким чином, починаючи з 1880-х років, були зафіксовані повідомлення з країн Скандинавії та Сполучених Штатів Америки про серії спалахів дитячого паралічу. Цікавим є факт одночасної появи спалахів в Європейських країнах та США. У колишньому Радянському Союзі різкий підйом захворюваності на поліомієліт був зафіксований у 1954–1956 рр. У 1940 році показники захворюваності становили 0,67 на 100 тис. населення, а в 1956 році — вже 8,79 на 100 тис. населення. Найвищі показники захворюваності на поліомієліт були зафіксовані у 1958 році і становили 10,76 на 100 тис. населення країни. Епідемія поліомієліту в СРСР виникла не раптово, а з поступовим підйомом кількості випадків у країнах Прибалтики, залученням до епідемічного процесу сучасних територій України, Молдови та Білорусії у 1947–1948 рр., західних та центральних регіонів Росії у 50-х роках [7].

Створення поліомієлітної вакцини у 1955 році дало початок поетапному викоріненню поліомієліту в усьому світі. Застосування інактивованої поліомієлітної вакцини (ІПВ) на території України було розпочато у 1957 році, а оральна поліомієлітна вакцина (ОПВ) була вперше впроваджена у 1959 році. Остаточна елімінація дикого вірусу поліомієліту на території України була досягнута у 1994 році завдяки впровадженню масової вакцинації населення та епідемічному нагляду за інфекцією. Завдяки проведенню масштабних заходів вакцинації ОПВ та ІПВ в багатьох країнах вдалося знизити показники захворюваності на поліомієліт з 600 тис. випадків на рік у світі у 1980-х до менше, ніж 300 випадків на рік у 2013 році [8]. Циркуляція «дикого» вірусу поліомієліту 2-го типу в світі була припинена у 1999 році, останній випадок поліомієліту, викликаного «ди-



ким» поліовірусом 3-го типу, зареєстрований у 2012 році в Індії. Однак, на жаль, поки продовжується циркуляція «диких» вірусів поліомієліту 1-го типу у трьох країнах Азії та Африки (Пакистан, Нігерія, Афганістан) (рис. 3) [9].

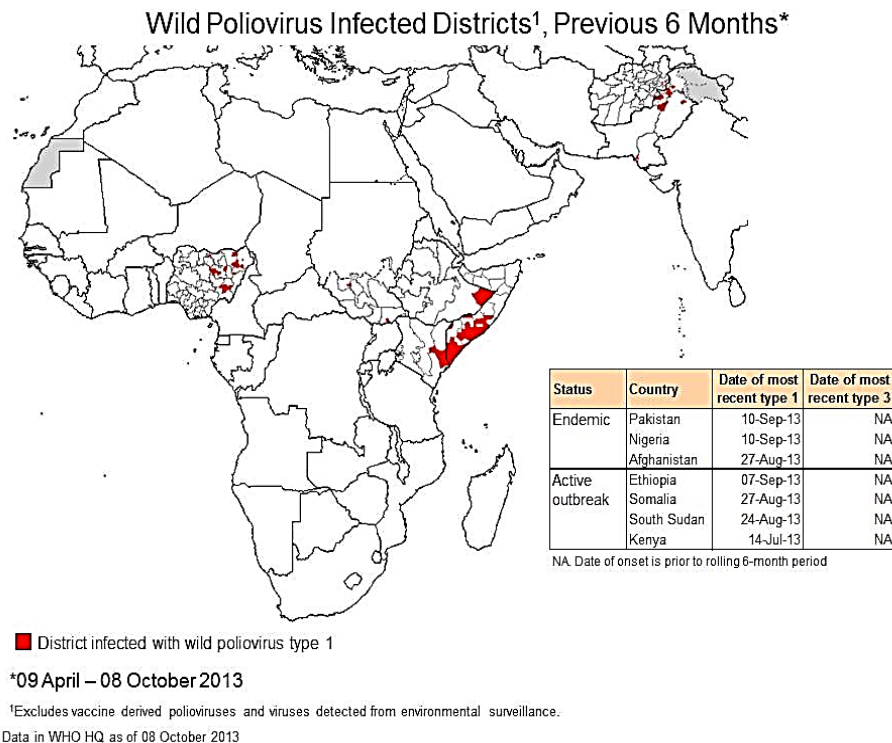


Рис. 3. Розповсюдженість «диких» вірусів поліомієліту в світі у 2013 році [9]

Fig. 3. Wild poliovirus infected districts of the world, data collected in 2013 [9]

У 1988 році за рішенням Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я була створена Програма глобальної ерадикації поліомієліту (GPEI). Завдяки роботі GPEI досягнуто прогресу в нагляді за випадками гострих в'ялих паралічів (AFP), проведенні тестування фекальних зразків, пов'язаних з цими випадками, на наявність вірусів поліомієліту у 145 лабораторіях глобальної мережі нагляду за поліомієлітом (GPLN), акредитованих ВООЗ [10]. До обов'язків існуючої системи нагляду також входить нагляд за навколишнім середовищем (контроль зразків стічних вод). Стандартні показники ефективності нагляду за AFP на національному та субнаціональному рівнях дають змогу вчасно виявляти потенційні прогалини, де циркуляція вірусу може бути непоміченою. Контроль за своєчасним транспортуванням зразків та звітністю лабораторій запобігає пізньому реагуванню та безконтрольній циркуляції вірусу на певних територіях [11].

На сьогоднішній день завдяки роботі GPLN більшість країн успішно подолали циркуляцію вірусу поліомієліту. Однак, близько половини людей, інфікованих поліовірусом протягом останніх трьох років, проживають у країнах, вільних від поліомієліту. Встановлено, що ці випадки захворювання були спричинені вірусами поліомієліту, завезеними з ендемічних країн. В деяких країнах, вільних від циркуляції «диких» вірусів поліомієліту, спостерігають зниження рівня охоплення населення вакцинацією та зростання кількості серонегативних осіб, сприйнятливих до інфекції. Нажаль, показники смертності у випадках інфікування таких осіб, є значно вищими, ніж серед вакцинованого населення [10].

Система нагляду за гострими в'ялими паралічами залишається головною стратегією моніторингу за «дикими» вірусами поліомієліту та вакцин-асоційованими вірусами поліомієліту (VDPV). В системі нагляду за АФР використовують стандартні показники:

- визначення та дослідження більше одного випадку АФР неpolіомієлітної природи на 100 тис. населення віком до 15 років (в деяких країнах показник становить >2 на 100 тис. населення);
- збір зразків від хворих у 80% і більше зареєстрованих випадків АФР;
- опрацювання всіх зразків в акредитованих лабораторіях мережі GPLN.

Щорічно кожна країна Європейського Регіону надає документацію до Європейського бюро ВООЗ для підтвердження статусу території, вільної від циркуляції «дикого» штаму поліомієліту. На підставі аналізу документації кожної країни Регіональний сертифікаційний комітет вирішує питання щодо статусу Європейського Регіону в цілому [9].

Циркулюючі вакцин-асоційовані віруси поліомієліту

На початку ХХІ століття основну перешкоду для повної елімінації вірусів поліомієліту в світі становлять не «дикі» штами вірусів, а ті, що мають вакцинне походження та циркулюють в оточуючому середовищі (циркулюючі вакцин-асоційовані віруси поліомієліту — cVDPV) (табл. 1) [12–14].

Для поліовірусів характерною є здатність однієї інфікованої клітини продукувати десятки тисяч інфекційних часток поліовірусу [15], де окрема вірусна популяція буде містити колекцію геномів. Ця обставина може приводити до реверсії нейровірулентних властивостей у вакцинних поліовірусів та формування поліовірусів вакцинного походження за рахунок накопичення мутацій [12]. Перебудова геномів може відбуватися при одночасній реплікації двох варіантів вірусу в недостатньо сприятливих умовах для кожного з них. Вірогідно, що вакцинні штами поліовірусів не повністю адаптовані до розмноження у кишечнику реципієнтів. Про це говорить той факт, що при використанні оральної поліомієлітної вакцини, яка містить одночасно віруси трьох серотипів, вакциновані особи



можуть виділяти не тільки ревертанти, а і міжтипові рекомбінанти, а саме віруси, різні ділянки геному яких відповідають ділянкам РНК різних вірусів — попередників. Існує припущення, що ці рекомбінанти краще пристосовані до розмноження у кишечнику [12].

Таблиця 1

Кількість вірусологічно підтверджених випадків паралітичного поліомієліту, асоційованими з поліовірусами вакцинного походження, 2000–2010 роки [14]

Table 1

Number of Virologically Confirmed Cases of Paralytic Poliomyelitis Associated With Vaccine-Derived Polioviruses, 2000–2010 [14]

Країна	Тип вірусу	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Гаїті та Домініканська Республіка	1	12	9									
Філіппіни	1		3									
Мадагаскар	2			4			5					
Китай	1					3						
Індонезія	1						46					
Камбоджа	3						1	1				
Нігерія	2						1	21	68	63	153	9
Нігер	2							2				
М'янма	1							1	4			
ДР Конго	2									14	2	3
Гвінея	2										1	
Індія	2										11	1
Ефіопія	3										1	5

На сьогоднішній день ОПВ є найменш реактогенною з вакцин, які використовуються, але потенційний ризик виникнення ВАПП у вакцинованих осіб вимагає обережного ставлення до цієї вакцини, особливо в регіонах, де припинено циркуляцію «диких» штамів вірусу.

Вакцин-асоційований паралітичний поліомієліт (VDPP) частіше виникає у реципієнтів вакцин (45% випадків). Етіологічним фактором виникнення VDPP є переважно вакцинні віруси поліомієліту типу 2 для реципієнтів вакцин, та типу 3 — для осіб, що контактували з імунізованими особами [16–18].

Особливу групу ризику для виникнення VDPP становлять особи з імунодефіцитними станами різної етіології (агаммаглобулінемія, гіпогам-



маглобулінемія, комбіновані імунodefіцити) та ті, що тривалий час знаходяться на стероїдній терапії [19]. Особи з імунodefіцитними станами являють собою потенційну загрозу повторної появи вірусу поліомієліту після його ерадикації. Відомо, що після вакцинації ОПВ імункомпетентні особи здатні до виділення вакцинного штаму вірусу протягом 2–3 місяців після вакцинації. Проблема виділення вакцинних вірусів особами з імунodefіцитами вивчена недостатньо. Однак, добре відомо, що первинні імунodefіцити є фактором ризику розвитку VDPP, а також тривалої персистенції інших ентеровірусів [20].

Ризик виникнення VDPP у дітей зі спадковими імунodefіцитами в 10 тис. разів вищий, ніж у здорових [19]. Вагомою причиною збільшення випадків VDPP є недостатній рівень діагностики первинних імунodefіцитів у дітей першого року життя, коли проводиться вакцинація. Особливий ризик щодо виникнення раннього VDPP становлять країни, де в календарі щеплень не передбачається застосування ІПВ (дитина отримує 3 дози ОПВ).

Згідно світової статистики ризик розвитку VDPP на сьогоднішній день становить 1 на 790 тис. доз ОПВ [21]. За розрахунками ВООЗ ризик виникнення VDPP після ерадикації вірусу поліомієліту може становити 250–500 випадків щороку [22].

На території України протягом 1998–2010 рр. зареєстровано 27 випадків VDPP (рис. 4.). За цей період частота VDPP становила від 1 випадку на 430 тис. доз ОПВ до 1 на 3 млн. 450 тис. доз вакцин [9] (рис. 4).

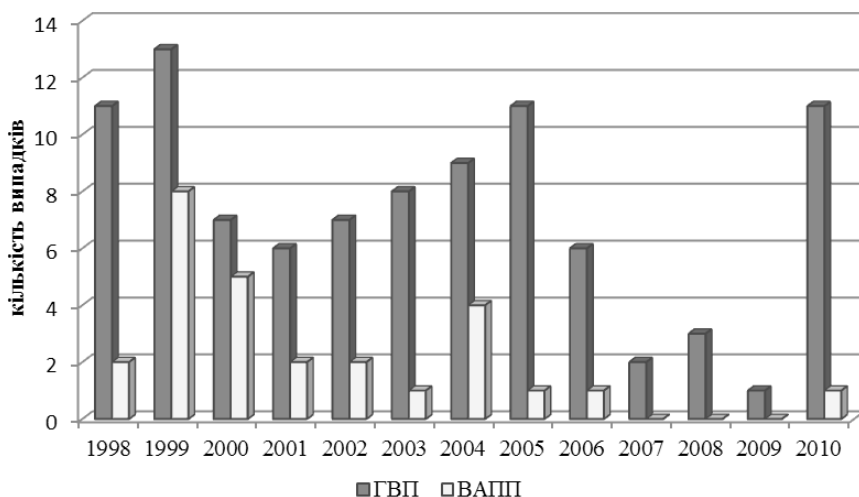


Рис. 4. Кількість випадків ГВП та ВАПП у 1998–2010 роках на території України [9]

Fig. 4. Flaccid acute paralysis cases and VDPP cases in Ukraine in 1998–2010 [9]



Виникає питання: чому випадки, пов'язані з сVDPV, почали реєструвати лише у 2000 році, через 40 років після початку застосування ОПВ? В першу чергу, цей феномен пов'язаний з появою методу сиквенування вірусних нуклеїнових кислот та можливістю встановлення різниці між вірусними ревертантами вакцинних штамів та дикими вірусами поліомієліту [23]. По-друге, створена потужна система нагляду за поліомієлітом світового масштабу, яка займається виділенням та характеристикою поліовірусів [24]. Тим не менше, найвагомішою причиною загострення ситуації з випадками, пов'язаними з вакцин-асоційованими вірусами, є невиконання програми вакцинації дітей, коли менше 50% дітей одержують 3 дози оральної поліомієлітної вакцини.

При дослідженні рівнів вакцинації дітей в Україні виявлена подібна ситуація з недостатнім охопленням населення вакцинопрофілактикою (рис. 5).

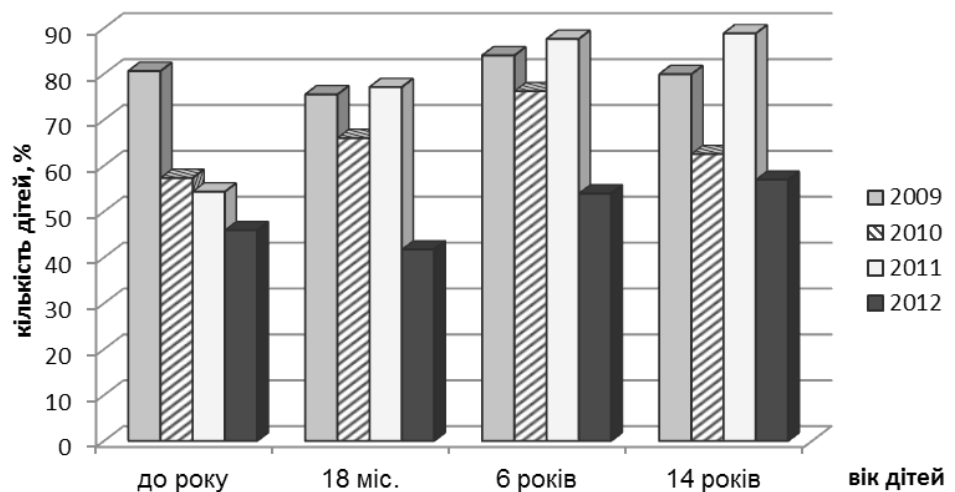


Рис. 5. Рівні охоплення щепленнями дітей в Україні у 2009–2012 роках [25]

Fig. 5. Immunization coverage of children in Ukraine in 2009–2012 [25]

Для прикладу, у 2012 році було вакциновано 45,9% дітей першого року життя. Охоплення щепленням дітей у віці 18 місяців в 2012 році становило 41,6%. Дещо вищі показники охоплення щепленнями були серед дітей у віці 6 років — 53,9%, та серед дітей у віці 14 років — 56,9%. Ці показники є сумарними даними з усіх регіонів України у 2012 році, в окремих регіонах подекуди показники охоплення щепленнями дітей були нижчими, ніж 35%.

Отже, при порушенні схем вакцинації створюються умови для поширення інфекції та виникнення спалахів паралітичного поліомієліту, оскільки певний прошарок населення, особливо дітей, залишається сприйнятливими до поліовірусів. У регіонах з високим рівнем охоплен-

ня населення вакцинацією кількість випадків захворювання зведена до мінімуму [26].

Незважаючи на досягнуті успіхи в боротьбі з поліомієлітом у світі, з метою сертифікації земної кулі, як території вільної від поліомієліту, проблема поліомієліту набуває все більшого значення. Систематично «дикий» поліовірус з територій, які залишаються епідемічними, завозиться та поширюється у регіонах, які певний час вважалися вільними від цього збудника (Таджикистан, Китай). Також привертає увагу циркуляція поліовірусів вакцинного походження зі зміненими біологічними властивостями та ризиком виникнення VAPP на фоні застосування оральної поліомієлітної вакцини.

Результати моніторингу за VDPV свідчать про необхідність довгострокової імунізації населення після припинення циркуляції «диких» вірусів поліомієліту для попередження виникнення пандемії, викликаной «диким» вірусом або VDPV [9]. Підтримка високого рівня специфічного популяційного імунітету є першочерговим завданням на майбутнє. Застосування ОПВ та ІПВ виявилися надзвичайно ефективними у контролі за поліомієлітом. Оскільки використання цих вакцин має свої недоліки (низька імуногенність ІПВ, ризик виникнення VAPP при використанні ОПВ), ВООЗ наголосила на необхідності пошуку безпечних вакцин проти поліомієліту. Перспективними напрямками розробок таких вакцин визначено:

ДНК-вакцини, формування поліовірусного капсиду за допомогою не-поліовірусних експресуючих систем;

- застосування атенуйованих штамів Себіна у виробництві ІПВ;
- модифікація 5'NTR регіону геному вірусу поліомієліту з метою зниження вірулентності вірусу у складі ОПВ;
- стабілізації функцій РНК-залежної РНК-полімерази вірусу з метою підвищення реплікаційної точності та зменшення так званих quasi-видів у популяції вакцинних штамів вірусів;
- атенуйовані вакцини, одержані шляхом перестановки синонімічних кодонів РНК, що не впливають на амінокислотну послідовність;
- одержання атенуйованих штамів вірусів зі збереженням антигенності «диких» за допомогою інерції послідовності еукаріотної мікроРНК до геному вірусу;
- використання ад'ювантів для підвищення імуногенності вакцин.

На основі широкого застосування в епідеміології та вірусології сучасних молекулярно-генетичних методів одержані дані, які викликають сумніви щодо можливості ліквідації у недалекому майбутньому поліовірусу як біологічного виду. Це зумовлено здатністю поліовірусу до тривалої персистенції, особливо в організмі осіб з порушенням в імунній системі, здатністю вакцинних вірусів до реверсії та здобуттям нейровірулентних властивостей, можливістю внутрішньотипової рекомбінації поліовірусу,

а також формуванням поліовірусу вакцинного походження з нейровірулентними властивостями [27].

Для досягнення поставленої мети та повного викорінення вірусу поліомієліту в світі необхідно вирішити ряд існуючих проблем, а саме:

- циркуляція «диких» вірусів поліомієліту в ендемічних країнах (Пакистан, Афганістан, Нігерія);
- повторне завезення вірусу на території, вільні від поліомієліту, за рахунок інтенсивних міграційних процесів;
- циркуляція вірусів поліомієліту вакцинного походження та збільшення кількості випадків вакцин-асоційованого паралітичного поліомієліту;
- виділення вірусів поліомієліту вакцинного походження особами з В-клітинними імунodefіцитами.

Діюча програма глобальної ерадикації поліомієліту, прийнята Всесвітньою асамблеєю охорони здоров'я 14 травня 1988 року, наголошує на необхідності досягнення поставлених завдань для остаточного вирішення проблеми поліомієліту в світі. Згідно планам ВООЗ кінцевим терміном ерадикації поліомієліту визначено 2018 рік [28].

А.Ю. Фесенко, В.К. Позур

УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, 03022, Киев, ул. Академика Глушкова, 2, тел.: +38 (044) 275 02 97,
e-mail: fesna2007@rambler.ru

ПОЛИОМИЕЛИТ: ПРЕГРАДЫ НА ПУТИ ЭРАДИКАЦИИ

Реферат

Обзор посвящен ситуации по полиомиелиту в Украине и странах мира. В течение многих лет проблема полиомиелита остается актуальной. На сегодняшний день циркуляция «диких» штаммов вируса полиомиелита продолжается в трех эндемических странах Азии и Африки. Благодаря постоянному росту миграционных процессов существует угроза завоза «диких» полиовирусов в страны, свободные от циркуляции этого вируса. Продемонстрирован низкий уровень охвата вакцинацией детей в Украине, что приводит к увеличению слоя населения, восприимчивого к заболеванию. Показано увеличение количества случаев вакцин-ассоциированного паралитического полиомиелита преимущественно в развитых странах, что обусловлено усилением системы эпидемиологического надзора за полиомиелитом с одной стороны и увеличением числа лиц с иммунодефицитными состояниями — с другой. Показан механизм образования вирусных ревертантов с возможным обратным приобретением ими нейровирулентных свойств, а также образование межтипových вирусных рекомбинантов.



В обзоре приведены основные задачи ВООЗ, направленные на борьбу с полиомиелитом, конечной целью которых является полная эрадикация этого заболевания.

Ключевые слова: полиомиелит, вакцинация, вирус полиомиелита вакцинного происхождения, вялый детский паралич.

A.Yu. Fesenko, V.K. Pozur

ESC «Institute of Biology» of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2, Academic Glushkov Str., Kyiv, Ukraine, 03022, tel.: +38 (044) 275 02 97, e-mail: fesna2007@rambler.ru

POLIO: OBSTACLES TO ERADICATION

Summary

Review is devoted to the situation of poliomyelitis in Ukraine and worldwide. For many years, the problem of polio remains relevant. Today circulation of «wild» strains of poliovirus continues in the three endemic countries in Asia and Africa. Thanks to the continuous growth of migration threatens to deliver «wild» polioviruses to the countries, free from virus circulation. It was demonstrated the low level of vaccination coverage of children in Ukraine, that leads to increased segment of the population susceptible to the disease. It was demonstrated the increase in the incidence of vaccine-associated paralytic poliomyelitis mainly in developed countries, due to the strengthening of epidemiological surveillance of poliomyelitis on the one hand, and the increasing number of persons with immunodeficiency states — on the other. It was reproduced the mechanism of viral revertants with the possible return of their entry neurovirulence properties and formation of virus interspecies recombinants. The review shows the main objectives of WHO, to combat polio, which ultimate goal is the complete eradication of the disease.

Key words: poliomyelitis, vaccination, vaccine-derived poliovirus, flaccid infantile paralysis.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Racaniello V.R.* One hundred years of poliovirus pathogenesis // *Virology* — 2006. — V. 344, №1. — P. 9—16.
2. *Mueller S., Wimmer E., Cello J.* Poliovirus and poliomyelitis: a tale of guts, brains, and an accidental event // *Virus Res.* — 2005. — V. 111, №2. — P. 175—193.



3. *Yongning H., Bowman W., Mueller S., Bator C., Bella J. et. al.* Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus // PNAS — 2004. — V. 97, №1. — P. 79–84.
4. *Jesus N.* Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis // J. Virol. — 2007. — V. 70, №4. — 6 p.
5. *Nathanson N.* Viral Pathogenesis and Immunity. — 2nd ed. — Academic Press, Elsevier — 2007. — V. 280. — 119 p.
6. *Лещинская Е.В., Латишева И.Н.* Клиника, диагностика и лечение острого полиомиелита. Методические рекомендации. — М.: 1998. — 48 с.
7. *Поліомієліт: імунопрофілактика та її вплив на еволюцію епідемічного процесу* / Під ред. Задорожної В.І.— К.: ДІА, 2012. — 52 с.
8. *Polio case count.* World Health Organization. Режим доступу: http://apps.who.int/immunization_monitoring/en/diseases/poliomyelitis/afpextract.cfm
9. *Global polio eradication.* Polio this week. Data and monitoring. Режим доступу: <http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Poliocasesworldwide.aspx>
10. *Protecting polio-free areas.* Global Polio Eradication Initiative // Annual Report. — 2011. — V.52. — P. 27–30.
11. *Tracking progress towards global polio eradication* // Weekly Epidemiol. Rep. — 2012. — V. 87, №16. — P.153–160.
12. *Задорожна В.І., Мойсєєва Г.В., Бондаренко В.І., Доан С.І.* Поліомієліт в Україні та стратегія його профілактики // Керовані інфекції. Матер. наук.-практ. конф. і пленуму Асоціації інфекціоністів України (14-15 травня 2003р. м. Івано-Франківськ.). — Т.: Укрмедкнига, 2005. — С. 85–87.
13. *Wringe A., Fine P.E., Sutter R.W. et al.* Estimating the extent of vaccine-derived poliovirus infection // PLoS ONE. — 2008. — V. 3, №10. — P. 3433.
14. *World Health Organization.* Data, Statistics and Graphics by Subject [database]. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010. Режим доступу: http://www.who.int/immunization_monitoring/data/data_subject
15. *Kew O., Sutter R., de Gourville E., Dowdle W., Pallanch M. et. al.* Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for Global Polio Eradication // Annual Rev. Microbiol. — 2005. — V. 59. — P. 587–635.
16. *Edwards T.A., Grant C.C., Huang Q.S. et. al.* A case of vaccine-associated paralytic poliomyelitis // J. Pediatr. Child. Health. — 2000. — V. 36, № 4 — P. 408–411.
17. *Mas L.P., Caceres V.M., Galindo M.A. et. al.* Persistence of vaccine-derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication // J. Epidemiol. — 2001. — V. 30, № 5. — P. 1029–1034.



18. *Patti A.M., Santi A.L., Fiore L.* The study group. Enterovirus surveillance of Italian healthy children // *Eur. J. Epidemiol.* — 2000. — V. 16, №11. — P. 1035–1038.

19. *Garvilin G.V., Chercasova E.A., Lipskaya G.Y.* Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model // *J. Virol.* — 2000. — V. 74, № 16. — P. 7381–7390.

20. *Khetsuriani N., Prevots D.R., Elder M., Pallansch M., Kew O. et al.* Persistence of Vaccine-Derived Poliovirus among Immunodeficient Persons with Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis // *J. of Infectious Diseases* — 2003. — V. 188. — P. 1845–52.

21. *Pebody R.* Polio vaccination in Europe: The Shift from OPV to IPV use // *Eurosurveillance.* — 2004. — V. 9, №3. — P. 43–44.

22. *Костюченко В.А., Месянжинов В.В.* Архитектура сферических вирусов // *Успехи биологической химии.* — 2002. — Т. 42. — С. 177–192.

23. *Kew O.M., Sutter R.W., de Gourville E.M.* Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication // *Annu Rev Microbiol.* — 2005 — V. 59. — P. 587–635.

24. *Laboratory* surveillance for wild and vaccine-derived polioviruses—worldwide, January 2008–June 2009 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* — 2009. — V. 58, №34. — P. 950–954.

25. *Фесенко А.Ю., Мироненко А.П., Позур В.К.* Вакцинопрофілактика поліомієліта в Україні // *Педіатрія. Восточная Европа* — 2013. — №3. — С.36–40.

26. *Mbs Lago P., Cбceres V.M., Galindo M.A. et al.* Persistence of vaccine-derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication // *Int J Epidemiol.* — 2001. — V. 30, №5. — P. 1029–1034.

27. *Фролов А.Ф., Задорожная В.И.* Молекулярная эпидемиология вирусных и прионовых инфекций — К.: ДИА, 2010. — 235 с.

28. *Global* polio eradication initiative. Data and monitoring. Режим доступу: <http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Polioeradicationtargets.aspx>.

Стаття надійшла до редакції 19.11.2013.



UDC 579.222:579.262

Muchlis Abedalabas, N.B. Galkin, E.Yu. Pachomova,
T.O. Filipova

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

INFLUENCE OF THE EXOGENOUS QUORUM SENSING AUTOINDUCERS ON *PSEUDOMONAS* *AERUGINOSA* RHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS

The aim of this investigation was to discover the effect of *Pseudomonas aeruginosa* exogenic QS autoinducers: *N*-(3-oxo-dodecanoyl)homoserinlacton (3-oxo- C_{12} -HSL), *N*-butyryl-homoserinlacton (C_4 -HSL), and 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS) on *P. aeruginosa* ATCC 15692 mono- and di-rhamnolipids biosynthesis. **Methods.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 were cultured on Giss medium with 2% glucose at 37°C for 24 h. The investigations were performed in «plancton-biofilm» system with using of «Nunclon» 48-well plates. Di- and monorhamnolipids separation was conducted by TLC methods on Alugram Sil G /UV 254 TLC plates. Di- and monorhamnolipids were eluted separately and their content was determined by the orcinic test. Dirhamnolipids /monorhamnolipids ratio was calculated taking a monorhamnolipids content as 1 unit. There were used in this work homoserinlactones (Sigma Aldrich) and 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon synthesized in ONU Biotechnological scientific-educational center. **Results.** It was determined that exogenous 3-oxo- C_{12} -HSL showed no effects on rhamnolipids biosynthesis. In presence of the two others autoinducers: C_4 -HSL and PQS, rhamnolipids content increases. C_4 -HSL at the concentrations of 5 and 10 μ M caused increasing of the biosurfactants biosynthesis in 3.4 and 4.1 times. In presence of PQS in 40-80 μ M concentration range a proportional increase in the synthesis was observed. Its level increased in 1.9; 3.3 and 5.2 times in presence of 40, 60 and 80 μ M signaling quinolon concentration respectively. After 24 hours of incubation di- and monorhamnolipids ratio was 2,2:1. In presence of C_4 -HSL it was 2:1 at the concentration of this autoinducer 5 μ M and 2,4:1 at the concentration of 10 μ M *N*-butyryl-homoserinlacton. **Conclusions.** PQS greatly increased dirhamnolipids biosynthesis, especially Rha-Rha- C_{10} - C_{10} . At PQS concentration of 40, 60 and 80 μ M Rha-Rha- C_{10} - C_{10} /Rha- C_{10} - C_{10} ratio was 3:1, 3,6:1 and 4,5:1, respectively. It was shown that supernatants of bacterial cultures, contained increased amounts of dirhamnolipids, showed the highest emulsifying activity.

К е у о р д s: *Pseudomonas aeruginosa*, di- and monorhamnolipids, autoinducers, quorum sensing.



Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids have a wide spectra of biological activity, especially antimicrobial and antitumor mode of action [9, 10]. Due to their high emulsifying capacity they can be used in bioremediation of the polluted soil [7] and for oil recovery enhancement [12]. *P. aeruginosa* biosurfactants are the rhamnolipids mixture with different molecular structure that mainly consists of di- and monorhamnolipids, contained two fatty acid residues in their structure, mostly β -hydroxydodecanoyl- β -hydroxydodecanoate (C_{10} - C_{10}). Dirhamnolipids are more soluble in water and possess the highest emulsifying activity [8].

It has been previously shown that in presence of the exogenous signal quinolone (PQS) — *P. aeruginosa* quorum sensing autoinducer, rhamnolipids biosynthesis increases [2]. In this connection it is interesting to ascertain the effect of other signal molecules, especially, homoserinlactones on this process, common rhamnolipids content and dirhamnolipids / monorhamnolipids ratio.

The aim of this work was to evaluate the effect of *Pseudomonas aeruginosa* exogenic QS autoinducers: N-(3-oxo-dodecanoyl)homoserinlactone (3-oxo- C_{12} -HSL), N-butyryl-homoserinlactone (C_4 -HSL), and 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) on *P. aeruginosa* ATCC 15692 mono- and di-rhamnolipids biosynthesis.

The investigations were performed in «plancton-biofilm» system with using of the «Nunc» 48-well plates. *P. aeruginosa* ATCC 15692 overnight cultures diluted with sterile saline buffer were added in the plate wells, containing 1 ml of Giss media to final cell concentration equal 10^3 CFU. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. Rhamnolipids extraction and detection methods have been described earlier [2].

Rhamnolipids separation was performed with TLC method on Alugram Sil G /UV 254 TLC plates (Germany) in chloroform-methanol-water (65:12:2) mixture [11]. Rhamnolipids spots placement was determined by color reaction with rhamnose and acetic acid— sulphuric acid—anis aldehyde solution (50:1:0.05) and color reaction with fatty acid and 10% phosphomolybdic acid—ethanol. In both cases TLC plates treated with the specific reagents were heated at 80 °C till pink-orange or blue staining appearance, in the first and second cases, respectively.

Di- and monorhamnolipids were eluted separately with chloroform. The samples were centrifuged at 1500 g for 30 minutes for silica-gel removal. After centrifugation a chloroform layer was taken away and evaporated. Residue was diluted at 100 μ M of methanol and rhamnolipids concentration was determined using orcinol-assay [5]. Dirhamnolipids / monorhamnolipids ratio was calculated taking a monorhamnolipids content as 1 unit.

Culture supernatants emulsifying activity was determined using method [6]. 5 ml of supernatants and vegetable oil were placed in graduated tubes

of 1 cm in diameter. The samples were shaken vigorously for 5 minutes to obtain homogeneous emulsion and incubated at room temperature for 24 hours. After incubation the height of the column of the emulsion and its density were measured.

There were used in this work homoserinlactones (Sigma Aldrich) and 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon synthesized in ONU Biotechnological scientific-educational center. Homoserinlactons were used at the concentrations of 5 and 10 μM , PQS — 40, 60 and 80 μM . The data concerning a physiological concentration of autoinducers were used while concentrations choosing.

All the experiments were carried out triple with 6 repeats in each case.

Statistical analysis was performed using standard methods of variational analysis. Average values ($\bar{X}$) and their standard error ($S_{\bar{X}}$) were calculated. Reliability of differences was determined by Student's criterion at a significance level of not less than 95% ($p \leq 0.05$). All mathematics calculations were performed using the computer program Excel [1].

Results and discussions

It was shown that rhamnolipids total content in control cultures were $3.75 \pm 0.28 \mu\text{g} / \text{ml}$. The results showed that exogenous 3-oxo- C_{12} -HSL exhibited no effects on rhamnolipids biosynthesis (fig. 1). At the same time in presence of the two others autoinducers: C_4 -HSL and PQS, rhamnolipids content increases. C_4 -HSL at concentrations of 5 and 10 μM caused increase of the biosurfactants biosynthesis in 3.4 and 4.1 times.

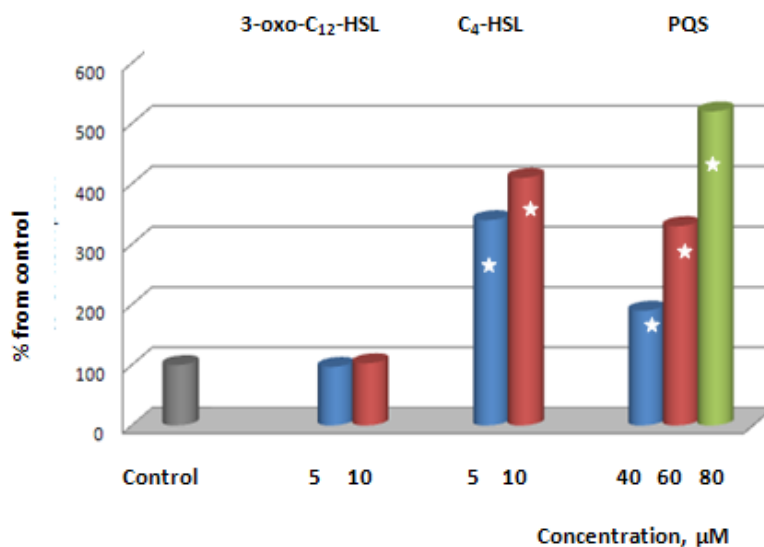


Fig. 1. Rhamnolipids biosynthesis in presence of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing autoinducers

Note: — the differences were significant in comparison with control



In presence of PQS in 40-80 μM concentration range proportional increasing in the synthesis was observed. Its level increased in 1.9; 3.3 and 5.2 times in presence of 40, 60 and 80 μM signaling quinolon concentration, respectively.

In addition to assessing the total rhamnolipids content, there were discovered di- and monorhamnolipids content in test samples separately (table). The obtained results show that $\text{C}_4\text{-HSL}$ and PQS increase Rha-Rha- $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ and Rha- $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ level. $\text{C}_4\text{-HSL}$ used in 5 μM concentration lead to proportional increase of the both rhamnolipids forms. In presence of 10 μM of this autoinducer dirhamnolipid concentration was in 4,6 times and monorhamnolipides in 3,7 times higher compare the control. PQS in all concentrations led to increase of dirhamnolipid level in 4,6-6,8 times. Monorhamnolipd level increased in 1.5-3 times. Presumably, PQS lead to rhamosyltransferase 2 activation, that catalyze dirhamnolipids biosynthesis from monorhamnolipids.

Based on the results shown in Table there were calculated dirhamnolipid /monoramnolipid ratio. After 24 hours of incubation this ratio was 2.2:1. In presence of $\text{C}_4\text{-HSL}$ it was 2:1 in concentration of this autoinducer 5 μM and 2.4:1 in concentration 10 μM N-butiryl- homoserinlacton. PQS greatly increased dirhamnolipids biosynthesis, especially Rha-Rha- $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$. At PQS concentration 40, 60 and 80 μM Rha-Rha- $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ /Rha- $\text{C}_{10}\text{-C}_{10}$ ratios were 3:1, 3.6:1 and 4.5:1, respectively.

Table

P. aeruginosa quorum sensing autoinducers action on di- and monorhamnolipids content

Variant	Dirhamnolipid, mg /ml	Monorhamnolipid, mg /ml
Control	1.92 ± 0.15	0.96 ± 0.11
3-oxo- $\text{C}_{12}\text{-HSL}$ 5 μM	1.85 ± 0.20	0.97 ± 0.14
3-oxo- $\text{C}_{12}\text{-HSL}$ 10 μM	1.94 ± 0.18	1.03 ± 0.09
$\text{C}_4\text{-HSL}$ 5 μM	$6.98 \pm 0.47^*$	$3.49 \pm 0.24^*$
$\text{C}_4\text{-HSL}$ 10 μM	$8.93 \pm 0.73^*$	$3.72 \pm 0.41^*$
PQS 40 μM	$4.38 \pm 0.36^*$	$1.46 \pm 0.15^*$
PQS 60 μM	$7.96 \pm 0.67^*$	$2.21 \pm 0.17^*$
PQS 80 μM	$13.10 \pm 0.89^*$	$2.91 \pm 0.25^*$

Note: * — distinctions are reliable as compared to control

P. aeruginosa culture supernatants emulsifying activity in presence of the various PQS concentrations are shown on Fig. 2.



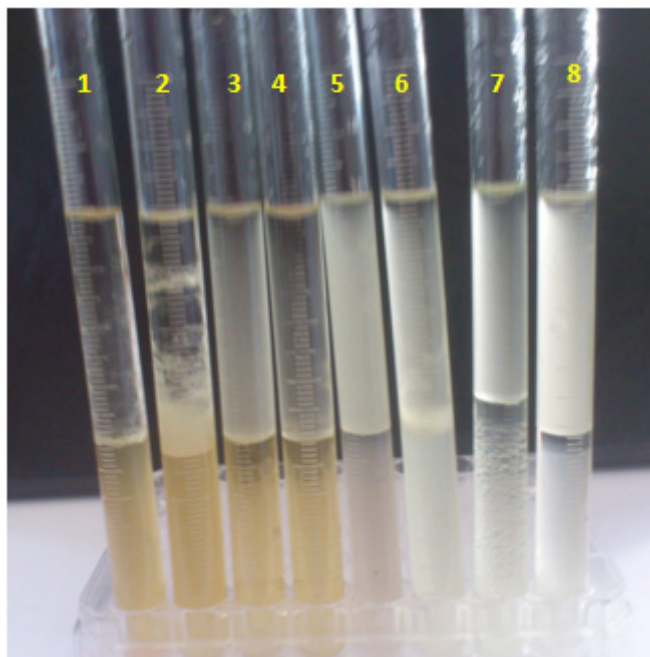


Fig. 2. Effect of PQS on the emulsifying activity of daily culture supernatant of *P. aeruginosa*

Note: 1 — medium control; 2 — supernatant of control culture; 3 — medium and Tween 20; 4 — medium and Tween 60; 5 — medium and Tween 80; 6 — culture supernatant and 40 μM PQS; 7 — culture supernatant and 60 μM PQS; 8 — culture supernatant and 80 μM PQS

After 24 hours of incubation emulsifying layer height was about a half from total oil column. Supernatants of cultures that grew in presence of PQS completely emulsified all oil in the sample. By emulsifying ability they did not concede standard emulsifiers such as Tween 20 and Tween 80. Supernatant of test-strain culture grown in presence of PQS in concentration 80 μM exceeded the variant with Tween 80 in emulsion density. It was interesting that increased content of rhamnolipids provided high emulsion stability. After 72 h emulsifying layer height in control culture decreased to 1 cm, but in the test samples emulsifying layer height was 4–4.5 cm.

Thus, there were shown in the research that two *P. aeruginosa* quorum sensing autoinducers — $\text{C}_4\text{-HSL}$ and PQS could stimulate biosurfactants biosynthesis added in culture medium together with bacterial cells. Signaling quinolon enriches the rhamnolipids mixture with dirhamnose form. Dirhamnolipid part increasing leads to increase of the emulsifying activity.

The obtained results allow to advance the hypothesis that signal quinolon can posses activation of rhamnosyltransferase 2 due to *rhlC*, expression enhancement. Moreover the possibility that PQS can directly activate rhamnosyltransferase 2 is not excluded.

Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, Є.Ю. Пахомова, Т.О. Філіпова

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

ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ АУТОІНДУКТОРІВ QUORUM SENSING НА СИНТЕЗ РАМНОЛІПІДІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Метою даної роботи була оцінка впливу аутоіндукторів QS *Pseudomonas aeruginosa* — N-(3-оксо-додеканоїл)гомосеринлактону (3-оксо- C_{12} -АГЛ), N-бутирил-гомосеринлактону (C_4 -АГЛ), и 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS) на синтез ди- і монорамноліпідів штамом *P. aeruginosa* ATCC 15692. **Методи.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 культивували на середовищі Гиса с 2% глюкози при 37 °C 24 години. Дослідження проводили в системі планктон—біоплівка в 48-лункових полістиролових плоскодонних планшетах «Nunclon». Розділення ди- і монорамноліпідів здійснювали за допомогою ТШХ на пластинках Alugram Sil G /UV 254. Ди- і монорамноліпіди роздільно елюювали з пластинок і визначали їх вміст в орциновому тесті. Співвідношення дирамноліпід / монорамноліпід розраховували, приймаючи за 1 одиницю вміст монорамноліпіда. У роботі були використані аутоіндуктори quorum sensing *P. aeruginosa*: гомосеринлактони (Sigma Aldrich) и 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон, синтезований у Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І.І. Мечникова. **Результати.** Екзогенний 3-оксо- C_{12} -АГЛ не впливає на синтез рамноліпідів. В присутності двох інших аутоіндукторів: C_4 -АГЛ и PQS, вміст рамноліпідів суттєво збільшується. C_4 -АГЛ у концентраціях 5 і 10 мкМ викликав підвищення синтезу біосурфактантів *P. aeruginosa* в 3,4 і 4,1 рази, відповідно. В присутності PQS в діапазоні концентрацій 40-80 мкМ спостерігалось пропорційне підвищення синтезу рамноліпідів. Їх рівень зростав в 1,9; 3,3 і 5,2 рази при 40, 60 и 80 мкМ сигнального хінолону, відповідно. Крім оцінки загального вмісту рамноліпідів у дослідних зразках визначали співвідношення ди- и монорамноліпідів. Через добу у контролі це співвідношення становило 2,2:1. За присутності C_4 -АГЛ воно майже не змінювалося і дорівнювало 2:1 при концентрації аутоіндуктора 5 мкМ та 2,4:1 при 10 мкМ N-бутирил-гомосеринлактону. Сигнальний хінолон суттєво підвищував синтез дирамноліпідів і, перш за все, Rha-Rha- C_{10} - C_{10} . За концентрацій PQS 40, 60 і 80 мкМ співвідношення Rha-Rha- C_{10} - C_{10} / Rha- C_{10} - C_{10} становило 3:1, 3,6:1 и 4,5:1, відповідно. Показано, що супернатанти культур з підвищеним вмістом дирамноліпідів мають більш високу емульгувальну активність.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, ди- и монорамноліпіди, аутоіндуктори quorum sensing.



Мухліс Абедалабас, Н.Б. Галкин, Е.Ю. Пахомова, 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

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ АУТОИНДУКТОРОВ QUORUM SENSING НА СИНТЕЗ РАМНОЛИПИДОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Целью данной работы была оценка влияния экзогенных аутоиндукторов QS *Pseudomonas aeruginosa* — N-(3-оксо-додеканойл)гомосеринлактона (3-оксо- C_{12} -АГЛ), N-бутирил-гомосеринлактона (C_4 -АГЛ), и 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS) на синтез ди- и монорамнолипидов штаммом *P. aeruginosa* ATCC 15692. **Методы.** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 культивировали на среде Гисса с 2% глюкозы при 37 °C 24 часа. Исследования проводили в системе планктон—биоплёнка в 48-луночных полистироловых плоскодонных планшетах «Nunclon». Разделение ди- и монорамнолипидов проводили с помощью ТСХ на пластинках Alugram Sil G /UV 254. Ди- и монорамнолипиды отдельно элюировали с пластинок и определяли их количественное содержание с помощью орцинового теста. Соотношение дирамнолипид / монорамнолипид рассчитывали, принимая за 1 единицу содержание монорамнолипидов. В работе были использованы аутоиндукторы quorum sensing *P. aeruginosa*: гомосеринлактоны (Sigma Aldrich) и 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон, синтезированный в Биотехнологическом научно-учебном центре ОНУ имени И.И. Мечникова. **Результаты.** Экзогенный 3-оксо- C_{12} -АГЛ не влияет на синтез рамнолипидов. В присутствии двух других аутоиндукторов: C_4 -АГЛ и PQS, содержание рамнолипидов значительно возрастает. C_4 -АГЛ в концентрациях 5 и 10 мкМ вызывал повышение синтеза биосурфактантов *P. aeruginosa* в 3,4 и 4,1 раза, соответственно. В присутствии PQS в диапазоне концентраций 40–80 мкМ наблюдалось пропорциональное увеличение синтеза рамнолипидов. Их уровень возрастал в 1,9; 3,3 и 5,2 раза при 40, 60 и 80 мкМ сигнального хинолона, соответственно. Кроме оценки общего содержания рамнолипидов в исследуемых пробах определяли соотношение ди- и монорамнолипидов. Через сутки в контроле это соотношение равнялось 2,2:1. В присутствии C_4 -АГЛ оно почти не менялось и составляло 2:1 при концентрации аутоиндуктора 5 мкМ и 2,4:1 в присутствии 10 мкМ N-бутирил-гомосеринлактона. Сигнальный хинолон значительно увеличивал синтез дирамнолипидов и, прежде всего, Rha-Rha- C_{10} - C_{10} . При концентрации PQS 40, 60 и 80 мкМ соотношение Rha-Rha- C_{10} - C_{10} / Rha- C_{10} - C_{10} составляло 3:1, 3,6:1 и 4,5:1, соответственно. Показано, что супернатанты культур с повышенным содержанием дирамнолипидов обладают более высокой эмульгирующей активностью.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, ди- и монорамнолипиды, аутоиндукторы quorum sensing.



REFERENCES

1. Ланац С.Н., Чубенко А.В., Бабиц П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
2. Мухлис Абедалабас, Галкин Н.Б., Семенец А.С., Филиппова Т.О. Образование биоплёнки и синтез рамнолипидов *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии сигнального хинолона и его синтетических аналогов // Микробиологія і біотехнологія. — 2013. — № 2. — С. 32–40.
3. Abalos A., Pinazo A., Infante M., Casals M., Garcia F., Manresa A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes // Langmuir. — 2001. — V. 17. — P. 1367–1371.
4. Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R., Manresa A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044 // Biotech. Bioeng. — 2003. — V. 81, № 3. — P. 316–322.
5. Koch A. K., Kappeli O., Fiechter A., Reiser J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants // J. bacteriol. — 1991. — V. 173. — № 13. — P. 4212–4219.
6. Maneerat S., Phetrong K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant Songklanakarin // J. Sci. Technol. — 2007. — V. 29, № 3. — P. 781–791.
7. Nguyen T.T., Youssef N.H., McInerney M.J., Sabatini D.A. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation // Water Research. — 2008. — V. 42. — P. 1735–1743.
8. Peker S., Helvacı S. S., Uzdemir G. Interface-subphase interactions of rhamnolipids in aqueous rhamnose solutions // Langmuir. — 2003. — V. 19. — P. 5838–5845.
9. Piljac G., Piljac V. Pharmaceutical preparation based on rhamnolipid // USA Patent № 5455232, 3 Oct. 1995.
10. Vatsa P., Sanchez L., Clement C., Baillieul F., Dorey S. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes // Int. J. Molecular Sci. — 2010. — V. 11. — P. 5095–5108.
11. Wadekar S.D., Kale S.B., Lali A.M., Bhowmick D.N., Pratap A.P. Microbial synthesis of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) on waste frying oil as low cost carbon source // Preparative Biochemistry & Biotechnology. — 2012. — V. 42. — P. 249–266.
12. Wang Q.H., Fang X.D., Bai B.J., Liang X.L., Shuler P.J., Goddard W.A., Tang Y.C. Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery // Biotech. Bioeng. — 2007. — V. 98. — P. 842–853.

Стаття надійшла до редакції 15.11.2013.



Н.М. Матвієнко¹, Л.П. Бучацький¹, О.М. Дерябін²¹Інститут рибного господарства НААН, 03164, вул. Обухівська, 135, Київ,
e-mail: mparine73@mail.ru²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
03151, вул. Донецька, 30, Київ

ЗАСТОСУВАННЯ ЗВОРОТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВІЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ПАНКРЕАТИЧНОГО НЕКРОЗУ РАЙДУЖНОЇ ФОРЕЛІ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Мета роботи: розробити діагностичну тест систему для виявлення та ідентифікації інфекційного панкреатичного некрозу форелі на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). **Матеріали та методи** Віруси: вірус інфекційного некрозу підшлункової залози штам референтний – Ab (8,0 lg ТЦД50 /см³); українські ізоляти – VF-11 (6,8 lg ТЦД50 /см³), VF-08 (6,2 lg ТЦД50 /см³), вірус геморагічної симтецимії форелі (VHSV), штам «DH4p101» [AY546581] (8,0 lg ТЦД50 /см³). Перещеплювальні лінії клітин риб: FHM (хвостове стебло чорного толстоголова) і RTG (гонади райдужної форелі). Для виявлення та ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі були використані дві пари олігонуклеотидних праймерів. Для пошуку та аналізу гомології генів білків VP2 і NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу використовували програму BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США. Конструювання і підбір праймерів проводили з використанням пакету програм «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США). **Результати досліджень.** З метою підбору ефективних праймерів для постановки ПЛР нами було проведене порівняльне вивчення нуклеотидних послідовностей геному ізолятів IPNV різних генотипів. Для роботи були синтезовані олігонуклеотидні праймери, що фланкують послідовності гена білка VP2. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 620 п.н. Додатково, в дослідженнях, були використані олігонуклеотидні праймери, специфічні до гену нуклеопротеїну (NS). Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК – 204 п.н. При перевірці специфічності полімеразної ланцюгової реакції з підібраними праймерами як матриця були використані пробі РНК референтних штамів та ізолятів IPNV виділених від малька райдужної форелі в господарствах України. **Висновки.** Розроблена діагностична тест-система на основі зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) є високоспецифічною та чутливою для виявлення та ідентифікації вірусу IPNV в матеріалах різного походження.

Ключові слова: ЗТ-ПЛР, вірус інфекційного панкреатичного некрозу, райдужна форель.



З виникненням потенціальної загрози розповсюдження вірусних хвороб риб та випадків підвищеної загибелі серед лососевих риб в господарствах України, виникла необхідність у вивченні біологічних властивостей виділених патогенів риб та розробки методів їх ідентифікації. Аналіз іхтіопатологічної ситуації на підприємствах, що займаються штучним відтворенням лососевих риб і природних водойм показав, що підвищений інтерес для України в цьому відношенні представляє вірус інфекційного панкреатичного некрозу (IPNV).

Збудником інфекційного некрозу підшлункової залози лососевих риб є вірус що відноситься до родини *Birnaviridae*, роду *Aquabirnavirus*. [1,4,5]

Вірус викликає епізоотії з високим рівнем смертності молоді лососевих риб при їх штучному відтворенні. Атлантичний лосось (*Salmo salar*) найбільш чутливий вид до цього вірусу в морській воді, при цьому його смертність може досягати 70% і більше. [4] У прісноводній аквакультурі найчутливішими до дії вірусу є райдужна форель (*Oncorhynchus mykiss*) і голец (*Salvelinus fontinalis*) [4,5].

Наразі для діагностики IPNV застосовують серологічні (імуноферментний аналіз (ІФА), реакція віруснейтралізації (РН)), вірусологічні (ізоляція вірусу в чутливих перещеплюваних культурах клітин (ЕРС, FHM, RTG), постановка біопроби на чутливих видах риб) та молекулярно-біологічні (зворотно-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР) методи [6–8,10].

Високий рівень контагіозності та смертності риб при IPNV, особливо при штучному вирощуванні риби в господарствах індустріального типу, зумовлює необхідність розроблення і застосування експрес-методів діагностики, з метою якнайшвидшої ідентифікації збудника.

Мета роботи: розробити діагностичну тест-систему для виявлення та ідентифікації інфекційного панкреатичного некрозу форелі на основі ЗТ-ПЛР.

Матеріали та методи

Віруси: вірус інфекційного некрозу підшлункової залози штам референтний — Ab (8,0 lg ТЦД₅₀ /см³); українські ізоляти — VF-11(6,8 lg ТЦД₅₀ /см³), VF-08 (6,2 lg ТЦД₅₀ /см³), вірус геморагічної симтецимії форелі (VHSV), штам «DH4p101» [AY546581] (8,0 lg ТЦД₅₀ /см³). Усі штами та ізоляти вірусів підтримувалися у лабораторній колекції ІРГ НААН.

Перещеплювальні лінії клітин риб: FHM (хвостове стебло чорного толстоголова) [9], RTG (гонади райдужної форелі) [13,14] .

Поживні середовища, розчини та сироватки: середовища Ігла (основне), Ігла MEM, Ігла MEM з подвійним набором амінокислот і вітамінів (2MEM), 199, DMEM /F12 (Sigma), сироватка крові плоду



ВРХ, розчин трипсину (0,25%), розчин версену (0,02%), 1М Нерес-буфер (рН 7,0).

Титр вірусу визначали за методом Ріда та Менча [12].

Для виділення IPNV, доставлені в лабораторію 20 проб патологічного матеріалу (5 риб /проба) були досліджені у відповідності до вимог міжнародних документів з вірусологічних досліджень риби [2,11].

Виділення РНК із зразків, реакцію зворотної транскрипції та полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконували за допомогою комерційних наборів: «Рибозоль-А», «РЕВЕРТА-L» та «АмплиСенс 200-1» («АмплиСенс», Росія).

Для виявлення та ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу форелі були використані дві пари олігонуклеотидних праймерів.

Для пошуку та аналізу гомології генів білків VP2 і NS вірусу інфекційного панкреатичного некрозу використовували програму BLAST 2.0 Національного центру біотехнологічної інформації (NCBI) США [3].

Конструювання і підбір праймерів проводили з використанням пакету програм «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США)[3].

Результати досліджень та їх обговорення

Підбір праймерів є ключовою ланкою ПЛР, оскільки ними визначається можливість специфічної ампліфікації необхідної послідовності.

Згідно з результатами аналізу нуклеотидних послідовностей вірусів інфекційного панкреатичного некрозу різних генотипів, проведеного Blake з співавт., середній рівень варіабельності геному становить 7%, а специфічні для кожного генотипу ділянки розміщені в генах білка оболонки VP 2 та генах не структурного білка NS [6]. Найконсервативнішим є сегмент геному А, що кодує домен структурного білка **VP 2 та не** структурного білка NS. Тому підбір праймерів проводився в межах даної ділянки геному.

Послідовність кожної з пар праймерів до IPNV була комплементарною консервативним ділянкам гену капсидного білка VP2 та гену NS вірусу. Використання різних праймерів зумовлено тим, що в генах капсидного білка можливі незначні генетичні зміни, спричинені мутаціями під впливом різних факторів. Ці зміни можуть призводити до проблем, пов'язаних з детекцією вірусних послідовностей. І тому, з метою перекрити більшу частину гену капсидного білка досліджуваних вірусів було вирішено використати різні пари праймерів.

Для розрахунку вищезазначених праймерів використовувалися зареєстровані в GenBank нуклеотидні послідовності геномів ізолятів IPNV різних генотипів. У результаті для роботи були синтезовані олігонуклеотидні праймери, що фланкують послідовності гена білка VP2. Оригінальні олігонуклеотидні праймери мали таку послідовність: F 5'- ATGAATTCTGAACCCCCAGGA -3' та R 5'-GCGAATTCTGATTG-



GTCTGA-3'. Для цієї реакції температурний профіль проведення реакції складав: 1 цикл при 95 °C — 3 хв.; 2 цикл — денатурація при 95 °C — 30 с, гібридизація праймерів при 62 °C — 30 с, елонгація при 72 °C — 60 с, цикл 2 повторюють 40 разів; 3 цикл — при 72 °C — 7 хв. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК — 620 п.н.

В дослідженні додатково використані олігонуклеотидні праймери, специфічні до гену нуклеопротеїну (NS) з послідовністю F 5'-AAAGC-CATAGCCCATGAAC- 3' та R 5'-TCTCATCAGCTGGCCCAGCTAC-3'. При цьому температурний профіль проведення реакції складав: 1 цикл при 95 °C — 4 хв.; 2 цикл — денатурація при 94 °C — 30 с, гібридизація праймерів при 60 °C — 30 с, елонгація при 72 °C — 60 с, цикл 2 повторюють 35 разів; 3 цикл — при 72 °C — 7 хв. Розмір ампліфікованого фрагменту ДНК — 204 п.н.

Для перевірки специфічності розроблених праймерів і відпрацювання умов реакції були підготовлені контрольні зразки референтного штаму IPNV «Ab» та українські ізоляти VF-11 та VF-8. Віруси пасажували в культурі клітин FHM. Репродукція вірусу супроводжувалася появою цитопатичної дії (ЦПД) впродовж 24–48 години. З метою порівняння ефективності виявлення IPNV використані обидві пари підібраних праймерів. Результати реакції наведені на рис. 1 та рис. 2.

При дослідженні встановлено, що з референтними штамами IPNV працюють обидві пари праймерів, при цьому виявлявся продукт ампліфікації 620 та 204 п.н. відповідно. Також при тестуванні цих систем були отримані позитивні результати з ізолятами IPNV, які попередньо були відтестовані на культурі клітин.

При перевірці специфічності полімеразної ланцюгової реакції з підібраними праймерами як матрицю використали проби культурального матеріалу, інокульованого ізолятами вірусу IPNV та клінічні матеріали від риб, що мали ознаки гострої форми захворювання. Для проведення аналізу були відібрані і приготовані гомогенати окремих органів: печінка, нирки, селезінка. Як негативний контроль слугували відібрані аналогічні матеріали з контрольної групи (попередньо тестовано на наявність вірусних інфекцій). Результати відображені на рис. 3.

В результаті реакції РНК вірусу була виявлена у всіх інфікованих пробах культурального матеріалу й у 2-х пробах органів малька райдужної форелі, підтверджуючи при цьому наявність вірусної РНК безпосередньо у патологічному матеріалі.

На сьогодні існує реальна небезпека поширення IPNV територією України, що створює загрозу значних матеріально-економічних втрат спеціалізованим господарствам, що займаються штучним вирощуванням форелі.

Комерційні набори для виявлення вірусу за допомогою методу імуноферментного аналізу (ІФА) виготовляють фірми Чехії, мають низьку чутливість, потребуючи концентрації вірусомісного матеріалу та є недостатньо специфічними.



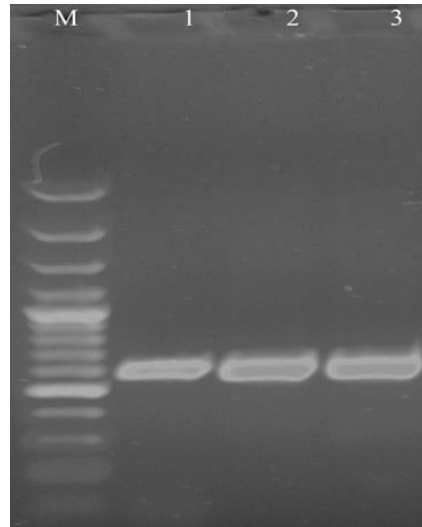


Рис. 1. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до гену білка VP2

М — маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — референтний штам IPNV «Ab», в культурі клітин RTC-2; 2 — ізолят VF-11 IPNV в культурі клітин FHM; 3 — ізолят VF-08 IPNV в культурі клітин FHM

Fig. 1. Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel products RT-PCR with primers to the gene protein VP2

М — marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — reference strain IPNV «Ab», in cell culture RTC-2; 2 — VF-11 isolate IPNV in cell culture FHM; 3 — VF-08 isolate IPNV in cell culture FHM

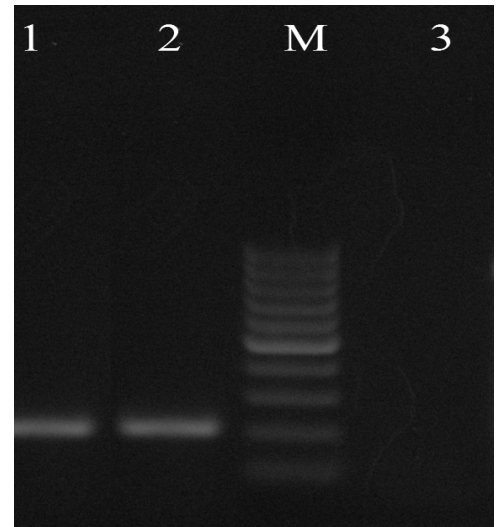


Рис. 2. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР з праймерами до гену білка NS

М — маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — референтний штам IPNV «Ab», в культурі клітин FHM; 2 — ізолят VF-11 IPNV в культурі клітин FHM; 3 — негативний контрольний зразок референтний штам ВВГС «DH4p101» в КК RTG-2

Fig.2 Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel products RT-PCR with primers to the gene protein NS

М — marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas); 1 — A reference strain of IPNV «Ab», in cell culture FHM; 2 — VF-11 isolate IPNV in cell culture FHM; 3 — negative control sample reference strains VHS «DH4p101» in cell culture RTG-2

Дослідження останніх років показали, що вибіркова ампліфікація ділянок вірусного геному за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), доповнюючи серологічні методи, здатна значно розширити можливості виявлення IPNV безпосередньо в клінічних зразках [6–8].

В разі необхідності підвищення чутливості діагностичного дослідження можливим є використання гніздового варіанту ЗТ-ПЛР, де для першої реакції використовуються праймери VP2, а для другої — праймери NS.

Отримані результати наших досліджень свідчать про те, що розроблений ПЛР-метод виявлення IPNV дозволяє значно підвищити рівень діагностики вірусних хвороб риб, а його перевагами, крім високої чутливості та можливості тестування безпосередньо патологічного матеріалу, можна вважати відносну простоту виконання за допомогою

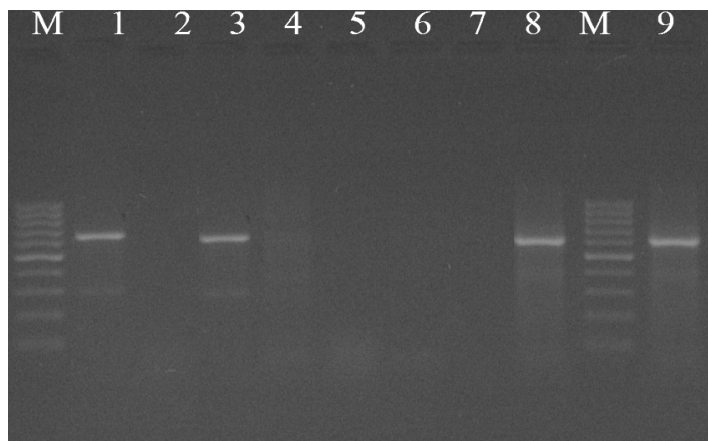


Рис. 3. Електрофоретичний аналіз в 1,5 % гелі агарози продуктів ЗТ-ПЛР

М — маркер «100 bp DNA Ladder» (Fermentas) 1 — гомогенат органів цьоголітки форелі з клінічними ознаками інфекційного панкреатичного некрозу; 2 — гомогенат органів здорової форелі (негативний контроль); 3 — гомогенат органів цьоголітки форелі з клінічними ознаками інфекційного панкреатичного некрозу; 4–6 — гомогенат органів здорової форелі (негативний контроль); 7 — негативний контроль (культуральний неінфікований матеріал); 8 — ізолят VF-11 IPNV в КК RTG-2; 9 — ізолят VF-11 IPNV в КК FHM.

Fig 3. Electrophoretic analysis in 1.5% agarose gel products RT-PCR

М — marker «100 bp DNA Ladder» (Fermentas), 1 — homogenates of underyearling trout with clinical signs of infectious pancreatic necrosis, 2 — homogenates of healthy trout (negative control); 3 — homogenates of underyearling trout with clinical signs of infectious pancreatic necrosis; 4–6 — homogenates of healthy trout (negative control), 7 — negative control (cultural uninfected material) 8 — VF-11 isolate IPNV in cell culture RTG-2; 9 — VF-11 isolate IPNV in cell culture FHM.

традиційного ПЛР-обладнання із звичайним методом детекції результатів реакції електрофорезом в агарозі.

Розроблена діагностична тест-система є високоспецифічною та чутливою для виявлення та ідентифікації вірусу IPNV в матеріалах різного походження (патологічний, культуральний, тощо). Запропоновано використовувати метод ПЛР як високочутливий метод у діагностиці вірусу інфекційного панкреатичного некрозу райдужної форелі.

Н.Н. Матвиенко¹, Л.П. Бучацкий,¹ О.Н. Дерябин²

¹Институт рыбного хозяйства НААН, 03164, ул. Обуховская, 135, Киев

²Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов, 03151, ул. Донецкая, 30, Киев

ПРИМЕНЕНИЯ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО НЕКРОЗА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

Реферат

Цель работы: разработать диагностическую тест-систему для обнаружения и идентификации инфекционного панкреатического некроза форели на основе обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). **Материалы и методы.** Вирусы: вирус инфекционного некроза поджелудочной железы: штамм референтный — Ab (8,0 lg ТЦД50/м³) украинские изоляты — VF-11 (6,8 lg ТЦД50/см³), VF-08 (6,2 lg ТЦД50/см³), вирус геморрагической симтецимии форели (VHSV), штамм «DH4p101» [AY546581] (8,0 lg ТЦД50/см³). Перевиваемые линии клеток рыб: FHM (хвостовой стебель черного толстоголова) и RTG (гонады радужной форели). Для выявления и идентификации вируса инфекционного панкреатического некроза форели были использованы две пары олигонуклеотидных праймеров. Для поиска и анализа гомологии генов белков VP2 и NS вируса инфекционного панкреатического некроза использовали программу BLAST 2.0 Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. Конструирование и подбор праймеров проводили с использованием пакета программ «Vector NTI Advanced v.11» (Invitrogen, США). **Результаты исследований.** С целью подбора эффективных праймеров для постановки ПЦР нами было проведено сравнительное изучение нуклеотидных последовательностей генома изолятов IPNV разных генотипов. Для работы были синтезированы олигонуклеотидные праймеры, которые фланкируют последовательности гена белка VP2. Размер амплифицированного фрагмента ДНК — 620 п.н. Дополнительно, в исследованиях, были использованы олигонуклеотидные праймеры, специфические к гену нуклеопротеинов (NS). Размер амплифицированного фрагмента ДНК — 204 п.н. При проверке специфичности полимеразной цепной реакции с подобранными праймерами в качестве матрицы были использованы пробы РНК референтных штаммов и изолятов IPNV выделенных от малька радужной форели в хозяйствах Украины. **Выводы.** Разработана диагностическая тест-система на основе обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) является высокоспецифической и чувствительной для выявления и идентификации вируса IPNV в материалах различного происхождения.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР, вирус инфекционного панкреатического некроза, радужная форель.



N.M. Matvienko¹, L.P. Buchatsky¹, O.M. Deryabin²

¹Institute of Fisheries of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine,
135 Obukhivska St., 03164, Kyiv, Ukraine, e-mail: mnarine73@mail.ru

²State Scientific Control Institute of Biotechnology and Microorganism strains.
Donetskaya Str. 30, 0315, Kyiv, Ukraine

**APPLICATION OF THE REVERSE TRANSCRIPTASE
POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION
AND IDENTIFICATION OF THE INFECTIOUS
PANCREATIC NECROSIS VIRUS OF RAINBOW TROUT
(*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

Summary

Purpose: To develop a diagnostic test system for detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus of trout based on the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Materials and methods:** Viruses: infectious pancreatic necrosis virus, reference strain — Ab (8.0 lg TCID/cm³); Ukrainian isolates — VF-11 (6.8 lg TCID/cm³), VF-08 (6.2 lg TCID/cm³), viral hemorrhagic septicemia virus of trout (VHSV), strain «DH4p101» [AY546581] (8.0 lg TCID/cm³). Finite cell line of fish: FHM (fathead minnow peduncle) and RTG (rainbow trout gonads). For detection and identification of infectious pancreatic necrosis virus of trout, two pairs of oligonucleotide primers were used. For search and analysis of gene homology of VP2 and NS proteins of infectious pancreatic necrosis virus, we used the BLAST 2.0 software of the National Center for Biotechnological Information (NCBI), USA. Constructing and matching of the primers were performed with the use of the «Vector NTI Advanced v.11» software package (Invitrogen, USA). **Findings:** For selecting effecting primers for PCR, we performed comparative study of nucleotide sequences of IPNV isolate genome of different genotypes. As a result, for the work we synthesized oligonucleotide primers, which flank VP2 protein gene sequence. The size of the amplified DNA fragment is 630 p.n. Additionally, we used oligonucleotide primers specific for the nucleoprotein gene (NS). The size of the amplified DNA fragment is 204 p.n. When checking the specificity of the polymerase chain reaction with matched primers as a matrix, we used RNA samples of the reference IPNV strains and isolates isolated from rainbow trout fingerlings from different fish farms of Ukraine. **Conclusions:** The developed diagnostic test system based on the reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) is highly specific and sensitive for detection and identification of IPNV virus in the materials of various origins.

Key words: RT-PCR, infectious pancreatic necrosis virus, rainbow trout.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Головина Н. А. , Бауер О. Н. . Ихтиопатология. — М.: Мир, 2007. — 448 с.
2. Вирусология. Методы: Пер. с англ / Под.ред. Б.Мейхи. — М: Мир, 1988. — 344 с.
3. Лысенко Е.А. Современные методы молекулярной биологии: Полимеразная цепная реакция. Стратегия подбора праймеров для анализа экспрессии генов. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — С. 75—96.
4. Ahne W., Negele R.D. Studies on the transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. //In: Ellis, A.E. (Ed.), Fish and Shellfish Pathology. Academic Press. London. 1985. — P. 262—270.
5. Antychowicz J. Choroby ryb srodladowych Antychowicz J. — Warszawa: Panstwowe Wydawnictwo Rolnicze i Lesne, — 2007. — 447 p.
6. Blake S.L., Schill W.B., McAllister P.E., Lee M.K., Singer J.T , Nicholson B. L. Detection and identification of aquatic birnaviruses by PCR assay. // J Clin Microbiol. — 1995. — V. 33(4). — P. 835—839.
7. Cutrin J.M., Barja J.L.; Nicholson B.L.; Bandin I., Blake S.; Dopazo C.P. Restriction fragment length polymorphisms and sequence analysis: an approach for genotyping Infectious pancreatic necrosis virus reference strains and other aquabirnaviruses isolated from northwestern Spain // Appl. Environm. Microbiol., — 2004. — № 70.V 2. — P. 1059—1067.
8. Dadar M., Peyghan R., Memari Hamid Rajabi. Sequence analysis of infectious pancreatic necrosis virus isolated from Iranian reared rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in 2012 // Virus Genes- September 2013. — Springer, Part of Springer Science+Business Media <http://link.springer.com/article/10.1007/s11262-013-0981-4>
9. Gravell, M., Malsberger R.G. A permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales promelas*). //Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1965. — V. 126. — P. 555—565.
10. Matvienko N, Buchatsky L, Deryabin O. Isolation of IPN virus from rainbow trout in the Ukraine // Diseases of Fish and Shellfish, (Split, September 12-16.2011):abstract book. — 2011. — P. 363.
11. OIE. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals Fourth Edition, (Chapter 2.1.8.). — 2003. <http://www.oie.int/doc/ged/D6505.PDF>
12. Reed L., Muench H. A simple method of estimating 50 % endpoints // Amer. J. Hygiene. — 1938. — V. 27. — P. 493—497.
13. Wolf K., Quimby. M. C.. Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science (Washington DC) . — 1962. — V. 135. — P. 1065.
14. Wolf K., Gravell M., Malsberger R. G. Lymphocystis virus: Isolation and propagation in centrarchid fish cell lines. Science . — 1966. — V. 151. — P. 1004—1005

Стаття надійшла до редакції 28.10.2013 р.



Т.О. Руднева¹, Т.П. Шевченко², В.О. Цвігун^{1,2}, В.П. Поліщук²

¹Інститут агроєкології і природокористування НААН,
вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64 /13, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuanaru@bigmir.net

МОНІТОРИНГ ВІРУСУ МОЗАЇКИ КАВУНА 2 У АГРОЦЕНОЗАХ КИЇВСЬКОЇ ТА ПОЛТАВСЬКОЇ ОБЛАСТЕЙ

Мета. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської і Полтавської областей. **Методи.** Рослинні зразки на наявність вірусних антигенів аналізували імуноферментним аналізом (ІФА) у модифікаціях «сандвіч» та «непрямий». Зразки для ІФА готували згідно стандартної методики. Використовували тест-системи до вірусу мозаїки кавуна 2 (ВМК 2) виробництва INRA (Франція), Agdia (Англія) та Leowe (Німеччина). **Результати.** У результаті дев'ятирічного моніторингу агроценозів України встановлено періодично змінний характер циркуляції вірусу мозаїки кавуна 2 на культурах рослин родини гарбузових. Показано, що ВМК 2 на території України інфікує рослини лише відкритого ґрунту. У агроценозах України ВМК 2 представлений переважно у вигляді змішаної інфекції у поєднанні з вірусом жовтої мозаїки цукіні, вірусом огіркової мозаїки чи вірусом пожовтіння огірка, що передається попелицями. **Висновки.** Після майже тридцятирічної перерви, ВМК 2 на території України знову було виявлено у 2005 році у агроценозах відкритого ґрунту Київської і Полтавської областей на рослинах родини гарбузових. Протягом дев'ятирічних досліджень не було зафіксовано жодного випадку наявності ВМК 2 на рослинах власне кавунів, тоді, як раніше даний патоген на культурі кавунів був широко розповсюджений. Необхідно зауважити, що нами не було знайдено жодного випадку контамінації тепличних культур вірусом мозаїки кавуна 2. Таким чином, в Україні ВМК 2 є патогеном рослин виключно відкритого ґрунту.

Ключові слова: вірус мозаїки кавуна 2, агроценози, моніторинг, змішана вірусна інфекція.

Однією з причин великих втрат врожаю гарбузових культур в Україні є вірусні хвороби. Значної шкоди овочевим культурам завдають збудники мозаїчного захворювання огірків, динь та гарбузів. З-поміж інших вірусів останні 10 років у агроценозах України активно циркулює вірус мозаїки кавуна 2 (Watermelon mosaic virus 2, WMV 2) [3]. Даний



патоген не є новим видом для нашої країни. Уперше вірус було виявлено на рослинах родини *Cucurbitaceae* у кінці 70-х років [1]. На той час вірус мозаїки кавуна 2 (ВМК 2) був найбільш поширеним збудником мозаїчних захворювань баштанних культур в Україні. Він уражував, в основному, кавуни, дині, кабачки, гарбузи, а кількість інфікованих рослин при цьому досягала 50 — 90%. Значного поширення вірус мозаїки кавуна 2 набув у відкритому ґрунті Запорізької, Одеської і Херсонської областей. На рослинах визначали моноінфекцію ВМК 2 та змішану інфекцію, зазвичай представлену ВМК 2 і вірусом огіркової мозаїки (ВОМ) [2].

Вірус мозаїки кавуна 2 належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*. ВМК 2 простий з ротаційно-трансляційним типом симетрії розмірами 730—765х11нм [8]. Цей вірус поширений, переважно, на баштанних культурах. Перші симптоми захворювання з'являються через 4—15 днів після ураження. Це певною мірою залежить від рослини-хазяїна і часу інфікування. Найбільш чіткі ознаки хвороби бувають на кабачках і гарбузах. На листках цих рослин вздовж жилок з'являється мозаїка у вигляді темно-зелених смуг, міжжилкових хлоротичних ділянок, крапчастості з темно-зеленою пухирчастістю [1]. На уражених рослинах утворюються квіти з недорозвиненими або не повністю відкритими пелюстками, які зазвичай опадають не формуючи плодів. Ці симптоми супроводжуються значною деформацією листкової пластинки. Інколи вона настільки деформується, що залишаються лише жилки з невеликими смугами тканини або верхівки листків, що утворюють довгі, вузькі й покручені вирости різних розмірів. На листках динь між жилками утворюються хлоротичні ділянки, іноді з темно-зеленими пухирчастими здуттями. На кавунах — темно-зелені смуги вздовж листових жилок, листки скручуються. Плоди набувають бурого кольору і сильно деформуються. Вірус мозаїки кавуна 2 передається з соком рослин при механічному контакті та попелицями неперсистентно. Найефективніше ВМК 2 передається видом *Myzus persicae* [6]. Оскільки даний патоген не передається насінням і через ґрунт, основними його резервуарами є бур'яни, мальва, буркун і люцерна [1].

Метою даної роботи був моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень слугували рослини родини *Cucurbitaceae* з вірусоподібними симптомами відібрані з агроценозів Київської та Полтавської областей.

Для досліджень використовували листки середнього або верхнього ярусу та плоди рослин.

Зразки на наявність вірусних антигенів аналізували імуноферментним аналізом (ІФА) у модифікаціях «сандвіч» та «непрямий». Аналіз проводили у полістиролових планшетах «Labsystem». Результати реєстрували на



підері Thermo Labsystems Opsi MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405 /630 нм [4].

Рослинні зразки (вегетативні органи і плоди рослин) для ІФА готували шляхом гомогенізації інфікованого рослинного матеріалу у 0,1М фосфатно-солевому буфері і 0,001М ЕДТА у співвідношенні 1:2 з наступним центрифугуванням у режимі 4000 об /хв протягом 20 хв при 4 °С на центрифугі PC-6 [5]. Отриманий гомогенат використовували для імуноферментного аналізу.

При постановці ІФА використовували тест-системи до вірусу мозаїки кавуна 2 виробництва INRA (Франція), Agdia (Англія) та Leowe (Німеччина).

Результати та їх обговорення

У агроценозах України вірус мозаїки кавуна 2 активно циркулював у період 70–80 років. На той час це був один з найпоширеніших збудників захворювань баштанних культур, який призводив до ураження 85–100% рослин [1].

Після довготривалої перерви вірус мозаїки кавуна 2 знову було виявлено у 2005 році. Вірус детектували на культурах огірків, кабачків, гарбузів та цукіні у агроценозах відкритого ґрунту Київської і Полтавської областей [7]. Відтак на предмет наявності ВМК 2 було проведено обстеження рослин родини гарбузових, як природних хазяїв вірусу, у агроценозах і тепличних господарствах різних областей України. Рослинні зразки відбирали з наступних регіонів: Автономної республіки Крим, Вінницької, Дніпропетровської, Донецької, Житомирської, Київської, Миколаївської, Одеської, Полтавської, Сумської, Харківської, Херсонської, Черкаської та Чернігівської областей. З відкритого ґрунту відбирали рослини огірків, кабачків, цукіні, патисонів, кавунів, гарбузів та динь, а з тепличних господарств — рослини огірків. Таким чином, у 2006 році було виявлено ВМК 2 на рослинах у агроценозах Київської і Полтавської областей. Вірус уражував рослини виключно відкритого ґрунту. Серед вірусінфікованих були огірки, кабачки, цукіні, гарбузи, дині (рис. 1).

Слід відмітити, що окрім моноінфекції, вірус мозаїки кавуна 2 досить часто зустрічався у вигляді змішаної інфекції, зазвичай представленої сумішшю вірусів огіркової мозаїки та вірусу пожовтіння огірка (ВПО), що передається попелицями. Необхідно зауважити, що нами не було знайдено жодного випадку контамінації тепличних культур вірусом мозаїки кавуна 2.

Починаючи з 2006 року проведено постійний моніторинг агроценозів відкритого ґрунту Київської і Полтавської областей на наявність вірусу мозаїки кавуна 2. Аналізуючи результати дев'ятирічних досліджень циркуляції вірусних антигенів у агроценозах необхідно відмітити їх періодично змінний характер (табл. 1).



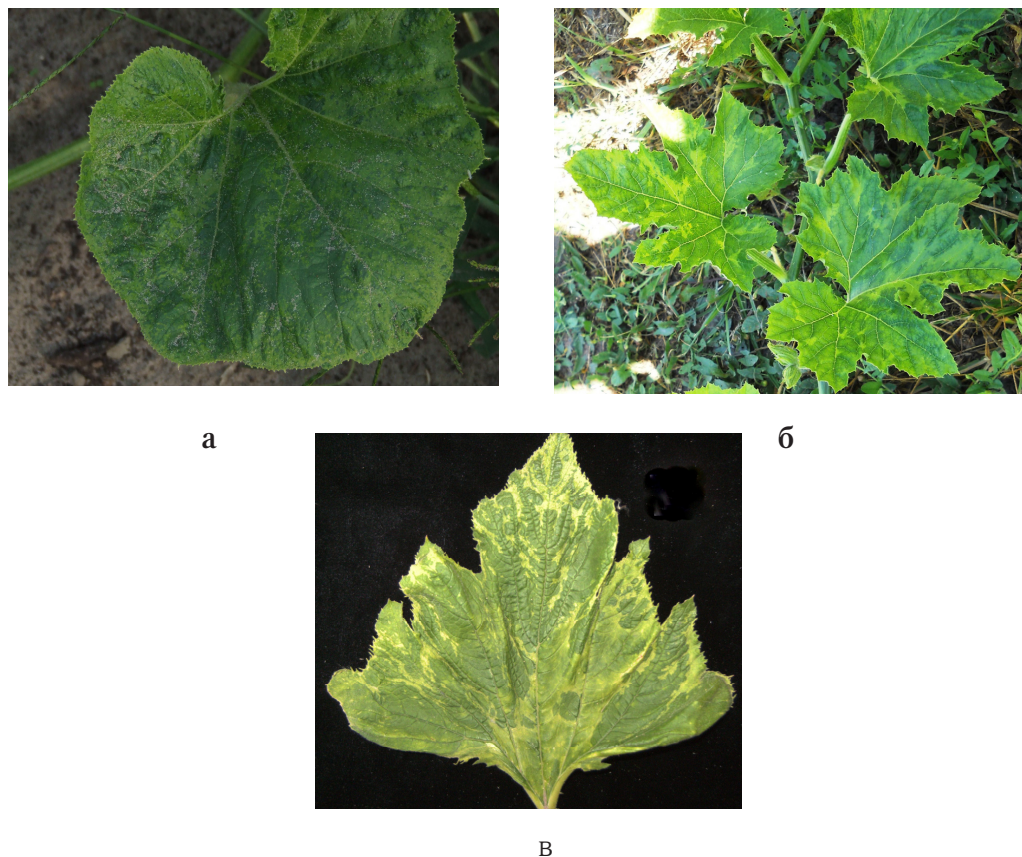


Рис. 1. Симптоми ураження рослин родини Cucurbitaceae, індуковані вірусом мозаїки кавуна 2

а — темнозелена мозаїка і пухирчасті здуття на листках *Cucumis melo*; б, в — темнозелена прижилкова мозаїка листкової пластинки *Cucurbita pepo*.

Fig. 1. Watermelon mosaic virus 2- induced symptoms on the plants of Cucurbitaceae family

а — dark green mosaic and blistering on the leaves of *Cucumis melo*; б, в — dark green veins mosaic of the leaves of *Cucurbita pepo*.

Так вірус мозаїки кавуна 2 виявляли два роки поспіль протягом 2005—2006 років у агроценозах Київської і Полтавської областей, а потім з чотирирічною перервою, у 2011 році, — лише у агроценозах Полтавської області на рослинах кабачків і динь у вигляді змішаної інфекції з поодинокими випадками моноінфекції. Так, вірус мозаїки кавуна 2 зустрічався переважно у комбінації з вірусом жовтої мозаїки цукіні і вірусом огіркової мозаїки. Цікавим виявилось поєднання ВМК 2 з вірусом зеленої крапчастої мозаїки огірка (ВЗКМО), який до цього часу на території України детектували лише в умовах закритого ґрунту. При змішаній інфекції зустрічали поєднання одночасно чотирьох вірусів, як от ВМК 2, ВЖМЦ, ВЗКМО і ВОМ. Протягом наступних 2012—2013

років вірус мозаїки кавуна 2 виявляли у агроценозах відкритого ґрунту як Київської так і Полтавської областей знову ж таки у вигляді змішаної інфекції з поодинокими випадками моноінфекції.

Таблиця

Результати виявлення ВМК 2 на рослинах родини *Cucurbitaceae*

Table

Test results of plants of *Cucurbitaceae* family for presence of WMV 2

Рік відбору зразків	Наявність ВМК2		Культура рослин, уражена ВМК2	Змішана інфекція	% рослин, уражених ВМК 2
	Київська область	Полтавська область			
2005	+	+	огірки, кабачки, гарбузи, цукіні	ВМК 2+ВЖМЦ	25
2006	+	+	огірки, кабачки, гарбузи, цукіні, дині	ВМК 2+ВЖМЦ, ВМК 2+ВОМ, ВМК 2+ВПО	
2007-2010	—	—	—	—	—
2011	—	+	кабачки, цукіні, дині	ВМК 2+ВЖМЦ+ВОМ, ВМК 2+ВЗКМО, ВМК 2+ВЖМЦ+ВЗКМО	16
2012	+	+	гарбузи, дині, кабачки	ВМК 2+ВЖМЦ	70
2013	+	+	гарбузи, дині, кабачки	ВМК 2+ВЖМЦ, ВМК 2+ВЖМЦ+ВОМ, ВМК 2+ВОМ	38

Примітка: + виявлено, — не виявлено

Підсумовуючи наведені результати необхідно зазначити, що протягом дев'ятирічних досліджень нами не було зафіксовано жодного випадку наявності вірусу мозаїки кавуна 2 на рослинах власне кавунів. Тоді, як тридцять років тому ВМК 2 на культурі кавунів був широко розповсюджений.

Періодично змінна циркуляція вірусу мозаїки кавуна 2 пов'язана зі шляхами його передачі. З одного боку, вірус ефективно передається багатьма видами попелиць, з іншого, дикорослі рослини є резерваторами вірусної інфекції, де він може зберігатися впродовж досить тривалого часу. Попелиці, отримавши вірус від рослини-резерватора, повторно уражують рослини культурного виду, викликаючи інфекцію. Щодо циркуляції вірусу у агроценозах, можна відмітити важливість впливу природно-кліматичних умов та сортів рослин на розвиток вірусної інфекції. Таким чином, сукупність різних факторів, таких, як наявність комах-переносників, бур'янів-резерваторів, сорту рослин та природно-кліматичних умов визначає за-



тухання чи навпаки активацію розвитку вірусної інфекції, впливаючи на кількість хворих рослин та відсоток їх ураження.

Таким чином, у результаті дев'ятирічного моніторингу агроценозів України встановлено періодично змінний характер циркуляції вірусу мозаїки кавуна 2 на культурах рослин родини гарбузових. Показано, що ВМК 2 на території України інфікує рослини виключно відкритого ґрунту. У агроценозах України вірус мозаїки кавуна 2 представлений переважно у вигляді змішаної інфекції у поєднанні з вірусом жовтої мозаїки цукіні, вірусом огіркової мозаїки чи вірусом пожовтіння огірка, що передається попелицями.

Т.А. Руднева¹, Т.П. Шевченко², В.А. Цвигун^{1,2}, В.П. Полищук²

¹Інститут агроекології і природопольовання НААН,
ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143, Україна,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 64 /13, Киев, 01601, Україна,
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuanaru@bigmir.net

МОНИТОРИНГ ВИРУСА МОЗАИКИ АРБУЗА 2 В АГРОЦЕНОЗАХ КИЕВСКОЙ И ПОЛТАВСКОЙ ОБЛАСТЕЙ

Реферат

Цель. Мониторинг вируса мозаики арбуза 2 в агроценозах Киевской и Полтавской областей. **Методы.** Растительные образцы на наличие вирусных антигенов анализировали в иммуноферментном анализе (ИФА) вариантах «сэндвич» и «непрямой». Образцы для ИФА готовили по стандартной методике. Использовали тест-системы к вирусу мозаики арбуза 2 (ВМА 2) производства INRA (Франция), Agdia (Англия) и Le-owe (Германия). **Результаты.** В результате девятилетнего мониторинга агроценозов Украины установлен периодически изменчивый характер циркуляции вируса мозаики арбуза 2 на культурах растений семейства тыквенных. Показано, что на территории Украины ВМА 2 инфицирует растения исключительно открытого грунта. В агроценозах Украины вирус мозаики арбуза 2 представлен, преимущественно, смешанной инфекцией с вирусом желтой мозаики цуккини, вирусом огуречной мозаики или вирусом пожелтения огурца, передаваемого тлём. **Выводы.** После почти тридцатилетнего перерыва ВМА 2 был выявлен на территории Украины в 2005 году в агроценозах открытого грунта Киевской и Полтавской областей на растениях семейства тыквенных. В результате девятилетних исследований ни одного случая наличия ВМА 2 на растениях собственно арбузов не было зафиксировано, тогда как раньше данный патоген на культуре арбузов был широко распространен. Нужно отметить, что нами не было найдено ни одного случая контаминации тепличных культур



вирусом мозаики арбуза 2. Таким образом, в Украине ВМА 2 является патогеном растений исключительно открытого грунта.

Ключевые слова: вирус мозаики арбуза 2, агроценозы, мониторинг, смешанная вирусная инфекция.

**T.O. Rudnieva¹, T.P. Shevchenko², V.O. Tsvigun^{1,2},
V.P. Polishchuk²**

¹Institute of Agroecology and Nature Management of NAAS of Ukraine,
12, Metrologichna st., Kyiv 03143

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 /13, Volodymyrska st., Kyiv, 01601
tel.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuanaru@bigmir.net

MONITORING OF WATERMELON MOSAIC VIRUS 2 IN AGRIECOSYSTEMS OF KYIV AND POLTAVA REGIONS

Summary

Aim. Monitoring of Watermelon mosaic virus 2 in agriecosystems of Kyiv and Poltava regions. **Methods.** Plant samples were analyzed using DAS- and indirect ELISA for presence of viral antigens. ELISA samples were prepared by standard methods. For Watermelon mosaic virus 2 (WMV-2) diagnostics, commercial antisera of INRA (France), Agdia (England) and Loewe (Germany) were used. **Results.** Following 9-year monitoring of Ukrainian agriecosystems we have demonstrated periodically changeable circulation of Watermelon mosaic virus 2 on plants of Cucurbitaceae family. It was determined that, in Ukraine, WMV 2-infected plants were typical only for open ground conditions. Watermelon mosaic virus 2 circulates mainly in form of mixed infection with Zucchini yellow mosaic virus, Cucumber mosaic virus or Cucurbit aphid-born yellows virus. **Conclusions.** In 2005, after nearly 30 years of absence, WMV-2 has been again detected on plants of Cucurbitaceae family in open-ground agriecosystems of Kyiv and Poltava regions of Ukraine. During the 9-year monitoring, WMV-2 has not been found at all on watermelon plants, though previously this pathogen was widely spread on watermelon plantings. In addition, it should be noticed we have never detected WMV-2 in glasshouse crops. Therefore in Ukraine WMV-2 remains a pathogen infecting exclusively the plants cultivated under open-ground conditions.

Key words: Watermelon mosaic virus 2, agriecosystems, monitoring, mixed virus infection.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Вірусні хвороби сільськогосподарських культур* / [Московець С.М., Бобир А.Д., Глушак Л.Ю., Онищенко А.М.]. — К.: Урожай, 1975. — 152 с.
2. *Московець С.М.* Деякі вірусні захворювання гарбузових культур в південних областях України / С.М. Московець, Г.І. Фегла, Л.Ю. Глушак // Мікробіологічний журнал. — 1970. — Т. 32, — №. 6. — С. 735–738.
3. *Руднева Т.О.* Поширення вірусних захворювань рослин родини *Cucurbitaceae* на території України / Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, А.С. Бисов, В.П. Поліщук // Агроєкологічний журнал.— 2008. — № 2. — С. 62–66.
4. *Crowther J.R.* (Ed.) ELISA. Theory and practice, Humana Press, N.Y. — 1995. — p. 223.
5. *Dijkstra J.* Practical Plant Virology: Protocols And Exercises / J. Dijkstra, Cees P. de Jager. — Berlin; — Springer. Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. — 459 p.
6. *Field and Laboratory Transmission of Watermelon Mosaic Virus 2 and Zucchini Yellow Mosaic Virus by Various Aphid Species* / S.J. Castle, Thomas M. Penning, C.A. Farrar [et al.] // Phytopathology. — 1991. — V. 82. — P. 235–240.
7. *Rudneva T.O.* Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine / T.O. Rudneva., T.P. Shevchenko, I.G. Budzanivska, O.V. Shevchenko, V.P. Polischuk // Plant science. — 2006. — № 6. — P. 508–510.
8. *Virus taxonomy.* Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff et al.] — London: Academic Press, 2006. — 1259 pp.

Стаття надійшла до редакції 9.11.2013.



С.С. Степанов, Е.К. Золотарёва

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина,
тел.: +38 (044) 272 32 31; e-mail: membrana@ukr.net

ФОТОСИНТЕЗ, ДЫХАНИЕ И РОСТ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В ПРИСУТСТВИИ ЭТАНОЛА

Цель. Целью данной работы было изучение влияния этанола на скорость фотосинтеза, дыхания и продуктивность микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. **Методы.** Концентрацию хлорофилла определяли в спиртовых экстрактах клеток спектрофотометрическим методом. Скорость накопления биомассы оценивали по изменению объема уплотненных клеток. Интенсивность фотосинтеза, максимальную интенсивность дыхания и интенсивность темнового дыхания определяли методом инфракрасного газового анализа. **Результаты.** В присутствии этанола рост культуры по показателю изменения объема уплотненных клеток ингибируется, также снижается накопление хлорофилла в клетках культуры и наблюдается гибель клеток и на свету и в темноте. Это сопровождается снижением pH среды культивирования с 7,2 до 3,5. Интенсивность темнового дыхания возрастает вдвое после добавления 50 мМ этанола в среду культивирования. Интенсивность фотосинтеза снижается в присутствии 50 мМ этанола на 25% по сравнению с контролем. **Выводы.** Причина торможения роста *C. reinhardtii* связана с неполным окислением этанола, вследствие чего в клетках накапливались продукты его промежуточного обмена и снижается pH среды культивирования на несколько единиц.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, фотосинтез, дыхание, этанол.

Зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* имеет важное биотехнологическое значение для моделирования многих процессов и разработки биотопливных технологий [16]. К преимуществам использования *C. reinhardtii* как модельного организма относятся наличие расшифрованного генома [11], протеомных баз данных, отработанных протоколов изучения метаболизма, что позволило раскрыть многие фундаментальные аспекты регуляции метаболизма у фотоавтотрофных организмов [9]. *C. reinhardtii* может расти за счет фотосинтеза на воздухе с CO₂ в качестве единственного источника углерода, или в гетеротрофных условиях в темноте с использованием различных экзогенных источников



углерода, а также в миксотрофных условиях (на свету в присутствии экзогенных органических соединений). Независимо от типа углеродного питания, *C. reinhardtii* остается зеленой и сохраняет нормально развитые хлоропласты [7].

При миксотрофном культивировании одноклеточных зеленых водорослей в присутствии одноатомного спирта метанола, как было показано на примерах *Chlorella minutissima*, *Scenedesmus obliquus* [15], *Botryococcus braunii* [12], а также *C. reinhardtii* [2], достигается значительное стимулирование их роста. Другой одноатомный спирт — этанол является эффективным источником углерода для микроводоросли *Euglena gracilis* [16]. Этанол экскретируется клетками *C. reinhardtii* в анаэробных условиях [8]. Продукт окисления этанола — ацетат ускоряет рост *C. reinhardtii* на свету и служит источником углерода и энергии [7] при гетеротрофном культивировании. В то же время для целого ряда микроводорослей установлен токсический эффект этанола, вызывающий ингибирование их роста [1,4]. Способность экзогенного этанола регулировать продуктивность *C. reinhardtii* в аэробных условиях на свету и в темноте ранее не исследовалась.

Целью нашей работы было изучение влияния экзогенного этанола на фотосинтез, дыхание и продуктивность накопительной культуры *C. reinhardtii*.

Материалы и методы исследования

Периодическую автотрофную культуру *C. reinhardtii* (IBASU-B — 163) выращивали на жидкой среде Кесслера в 0,5 л колбах при перемешивании и 24-часовом освещении флуоресцентными лампами с интенсивностью светового потока на поверхности колбы $100 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при комнатной температуре [5]. В качестве индикатора интенсивности роста культуры использовали общую концентрацию хлорофилла (Хл) в экспоненциальной фазе роста, поскольку известно, скорость деления клеток прямо пропорциональна концентрации Хл в культуре [6].

Концентрацию Хл определяли в спиртовых экстрактах клеток как описано ранее [19]. Эффекты этанола изучали на стадии экспоненциальной фазы роста накопительной культуры. Скорость накопления биомассы оценивали по объему уплотненных клеток (ОУК) — объем осадка клеток в мкл /мл после центрифугирования определенного объема клеточной суспензии при 1400 g в течение 5 мин в гематокритных трубках.

Интенсивность фотосинтеза, максимальную интенсивность дыхания и интенсивность темнового дыхания рассчитывали по изменению содержания CO_2 в газовой фазе над концентрированной суспензией микроводорослей (30–40 мг Хл/л) в термостатированной стеклянной ячейке методом инфракрасного газового анализа (ИКГА) с использованием S151 CO_2 анализатора Qbit system (Канада). Максимальная интенсивность



дыхания определяется как максимальная скорость выделения CO_2 после выключения освещения, со временем скорость выделения CO_2 стабилизируется и соответствует интенсивности темнового дыхания [10]. Скорость газового потока составляла 0,4 л /мин при концентрации CO_2 700 — 800 мкМ. Интенсивность фотосинтеза определяли при освещении ячейки белым светом с плотностью потока 350 мкмоль фотонов $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Темновое и максимальное дыхание микроводорослей измеряли при низком содержании CO_2 в газовом объеме после выключения света. Воздух перед подачей в анализатор пропускали через колонку с аскаритом для удаления CO_2 .

Каждый эксперимент повторялся не менее трех раз (n), средние значения (M) и стандартное отклонение (m) рассчитывали для каждой обработки. Для статистической обработки данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2010. Значимую разницу между выборками оценивали с помощью t-теста, статистически значимыми считали изменения с $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что метиловый спирт в концентрации 20–100 мМ значительно стимулирует рост, дыхание и продуктивность *C. reinhardtii* [2]. В настоящей работе исследовалось влияние различных концентраций этанола на рост культуры *C. reinhardtii* (рис. 1).

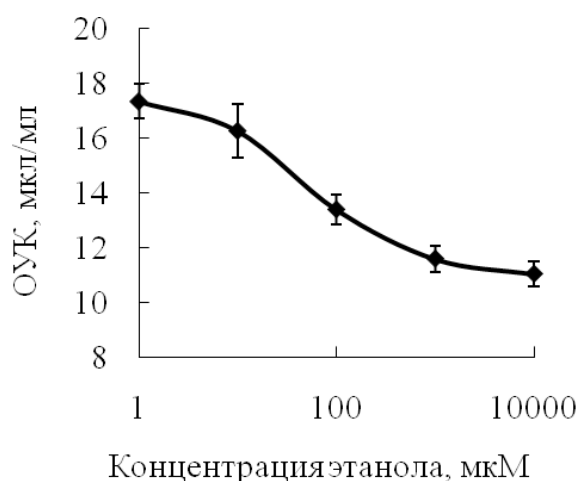


Рис. 1. Объем уплотненных клеток в автотрофной культуре *C. reinhardtii* на 3-ий день после добавления различных количеств этанола (M+m, n=3)

Fig. 1. Packed cell volume in autotrophic culture of *C. reinhardtii* on the third day after application of different amounts of ethanol (M+m, n=3)

Прирост биомассы *C. reinhardtii*, определенный по скорости изменения объема уплотнённых клеток (ОУК) в присутствии 10 мкМ, 100 мкМ, 1 мМ, 10 мМ этанола, снижался (рис. 1). В присутствии 100 мкМ этанола рост культуры ингибировался на 23%, а 1 мМ и 10 мМ — на 33%.

В присутствии этанола снижается накопление Хл в клетках культуры, и наблюдается гибель клеток и на свету и в темноте. Световая микроскопия показала уменьшение их подвижности и увеличение доли фиксированных клеток. Данные о влиянии этанола на содержание Хл в клетках *C. reinhardtii* на свету и при темновой инкубации приведены на рис. 2.

На 4-ый день после добавления этанола независимо от концентрации, рН суспензии снижался до 3,5, что сопровождалось побурением культуры. Изменения рН, вызванные этанолом, не зависели также и от освещения (табл. 1). Постепенное закисление среды происходившее как на свету, так и в темноте, может быть одной из причин снижения концентрации Хл в клетках, т.к. В слабокислой среде хлорофилл легко теряет атом Mg^{2+} , превращаясь в феофитин [18].

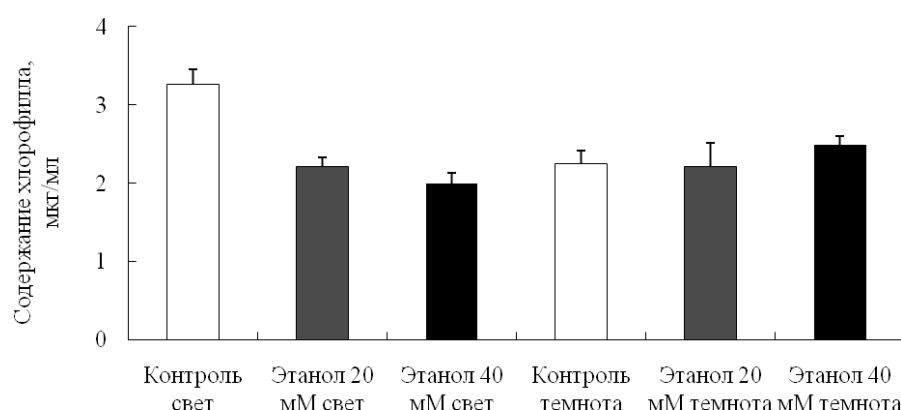


Рис. 2. Содержание общего Хл (мкг /мл) в суспензии *C. reinhardtii* на 4-ый день культивирования

А — на свету, В — в темноте (M+m, n=3)

Fig. 2. The content of total Chl ($\mu\text{g} /\text{ml}$) in *C. reinhardtii* suspension on the fourth day of cultivation

A — in the light, B — in the dark. (M+m, n=3)

Очевидно, снижение рН среды культивирования в присутствии этанола вызвано его неполным окислением внутри клеток микроводорослей. Окисление этанола происходит в несколько этапов: этанол $\rightarrow$ ацетальдегид $\rightarrow$ уксусная кислота $\rightarrow$ CO_2 .

Таблица

Изменение pH среды культивирования *C. reinhardtii*
при добавлении этанола. (M+m, n=6)

Table

Changing pH of growth medium *C. reinhardtii*
with ethanol addition. (M+m, n=6)

Время, ч	На свету			В темноте		
	Контроль	Этанол 20 мМ	Этанол 40 мМ	Контроль	Этанол 20 мМ	Этанол 40 мМ
1	6,49±0,37	6,5±0,29	6,51±0,41	6,49±0,26	6,5±0,17	6,53±0,31
18	6,35±0,11	6,28±0,31	6,29±0,22	6,42±0,09	6,16±0,24	6,18±0,18
48	6,36±0,18	5,48±0,15	5,51±0,13	6,31±0,17	5,27±0,16	5,28±0,29
96	6,4±0,32	3,6±0,27	3,46±0,29	5,9±0,32	3,6±0,37	3,6±0,33

Продуктом первого этапа является токсичный для клеток ацетальдегид. Метаболизм этанола с участием алкогольдегидрогеназы происходит в прямом и обратном направлении, и зависит от соотношения концентраций субстратов — этанола, ацетальдегида и никотинамидных коферментов. При экзогенном добавлении 40 мМ этанола равновесная концентрация ацетальдегида может составлять 1 мМ [13]. Образование значительных количеств уксусной кислоты, вызывающих снижение pH культуральной среды на несколько единиц, доказывает, что в условиях наших экспериментов система ферментативного окисления ацетальдегида в клетках активна. Избыток уксусной кислоты экскретируется в культуральную среду, когда скорость образования кислоты превышает скорость её полной внутриклеточной утилизации.

Интенсивность дыхания *C. reinhardtii* (R) определяли по выделению CO₂ в темноте. Данные приведенные на рис. 3, А показывают, что после шести часов выращивания микроводорослей в присутствии 50 мМ этанола значение R в накопительной культуре *C. reinhardtii* увеличивалось в два раза по сравнению с контролем. Повышение интенсивности дыхания может быть объяснено активацией работы цикла Кребса в результате утилизации дополнительного количества ацетил-КоА, образовавшегося в ходе окисления этанола.

В присутствии 50 мМ этанола параметр V_{max}, косвенно характеризующий внутриклеточный пул пирувата и малата [10], увеличивается на 29% по сравнению с контролем (рис. 3, В), что позволяет предполагать, что в присутствии этанола внутриклеточная концентрация трикарбоновых кислот повышается. При окислении этанола увеличивается содержание NADH в клетке [7], что также может быть причиной повышения концентраций малата или пирувата.



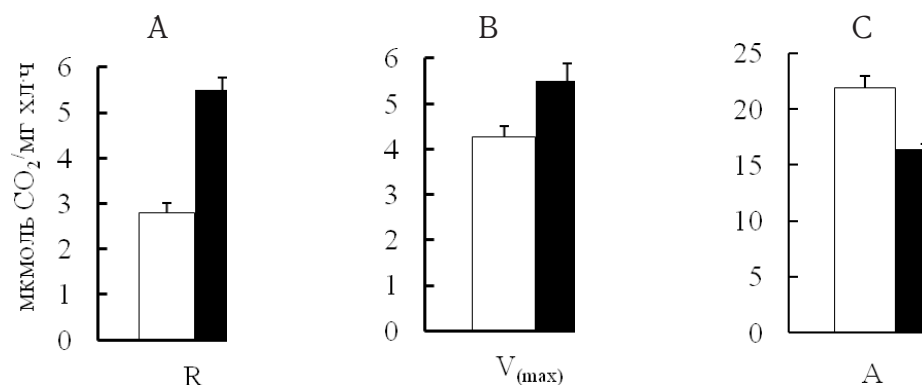


Рис. 3. Показатели CO₂ газообмена *C. reinhardtii*
(□ — контроль, ■ — в присутствии 50 мМ этанола)

Интенсивность темнового дыхания (R). В — максимальная интенсивность дыхания (V_{max}). С — интенсивность фотосинтеза (A) (M+m, n=5).

Fig. 3. Indicators of CO₂ gas exchange by *C. reinhardtii*
(□ — control, ■ — in the presence of 50 mM ethanol)

A — dark respiration rate (R); B — the maximum rate of respiration (V_{max}); C — photosynthetic rate (A) (M+m, n=5).

Интенсивность фотосинтеза (A), рассчитанная по поглощению CO₂ на свету, снижалась в присутствии 50 мМ этанола на 25% по сравнению с контролем (рис. 3, C). Ингибирование фотосинтеза возможно является следствием повреждения пигмент-белковых комплексов фотосинтетических мембран из-за накопления ацетальдегида и снижения pH. Изменение R и V_{max} при добавлении этанола в культуральную среду *C. reinhardtii* подобны изменению этих параметров в ходе миксотрофного выращивания *C. reinhardtii* в присутствии ацетата [14]. Однако, в отличие от культивирования с этанолом, ацетат стимулирует рост водорослей. Таким образом, можно предположить, что токсические действие этанола на *C. reinhardtii* связано с его неполным окислением и накоплением промежуточных продуктов — ацетальдегида и уксусной кислоты. Понижение pH, вызванное накоплением уксусной кислоты, может приводить к денатурации белковых компонентов клетки и феофитинизации Хл.

Таким образом, экзогенный этанол в концентрации более 10 мкМ подавляет рост накопительной культуры *C. reinhardtii*. В присутствии этанола интенсивность фотосинтеза *C. reinhardtii* снижается, а интенсивность темного дыхания значительно возрастает. Токсическое действие этилового спирта на метаболизм *C. reinhardtii* сопровождается снижением pH среды культивирования в результате накопления промежуточных продуктов его обмена.

УДК 582.264.12:581.132:57.017.7

С.С. Степанов, О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ;
тел.: +38(044) 272 32 31; e-mail: membrana@ukr.net

ФОТОСИНТЕЗ, ДИХАННЯ ТА РІСТ МІКРОВОДОРОСТІ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* В ПРИСУТНОСТІ ЕТАНОЛУ

Реферат

Мета. Метою даної роботи було вивчення впливу етанолу на швидкість фотосинтезу, дихання і продуктивність *Chlamydomonas reinhardtii*. **Методи.** Концентрацію хлорофілу визначали в спиртових екстрактах клітин спектрофотометричним методом. Швидкість накопичення біомаси оцінювали по зміні об'єму ущільнених клітин. Інтенсивність фотосинтезу, максимальну інтенсивність дихання і інтенсивність темнового дихання визначали методом інфрачервоного газового аналізу. **Результати.** За присутності етанолу ріст культури в показнику зміни об'єму ущільнених клітин пригнічується, також знижується накопичення хлорофілу в клітинах культури і спостерігається загибель клітин і на світлі і в темряві. Це супроводжується зниженням рН середовища культивування від 7,2 до 3,5. Інтенсивність темнового дихання зростає вдвічі після додавання 50 мМ етанолу до середовища культивування. Інтенсивність фотосинтезу знижується в присутності 50 мМ етанолу на 25% порівняно з контролем. **Висновки.** Зроблений висновок, що причина гальмування росту *C. reinhardtii* пов'язана з неповним окисленням етанолу, внаслідок чого в клітинах накопичуються проміжні сполуки його обміну, що супроводжується зниженням рН середовища культивування на кілька одиниць.

Ключові слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, фотосинтез, дихання, етанол, міксотрофія.

UDK 582.264.12:581.132:57.017.7

S.S. Stepanov, E.K. Zolotareva

M.G.Holodny Institute of Botany, NASU, 2, Tereshchenkivska str., 01004, Kyiv, Ukraine; tel.:
+38 (044) 272 32 31; e-mail: membrana@ukr.net

PHOTOSYNTHESIS, RESPIRATION AND GROWTH RATE OF *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* ON EXOGENIC ETHANOL APPLICATION

Summary

Aim. The aim of the present work was studying the effect of ethanol on the rate of photosynthesis, respiration and productivity of *Chlamydomonas*



reinhardtii. **Methods.** The amount of chlorophyll (Chl) was estimated photometrically. The rate of biomass accumulation was estimated by changes in packed cell volume. The rate of photosynthesis, maximum intensity of respiration and dark respiration was determined by infrared gas analysis. **Results.** In the presence of ethanol growth of culture in the terms of packed cell volume is inhibited, also the accumulation of Chl in cell culture is reduced and cell death is observed both in the light and in the dark. This is accompanied by decreasing pH of the culture medium from 7.2 to 3.5. The intensity of dark respiration is doubled after the addition of 50 mM ethanol to the culture medium. The rate of photosynthesis is reduced in the presence of 50 mM ethanol on 25% compared with the control. **Conclusions.** There were made a conclusion that the cause of growth inhibition of *C. reinhardtii* was incomplete oxidation of ethanol, resulting reduction of pH in the medium by a few units.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, photosynthesis, respiration, ethanol.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божков А.И., Мензянова Н.Г. Влияние этилового спирта на метаболизм водорослей. Метаболизм нуклеиновых кислот и белка в клетках *Dunaliella viridis* Teod // Альгология. — 2002. — 12, 3. — С. 300–308.
2. Степанов С. С., Золотарева Е. К. Метаболический шлях метанолу у рослин // Альгология. — 2011. — т. 21, № 2. — С. 178–190.
3. Bishop N.I., Senger H. Preparation and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus* // Meth. Enzymol. — 1971. — V. 23, part A. — P. 53–66.
4. El J. A Effects of organic solvents and solvent-atrazine interactions on two algae, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum* // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 1996. — V. 31, No. 1. — P. 84–90.
5. Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. A biochemical model of photosynthetic assimilation in leaves of species // Planta. — 1980. — V. 149. — P. 78–90.
6. Gitelson A., Grits Y., Etzion D. Optimal properties of *Nannochloropsis* sp and application to remote estimation of cell mass // Biotech. Bioengineering. — 2000. — V. 69, No. 5. — P. 516–525.
7. Johnson X., Alric J. Interaction between Starch Breakdown, Acetate Assimilation, and Photosynthetic Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biol. Chem. — 2012. — V. 287, No. 31. — P. 26445–26452.
8. Hemschemeier A., Jacobs J., Happe T. Biochemical and physiological characterization of the pyruvate formate-lyase Pfl1 of *Chlamydomonas*



reinhardtii, a typically bacterial enzyme in a eukaryotic alga // Eukaryot. Cell. — 2008. — V. 7, No. 3. — P. 518–526.

9. Lee D., Fiehn O. High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Meth. — 2008. — V. 4, 7.

10. Leegood R.C., Sharkey T.D., S. von Caemmerer (eds.) Advances in Photosynthesis: Physiology and Metabolism. — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. — 2000. — P. 165.

11. May P., Wienkoop S., Kempa S., Usadel B., Christian N., Rupprecht J., Weiss J., Recuenco-Munoz L., Ebenhuß O., Weckwerth W., Walther D. Metabolomics- and proteomics-assisted genome annotation and analysis of the draft metabolic network of *Chlamydomonas reinhardtii* // Genetics. — 2008. — V. 179. — P. 157–166.

12. Nonomura A., Benson A. The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1992. — V. 89, No. 20. — P. 9794–9798.

13. Perata P., Alpi A., LoSchiavo F. Influence of ethanol on plant cells and tissues // J. Plant Physiol. — 1986. — V. 126. — P. 181–188.

14. Roach T., Sedoud A., Krieger-Liszka A. Acetate in mixotrophic growth medium affects photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* and protects against photoinhibition // Biochim. Biophys. Acta. — 2013. — V. 1827, No. 10. — P. 1183–1190.

15. Theodoridou A., Dürnemann D., Kotzabasis K. Light dependent induction of strongly increased microalgal growth by methanol // Biochim. Biophys. Acta — 2002. — V. 1573, No. 2. — P. 189–198.

16. Yoval-Sánchez B., Jasso-Chávez R., Lira-Silva E., Moreno-Sánchez R., Rodríguez-Zavala J.S. Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis* // J. Bioenerg. Biomembr. — 2011. — V. 43, No. 5. — P. 519–530.

17. Wang Z.T., Ullrich N., Joo S., Waffenschmidt S., Goodenough U. Algal Lipid Bodies: Stress Induction, Purification, and Biochemical Characterization in Wild-Type and Starchless *Chlamydomonas reinhardtii* // Eukar. Cell. — 2009. — V. 8. — P. 1856–1868.

18. Wickliff J.L., Aronoff S. Degradation of chlorophyll *a* to pheophytin *a*, pheophorbide *a*, and pyropheophorbide XV for tracer studies // Anal. Biochem. — 1963. — V. 6. — P. 39–46.

19. Wintermans F.G., De Mots A. Chlorophyll determination. A suitable method for *Chlamydomonas* // Biochim. Biophys. Acta. — 1965. — V. 109. — P. 448–453.

Стаття надійшла до редакції 6.11.2013.



Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп,
А.Є. Бухтіяров, Г.В. Лісютін, І.В. Пузирьова, О.Г. Горшкова,
В.О. Іваниця

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

НАФТООКИСНЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Мета. Дослідження нафтоокиснювальної активності деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas*, відібраних для використання у біоремедіації ґрунту. **Методи.** Бактерії *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 культивували в поживному середовищі М-9, що містило сиру нафту густиною 0,84 г /см³ у концентрації 500 мг /л. Залишковий вміст нафти через 10, 20 та 30 діб визначали інтегральним методом інфрачервоної спектрометрії. Екстрагування нафти із проб здійснювали з використанням чотирехлористого вуглецю (CCl₄). **Результати.** У результаті проведених досліджень встановлено, що бактерії роду *Pseudomonas*, відібрані для використання в біотехнології очищення ґрунту, впродовж місяця розкладають вуглеводні сирої нафти з вихідною концентрацією 500 мг /дм³ на 70–80%. Нафтоокиснювальна активність усіх використаних штамів мікроорганізмів була високою. Уже в перші 10 діб експозиції – ступінь біодеструкції вуглеводнів нафти досягав 62,0–73,0%. **Висновок.** Штами бактерій *P. serasia* ONU327, *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328 можуть бути рекомендовані для розробки технологій біоремедіації ґрунту від нафти та нафтопродуктів.

Ключові слова: нафта, бактерії роду *Pseudomonas*, біодеструкція, нафтоокиснювальна активність.

Біологічний метод очищення ґрунту і води від нафти та нафтопродуктів, заснований на застосуванні мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів нафти, став пріоритетним. Різноманітна і пластична ферментативна система, що дозволяє досить швидко перемикається на споживання з одних на інші джерела вуглецю та енергії, висока пластичність обмінних процесів, швидка адаптація до умов існування дозволяє нафтоокиснювальним бактеріям активно утилізувати вуглеводні нафти [6, 8, 10].

Відомо широкий спектр гетеротрофних мікроорганізмів представників родів *Acinetobacter*, *Arhtrobacter*, *Arenimonas*, *Bacillus*, *Desulfobacterium*, *Rhodococcus* та інших, які здатні утилізувати вуглеводні нафти [4, 7, 11,



12]. До найбільш активних деструкторів вуглеводнів нафти відносяться бактерії роду *Pseudomonas* — типові хемоорганогетеротрофи, які здатні засвоювати вуглеводні нафти як єдине джерело вуглецю та енергії [12].

Метою роботи було дослідження нафтоокиснювальної активності деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas*, відібраних для використання у біотехнологіях очищення ґрунту.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження слугували три штами непатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, що попередньо були виділені, відібрані та зберігаються у колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327. Штами *P. fluorescens* ONU328 та *P. maltophilia* ONU329 виділені з морського середовища, а *P. cepacia* ONU327 — з забрудненого нафтопродуктами ґрунту.

В експериментах використовували сиру нафту темно-коричневого кольору з густиною 0,84 г /см³. Дослідження нафтоокиснювальної активності бактерій проводили за температури 28 °С впродовж місяця.

Культивування бактерій здійснювали на поживному середовищі М-9, що містило нафту у концентрації 500 мг /л. У контрольних пробах досліджували штами бактерій роду *Pseudomonas* культивували на поживному мінеральному середовищі М-9 без додавання нафти.

Залишковий вміст нафти через 10, 20 та 30 діб визначали інтегральним методом інфрачервоної спектроскопії на приладі «ИКС-29». У кожному випадку в діапазоні хвильових чисел 2700-3200 см⁻¹ здійснювали реєстрацію ІЧ-спектра поглинання, зумовленого валентними коливаннями СН₃- і СН₂- груп аліфатичних і аліциклічних сполук і бокових ланцюгів ароматичних вуглеводнів, а також вуглець-водневих зв'язків ароматичних сполук [5, 6]. Перевагою методу ІЧ-спектроскопії є те, що виключається стадія випаровування екстракту (в порівнянні з гравіметричним аналізом), що зазвичай, супроводжується значною втратою легких фракцій нафти.

Екстрагування нафти із проб здійснювали з використанням чотирихлористого вуглецю (CCl₄) марки «х.ч.» Органічний розчинник об'ємом 25 мл змішували з 10 мл досліджуваної проби, інтенсивно струшували впродовж хвилини, після чого давали пробі відстоятися впродовж 15 хв.

Шар екстрагента, куди переходили вуглеводні нафти (екстракт) відділяли від залишків суспензійної культури, далі екстракт пропускали через хроматографічну колонку, заповнену оксидом алюмінію (II ступеня активності по Брокману).

Оксид алюмінію заздалегідь витримували при температурі 600 °С впродовж 4 год у муфельній печі, охолоджували в ексікаторі, після чого інтенсивно перемішуючи додавали дистильовану воду в кількості 3% від

маси сорбенту та витримували добу. Перед фільтруванням колонку попередньо добре змочували чистим CCl_4 . При швидкості фільтрування 5 мл за 10 хв вуглеводні нафти переходили у фільтрат.

Нафтоокиснювальну активність бактерій (А, %) визначали за формулою:

$$A = \left(\frac{K_H^0 - K_{H(\text{практ})}}{K_H^0} \right) \cdot 100\%, \quad (1)$$

де K_H^0 – вихідна концентрація нафти (500 мг /л); $K_{H(\text{практ})}$ – залишкова або практична концентрація нафти (у мг /л), яка пов'язана з залишковою вимірною концентрацією нафти рівнянням:

$$K_{H(\text{практ})} = \frac{K_{H(\text{вимір})} \cdot \text{Об}_1}{\text{Об}_2}, \quad (2)$$

де Об_1 – об'єм чотирьох хлористого вуглецю 25 см^3 , взятого для екстракції; Об_2 – об'єм проби 10 см^3 .

Обробку експериментальних даних, а саме: значень $K_{H(\text{вимір})}$ і $K_{H(\text{практ})}$ здійснювали за допомогою програми Excel.

Результати та їх обговорення

Вуглеводні різних сортів нафти являють собою суміш сполук окремих класів, що володіють суттєво відмінними між собою властивостями. Тому перед вивченням нафтоокиснювальної здатності мікроорганізмів було встановлено градуїзовану логарифмовану залежність різниці оптичних густин досліджуваного і холостого розчинів (ΔD) від концентрації нафти (K_H).

Різницю оптичних густин (ΔD) розраховували при хвильових числах, що відповідають максимуму і мінімуму смуги поглинання, за формулою:

$$\Delta D = -\ln(T_1/T_2), \quad (3)$$

де T_1 – значення пропускання (%) в максимумі смуги поглинання при $(2926 \pm 15) \text{ см}^{-1}$; T_2 – значення пропускання (%) в мінімумі смуги поглинання при $(2700 \pm 15) \text{ см}^{-1}$.

У результаті досліджень одержано ІЧ-спектри поглинання вуглеводнів при концентраціях досліджуваної нафти 10, 50 і 100 мг /л (рис. 1, А).

На одержаних ІЧ-спектрах поглинання вуглеводнів за різних концентрацій досліджуваної нафти значення T_1 відповідає найвищій точці, а значення T_2 – лівій найнижчій точці на ІЧ-спектрі. У результаті обробки за допомогою програми Excel експериментально одержаних даних для досліджуваної нафти побудовано градуїований графік з точністю $R^2 = 0,9886$ (рис. 1, Б).



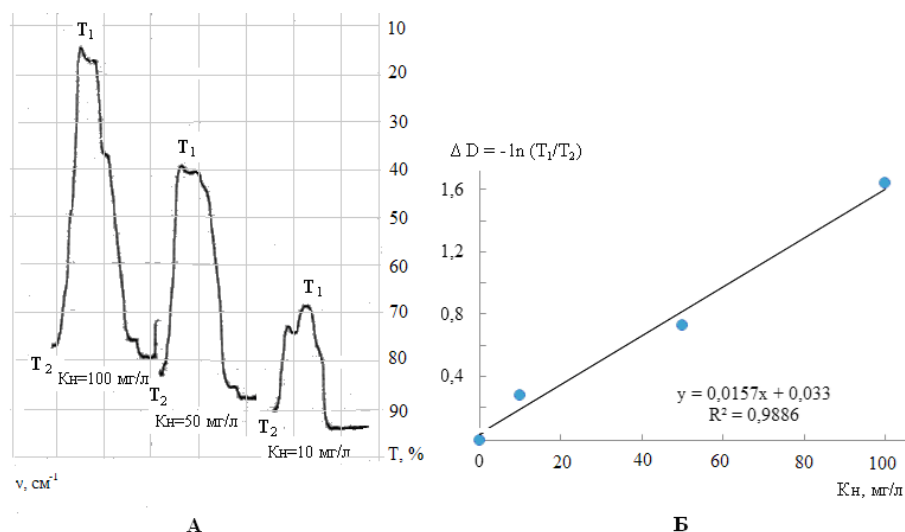


Рис. 1. ІЧ-спектрометричне дослідження нафти з густиною 0,84 г /см³ (А)
Градуирований графік визначення вмісту досліджуваної сирої нафти (Б)

Fig. 1. IR spectroscopic study of oil with density 0,84 g /cm³ (A).
Calibration curve of determination of investigated crude oil content (B)

У результаті ІЧ-спектрометричного дослідження (рис. 2) контрольних проб (суспензій бактерій штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 та *P. seracina* ONU327), які не містили нафти, встановлено, що сполуки, які входять до складу клітин бактерій, також мають поглинальну здатність в діапазоні хвильових чисел 2700–3200 см⁻¹ (рис. 2, Б).

На підставі проведених досліджень зроблено висновок про те, що інтерпретацію нафтоокиснювальної активності штамів роду *Pseudomonas* за одержаними ІЧ-спектрами необхідно здійснювати, враховуючи ІЧ-спектри поглинання суспензій бактерій.

Результати дослідження деструктивних властивостей штамів бактерій роду *Pseudomonas*, призначених для використання у біотехнологіях очищення ґрунту від нафтопродуктів, представлені у таблиці.

Дослідження показали, що нафтоокиснювальна здатність всіх використаних штамів мікроорганізмів була високою у перші 10 діб експозиції — ступінь біодеструкції вуглеводнів нафти досягав 62,0–73,0%.

Експериментальні дані, представлені у таблиці показують, що зі збільшенням терміну експозиції до 20 діб залишкова концентрація вуглеводнів нафти зменшувалася у 2,6–3,7 рази, а на тридцяту добу — у 5 разів порівняно з вихідною концентрацією — 500 мг /л.

З наведених у таблиці даних видно, що залишкова концентрація вуглеводнів нафти за деструкції їх бактеріями *P. fluorescens* ONU328 з десятої до двадцятої доби практично не змінилася (38,0%), а через 30 діб експозиції зменшилася до 20,6%.

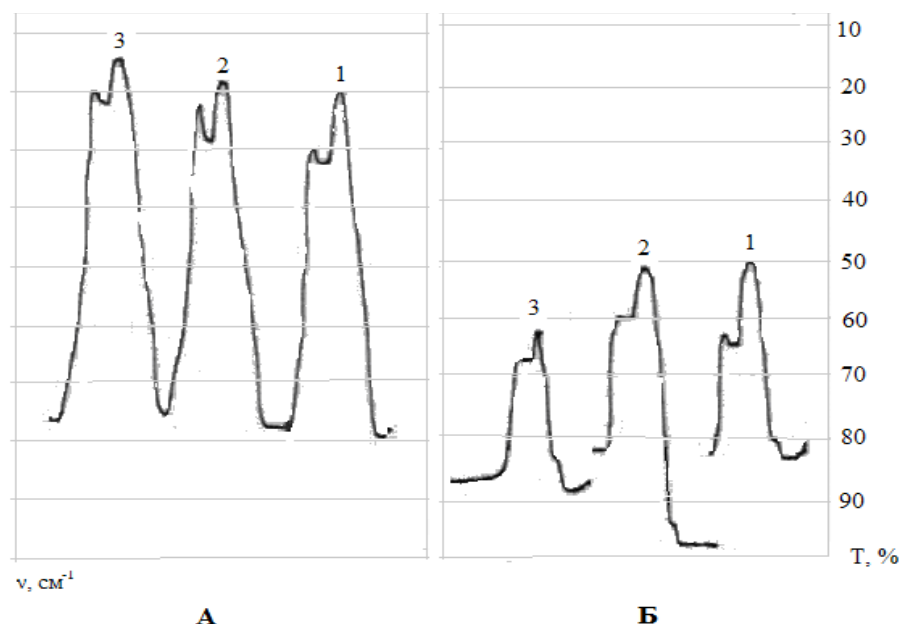


Рис. 2. ІЧ-спектри поглинання в області 2700-3200 см⁻¹:

А — дослідні проби, що містили вуглеводні нафти після біодеструкції бактеріями; Б — контрольні проби — суспензії бактерій, що не містили вуглеводні нафти. Експозиція двадцять діб.

Позначення: 1 — *P. cepacia* ONU327, 2 — *P. maltophilia* ONU329, 3 — *P. fluorescens* ONU328.

Fig. 2. IR absorption spectra in the field of 2700-3200 cm⁻¹:

A — the studied samples containing hydrocarbons of oil biodegradation by bacteria; B — control samples — suspension of bacteria not contained oil hydrocarbons. Exposition of twenty days.

Designation: 1 — *P. cepacia* ONU327, 2 — *P. maltophilia* ONU329, 3 — *P. fluorescens* ONU328.

Таблиця

Залишковий вміст вуглеводнів нафти після деструкції бактеріями роду *Pseudomonas*

Table

The residual content of oil hydrocarbons after the destruction by bacteria of *Pseudomonas* genus

Штам	10 діб		20 діб		30 діб	
	мг /л	%	мг /л	%	мг /л	%
<i>P. fluorescens</i> ONU328	190±1,0	38,0	190±5,0	38,0	103±3,0	20,6
<i>P. maltophilia</i> ONU329	154±3,0	30,8	140±3,0	28,0	100±5,0	20,0
<i>P. cepacia</i> ONU327	135±1,0	27,0	134±3,0	26,8	116±2,0	23,2

Примітка: Вихідна концентрація вуглеводнів нафти 500 мг /л
Note: the initial concentration of oil hydrocarbons 500 mg /l



Залишкова концентрація вуглеводнів нафти під дією бактерій *P. maltophilia* ONU329 та *P. ceracia* ONU327 впродовж всього терміну спостережень поступово зменшувалася та досягла мінімуму (відповідно, 20,0% і 23,2%) на 30 добу експозиції.

Отже, найвищу деструктивну активність виявили усі досліджувані штами впродовж перших 10 діб культивування. Це, очевидно, можна пояснити тим, що за цей час, в першу чергу, бактерії утилізують легкозасвоювані вуглеводні: н-алкани і циклічні сполуки із одним ароматичним кільцем легких фракцій нафти. Зниження швидкості деградації в другій половині експерименту зумовлено утилізацією вуглеводнів важких (асфальтенових) фракцій нафти, які є важко засвоюваними компонентами і вимагають більш тривалого періоду окиснення [1, 9].

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що досліджені в роботі штами бактерій роду *Pseudomonas*, які були відібрані як перспективні для використання у біотехнологіях очищення ґрунту [2, 3], розкладають нафту з густиною 0,84 г /см³ та вихідною концентрацією 500 мг /л на 70–80% за 10–30 діб експозиції. За здатністю утилізувати вуглеводні нафти досліджені штами бактерій роду *Pseudomonas* перевищують відомі із літератури мікроорганізми, що використовуються у біотехнологіях очищення ґрунту і води від нафти та нафтопродуктів [4, 7, 10, 11].

Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.А. Беляева, И.П. Конуп,
А.Е. Бухтияров, Г.В. Лисютин, И.В. Пузырева, Е.Г. Горшкова,
В.А. Иваница

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

НЕФТЕОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Реферат

Цель. Исследование нефтеокислительной активности некоторых штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, отобранных для использования в биоремедиации почвы. **Методы.** Бактерии *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 культивировали в питательной среде М-9, содержащей сырую нефть плотностью 0,84 г /см³ с концентрацией 500 мг /л. Остаточное содержание нефти через 10, 20 и 30 суток определяли интегральным методом инфракрасной спектрометрии. Извлечение нефти из проб осуществляли с использованием четыреххлористого



углерода (CCl_4). **Результаты.** В результате проведенных исследований установлено, что бактерии рода *Pseudomonas*, отобранные для использования в биотехнологии очистки почвы, в течение месяца разлагают углеводороды сырой нефти с исходной концентрацией 500 мг / дм^3 на 70–80%. Нефтеокислительная активность всех использованных штаммов микроорганизмов была высокой уже в первые 10 суток экспозиции — степень биодеструкции углеводородов нефти достигала 62.0–73.0%. **Вывод.** Штаммы бактерий *P. cepacia* ONU327, *P. maltophilia* ONU329 и *P. fluorescens* ONU328 могут быть рекомендованы для разработки технологий биоремедиации почвы от нефти и нефтепродуктов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: нефть, бактерии рода *Pseudomonas*, биодеструкция, нефтеокислительная активность.

T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva, I.P. Konup,
A.E. Bukhtiarov, G.V. Lisiutin, I.V. Puzyreva, O.G. Gorshkova,
V.O. Ivanytsia

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: v_ivanit@ukr.net

OIL OXIDATIVE ACTIVITY OF SOME STRAINS OF BACTERIA OF *PSEUDOMONAS* GENUS

Summary

The aim. Study of oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus, selected for use in bioremediation of soil. **Methods.** Bacteria *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 have been cultivated in nutrient medium M-9 contained crude oil with density of 0.84 g / cm^3 with the concentration 500 mg /l. The residual content of oil in 10, 20 and 30 days, was determined by the integral method of infrared spectroscopy. Oil extraction of the samples was performed by using carbon tetrachloride (CCl_4). **Results.** It was determined that the bacteria of genus *Pseudomonas* selected for use in biotechnology of purification of soil, within a month broke down hydrocarbons of crude oil with initial concentration of 500 mg / дм^3 up to 70–80%. Oil oxidative activity of all used strains of microorganisms was high in the first 10 days of the exhibition — the degree of biodegradation of petroleum hydrocarbons reached 62.0–73.0%. **Conclusion.** Bacteria strains of *P. cepacia* ONU327, *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328 can be recommended for the development of technologies of soil bioremediation from oil and oil products.



K e y w o r d s: oil, bacteria of *Pseudomonas* genus, biodestruction, oil oxidative activity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ветрова А.А.* Биодegradация углеводородов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами: автореферат дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. — 24 с.
2. *Гудзенко Т.В., Беляева Т.О., Конуп І.П., Бухтияров А.Є., Лісютин Г.В., Волювач О.В., Пузирьова І.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О.* Мікробна технологія біоремедіації засоленого ґрунту о. Зміїний // XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Ялта, жовтень, 2013 р.): тез. доп. — Сімферополь: ФОП Бражнікової Н.А., 2013. — С. 373.
3. *Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляева Т.О., Конуп І.П., Пузирьова І.В.* Розробка біотехнологічного способу знешкодження нафтових забруднень ґрунту // Збірник міжнародної конференції «Цілі збалансованого розвитку для України». — 18-19 червня 2013, м. Київ. — С. 157–158.
4. *Киреева Н.А., Григориади А.С., Хайбулина Е.Ф.* Ассоциации углеводородоокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Башкирского университета. — 2009. — Т. 14, № 2. — С. 391–394.
5. *Леоненко И.И., Антонович В.П., Андрианов А.М., Безлуцкая И.В., Цымбалюк К.К.* Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды (обзор) // Методы и объекты химического анализа. — 2010. — Т. 5, № 2. — С. 58–72.
6. *Суртко Л.Ф., Финкельштейн З.И., Баскунов Б.П. Яковлев В.И., Головлева Л.А.* Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Микробиология. — 1995. — Т. 64, № 3. — С. 393–398.
7. *Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К. Мартовецкая И.И., Миронова Р.И., Жиркова Н.А., Холоденко В.П.* Разработка и испытания биосорбента «Экосорб» на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. — 2000. — Т. 36, № 6. — С. 661–665.
8. *Kaczorek E, Salek K, Guzik U, Jesionowski T, Cybulski Z.* Biodegradation of alkyl derivatives of aromatic hydrocarbons and cell surface properties of a strain of *Pseudomonas stutzeri* // Chemosphere. — 2013. — Vol. 90, № 2. — P. 471–478.
9. *Osuji L., Ozioma A.* Environmental degradation of polluting aromatic and aliphatic hydrocarbons: a case study // Chem. Biodivers. — 2007. — Vol. 4. — P. 424–430.
10. *Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Abu Al-Soud W., Langenhoff A.A., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H., Smidt H.* Impact of long-term diesel



contamination on soil microbial community structure // *Appl Environ Microbiol.* — 2013. — Vol. 79, № 2. — P. 619–630.

11. *Патент* РФ на изобретение № 2396340. Штамм *Gordona terrae* ВКПМ Ас-1741 для разложения нефти и нефтепродуктов / Немцева Н.В., Гоголева О.А., Бухарин О.В. / Оpubл. 10.08.2010. Бюл. № 22.

12. *Патент* України № № 95859 А. Біопрепарат для сорбції і деструкції вуглеводнів і спосіб очищення води та /або ґрунту від забруднень нафтою та нафтопродуктами / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Беляєва Т.О., Бобрешова Н.С., Кожанова Г.А., Кривицька Т.М., Конуп І.П., Баранов О.О. / Оpubл. 12.09.2011. Бюл. № 17.

Стаття надійшла до редакції 30.05.2013 р.



УДК: 579. [222.3 : 23 : 24 : 811.21 /22]

С.О. Гнатуш¹, С.В. Лаврик²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна, тел: +38 (032) 239 40 53;

²Педагогічний коледж ЛНУ імені Івана Франка, вул. Туган-Барановського, 7, Львів 79005, Україна, e-mail: sofii_lavryk@email.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ПУРПУРОВИХ НЕСІРКОВИХ БАКТЕРІЙ *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* З ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ (УКРАЇНА)

Мета роботи. Виділення з води озера Яворівське, ідентифікація та дослідження пурпурових несіркових бактерій, які можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук.

Методи. Бактерії культивували анаеробно чи у мікроаерофільних умовах на світлі та у темряві на середовищах Ван Ніля і PNSB за внесення різних донорів електронів, джерел карбону і нітрогену. Біомасу визначали за мутністю розведеної суспензії клітин фотометруванням на КФК-3. Концентрацію S^{2-} визначали турбідиметрично за утворенням метиленової сині. Сірку екстрагували з культурального середовища фільтруванням через нітроцелюлозні фільтри, надалі її концентрацію визначали за методом Ван Гемердена. Аналіз пігментного складу здійснювали спектрофотометрично на Specord M-40. Ультраструктуру клітин бактерій досліджували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-100. Зразки генів 16S ДНК ампліфікували методом ПЛР. Первинну структуру фрагментів визначали на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). **Результати.** Отримали чисті культури пурпурових несіркових бактерій. Клітини дослідженого штаму паличкоподібні, рухливі. Фотосинтетичні мембрани ламелярного типу, основні пігменти – бактеріохлорофіл *a* та каротиноїди спірілоксантинової серії. Бактерії ростуть як хемотрофно, так і фототрофно, при використанні сірководню як донора електронів утворюють сірку, що виводиться у культуральне середовище. Використовують різні донори електронів, джерела карбону та нітрогену. Є факультативними анаеробами. Генетично близькі до видів *Rhodopseudomonas faecalis* (99%) і *Rhodopseudomonas palustris* (98%), *Rhodopseudomonas rhenobacensis* (98%). **Висновок.** Виділені з води озера Яворівське пурпурові несіркові бактерії ідентифіковані нами за морфо-фізіологічними ознаками і за результатами аналізу нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК як *Rhodopseudomonas palustris*. Вони можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук.

Ключові слова: пурпурові несіркові бактерії, *Rhodopseudomonas palustris*.



Унаслідок зміни деяких промислових технологій виникла потреба у рекультивациі водойм, утворених при розробці родовищ корисних копалин. Зокрема, рекультивациі потребує озеро Яворівське, утворене на місці котловану Язівського сіркового родовища (Львівська область). Однією з проблем цієї водойми є постійне утворення сірководню у придонній зоні внаслідок життєдіяльності бактерій циклу сульфуру [1]. Сірководень є токсичним для більшості організмів навіть у невеликих дозах, а тому стримує заселення глибинної частини озера еукаріотами.

Оскільки припинити утворення сірководню шляхом ізоляції сіркового пласту технічно неможливо, слід зосередитись на пошуку способів утримання низької концентрації цієї сполуки у водній товщі. З цією метою можна використати бактерії, які утилізують сірководень у процесі своєї життєдіяльності. Зважаючи на перспективність біоочищення цієї водойми, ми зосередили свою увагу на виділенні, ідентифікації та дослідженні фізіологічних властивостей пурпурових несіркових бактерій, які можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук, присутніх в озері у достатніх кількостях.

Матеріали і методи

Проби води відбирали за методом Столбунова-Рябова у прибережній зоні Яворівського озера з глибини 27 м [3]. Нагромаджувальні культури пурпурових бактерій отримували, використовуючи середовище Ван Ніля. Чисті культури пурпурових несіркових бактерій отримували та культивували у рідкому і агаризованому середовищах PNSB у пробірках та на чашках Петрі (г/л): KH_2PO_4 — 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NH_4Cl — 1,0; NaHCO_3 — 3,0; Na_2SO_4 — 0,7; NaCl — 1.

Анаеробні умови створювали з використанням кисеньпоглинаючих пакетів GENbox анаер (Франція) [6]. Як джерело світла використовували лампи розжарювання. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю-116.

Оптимальні для росту температуру та освітленість визначали, вирощуючи бактерії у пробірках з рідким середовищем PNSB. Здатність досліджених бактерій асимілювати органічні речовини та сполуки нітрогену і сульфуру досліджували згідно рекомендованих стандартів опису нових видів аноксигенних фототрофних бактерій [10]. Біомасу визначали за мутністю розведеної суспензії клітин з використанням КФК-3.

Концентрацію S^2 визначали турбідиметрично з використанням КФК-3. Метод ґрунтується на взаємодії S^2 з п-аміно-диетиланіліном з утворенням метиленової сині [15]. Вміст сірки у культуральному середовищі визначали, осаджуючи її на нітроцелюлозних мембранних фільтрах з порами 0,45 мкм як описано для *Thiobacillus*. Сірку екстрагували етанолом, а її концентрацію у екстракті визначали спектрофотометрично [8, 12]. Склад пігментів визначали у бактерій, вирощених на середовищі з сульфід-іоном та ацетатом [2, 4, 7,



9]. Спектри поглинання інтактних клітин та екстрагованих з них пігментів реєстрували на спектрофотометрі Specord M-40. Ультраструктуру бактерій вивчали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100. Фіксацію і контрастування клітин проводили за методом Рейнольдса [11].

Очищення та ампліфікацію рибосомальної 16S ДНК здійснювали як описано [5]. Визначення первинної структури ампліфікованих фрагментів ДНК проводили на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany), використовуючи праймери: 337F: GACTCCTACGGGAGGCGWGCAG; 518R: GTATTACCGCGGCTGCTGG; 928F: TAAAACTYAAAKGAATTGACGGG. Для пошуку гомологів досліджених бактерій використовували програму BLASTN.

Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програму OriginPro 7.0.

Результати та їх обговорення

Із проб води озера Яворівське отримано нагромаджувальну культуру, в якій виявлено значну кількість невеликих паличкоподібних клітин без внутрішньоклітинної сірки. Відсутність глобул сірки всередині клітини є однією із основних ознак родини *Rhodospirillaceae* [6]. У результаті досліджень виділено штами пурпурових несіркових бактерій: Ya-2010/A, Ya-2010/B, Ya-2010 /C і Ya-2010 /D, які використовували сірководень у процесі автотрофного росту і, подібно до *Rhodopseudomonas palustris*, виділяли сірку у культуральне середовище.

У подальших дослідженнях використовували штам Ya-2010/A, який найактивніше утилізував сульфід-іон і утворював найбільше сірки.

Для ідентифікації штаму Ya-2010/A проведено аналіз нуклеотидної послідовності гену 16S рРНК та її порівняння з гомологічними послідовностями, депонованими у GenBank (табл. 1).

Високий рівень спорідненості виявлено до кількох видів роду *Rhodopseudomonas*. Однак, генетично близькі види часто відрізняються морфо-фізіологічними властивостями. Тому, щоб визначити, до якого саме з наданих видів належить штам Ya-2010 /A було визначено його морфо-фізіологічні характеристики.

У клітинах штаму Ya-2010 /A виявлено внутрішні фотосинтетичні мембрани ламелярного типу, розташовані паралельно цитоплазматичній мембрані. В той же час, сіркових глобул ні всередині, ні на поверхні клітин не виявлено. Ці морфологічні ознаки підтверджують приналежність досліджуваного штаму до родини *Rhodospirillaceae* [6].

Фотосинтетичними пігментами клітин штаму Ya-2010 /A є бактеріохлорофіл *a* (абсорбційні максимуми 376, 593, 805, 872 нм) та каротиноїди спірилоксантинової серії (467, 490 і 525 нм). Порівняння абсорбційних максимумів окремих пігментів, розділених методом тонкошарової хроматографії, з даними літератури, підтвердило присутність бактеріохлорофілу *a* та дозволило ідентифікувати лікопін, родопін і сфероіденон [4, 7, 13].

Таблиця 1

Результати пошуку бактерій-гомологів штаму Ya-2010/A за результатами BLASTN-аналізу

Table 1

The results of search for homologues to strain Ya-2010/A based on BLASTN-analysis data

Штам	Довжина фрагменту, пн	Ідентичність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
Ya-2010 /A	1517	99	Rhodopseudomonas faecalis	NR_024971.1
Ya-2010 /A	1517	98	Bradyrhizobium japonicum	NR_074322.1
Ya-2010 /A	1517	98	Bradyrhizobium betae	NR_029104.1
Ya-2010 /A	1517	98	Rhodopseudomonas palustris	NR_103926.1
Ya-2010 /A	1517	98	Bradyrhizobium liaoningense	NR_041785.1
Ya-2010 /A	1517	98	Rhizobium lupini	NR_044869.1
Ya-2010 /A	1517	98	Rhodopseudomonas rhenobacensis	NR_028641.1
Ya-2010 /A	1517	98	Nitrobacter vulgaris	NR_042449.1

Бактерії роду *Rhodopseudomonas* здатні рости фототрофно або хемотрофно, причому найкращим типом метаболізму для них є фотогетеротрофія [6]. Встановлено, що бактерії штаму Ya-2010 /A як основне джерело карбону можуть використовувати різні органічні сполуки. Очевидно, ця властивість сприяє їхньому виживанню за зміни хімічного складу природного середовища (табл. 2).

Пурпурові несіркові бактерії, в тому числі *R. rhenobacensis*, *R. palustris*, можуть використовувати органічні сполуки не лише як джерело карбону, а й як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [6]. Бактерії штаму Ya-2010 /A здатні рости фототрофно за відсутності S²⁻ на середовищі з ацетатом, малатом, піруватом.

Джерелами нітрогену для штаму Ya-2010 /A були амоній, нітрат, аспартат, аргінін, глутамат, дріжджовий екстракт. Нітрат, можливо, перетворювався до нітриту завдяки нітратредукції, яка характерна для бактерій роду *Rhodopseudomonas* [6, 13].

Результати дослідження морфо-фізіологічних характеристик штаму Ya-2010 /A наведені у табл. 3.



Таблиця 2

Ріст бактерій штаму Ya-2010 /A за внесення органічних сполук
як джерела карбону

Table 2

The growth of strain Ya-2010 /A under addition of some organic compounds
as carbon sources

Органічна речовина	Наявність /відсутність росту	Органічна речовина	Наявність /відсутність росту
Ацетат	+	Малат	+
Аспартат	—	Метанол	—
Валерат	+	Піруват	+
Гліцерол	—	Пропанол	—
Глутамат	+	Пропіонат	+
Глюкоза	—	Сорбітол	+
Дріждж. екстракт	+	Тартрат	—
D—фруктоза	—	Форміат	—
Етанол	+	Фумарат	+
Лактат	+	Контроль	+

Примітка: «+» — забезпечували ріст бактерій; «—» — відсутність росту бактерій;
контроль — ріст бактерій на середовищі PNSB

Note: «+» — support growth of bacteria; «—» — absence of growth of bacteria control —
growth of bacteria on medium PNSB

Необхідно зазначити, що ріст бактерій штаму Ya-2010 /A не пригнічувався за внесення NaCl (1 г /л), на відміну від генетично близького *R. rhodobacensis* [6]. Одночасно не можна підтвердити приналежність штаму Ya-2010 /A до *R. faecalis*, бо досліджені бактерії як донори електронів здатні використовувати S²⁻ та тіосульфат, що не характерно для *R. faecalis* [14].

Отже, за результатами генетичних та морфо-фізіологічних досліджень пурпурові несіркові бактерії штаму Ya-2010 /A, виділені з води Яворівського озера (Україна, Львівська обл.), належать до роду *Rhodopseudomonas* і з високою імовірністю є *Rhodopseudomonas palustris*. Вони можуть утилізувати сірководень і добре рости завдяки використанню органічних сполук.



Таблиця 3

Морфо-фізіологічна характеристика бактерій штаму Ya-2010 /А

Table 3

The morphophysiological characteristic of strain Ya-2010 /A

Ознака	Характеристика ознаки	
	Штам Ya-2010 /А	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> [6]
Морфологія клітин	паличкоподібні, поодинокі; у старих культурах утворюють розеткоподібні угруповання, грамнегативні	від паличкоподібних до овальних, поодинокі; у старих культурах можуть утворювати угруповання за типом кластерів чи розеток, грамнегативні
Розмір клітин, мкм	0,5-0,9x1,8-2,0	0,6-0,9x1,2-2,0
Рухливість	рухливі	рухливі
Внутрішні цитоплазматичні мембрани	ламелярного типу, паралельні мембрані клітини	ламелярного типу, паралельні мембрані клітини
Забарвлення суспензії клітин	темно-червоне	від червоного до червоно-коричневого
Основні пігменти	бактеріохлорофіл <i>a</i> , каротиноїди спірілоксантинової серії	бактеріохлорофіл <i>a</i> , каротиноїди спірілоксантинової серії
Оптимальне значення: температури, °С освітленості, люкс сульфіду, мМ	28–30 1400–1500 2–3	30–37 не вказано не вказано
Максимальна концентрація S ²⁻	5	не вказано
Донор електронів: сульфід тіосульфат сірка	+ + –	+ + / –
Ріст у темряві: аеробні умови мікроаерофільні умови анаеробні умови	– + +	+ / – + +
Відношення до кисню	факультативний анаероб	факультативний анаероб

Автори публікації висловлюють подяку за визначення первинної структури фрагментів ДНК директору з досліджень Середземноморського Інституту Нейробиології (INMED /INSERM) І. Медіні та завідувачу міжфакультетської лабораторії електронної мікроскопії ЛНУ імені Івана Франка, к.б.н. О. Кулачковському за допомогу у дослідженні ультраструктури клітин.



С. А. Гнатуш¹, С. В. Лаврик²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина, тел: +38 (032) 239 40 53;

²Педагогический колледж ЛНУ имени Ивана Франко, ул. Туган-Барановского, 7, Львов 79005, Украина, тел: +38 (063) 278 73 43, e-mail: sof_lavryk@email.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ПУРПУРНЫХ НЕСЕРНЫХ БАКТЕРИЙ *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* ИЗ ОЗЕРА ЯВОРИВСКОЕ (УКРАИНА)

Реферат

Целью работы было выделение из воды озера Яворивское, идентификация и исследование свойств пурпурных несерных бактерий, способных утилизировать сероводород и расти с использованием органических соединений. **Методы.** Бактерии культивировали анаэробно и в микроаэрофильных условиях, на свету и в темноте, на средах Ван Ниля и PNSB с разными донорами электронов, источниками углерода и азота. Биомассу определяли по мутности разбавленной суспензии клеток с использованием КФК-3. Концентрацию S²⁻ определяли турбидометрически по образованию метиленовой сини. Серу из культуральной среды экстрагировали методом осаждения на нитроцеллюлозные фильтры, а ее концентрацию определяли методом Ван Гемердена. Для анализа пигментного состава бактерий использовали спектрофотометр Specord M-40. Ультраструктуру бактерий изучали с помощью электронного трансмиссионного микроскопа ПЕМ-100. Первичную структуру фрагментов ДНК определяли на GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). Для поиска гомологов исследованных бактерий использовали программу BLASTN. **Результаты.** Клетки бактерий палочкообразные, подвижные. Фотосинтетические мембраны ламеллярного типа, пигменты — бактериохлорофилл *a* и каротиноиды спириллоксантиновый серии. Бактерии растут хемотрофно и фототрофно, при использовании сероводорода в качестве донора электронов образуют серу, которая выводится в среду. Используют разные источники углерода и азота. Факультативные анаэробы. Генетически близки видам *Rhodopseudomonas faecalis* (99%), *Rhodopseudomonas palustris* (98%), *Rhodopseudomonas rheinobacensis* (98%). **Вывод.** Выделенные из воды озера Яворивское пурпурные несерные бактерии идентифицированы нами как *Rhodopseudomonas palustris*. Они могут утилизировать сероводород и хорошо расти благодаря использованию органических соединений.

Ключевые слова: пурпурные несерные бактерии, *Rhodopseudomonas palustris*.



S.O. Hnatysh¹, S.V. Lavryk²

¹Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevsky Str., Lviv 79005, Ukraine,
tel. +38 (032) 239 40 53;

²Pedagogical college of Ivan Franko National University of Lviv, 7, Tuhon-Baranovsky Str., Lviv
79005, Ukraine; tel. +38 (063) 278 73 43, e-mail: sof_lavryk@email.ua

CHARACTERISTIC OF NON-SULFUR PURPLE BACTERIA *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* FROM LAKE JAVORIVSKE (UKRAINE)

Summary

The **aim** of work was isolation from water of lake Javorivske, identification and investigation of purple non-sulfur bacteria with ability to use sulfide and grow on the organic compounds. **Methods.** Bacteria were cultivated under anaerobic and microaerophilic conditions, on the light or in the dark in the Van Niel or PNSB media with addition of different electron donors, carbon and nitrogen sources. Biomass was determined using turbidity diluted cell suspension photometration on CPK-3. The concentration of S^{2-} was determined colorimetrically for methylen blue formation. The elemental sulfur extracted from medium used filtration through nitrocellulose filters. The sulfur concentration was measured by the method of Van Gernerden. For analyses of pigment content it has been used spectrophotometer Specord M-40. Bacterial cell structure was investigated with an electron transmission microscope PEM-100. The fragments primary structure was determined on GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). The search for homologues to our bacteria used the BLASTN-program. **Results.** The bacteria cells are rod-shaped and motile. Photosynthetic membranes are of lamellar type. The main photosynthetic pigments are bacteriochlorophyll *a* and carotenoids of spirilloxanthin series. Bacteria grow chemotrophically or phototrophically, use sulfide as an electron donor and produce elemental sulfur, which extracted in cultural medium. Bacteria use different electron donors, carbon and nitrogen sources. They are facultative anaerobes. Bacteria were genetically similar to *Rhodopseudomonas faecalis* (99%), *Rhodopseudomonas palustris* (98%) and *Rhodopseudomonas rhenobacensis* (98%). **Conclusions.** Purple bacteria isolated from water of lake Javorivske were identified as *Rhodopseudomonas palustris*. They use sulfide and grow well due to utilization of organic compounds.

Key words: purple non-sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Мороз О.М., Колісник Я.І., Подопрігора О.І., Клим І.Р., Гудзь С.П., Борсукевич Б.М., Гнатуш С.О. Мікрофлора води озера Яворів-



ське // Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Серія біологія. — 2008. — 24. — С. 131–138.

2. Мусієнко М.М., Паршикова Т.В., Славний П.С. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. — 200 с.

3. Родина А. Г. Методы водной микробиологии. Практ. руководство. — М.—Л.: Наука, 1965. — 363 с.

4. Akiba T., Usami R., Horikoshi K. *Rhodopseudomonas rutila*, a new species of non-sulfur purple photosynthetic bacteria // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1983. — 33, № 3. — P. 551–556.

5. Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., Weisburg W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. — 1991. — 173, № 2. — P. 697–703.

6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — 10th ed. — New York, 2005. — Vol. 2. — 1416 p.

7. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. — 1985. — 3. — P. 113–145.

8. Gernerden H. Growth measurements of *Chromatium* cultures // Arhiv. Mikrobiol. — 1968. — 64. — P. 103–110.

9. Hirashi A., Santos T., Siguyama J., Komagata K. *Rhodopseudomonas rutila* is a later subjective synonym of *Rhodopseudomonas palustris* // International Journal of Systematic Bacteriology. — 1992. — 42, № 1. — 186–188.

10. Imhoff J., Caumette P. Recommended standards for description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria // J. Syst. Bacteriol. — 2004. — 54. — P. 1415–1421.

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

12. Visser J., Robertson L., Verseveld H., Kuenen G. Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species // Applied and Environmental Microbiology. — 1997. — 63, № 6. — P. 2300–2305.

13. Yongqin J., Kappler A., Croal L., Newman D. Isolation and characterization of a genetically tractable photoautotrophic Fe(II)-oxidizing bacterium, *Rhodopseudomonas palustris* strain TIE-1 // Applied and Environmental Microbiology. — 2005. — 71, № 8. — P. 4487–4496.

14. Zhang D., Yang H., Huang Z., Zhang W., Liu S. J. *Rhodopseudomonas faecalis* sp. nov., a phototrophic bacterium isolated from an anaerobic reactor that digests chicken faeces // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2002. — 52. — P. 2055–2060.

15. Пат.6340596 США, МКИ G 01 N33 /00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Masami Sugiyama (Японія); Fujirebio Inc. № 248316; Заявл. 02.01. 1999. — Опубл. 22.01.2002; НКИ 436.121.

Стаття надійшла до редакції 9.10.2013.



УДК 579.23+579.25:631.4

Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка, вул. Гетьмана
Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ КОРОЗІЙНО АКТИВНОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ ФЕРОСФЕРИ ГАЗОПРОВОДУ, ПРОКЛАДЕНОГО У ПІЩАНОМУ ГРУНТІ

Метою роботи було комплексне дослідження сульфідогенного угруповання мікроорганізмів феросфери вуличного газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті та визначення його складу. **Методи.** Виявлення та виділення компонентів угруповання бактерій та комплексу мікроскопічних грибів проводили методом граничних розведень при висіві клітинної суспензії на відповідні рідкі елективні середовища. За чисельністю та якісним складом бактерій сульфідогенне угруповання феросфери є корозійно небезпечним. Чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій одержували шляхом багаторазових пересівів окремих колоній на твердому та рідкому середовищах Постгейта «В». **Результати.** Виділено переважальний штам сульфатвідновлювальних бактерій — М-4.1, який охарактеризовано за фенотиповими ознаками та ідентифіковано за методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням універсальних праймерів до фрагментів генів 16S рРНК. При порівнянні секвенсів ділянок ДНК, що кодують ген 16S рРНК досліджуваних бактерій з аналогічними послідовностями штамів із бази даних GenBank штам сульфатвідновлювальних бактерій М-4.1 віднесено до роду *Desulfovibrio*. Мікроскопічні гриби виділяли висіваючи відповідні розведення ґрунтової суспензії в чашки Петрі з агаризованим середовищем Чапека-Докса. Ідентифікацію грибів проводили на основі їх морфолого-культуральних особливостей за визначниками. Ізольовано 78 культур грибів (12 видів 5 родів групи *Anamorphic fungi*). **Висновки.** Таким чином, проведені дослідження показали, що у феросфері на поверхні пошкодженого вуличного газопроводу, за умов піщаного ґрунту формується корозійно небезпечний за чисельністю та видовим складом комплекс фізіологічних груп бактерій та мікроміцетів.

Ключові слова: сульфідогенне мікробне угруповання, мікроміцети, групи *Anamorphic fungi*.

Природне мікробне угруповання ґрунту під впливом антропогенного навантаження зазнає змін, наслідками яких є формування корозійно небезпечного мікробного угруповання у феросфері, яке є важливим чинником

© Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк, 2013



руйнування металів у ґрунті [1]. Процес формування агресивних мікробних сукупностей стимулюється сталевими та залізобетонними конструкціями. При цьому змінюється якісний та кількісний склад мікроорганізмів корозійного угруповання, що сприяє виникненню осередків біокорозії [1, 2]. Багаторічні мікробіологічні дослідження формування агресивного мікробного угруповання у феросфері газо- та нафтопроводів підтверджують, що панівну роль у мікробній корозії сталі відіграють сульфатвідновлювальні бактерії [1, 13]. Мікроскопічні гриби також здатні пошкоджувати захисні покриття і метал трубопроводів [8, 9]. Слід зазначити, що структура ґрунту та глибина залягання трубопроводу визначає швидкість корозії металу, так як від них залежить дифузія кисню. Зокрема, особливості структури піщаного ґрунту, а саме достатня аерація та водопроникність, уможлиблює участь як бактерій, так і мікроскопічних грибів в процесах біопшкодження матеріалів. Саме в таких ґрунтах прокладено більшість вуличних газопроводів у північній частині Чернігівської області.

Дослідження сульфідогенних природних угруповань мікроорганізмів феросфери, що вносять свій вклад у створення екстремальних корозійних ситуацій при експлуатації вуличних газопроводів, прокладених у піщаному ґрунті, є актуальним.

Метою роботи було комплексне дослідження сульфідогенного угруповання мікроорганізмів феросфери піщаного ґрунту та визначення його складу.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було сульфідогенне мікробне угруповання, яке виділене нами із феросфери кородуючої поверхні та ґрунту поза зоною вуличного газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті (с. Малійки, Чернігівського району Чернігівської області). Характеристика підземного газопроводу надана співробітниками ВАТ «Чернігівгаз»: тиск низький; довжина та діаметр труби — 808 м та 159 см відповідно; матеріал труби — сталь 20; глибина укладання від верху труби до поверхні землі — 0,8 м; тип ізоляції — БНІ–ІV; товщина ізоляції — 7,5 мм; питомий електроопір ґрунту — 20 Ом · м. Зразки відібрано згідно до ДСТУ 3291-95 [7]. Ґрунт має такі характеристики: за механічним складом — пісок зв'язний; рН водної витяжки — 7,4; рН сольової витяжки — 6,4; вміст P_2O_5 — 100 мг / кг; K_2O — 30 мг / кг; азоту — 7 мг / кг; кальцію — 2,2 мгеков. / 100 г ґрунту; магнію 0,63 — мгеков. / 100 г ґрунту; вміст загального заліза 1,92%; вміст загальної сірки 4,05%; гумусу — 0,15%; вологість — 9%.

Виявлення та виділення компонентів природного угруповання бактерій та комплексу мікроскопічних грибів проводили методом граничних розведень при висіві клітинної суспензії на відповідні рідкі елективні середовища: сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ) — на середовище Постгейта «В»; залізовідновлювальні бактерії (ЗВБ) — на середовище Каліненка; денітрифікувальні бактерії (ДНБ) — на середовище Гільтая;



амоніфікувальні бактерії (АМБ) — на м'ясопептонний бульйон; мікроміцети — на агаризоване середовище Чапека-Докса (АЧД). Чисельність бактерій перераховували на 1 г абсолютно сухого ґрунту.

Чисті культури сульфатвідновлювальних бактерій одержували шляхом багаторазових пересівів окремих колоній на твердому та рідкому середовищах Постгейта «В». Очищення культури контролювали мікроскопічно та висівом на середовище для виявлення клостридіальних бактерій, які викликають бродіння, такого складу (г /л): пептон — 4; глюкоза — 10; Na_2SO_4 — 2; MgSO_4 — 1; агар — 15. Додатки, що стерелізували окремо, вносили безпосередньо перед використанням: сіль Мора (5% р-н солі Мора в 1% HCl) — 10 мл; 1% Na_2S — 2 мл.

Мікроскопічні гриби виділяли, застосовуючи метод ґрунтових розведень. Розведення ґрунтової суспензії висівали в чашки Петрі з АЧД. Після появи на чашках видимого росту мікроміцетів морфологічно різні колонії висівали на скошене АЧД [10]. Ідентифікацію грибів проводили на основі їх морфолого-культуральних особливостей, використовуючи визначники [4–6].

Морфотип бактерій у сульфідогенному природному угрупованні (після фіксації та забарвлення фуксином) та мікроскопічних грибів досліджували за допомогою оптичного мікроскопу (Ч1050) Мікромед-1 («ЛОМО», Росія), для монокультури сульфатвідновлювальних бактерій використовували фазово-контрастну мікроскопію (Ч1000, Meiji MT5300H). Препарати клітин монокультури забарвлювали для визначення грамнегативних та грампозитивних бактерій [11]. Здатність мікроорганізмів до спороутворення перевіряли шляхом нагрівання суспензії клітин у запаяних ампулах на водяній бані при температурі 80° протягом 10, 20, 30 хвилин з наступним висівом на поживне середовище Постгейта «В».

Молекулярно-генетичний аналіз генів 16S рРНК здійснювали згідно з [3].

Результати та їх обговорення

Мікробіологічне дослідження зразків ґрунту та феросфери виявило мікробне угруповання, до складу якого входять сульфатвідновлювальні, залізовідновлювальні, денітрифікувальні, амоніфікувальні бактерії та мікроскопічні гриби (рис. 1).

Чисельність сульфатвідновлювальних, залізовідновлювальних та денітрифікувальних бактерій у феросфері перевищує таку у ґрунті: СВБ (переважальна група) та ДНБ — на 2 порядки; ЗВБ — на порядок. Останні сприяють відновленню Fe (III) до Fe (II), накопичення якого знижує окисно-відновний потенціал, що сприяє розвитку як СВБ, так і ДНБ. Гетеротрофні асоціанти — амоніфікувальні бактерії забезпечують створення анаеробних умов. Все це призводить до розвитку та підвищення активності сульфатвідновлювальних бактерій [1, 2].



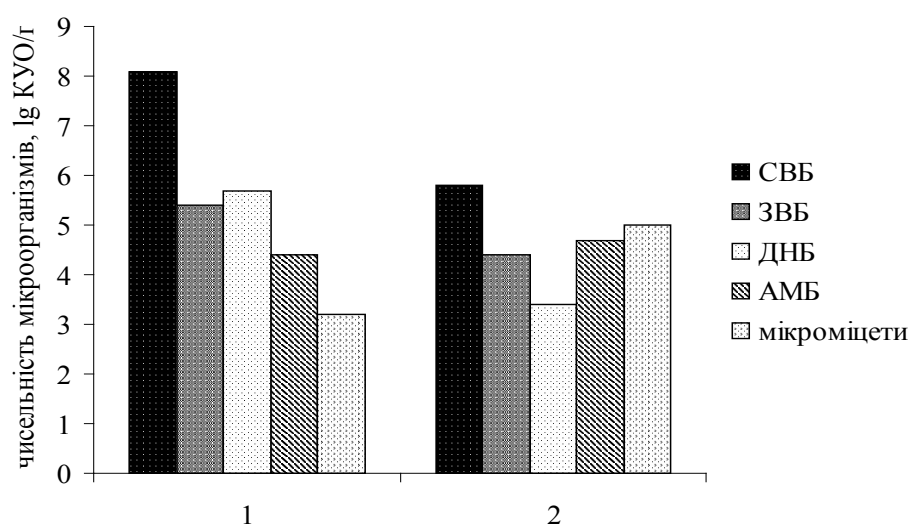


Рис. 1. Чисельність еколого-фізіологічних груп бактерій та мікроскопічних грибів сульфідогенного природного угруповання у феросфері (1) та у зразку ґрунту (2)

Fig. 1. Number of ecology-physiological groups of bacteria and microscopic fungi of sulfidogenic microbial community of ferrosphere (1) and soils (2)

Чисельність амоніфікувальних бактерій у ґрунті в 2 рази більша ($5,0 \times 10^4$ кл./г) ніж у феросфері ($2,5 \times 10^4$ кл./г). Досить висока кількість амоніфікувальних бактерій у ґрунті може свідчити про наявність у ґрунті доступних джерел Карбону та Нітрогену. Розвиток АМБ у феросфері може пригнічуватися інтенсивним розвитком інших членів корозійного угруповання, зокрема СВБ та ЗВБ, оскільки залежно від екологічних умов та наявності джерел живлення в угрупованні відбувається послідовна зміна переважальних груп мікроорганізмів під час перебігу процесу руйнування металу. Таким чином, за чисельністю та якісним складом бактерій сульфідогенне угруповання феросфери можна віднести до корозійно небезпечного [1].

Нами виділено штам сульфатвідновлювальних бактерій М-4.1 — переважального компонента угруповання феросфери. Визначено морфотип бактерій монокультури: короткі палички з заокругленими кінцями.

Бактерії мезофільні, грамнегативні, факультативні анаероби, спор не утворюють (табл. 1).

Для визначення родової належності штаму М-4.1 було проведено ідентифікацію із використанням методу полімеразної ланцюгової реакції. Одержано і секвеновано ампліфіканти гена 16S рРНК. За допомогою програми BLASTN порівняно нуклеотидну послідовність гена 16S рРНК штаму М-4.1 з такими у бактерій роду *Desulfovibrio* з банку нуклеотидних послідовностей GenBank. Встановлено 100 % гомологію з

депонованою послідовністю *Desulfovibrio* sp. H1 (FJ225426.1) та 92 % — з послідовністю *Desulfovibrio* sp. SM12803 (AJ251630.1) табл. 2. Таким чином, підтверджено належність штаму М-4.1 до роду *Desulfovibrio*.

Таблиця 1

Характеристика штаму М-4.1

Table 1

The characteristic of strain М-4.1

Ознака	Характеристика ознаки	Наявність(+) чи відсутність (-) ознаки
Морфологія клітин	Забарвлення за Грамом	грамнегативні
	Форма клітин	Короткі палички з заокругленими кінцями
	Рухливість	+
	Спороутворення	—
Ріст за температури, °С	20	+
	30	++
	40	+
	50	—
Ріст за присутності NaCl, %	3	+
	5	—
Відношення до кисню	Відношення до кисню	Факультативний анаероб

Примітка: «+» — наявність ознаки; «—» — відсутність ознаки.

Note: «+» — presence of characteristic; «—» — absence of characteristic.

Особливістю дослідженого мікробного угруповання піщаного ґрунту та феросфери є наявність мікроскопічних грибів, які можуть брати участь у процесах біопшкодження бітумного покриття та біокорозії сталі [8]. Нами встановлено, що чисельність мікроміцетів у зразках ґрунту $[(9,3 \pm 0,6) \times 10^4$ КУО /г] більша у 55 разів $[(1,7 \pm 0,2) \times 10^3$ КУО /г] ніж у феросфері. Поширення мікроскопічних грибів зумовлено особливостями піщаного ґрунту, які створюють сприятливі умови для їх функціонування у комплексі з бактеріями. До того ж, бітумні покриття, що використовуються для захисту підземних споруд можуть бути додатковим джерелом живлення для мікроміцетів. Наявність мікроскопічних грибів у відібраних зразках свідчить про їх участь в процесах біопшкодження покриття та сталі завдяки оксидазному комплексу ферментів [9]. Тому актуально було дослідити видовий склад комплексу мікроскопічних грибів, що входять до складу корозійного мікробного угруповання і можуть бути його активним компонентом.



Таблиця 2

Визначення гомології гена 16S рРНК штаму М-4.1

Table 2

Determination of homology 16s rRNA gene of strain M-4.1

Довжина фрагменту гена, пн	Результати BLASTN-аналізу		
	Подібність, %	Гомологічний вид	Код GenBank
436	100%	Desulfovibrio sp. H1	FJ225426.1
	92%	Desulfovibrio sp. SM12803	AJ251630.1

Ізольовано 78 культур грибів, які після ідентифікації [4–6] віднесено до 12 видів 5 родів групи *Anamorphic fungi* (табл. 3).

Таблиця 3

Видовий склад комплексу мікроскопічних грибів

Table 3

Specific composition of complex of microfungi

Вид	Ґрунт	Феросфера
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) von Keissl.	+	+
<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlb.) Cohn	+	+
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	—	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	+	—
<i>Cladosporium</i> sp.	+	—
<i>Penicillium corylophyllum</i> Dierckx	+	—
<i>P. cyclopium</i> Westl.	+	—
<i>P. chrysogenum</i> Thom	—	+
<i>P. purpurogenum</i> Stoll	+	—
<i>Penicillium</i> sp.	+	—
<i>Fusarium oxysporum</i> (Schlecht.) Snyd. et Hans	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	—	—

Примітка: «+» — наявність виду; «—» — вид не виявлено

Note: «+» — presence of the species; «—» — the species is not found.



Видове представництво мікроміцетів у ґрунті різноманітніше ніж у феросфері. Зокрема, у ґрунті ідентифіковано 9 видів (відносяться до 5 родів), а у феросфері — 5 видів (відносяться до 4 родів). У ґрунті та феросфері зустрічаються *Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae* та *Fusarium oxysporum*. Для ґрунту спостерігається найбільше видове різноманіття представників роду *Penicillium*.

Таким чином, у феросфері на поверхні пошкодженого вуличного газопроводу, за умов піщаного ґрунту формується корозійно небезпечний за чисельністю та видовим складом комплекс фізіологічних груп бактерій та мікроміцетів. Наявність мікроскопічних грибів родів *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* у ґрунті і феросфері може слугувати додатковою характеристикою, важливою у прогнозуванні агресивності ґрунтів та розробці ефективних засобів захисту підземних споруд.

Н.Р. Демченко, И.Н. Курмакова, А.П. Третяк

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,
ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

ОСОБЕННОСТИ КОРРОЗИОННО АКТИВНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ФЕРРОСФЕРЫ ГАЗОПРОВОДА, ПРОЛОЖЕННОГО В ПЕСЧАНОМ ГРУНТЕ

Реферат

Целью работы было комплексное исследование сульфидогенного сообщества микроорганизмов ферросферы уличного газопровода, проложенного в песчаном грунте и определение его состава. **Методы.** Обнаружение и выделение компонентов сообщества бактерий и комплекса микроскопических грибов проводили методом предельных разведений, высевая суспензию клеток на соответствующие жидкие элективные среды. По количественному и качественному составу бактерий сульфидогенное сообщество ферросферы является коррозийно опасным. Чистые культуры сульфатовосстанавливающих бактерий получали путем многочисленных посевов отдельных колоний на твердой и жидкой средах Постгейта «В». **Результаты.** Выделен доминирующий штамм сульфатовосстанавливающих бактерий — М-4.1, который охарактеризован по морфолого-культуральным признакам и идентифицирован методом полимеразной цепной реакции с использованием универсальных праймеров к фрагментам генов 16S рРНК. При сравнительном анализе секвенсов участков ДНК, которые кодируют ген 16S рРНК исследуемых бактерий с аналогичными последовательностями штаммов из базы данных GenBank, штамм сульфатовосстанавливающих бактерий М-4.1 отнесен к роду *Desulfovibrio*. Микроскопические грибы выделяли посевом соответствующих разведений грунтовой суспензии



в чашки Петри с агаризованной средой Чапека-Докса. Идентификацию грибов проводили на основе их морфолого-культуральных особенностей, используя определители. Изолировано 78 культур микромицетов, которые отнесены к 12 видам 5 родам группы *Anamorphic fungi*. **Выводы.** Таким образом, проведенные исследования показали, что в ферросфере на поверхности поврежденного уличного газопровода, в условиях песчаного грунта формируется коррозионно опасный по численности и видовому составу комплекс физиологических групп бактерий и микромицетов.

Ключевые слова: сульфидогенное микробное сообщество, микромицеты группы *Anamorphic fungi*.

N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, A.P. Tretiak

Chernihiv Shevchenko State Pedagogical University,
53, Getman Polubotok Str., Chernihiv, 14013, Ukraine,
tel.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

FEATURES OF CORROSION ACTIVITY OF MICROBIAL COMMUNITIES OF GAS-PIPELINE FERROSPHERE LAID IN SANDY SOIL

Summary

Aim. To study the sulfidogenic microbial communities road gas-pipeline ferrospheres laid in the sandy soil and the determination of its composition was the aim of this research work. **Methods.** The method of limiting dilution (plating cell suspension to appropriate liquid selection medium) was used for detection and isolation of the components of communities of bacteria and microscopic fungi complex. Due to quantitative and qualitative composition, sulfidogenic community of ferrospheres in corrosive dangerous. Pure cultures of sulfate-reducing bacteria were obtained by planting numerous individual colonies on solid and liquid medium Postgate «B». **Results.** The dominant strain of sulfate-reducing bacteria — M-4.1 described by morphological and cultural characteristics has been isolated and identified by using PCR, with the use of universal primers to the fragments of 16S rRNA genes. When conducting a comparative analysis of DNA sequencer which encodes 16S rRNA gene of tested bacteria with the strains of similar sequences from the GenBank database, sulfate reducing bacteria strain M-4.1 belonging to *Desulfovibrio* genus has been confirmed. Microfungi were isolated by planting soil suspension dilutions with agar Czapek-Dox in Petri dishes. Fungal identification was carried out on the basis of their morphological and cultural features using determinants. 78 microfungi cultures belonging to *Anamorphic fungi* group (12 species of 5 genera), have been isolated. **Conclusions.** Thus, this scientific study has shown that in the ferrospheres on the surface of damaged road gas-pipeline laid in the



sandy soil the corrosion dangerous abundance and species composition of complex physiological bacteria group and micromycetes is formed.

Key words: sulfidogenic microbial community, microfungi of *Anamorphic fungi* group.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреев К.І., Козлова І.П., Коптева Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуриш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. — Київ: Наук. думка, 2005. — 259 с.
2. Абдуліна Д.Р. Розповсюдження корозійно агресивних бактерій у ґрунтах різних біотопів / Д. Р. Абдуліна, Л. Г. Асауленко, Л. М. Пуриш // Біологічні студії. — 2011. — Т. 5, № 1. — С. 1–16.
3. Асауленко Л.Г. Таксономічне положення окремих представників сульфідогенного корозійно-агресивного мікробного угруповання / Л.Г. Асауленко, Д. Р. Абдуліна, Л. М. Пуриш // Мікробіол. журн. — 2010. — Т. 72, № 4. — С. 3–10.
4. Билай В.И. Фузарии / Билай В. И. — К.: Наук. думка, 1977. — 442 с.
5. Билай В.И. Аспергиллы / В. И. Билай, Э.З. Коваль — Киев: Наук. думка, 1988. — 204 с.
6. Визначник грибів України / [Морочковський С.Ф., Зерова М.Я., Лавітська З.Г., Сміцька М.Ф.]. — Київ: Наук. думка, 1969. — Т. 2. — 517 с.
7. Єдина система захисту від корозії та старіння. Методи оцінки біокорозійної активності ґрунтів і виявлення наявності мікробної корозії на поверхні підземних металевих споруд : ДСТУ 3291-95. — [Чинний від 1997-01-01]. — К. : Держстандарт України, 1997. — 28 с. — (Держстандарт України).
8. Микодеструкторы промышленных материалов / Коваль Э.З., Сидоренко Л.П.; Отв. ред. Билай В. И.; АН УССР. Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного. — Киев: Наук. думка, 1989. — 192 с.
9. Герасименко А.А. Микромицетная коррозия металлов. II. Коррозионные электрохимические исследования. Электронная микроскопия. Механизм / А.А. Герасименко // Защита металлов. — 1998. — Т. 34, № 4. — С. 350–359.
10. Методы экспериментальной микологии: Справочник. — Киев: Наук. думка. — 1982. — 550 с.
11. Практикум по микробиологии / Под ред. Н. С. Егорова. — М.: Изд-во Моск. ун-та., 1976. — 306 с.
12. Практикум по биологии почв: Учеб. пособие / Зенова Г.М., Степанов А.Л., Лихачева А.А., Манучарова Н.А. — М: Издательство МГУ, 2002. — 120 с.
13. Hamilton W. A. Sulfate-reducing bacteria and anaerobic corrosion / W.A. Hamilton // Ann. Rev. Microbiol. — 1985. — Vol. 39. — P. 195–217.

Стаття надійшла до редакції 04.07.2013.



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, біосенсиори, діагностичуми, 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 дискові (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 аббревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

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

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



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

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

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

1. *Лопатина Н.В., Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У.* Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. «Микробиол. журн.» — К., 1991. — 7 с. — Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-B92.

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



Instructions for the authors

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

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

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

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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



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

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

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

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

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

Books

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

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

Journals

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

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. № 787. Тираж 100 прим.

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