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

№ 1(25)
2014

Одеса
ОНУ
2014

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 (Чікаго, США), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немялтовський (Варшава, Польща), В.П. Патика (Київ, Україна), Петров С.А. (Одеса, Україна), В.С. Підгорський (Київ, Україна), В.К. Позур (Київ, Україна), В.П. Поліщук (Київ, Україна), А.А. Сибірний (Львів, Україна), Ю.М. Сиволап (Одеса, Україна), М.Я. Співак (Київ, Україна), І.А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф.І. Товкач (Київ, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна)

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

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

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

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

Журнал індексується/реферується в Index Copernicus, Джерело, Україніка наукова.

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, 2014

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), 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).

MBT Journal is indexed in Index Copernicus database and is abstracted in Ukrainian abstract journals "Source" (Dzherelo), and Bibliographic Database "Ukrainika scientific" (Ukrainika Naukova)

Publishibing editor N.G. Yurgelaitis
Editors: L.B. Kotlyarova, I.V. Raiko
Address:
Odesa National Mechnykov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
http: //mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2014

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Н.В. Ліманська, Н.В. Коротаєва, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця
ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА УТВОРЕННЯ ПУХЛИН, СПРИЧИНЕНИХ *RHIZOBIUM RADIOBACTER* 8

Л.О. Білявська, О.Ю. Повниця, Ю.Г. Шермолович, Г.П. Гудзь, Н.В. Нестерова
ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИАДЕНОВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ФТОРОВМІСНИХ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК 19

П.П. Зелена, Ю.М. Юмина, І.В. Домбровська, І.М. Малиновська, В.В. Шепелевич, Л.М. Гриценко, Н.В. Яворська, В.К. Позур, Л.М. Сківка
ВПЛИВ ЕФІРНИХ ОЛІЙ *ANIBA ROSAEODORA, LAURUS NOBILIS, SYZYGIUM AROMATICUM, MENTHA PIPERITA* ТА *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* НА РІСТ МІКРОМІЦЕТІВ 27

О.В. Крисенко, Т.В.Скляр, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко
ОСОБЛИВОСТІ СКЛАДУ МІКРОБНИХ АСОЦІАЦІЙ ТА СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ МІКРОБІОТИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ 35

Мухліс Абедалабас, М.Б. Галкін, Є.Ю. Пахомова, Т.О. Філіпова
КІНЕТИКА БІОСИНТЕЗУ ДИРАМНОЛІПІДІВ ТА АКТИВНІСТЬ РАМНОЗІЛТРАНСФЕРАЗИ 2 ЗА ПРИСУТНОСТІ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ PSEUDOMONAS AERUGINOSA 45

О.С. Радченко, Л.Г. Степура, Ю.М. Юмина, М.О. Борецька, П.П. Зелена
ЗМІНА ДЕЯКИХ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ПІД ВПЛИВОМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ 53

О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, Т.М. Шевченко, О.А. Сірокваша
ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ПЛАНКТОННИХ ТА БІОПЛІВКОВИХ КУЛЬТУР S*TAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* 63

Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Бєляєва, О.Г. Горшкова, І.В. Пузирьова, В.О. Іваниця
ВИДАЛЕННЯ БРОМІДУ ГЕКСАДЕЦИЛПІРИДИНІЮ ІЗ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS* ЗА ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З ГЛИНИСТИМ МІНЕРАЛОМ ТА ХІТОЗАНОМ 72

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

N.V. Limanska, N.V. Korotaeva, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia
EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ON TUMOR FORMATION CAUSED BY *RHIZOBIUM RADIOBACTER* 8

L.O. Biliavska, O.Yu. Povnitsia, Yu.G. Shermolovich, G.P. Gudz, N.V. Nesterova
STUDY OF ANTIADENOVIRAL ACTIVITY OF NEW FLUORINE-CONTAINING HETEROCYCLIC COMPOUNDS 19

P.P. Zelena, Yu.M. Yumyna, I.V. Dombrovska, I.M. Malynovska, V.V. Shepelevych, L.M. Grytsenko, N.V. Yavorska, V.K. Pozur, L.M. Skivka
EFFECT OF ESSENTIAL OILS OF *ANIBA ROSAEODORA, LAURUS NOBILIS*, *SYZYGIUM AROMATICUM*, *MENTHA PIPERITA* AND *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* ON GROWTH OF MICROMYCETES..... 27

O.V. Krysenko, T.V. Skliar, O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha, T.M. Shevchenko
FEATURES OF MICROBIAL ASSOCIATION COMPOSITION AND ANTIBIOTICRESISTANCE OF ORAL CAVITY MICROFLORA 35

Mukhlis Abedalabas, M.B. Galkin, E.Yu. Pahomova, T.O. Filipova
KINETICS OF DIRHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS AND RHAMNOSYLTRANSFERASE 2 ACTIVITY IN THE PRESENCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SIGNAL QUINOLONE..... 45

O. Radchenko, L. Stepura, Iu. Iumyna, M. Boretska, P. Zelena
CHANGING OF SOME *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* BIOLOGYCAL PROPERTIES UNDER EFFECT OF SODIUM DODECYL SULFATE..... 53

O.I. Sidashenko, O.S. Voronkova, T.M. Shevchenko, O.A. Sirokvasha
SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF PLANKTON AND BIOFILM CULTURE OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*..... *63*

T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.A. Beliaeva, O.G. Gorshkova, I.V. Puzyreva, V.O. Ivanytsia
REMOVE OF HEXADECYLPYRIDINIUM BROMIDE FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* IN THEIR INTERACTION WITH CLAY MINERAL AND CHITOSAN 72

І.В. Жерносєкова, О.А. Тимчук, В.П. Ткаченко, А.І. Вінніков
ВПЛИВ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ *STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS* НА РІСТ ПРОРОСТКІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР 79

О.В. Сищикова
БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ТАКСОНОМІЧНИЙ СКЛАД СТРЕПТОМІЦЕТІВ ПРИРОДНИХ ҐРУНТІВ ТА ТЕХНОЗЕМІВ КРИВОРІЖЖЯ 91

АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2013 РОЦІ 105

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 110

I.V. Zhernosekova, A.A. Tymchuk, V.P. Tkachenko, A.I. Vinnikov
EFFECT OF METABOLIC PRODUCTS *OF STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS* ON THE VEGETABLES SPROUTS GROWTH 79

O.V. Syshchykova
STREPTOMYCETES BIOLOGICAL PROPERTIES AND TAXONOMICAL STRUCTURE FROM NATURAL SOILS AND TECHNOZEMS OF KRYVYI RIG AREA 91

ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL "MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY" IN 2013 YEAR..... 105

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS 114

UDC 579.6:634.75

N.V. Limanska, N.V. Korotaeva, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia

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

EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ON TUMOR FORMATION CAUSED BY *RHIZOBIUM RADIOBACTER*

*The **aim** of investigation was to study the effect of Lactobacillus plantarum bacteria and their metabolites on tumor formation in Kalanchoe daigremontiana Mill. plants experimentally inoculated with crown gall agents Rhizobium radiobacter. **Methods**. Leaves of test plants were inoculated with the cultures of bacteria R. radiobacter C58 and three Lactobacillus plantarum strains or their cell-free supernatants (CFS) with primary low pH (4.1–4.3) and with neutralized pH (6.5) in a ratio 1:1. After 45 days amount of samples with tumors and weight of tumor tissues were evaluated, and formation of necroses were checked out. **Results**. Lactobacilli and their supernatants effected tumor formation differently depending on the variant of treatment. Inhibiting activity in a case of all three investigated L. plantarum strains was exhibited by CFS with primary pH (4.1–4.3). Lactobacilli injected in plant tissues simultaneously with the pathogen decreased the amount of crown galled samples both in a case of low initial pH of cultural liquid (strain L. plantarum ONU 87 decreased in 86%, strain L. plantarum ONU 206 – in 95%), and in a case of neutralized pH of cultural liquid (strain L. plantarum ONU 87 decreased in 75%, strain L. plantarum ONU 206 – decreased in 94%). Bacteria of the strain L. plantarum ONU 991 didn't exhibit the inhibiting activity in cases of the treatments with cultures of lactobacilli and with the neutralized supernatant. At the same time, the overnight cultures of all strains showed clear antagonistic activity in vitro. Injecting the cultures of lactobacilli and their supernatants both with low and neutral pH resulted in wide zones of necrosis comparing to that obtained after the injection of tissues with sterile distillated water with the same pH. **Conclusion**. Lactic acid bacteria L. plantarum differ in the level of inhibition of tumor formation caused by R. radiobacter. Strain L. plantarum 206 was the best antagonist in these investigations: both the amount of infected samples and weight of formed tumors significantly decreased in all variants of the treatments. Inhibiting activity of metabolites from the cultural liquid of lactobacteria probably is explained not only with the action of organic acids, but also with the action of bacteriocins and other products of metabolism.*

Key words: Rhizobium radiobacter, Lactobacillus plantarum, inhibition of tumor formation, crown gall, Kalanchoe daigremontiana.

© N.V. Limanska, N.V. Korotaeva, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia, 2014

Bacteria from *Lactobacillus* genus inhabit the rhizosphere and phyllosphere of plants [15], where they can comprise 0.01–1% from the total microbial population [4]. On the leaf surfaces the representatives of species *L. plantarum, L. paracasei, L. fermentum, L. brevis, L. buchneri* can be found [4; 13; 16]. Owing to their antagonistic properties, lactobacilli were studied as the potential agents of biological control of phytopathogens. The significant decrease in the symptoms on haricot beans infected with *Pseudomonas syringae* was detected when plants were treated with the strain *L. plantarum* L292 [18]. It is known that certain strains of lactobacilli and bacterial mixes containing lactobacilli can inhibit Ralstonia solanacearum [12], *Xanthomonas campestris* [5; 17], *Colletotrichum gloeosporioides* [7], *Fusarium* [8], *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* [2; 17].

In previous investigations there were revealed the antagonistic effect of *L. plantarum* in a mixture with autolysate of erwinias against crown gall agent *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter* according to the new nomenclature proposed by Young et al., 2001 [19]), the agents of black foot and soft rot [11; 14]. The aim of the investigation was to study the effect of *Lactobacillus plantarum* bacteria and their metabolites on tumor formation in *Kalanchoe daigremontiana* Mill. plants experimentally inoculated with crown gall agents *Rhizobium radiobacter*.

Materials and Methods

The effect of the three strains of *L. plantarum* from the Collection of the Chair of Microbiology, Virology and Biotechnology of Odesa National I.I. Mechnykov University *L. plantarum* ONU 87, *L. plantarum* ONU 206 and *L. plantarum* ONU 991 was studied. Lactobacilli were cultivated overnight in MRS broth at 37 ºC [6] and used in the experiments in concentration of 10^9 CFU (colony forming units)/ml typical for overnight cultures. To obtain the cell-free supernatant (CFS), overnight cultures in liquid medium were centrifuged at 10 000 g 10 min and filtrated through the bacterial filters with the diameters of pores 0.22 µm (Millipore Millex-GS, Merck Millipore). The effect of supernatants of lactobacilli with primary low and neutralized pH was studied *in vitro* on a lawn of *R. radiobacter* C58 by the well-diffusion method. In the same way the sterile distillated water (SDW) with the low and neutral pH was applied onto the lawn of phytopathogen. The presence of growth inhibition zones was observed after overnight cultivation at 28 ºC.

As test-plants *Kalanchoe daigremontiana* Mill. were used. Plants were infected with bacteria of *R. radiobacter* C58 strain kindly provided by Senior Research Associate of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine Dr. F.I. Tovkach. Rhizobia were cultivated overnight in LB broth [1] at 28 ºC and used for further investigations in concentration of 10^8 CFU/ml.

Inoculations were carried out in three independent experiments by the injection method. In each of the independent experiments, 3–5 injections on a leaf of 25–30 plants were done. 10 µl of overnight rhizobial cultures and tested liquids (overnight cultures of lactobacilli and their supernatants with primary low and neutral pH) in a ratio 1:1 were injected in leaf tissues [9]. The positive control of tumor formation

was the mixture of overnight rhizobial culture and SDW with the same pH as in overnight cultures of lactobacilli. Also SDW was injected in leaves as a control for necroses formation.

After 45 days, amount of crown galled samples, weight of tumor tissues and character of necroses were checked out.

Significant differences between the mean values were estimated by Student's criteria on significance level not less than 95% ($p \leq 0,05$). The data were calculated by the Excel program.

Results of Investigation and Their Discussion

In vitro on Petry's dishes the tested strains of lactobacilli revealed the clear antagonistic activity of overnight cultures and CFS with low pH, which was exhibited as the zones of absence of phytopathogen growth with the diameter of 8–10 mm. The neutralized CFS did not inhibit the growth of *R. radiobacter* C58 that gave us the possibility to hypothesize that the key factor of phytopathogen inhibition was the low pH. To reveal the possible role of acidic medium in inhibition of tumor formation, further investigations *in vivo* were carried out both with the primary low pH 4.1–4.3 and with the neutral pH.

Further investigations *in vivo* have shown that the simultaneous injections of cultures of lactobacilli and their metabolites and inoculation of *K. daigremontiana* with the phytopathogen *R. radiobacter* C58 inhibit tumor formation in the majority of variants of the treatment. Inhibiting activity in cases of all three strains has been exhibited by the CFS with the primary low pH of overnight culture (pH 4.1–4.3). The treatment with the CFS of *L. plantarum* ONU 87 culture decreased the amount of crown galled samples in 71.7% (Fig. 1), *L. plantarum* ONU 206 – in 84,0% (Fig. 2), *L. plantarum* ONU 991 – in 68.1% (Fig. 3).

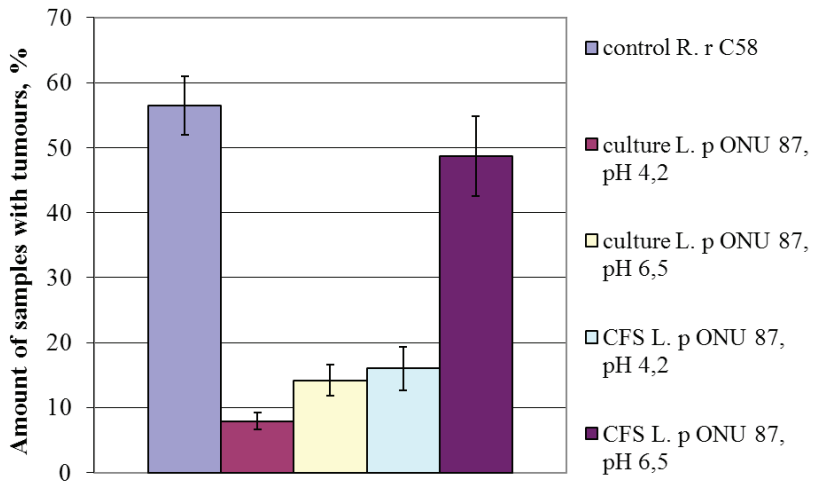


Fig. 1. The effect of bacterial culture and cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 on tumor formation caused by *R. radiobacter* C58 in plants *K. daigremontiana*

Bacterial cultures injected in plant tissues simultaneously with the pathogen decreased the amount of crown galled samples both in case of low initial pH of cultural liquid (strain *L. plantarum* ONU 87 decreased in 86%, strain *L. plantarum* ONU 206 – in 95%) and in case of neutralized pH of cultural liquid (strain *L. plantarum* ONU 87 decreased in 75%, strain *L. plantarum* ONU 206 – decreased in 94%) (Fig. 1 and Fig. 2).

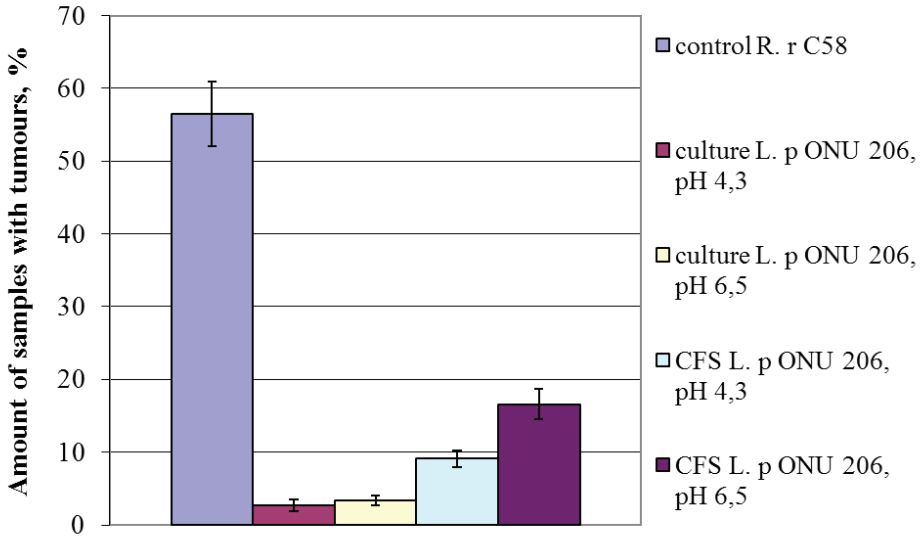


Fig. 2. The effect of bacterial culture and cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* ONU 206 on tumor formation caused by *R. radiobacter* C58 in plants *K. daigremontiana*

The supernatant of the strain *L. plantarum* ONU 206 culture with pH 6.5 also had the inhibiting effect on tumor formation decreasing the amount of infected samples in 70.6%. The neutralized CFS of other strains – *L. plantarum* ONU 87 and *L. plantarum* ONU 991, did not decrease the manifestation of crown gall. Besides, the strain *L. plantarum* ONU 991 did not inhibit any tumorigenic activity of crown gall agent when overnight cultures both with primary pH (4.1) and neutralized pH (6.5) were applied. This fact does not coincide with the results of investigations *in vitro*, when CFS of the *L. plantarum* ONU 991 culture with a primary pH inhibited the growth of phytopathogen as the same effective as the CFS of other strains.

Although the strain *L. plantarum* ONU 991 exhibited antagonistic activity in the tests on phytopathogen lawns, in the investigations on plants its effect on tumor formation was not the same, and only the CFS of overnight culture with initial low pH inhibited the formation of tumors.

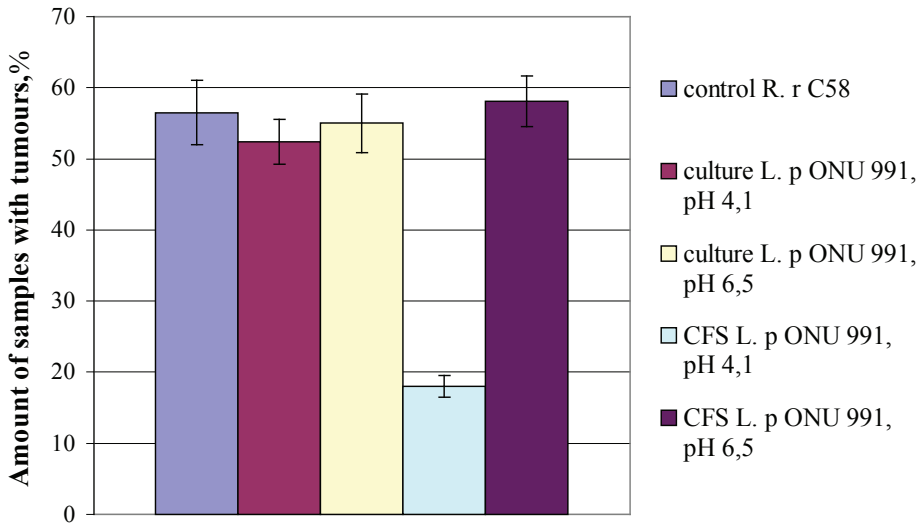


Fig. 3. The effect of bacterial culture and cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* ONU 991 on tumor formation caused by *R. radiobacter* C58 in plants *K. daigremontiana*

The strain *L. plantarum* ONU 206 was the best antagonist in these investigations. Both the amount of infected samples and weight of formed tumors significantly decreased in all variants of the treatments (Fig. 2, Fig. 4, Fig. 5).

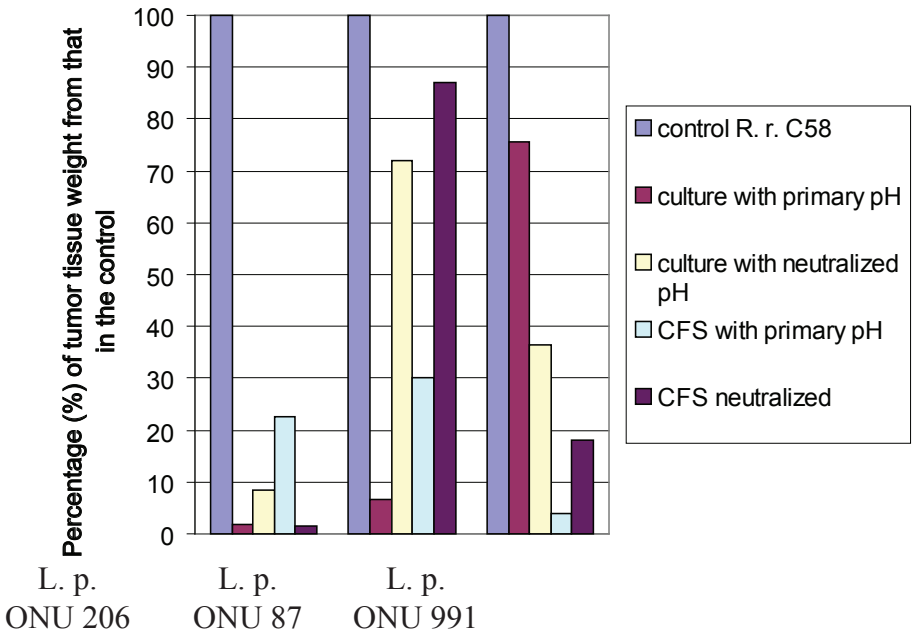


Fig. 4. The percentage of tumor tissue weight in the variants of treatment with the culture and supernatant of *Lactobacillus plantarum* ONU 206 comparing to the control

It is possible to hypothesize that the inhibiting activity of CFS with pH 6.5 is probably caused by the effect of bacteriocins or other antagonistic compounds which should be revealed during the further investigations.

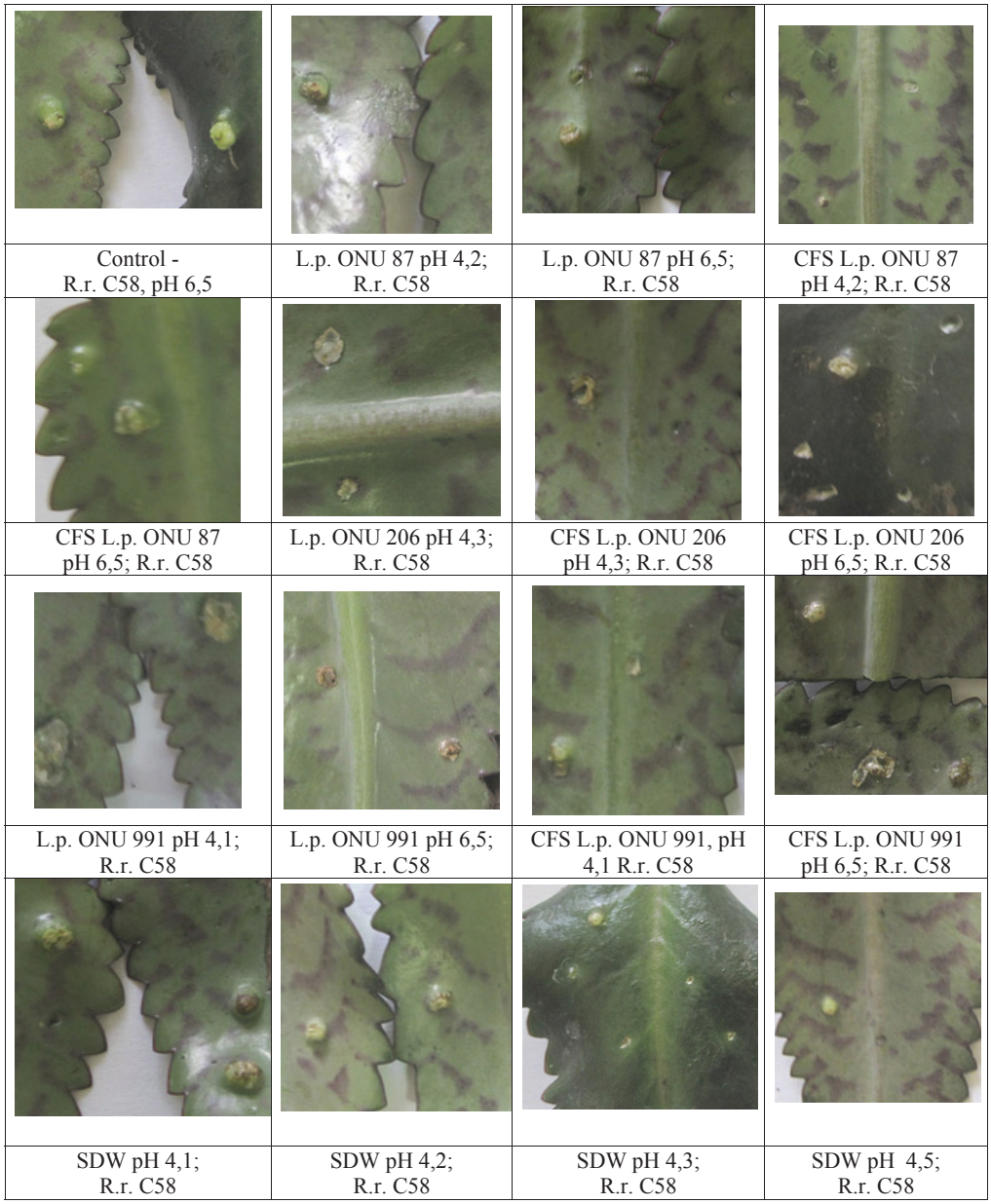


Fig. 5. Tumors formed on *K. daigremontiana* leaves after the inoculations with *R. radiobacter* C58 and different variants of the treatments with cultures of lactobacilli and their CFS

The obtained data show that the injections of bacteria of *L. plantarum* ONU 87 and ONU 206 strains both with pH 4.1–4.3 and pH 6.5 did not differ significantly by the effect of action (Fig. 1, Fig. 2). Thus, in the case of the tested strains the

antagonism is ensured by the presence of bacteria in plant tissues which actively inhibit the phytopathogen action not depending on the primary pH of the injected cultural liquid.

To check out if the low pH of the cultures of lactic acid bacteria and their CFS is the main factor of antagonism, the tests for the effect of SDW with the pH typical for the overnight cultures of *L. plantarum in vitro* and *in vivo* have been carried out. There were no zones of growth inhibition on the lawns of *R. radiobacter* C58. As it is known [10], rhizobia can grow in a wide range of pH including pH 4.0. Thus, only the low pH of the cultures of lactobacilli cannot explain their inhibition effect on tumor formation.

Necroses on kalanchoe leaves formed as the result of separated injections of lactobacilli, their metabolites and SDW with the same low pH were also different (Fig. 6).

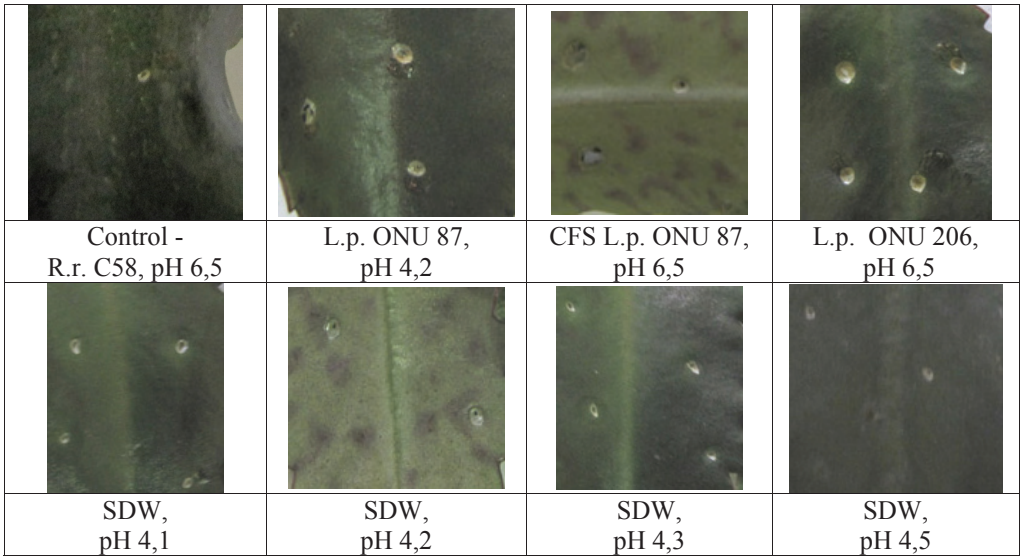


Fig. 6. Necroses formed as the results of injections of bacteria, their metabolites and sterile distillated water with low pH into the kalanchoe leaves

SDW with the low pH caused only the slight necroses spots. Opposite, the injections of the cultures of lactobacilli and their CFS both with low and neutral pH caused the vast zones of necroses. This makes possible to hypothesize that the injection of lactobacilli or their metabolites results in a hypersensitivity reaction which probably leads to inhibition of tumor formation. The fermentative activity of lactobacilli towards wounded plant tissues [3] with the same probability could result in some damages.

Thus, the studied lactic acid bacteria of *L. plantarum* strains differ in the level of inhibition of tumor formation caused by *R. radiobacter* in the experiments *in vivo* on *K. daigremontiana* plants. Strain *L. plantarum* 206 was the best antagonist. Bacteria of this strain significantly decreased both the amount of infected samples

and weight of formed tumors. It was hypothesized that the inhibiting activity of metabolites from the cultural liquid of lactobacteria is explained not only with the action of organic acids, but also with the action of bacteriocins or other products of metabolism which will be the subject of further investigation.

УДК 579.6:634.75

Н.В. Ліманська, Н.В. Коротаєва, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця

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

ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА УТВОРЕННЯ ПУХЛИН, СПРИЧИНЕНИХ *RHIZOBIUM RADIOBACTER*

Реферат

Метою *дослідження було вивчення впливу бактерій Lactobacillus plantarum та їх метаболітів на утворення пухлин у рослин Kalanchoe daigremontiana Mill. за інокуляції збудниками бактеріального раку Rhizobium radiobacter.* **Методи**. *Листя тест-рослин інокулювали культурами бактерій R. radiobacter C58 та трьох штамів Lactobacillus plantarum або їх надосадовими рідинами (НОР) з вихідним низьким значенням pH (4,1–4,3) та з нейтралізованим pH (6,5) у співвідношенні 1:1. Через 45 днів враховували кількість зразків, у яких утворилися пухлини, масу пухлинних тканин і відмічали утворення некрозів.* **Результати**. *Показано, що на утворення пухлин лактобацили та їх надосадові рідини впливали по-різному в залежності від варіанта обробки. Інгібувальну активність у випадку усіх трьох досліджених штамів L. plantarum проявила НОР з вихідним pH (4,1–4,3). Лактобацили, введені у рослинні тканини одночасно із патогеном, зменшували кількість зразків із симптомами бактеріального раку як у випадку низького вихідного pH культуральної рідини (штам L. plantarum ОНУ 87 зменшував на 86%, штам L. plantarum ОНУ 206 – на 95%), так і у випадку нейтралізованого pH культуральної рідини (штам L. plantarum ОНУ 87 зменшував на 75%, штам L. plantarum ОНУ 206 – на 94%). Бактерії штаму L. plantarum ОНУ 991 не проявляли інгібувальної активності у випадку обробки культурами лактобацил, а також нейтралізованою надосадовою рідиною. В той же час добові культури усіх штамів in vitro виявили чітку антагоністичну активність. Введення культур лактобацил та їх надосадових рідин як з низьким, так із нейтральним pH, призводило до поширених зон некрозу у порівнянні з такими за ін'єкцій тканин стерильною дистильованою водою з такими самими значеннями pH.* **Висновок**. *Молочнокислі бактерії штамів L. plantarum відрізняються за рівнем пригнічення пухлиноутворення, спричиненого R. radiobacter. Штам L. plantarum ОНУ 206 виявився найкращим антагоністом у даних випробуваннях: за усіма варіантами обробок істотно зменшувались як кількість інфікованих зразків, так і маса утворених пухлин. Інгібувальна активність продуктів метаболізму, що містяться в культуральній рідині лактобактерій, ймовірно, обумовлена дією не лише органічних кислот, а також бактеріоцинів або інших продуктів метаболізму.*

Ключові слова: Rhizobium radiobacter, Lactobacillus plantarum, пригнічення пухлиноутворення, бактеріальний рак, Kalanchoe daigremontiana.

УДК 579.6:634.75

Н.В. Лиманская, Н.В. Коротаева, А.В. Ямборко, В.А. Иваница

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

ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ, ВЫЗВАННЫХ *RHIZOBIUM RADIOBACTER*

Реферат

Целью *исследования было изучение влияния бактерий Lactobacillus plantarum и их метаболитов на образование опухолей у растений Kalanchoe daigremontiana Mill. при инокуляции возбудителями бактериального рака Rhizobium radiobacter.* **Методы**. *Листья тест-растений инокулировали культурами R. radiobacter C58 и трех штаммов Lactobacillus plantarum или их надосадочными жидкостями (НОЖ) как с первичными низкими значениями pH (4,1–4,3), так и с нейтрализованными pH (6,5) в соотношении 1:1. Через 45 дней учитывали количество образцов с опухолями, массу опухолевых тканей и отмечали образование некрозов.* **Результаты**. *Показано, что на образование опухолей лактобациллы и их надосадочные жидкости влияли по-разному в зависимости от варианта обработки. Ингибирующую активность в случае всех трех исследованных штаммов L. plantarum проявила НОЖ с первичным pH (4,1–4,3). Лактобациллы, введенные в растительные ткани одновременно с патогеном, уменьшали количество образцов с симптомами бактериального рака как в случае низкого первичного pH культуральной жидкости (штамм L. plantarum ОНУ 87 уменьшал на 86%, штамм L. plantarum ОНУ 206 – на 95%), так и в случае нейтрализованного pH культуральной жидкости (штамм L. plantarum ОНУ 87 уменьшал на 75%, штамм L. plantarum ОНУ 206 – на 94%). Бактерии штамма L. plantarum ОНУ 991 не проявляли ингибирующей активности в случае обработки культурами лактобацилл, а также нейтрализованной надосадочной жидкостью. В то же самое время суточные культуры всех штаммов in vitro выявили четкую антагонистическую активность. Введение культур лактобацилл и их надосадочных жидкостей как с низким, так и с нейтральным pH, приводило к обширным зонам некроза по сравнению с такими в случае инъекций тканей стерильной дистиллированной водой с такими же значениями pH.* **Вывод.** *Молочнокислые бактерии штаммов L. plantarum отличаются по уровню угнетения опухолеобразования, вызванного R. radiobacter. Штамм L. plantarum ОНУ 206 выявился лучшим антагонистом в данных испытаниях: во всех вариантах обработок существенно уменьшались как количество инфицированных образцов, так и масса образованных опухолей. Ингибирующая активность продуктов метаболизма, содержащихся в культуральной жидкости лактобактерий, вероятно, обусловлена действием не только органических кислот, а также бактериоцинов или других продуктов метаболизма.*

Ключевые слова: Rhizobium radiobacter, Lactobacillus plantarum, угнетение опухолеобразования, бактериальный рак, Kalanchoe daigremontiana.

LITERATURE

1. *Bertani G.* Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1951. – Vol. 62. – P. 293–300.

2. *Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P.* Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 // Applied Microbiology Biotechnology. – 1998. – Vol. 50. – P. 253–256.

3. *Daeschel M.A., Fleming H.P.* Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations // Proceedings of the symposium "Selection parameters of microorganisms for use in the fermentation of plant foods and beverages". – Academic Press: London, 1984. – P. 303–313.

4. *Daeschel M.A., Andersson R.E., Fleming H.P.* Microbial ecology of fermenting plant materials // FEMS Microbiology Letters. – 1987. – Vol. 46, № 3. – P. 357–367.

5. *Dalirsaber Jalali M., Khosro I., Ghasemi M. F., Tabrizi S. S. Kh.* Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plants // Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. – 2012. – Vol. 9. – P. 480–484.

6. *de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E.* A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.

7. *El-Mabrok A.S.W., Hassan Z., Mokhtar A.M., Aween M.M.* Efficacy of *Lactobacillus plantarum* C5 cells and their supernatant against *Colletotrichum gloeosporioides* on germination rate of chilli seeds // Research Journal of Biological Sciences – 2012. – Vol. 7. – P. 159–164.

8. *Hoda A.H., Yomna A.M., Shadia M.A.-A. In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant // Life Science J. – 2011. – Vol. 8. – P. 462–468.

9. *Kawaguchi A., Inoue K., Nasu H.* Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1 // J Gen Plant Pathol. – 2007. – Vol. 73. – P. 133–138.

10. *Kersters K., De Ley J.* Genus III. *Agrobacterium* Conn /Ed. by N.R. Krieg, J.G. Holt. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Vol. 1. – Williams and Wilkins Co.: Baltimore-London, 1984. – P. 244–254.

11. *Korotaeva N.V., Kondratiuk T.V., Basiul O.V., Krylova K.D., Yamborko G.V., Ivanytsia V.O., Limanska N.V.* Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 in mixture with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58 // Microbiology and Biotechnology. – 2013. – Vol. 22, № 2. – P. 6–14.

12. *Lwin M., Ranamukhaarachchi S.L.* Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations // Int. J. Agricult. Biol. – 2006. – Vol. 8, № 5. – P. 657–660.

13. *Müller M., Lier D.* Fermentation of fructans by epiphytic lactic acid bacteria // Journal of Applied Bacteriology. – 1994. – Vol. 76. – P. 406–411.

14. *Sergeeva Zh.U., Krylova K.D., Limanska N.V., Vasyleva N.U., Tovkach F.I., Ivanytsia V.O.* Influence of bacteria *Lactobacillus plantarum* ONU-87 and autolysate of bacteria *Erwinia carotovora* ZM1 on soft rot disease infectious process // Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 20, № 4. – P. 18–28.

15. *Shurkhno R.A., Validov Sh.Z., Boronin A.M., Naumova R.P.* Modeling of lactic acid fermentation of leguminous plant juices // Appl. Biochemistry Microbiol. – 2006. – Vol. 42, № 2. – P. 204–209.

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

17. *Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E.* Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // International Microbiology. – 2008. – Vol. 11. – P. 231–236.

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

19. *Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H.* A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajude et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola* and *R. vitis* // Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2001. – 51. – P. 89–103.

Стаття надійшла до редакції 10.02.2014 р.

УДК 578.826:615.281

Л.А. Белявская[1], О.Ю. Повница[1], Ю.Г. Шермолович[2], А.П. Гудзь[2], Н.В. Нестерова[1]

[1]Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина, e-mail: bilyavskal@ukr.net;
[2]Институт органической химии НАН Украины, ул. Мурманская 5, Киев, 02660, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАДЕНОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

***Цель работы**: исследование цитотоксического действия и антивирусной активности новых фторсодержащих нуклеозидных соединений на модели аденовируса человека и определение роли отдельных фрагментов молекул в их активности. **Методы.** Цитотоксическое действие соединений определяли колориметрическим МТТ-методом. Антивирусную активность веществ изучали цито-морфологическим методом по наличию вирусспецифических внутриядерных включений, применяя краситель акридиновый оранжевый. **Результаты.** В данной работе исследована цитотоксичность 2N-замещенных-4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов для клеточных линий Hep-2 и Hela. Выявлена зависимость токсичности соединений от структуры заместителей в ароматических кольцах молекул. Сочетание остатков 3-хлор–тетрагидропирана, 3-хлор–тетрагидрофурана или дигидрофурана в гликозидной части молекулы с трифторметилом или перфторпропилом в триазольном кольце усиливало токсичность соединений. In vitro показана анти HAdV5 активность 3-х соединений (G7, G8 и G10). Эффективная антивирусная концентрация (EC_{50}) для них составляла 16, 70 и 186 мкг/мл, а индекс селективности был равен 91, 8 и 4, соответственно. **Выводы.** Высокие показатели антивирусной активности и незначительная цитотоксичность соединения G8 делают его перспективным в плане разработки антивирусного средства, направленного на преодоление инфекций, вызванных аденовирусами.*

Ключевые слова: фторсодержащие нуклеозиды, аденовирус, антивирусная активность.

Аденовирусы человека (HAdV) занимают третье место по распространенности в группе острых респираторных вирусных инфекций. Особенностью аденовирусной инфекции является ее способность к различной тяжести поликлинических проявлений. Вирусы вызывают острые и хронические респираторные заболевания, пневмонии, конъюнктивиты, гастроэнтериты, геморрагические циститы. В некоторых случаях аденовирусы могут вызывать гепатиты, миокардиты, менингоэнцефалиты, лимфадениты, гаймориты [1]. Тяжелое течение заболеваний наблюдается у детей младшего возраста, иммунодефицитных лиц и пациентов после трансплантации [12, 14, 15]. HAdV могут длительное время

© Л.А. Белявская, О.Ю. Повница, Ю.Г. Шермолович, А.П. Гудзь, Н.В. Нестерова, 2014

находиться в латентном состоянии в лимфоидных тканях, оказывать иммунодепрессивное действие и активироваться под влиянием различных факторов.

В мире пока не создано высокоэффективных специфических лицензированных препаратов для лечения аденовирусной инфекции [7, 8], поэтому, актуальным остается поиск препаратов и схем терапии, которые были бы не только эффективны и безопасны даже при длительном применении, но и доступны по стоимости для широкого круга пациентов.

Целью работы было исследование цитотоксического действия и антивирусной активности новых фторсодержащих нуклеозидных соединений на модели аденовируса человека и определение роли отдельных фрагментов молекул в их активности.

Материалы и методы

В работе использовали культуры перевиваемых клеток Hep-2 – клетки карциномы гортани человека и HeLa – карциномы шейки матки. Клетки культивировали согласно общепринятой методике [3]. Эталонный штамм аденовируса человека 5 серотипа (HAdV5) получен из коллекции Института микробиологии Будапештского медицинского университета. Вирус накапливали на культуре клеток Hep-2, хранили при – 20 °С [3].

Гетероциклические соединения, с различными заместителями в нуклеиновом основании 2*N*-замещенные-4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолы (табл. 1): трифторметил (G14, G6, G8, G10, G12), перфторпропил (G7, G9, G11, G13), толилсульфонил (G6-G14) и гликозидным фрагментом: 3-хлортетрагидрофуран (G8, G9), 3-хлортетрагидропиран (G6, G7), дигидрофуран (G12, G13), дигидропиран (G10, G11). Соединения до концентрации 20 мг/мл растворяли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma, США) и хранили до использования при +4 °С. Рабочие серийные двукратные разведения соединений от 1 мг/мл до 64 мкг/мл готовили на среде для культур клеток без сыворотки (RPMI–1640, Sigma, США) непосредственно перед использованием. Стерилизовали растворы фильтрованием через шприцевые мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Sarstredt, Германия).

Цитотоксическое действие соединений определяли с помощью МТТ-теста по стандартной методике [10]. Используя программу линейной регрессии Microsoft Excel10 для Pentium Pro, определяли концентрацию соединений, подавляющую жизнеспособность клеток на 50% по сравнению с контролем (CC_{50}).

Для выявления инфицированных аденовирусом клеток, содержащих вирусоспецифические включения [2], клетки Hep-2 или Hela выращивали в пробирках с полосками покровных стекол. Через 24 часа среду удаляли и клетки инфицировали вирусом с множественностью 10–20 ВОЕ/клетку. После адсорбции вируса в течение 1,5 ч при комнатной температуре клетки отмывали раствором Хенкса и добавляли поддерживающую среду, содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях. На каждую концентрацию использовали по 3 пробирки с клетками. В качестве контроля использовали клетки, инфицированные аденовирусом при отсутствии соединений в среде

(контроль вируса). Результаты учитывали через 48 ч. Клетки отмывали раствором Хенкса, фиксировали 96° этиловым спиртом и хранили при комнатной температуре до дальнейшего исследования. С целью выявления внутриядерных ДНК-содержащих вирусспецифических включений клетки отмывали раствором Хенкса, флюорохромировали 0,01% раствором акридинового оранжевого в течение 1–5 мин и исследовали в люминесцентном микроскопе МЛ- 2 (ЛОМО, Россия), используя объектив 40х. На каждом из 3-х стекол определяли количество клеток с включениями из 500 подсчитанных клеток монослоя. Ингибирующее влияние соединений на репродукцию вируса определяли по редукции числа инфицированных клеток в опыте по сравнению с контролем, этот показатель выражали в процентах и определяли по формуле [4]: Процент ингибирования = 100 – (О*100/К), где К – количество клеток с включениями в контроле, О – количество клеток с включениями в опыте.

За эффективную концентрацию (EC_{50}) принимали ту, что вызывала уменьшение на 50% числа клеток с включениями. Для определения EC_{50} использовали программу линейной регрессии Microsoft Exel10 для Pentium Pro.

Результаты и их обсуждение

Критерием оценки специфической активности лекарственных соединений в культуре клеток является индекс селективности (SI), как отношение CC_{50} (цитотоксической концентрации, которая на 50% подавляет жизнеспособность клеток) к EC_{50} (эффективной концентрации, которая на 50% ингибирует репродукцию вируса) [4]. Малотоксичные препараты, значительно подавляющие репродукцию вируса, имеют высокий показатель SI, могут иметь и значительный лечебный эффект.

Было проведено исследование цитотоксического действия новых фторсодержащих гетероциклических соединений в двух линиях перевиваемых клеток, чувствительных к аденовирусам человека: HeLa и Hep-2. Результаты анализа цитотоксического действия соединений приведены в таблице. Большое количество соединений было плохо растворимо в среде для культур клеток, такие соединения были, преимущественно, токсичные для клеток HeLa. По цитотоксичности соединения условно поделили на токсичные (в концентрации до 300 мкг/мл) и малотоксичные (от 300 мкг/мл и выше).

Токсическое действие соединений отличалось в зависимости от использованной линии клеток, что, возможно, связано с функциональными особенностями клеток. Так, соединения G6, G7, G12 были более токсичны для клеток HeLa, их CC_{50} составляла 194–298 мкг/мл, тогда как для линии клеток Hep-2 показатель токсичности всех соединений был больше 500 мкг/мл.

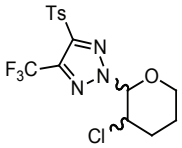
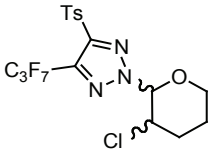
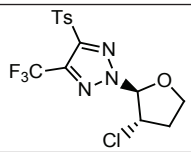
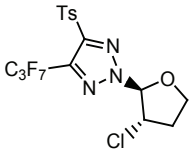
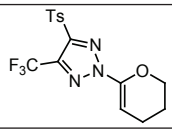
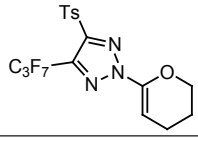
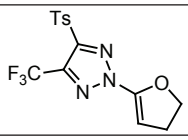
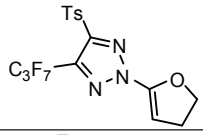
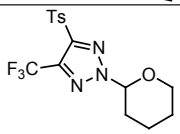
Выявлена зависимость токсичности соединений от структуры заместителей в ароматических кольцах молекул. Очевидно, токсичность вызвана сочетанием остатков 3-хлор-тетрагидропирана, 3-хлор-тетрагидрофурана или дигидрофурана в гликозидной части молекулы с трифторметилом или перфлуорпропилом в триазольном кольце.

Таблица

Биологическая активность фторсодержащих соединений

Table

Biological activity of fluorine-containing compounds

Шифр	Структурная формула	Раство-римость*	Цитотоксичность веществ (CC_{50}), мкг/мл		Антиаденовирусная активность (EC_{50}), мкг/мл
			HeLa	Hep-2	
G6		плохая	194	941	Н.а
G7		плохая	218	665	186±5,9
G8		хорошая	473	1461	16±3,6
G9		плохая	310	640	Н.а
G10		хорошая	387	573	70±4,9
G11		плохая	536	2127	Н.а
G12		плохая	298	535	Н.а.
G13		хорошая	309	500	Н.а.
G14		плохая	339	650	Н.а.

Примечания: * – растворимость в питательной среде RPMI1640; Н.а – нет активности

Для изучения антивирусной активности соединений использовали не токсичные концентрации, ниже CC_{50} (от 250 мкг/мл). Схемы внесения были следующими: обработка клеток за 1–2 часа до заражения (1); присутствие во время адсорбции вируса (2); внесение соединений после адсорбции и отмывки клеток от не адсорбированного вируса, в составе поддерживающей среды (3); совместная инкубация вируса и соединений с последующим инфицированием этой смесью клеток – вирулицидная активность (4).

При использовании 1, 2 и 4 схем обработки клеток не выявлено какого-либо влияния соединений на репродукцию аденовируса (данные не приводятся). При внесении соединений G6, G9, G12, G13 после адсорбции вируса (схема 3) не наблюдалось снижения количества инфицированных клеток со специфическими внутриядерными ДНК-содержащими включениями в сравнении с контролем вируса, т.е. эти соединения не влияли на репродукцию вируса. Угнетение репродукции HAdV5 показано для соединений G7, G8 и G10 (табл.). В концентрации 20 мкг/мл соединение G8 ингибировало репродукцию HAdV5 на 62%, а в концентрации 4 мкг/мл – на 16%. Соединение G10 в концентрации 20 мкг/мл угнетало репродукцию HAdV5 на 43%, в концентрации 4 мкг/мл – на 10%. Соединение G7 ингибировало репродукцию HAdV5 на 61% в концентрации 250 мкг/мл, на 42% и 21% в концентрациях 125 и 62 мкг/мл, соответственно.

Эффективная антивирусная концентрация, вызывающая редукцию 50% вирусспецифических внутриядерних включений, (EC_{50}) для G8 и G10 составляла 16 и 70 мкг/мл, а индекс селективности был равен 91 и 8, соответственно. EC_{50} для G7 равнялась 186 мкг/мл. Возможно, антивирусная активность соединений вызвана наличием остатка трифторметила в триазольном кольце молекулы.

Наибольшее число антивирусных препаратов, внедренных в медицинскую практику – нуклеозиды, модифицированные в гетероциклическом, фосфатном или углеводном фрагментах молекул. Пиримидиновые и пуриновые основания входят в структуру молекулы нуклеиновых кислот как фосфорилированные N-гликозиды, их изменение, путем замены групп атомов или отдельных атомов, приводит к получению аномальних антиметаболитов, имитирующих природные, способных вступать в биохимические реакции и нарушать нормальный метаболический процесс [5].

Десятилетние исследования в области химии фтор-сахаров и нуклеозидов послужили основой для разработки ряда перспективных химиотерапевтических препаратов с противоопухолевыми и антивирусными активностями. А усовершенствование методов синтеза соединений позволило создать на их основе известные лекарственные препараты. Известно, что введение атома фтора в гетероциклические системы значительно влияет на физические, химические и биологические свойства молекулы. Дальнейший прогресс в этом направлении исследований связан с синтезом новых фторированных нуклеозидов, а также более глубоком понимании механизмов их действия. [6, 9,11,13].

Поскольку соединения G8 и G10 не обладали вирулицидной активностью и не влияли на адсорбцию вируса, а их действие показано только в случае присутствия соединений непосредственно во время репродукции аденовиру-

са, то можно предположить, что аномальные нуклеозиды G8 и G10 влияли на репликацию вирусной ДНК.

Таким образом, изучена цитотоксическая и антиаденовирусная активность 9-ти новых фторированных нуклеозидов. Выявлена зависимость цитотоксичности соединений от структуры заместителей в ароматических кольцах молекул. Показана антиаденовирусная активность для соединений G8 и G10, которая, возможно, вызвана наличием остатка трифторметила в триазольном кольце молекулы. Высокие показатели антивирусной активности и незначительная цитотоксичность соединения G8 делают его перспективным в плане разработки антивирусного средства, направленного на преодоление инфекций, вызванных аденовирусами.

Л.О. Білявська[1], О.Ю. Повниця[1], Ю.Г. Шермолович[2], Г.П. Гудзь[2], Н.В. Нестерова[1]

[1]Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна,
e-mail: bilyavskal@ukr.net,
[2] Інститут органічної хімії НАН України, вул. Мурманська 5, Київ, 02660, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИАДЕНОВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ФТОРОВМІСНИХ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК

Реферат

Мета роботи: *дослідження цитотоксичної дії і антивірусної активності нових фторовмісних нуклеозидних сполук на моделі аденовірусу людини і визначення ролі окремих фрагментів молекул в їх активності.* **Методи**. *Цитотоксичну дію сполук визначали колориметричним МТТ-методом. Антивірусну активність речовин вивчали цито-морфологічним методом за наявністю вірусспецифічних внутрішньоядерних включень, застосовуючи барвник акридиновий оранжевий.* **Результати.** *У даній роботі досліджено цитотоксичність 2N-заміщених-4-тозил-5-поліфторалкіл-1,2,3-триазолов для клітинних ліній Hep-2 і Hela. Виявлено залежність токсичності сполук від структури замісників в ароматичних кільцях молекул. Поєднання залишків 3-хлор-тетрагідропірану, 3-хлор-тетрагидрофурану або дигідрофурану в глікозидній частині молекули з трифторметилом або перфторпропілом в триазольному кільці посилювало токсичність сполук. In vitro показано антиHAdV5 активність 3-х сполук (G7, G8 і G10). Ефективна антивірусна концентрація (EC50) для них складала 16, 70 і 186 мкг/мл, а індекс селективності дорівнював 91, 8 і 4, відповідно.* **Висновки**. *Високі показники антивірусної активності і незначна цитотоксичность сполуки G8 роблять її перспективною в плані розробки антивірусного засобу, спрямованого на подолання інфекцій, викликаних аденовірусами.*

Ключові слова: фторовмісні нуклеозиди, аденовірус, антивірусна активність.

L.O. Biliavska[1], O.Yu. Povnitsia[1], Yu.G. Shermolovich[2], G.P. Gudz[2], N.V. Nesterova[1]

[1]D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03680, Ukraine, e-mail: bilyavskal@ukr.net
[2]Institute of Organic Chemistry NAS of Ukraine, 5, Murmanska str., Kyiv, 02660, Ukraine

STUDY OF ANTIADENOVIRAL ACTIVITY OF NEW FLUORINE-CONTAINING HETEROCYCLIC COMPOUNDS

Summary

Purpose: *To study the cytotoxic action and antiviral activity of new fluorinated nucleoside compounds on human adenovirus model and the role of individual molecular fragments in their activity.* **Methods.** *Cytotoxic activity of the compounds was determined by the MTT method. Antiviral activity of substances was studied using cyto-morphological method with acridine orange dye. The virus-specific intranuclear inclusions were determined.* **Results.** *In present study the cytotoxicity of 2N-substituted-4-tosyl-5-polyfluoroalkyl-1,2,3-triazoles for Hep-2 and Hela cell lines were studied. The dependence of cytotoxicity on the compounds in the structure of substituents in the aromatic rings of the molecules was defined. Combination of residues of 3-chloro-tetrahydropyran, 3-chloro-dihydrofuran tetrahydrofuran in a glycosidic moiety with trifluoromethyl or perfluoropropyl in a triazole ring were more toxic. Antiviral activity of 3 compounds (G7, G8 and G10) against HAdV5 in vitro was revealed. The effective antiviral concentrations (EC_{50}) for them were 16, 70 and 186 mg/ml, and the selectivity indexes were equal to 91, 8 and 4, respectively.* **Conclusions.** *High rates of antiviral activity and low cytotoxicity of G8 compound make it perspective for development antiviral agents.*

Key words: fluoro-containing nucleosides, adenovirus, antiviral activity.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Дяченко Н.С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л.Н. и др.* Аденовирус, клетка, организм / Киев: Наук. думка, 1988. – 232 с.
2. *Носач Л.Н., Дяченко Н.С.* Цитопатология аденовирусной инфекции. – К.: Наукова думка. – 1982. – 124 с.
3. *Носач Л.Н., Дяченко Н.С., Тарасишин Л.А. и др.* Влияние рибамидила на экспрессию аденовирусного генома//Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 1984. – № 11. – С. 41–45.
4. *Носач Л.Н., Повница О.Ю.* Доклиническое исследование специфического антивирусного действия лекарственных средств в культуре клеток на модели аденовируса. Методические рекомендации // Вестник фармакологи и фармации. – 2007, № 9. – С. 52–64.
5. *Посібник* з хіміотерапії вірусних інфекцій: Навчально-методичний посібник для лікарів/за ред. Дзюблік І.В. – К., 2004. – 176 с.

6. *Filler R, Saha R.* Fluorine in medicinal chemistry: a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights // Future Med.Chem. – 2009. –Vol. 1. – P. 777–791.

7. *Hovarth J., Kulcsar G., Ugryumov I. et al.* Effect of adenovirus infection on human peripheral lymphocytes // Acta Microbiologica. – 1983. – Vol. 30. – № 3. – P. 203–209.

8. *Kinchington P., Romanowski E., Gordon G.* Prospects for adenovirus antivirals // J of Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – Vol. 55. – P. 424–429.

9. *Liu P., Sharon A., Chu C.K.* Fluorinated nucleosides: synthesis and biological implication // J.Fluor.Chem. – 2008. – Vol. 129. – P. 743–766.

10. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and surviral:application to proliferation and cytotoxicity assays//J Immunol. Methods. – 1983. – 65. – P. 55–63.

11. *Qiu X.L., Xu X.H., Qing F.L.* Recent advances in the synthesis of fluorinated nucleosides //Tetrahedron. – 2010. – Vol. 66. – P. 789–843.

12. *Runde V., Ross S., Trenschel R. et al.* Adenoviral infection after allogenic stem cell transplantation (SCT) report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi centre surveillance study // Bone Marrow Transplantation. – 2001. – 28 – P. 51–57.

13. *Strunecka A., Patocka J., Connett P.* Fluorine in medicine // J.Applied Biomedicine. – 2004. – Vol. 2. – P. 141–150.

14. *Walls T., Shankar A.G., Shingadia D.* Adenovirus: an increasingly important pathogen in pediatric bone marrow transplant patients // Lancet.Infect. Dis. – 2003. – 3. – P. 79–86.

15. *Wang W.H., Wang H.L.* Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature // Arch. Pathol. Lab.Med. – 2003. – 127. – P. 246–248.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2014 р.

УДК 579.61; 579.63; 57.044

P.P. Zelena[1], Yu.M. Yumyna[1], I.V. Dombrovska[1], I.M. Malynovska[2], V.V. Shepelevych[1], L.M. Grytsenko[1], N.V. Yavorska[1], V.K. Pozur[1], L.M. Skivka[1]

[1]Educational and Scientific Centre "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01601,
Phone +380679988064 ; Fax +380445253841; e-mail: realmed@i.com.ua
[2]National research centre "Institute of agriculture of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, 2-b, Mashynobudivnykiv str., Chabany, Kyevo-Svyatoshunskyi district, Kyiv region, Ukraine, 08162

EFFECT OF ESSENTIAL OILS OF *ANIBA ROSAEODORA*, *LAURUS NOBILIS*, *SYZYGIUM AROMATICUM*, *MENTHA PIPERITA* AND *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* ON GROWTH OF MICROMYCETES

Aim: *to investigate the effect of essential oils (EOs) of rosewood Aniba rosaeodora Ducke, laurel Laurus nobilis L, clove Syzygium aromaticum (L.) Merr. &L.M. Perry, mint Mentha piperita L. and lavender Lavandula angustifolia Mill. on the mycelial growth and spore germination of Alternaria alternata (Fr.) Kiessl, Aspergillus ochraceus G. Wilh. and Penicillium chrysogenum Thom was performed.* ***Methods:*** *tested fungi were isolated from contaminated carrot seeds, stored tomatos and spikelets of wheat. Agar diffusion method and modified agar diffusion and vapor assay were used.* ***Results:*** *EOs of rosewood, clove and laurel exerted a potent dose dependent inhibitory effect on mycelial growth of tested fungi. Mycelium of micromycetes was more sensitive to the fungistatic action of EOs than their conidia. This EO at the concentrations of 1.5µl/ml caused prolonged total inhibition of mycelial growth and spore germination of all tested fungi.* ***Conclusion:*** *these findings support the potential use of EO of Aniba rosaeodora as well as EOs of Laurus nobilis and Syzygium aromaticum for natural food protection against mold infestation.*

Key words: essential oil, antimicrobial activity, micromycetes.

In spite of the introduction of new antifungal drugs, they are limited in number. The increase of fungal resistance to classical drugs justify the search for new strategies. Essential oils are one of the most promising groups of natural compounds from which a new prototype of antifungal agents may be developed. The antifungal activity of plant essential oils (EOs) are commonly used in medicine [9]. Relatively new fields of application for EO antifungal effect are stored product protection against mold infestation and post harvest preservation of fruits and vegetables [5, 8, 10]. The possibility of application of fungicidal and fungistatic potentials of EOs in agriculture and food industry is being extensively investigated [1, 2]. Particularly, EOs of Mentha piperita and Lavandula angustifolia showed strong antifungal activity

© P.P. Zelena, Yu.M. Yumyna, I.V. Dombrovska, I.M. Malynovska, V.V. Shepelevych, L.M. Grytsenko, N.V. Yavorska, V.K. Pozur, L.M. Skivka, 2014

against post-harvest phytopathogenic fungi [3]. Syzygium aromaticum EO exibited potential antifungal capacity against fungi causing spoilage of bakery products [4]. Antifungal activity of many EOs with broad spectrum of biological effects such as EOs from the plants belonging to Lauraceae family, is vitrually not studied [11, 13]. The application of EOs as medicinal agents or food preservatives requires detailed knowledge about their properties, i.e., the minimum inhibitory concentration (MIC), the range of target organisms etc.

The purpose of this paper was to investigate the effect of EOs of *Aniba rosaeodora* Ducke*, Laurus nobilis* L*, Syzygium aromaticum* (L.) Merr. &L.M. Perry*, Mentha piperita* L. *and Lavandula angustifolia* Mill. on mycelial growth and spore germination of *Alt. alternata* (Fr.) Kiessl*, A. ochraceus* G. Wilh. and *P.chrysogenum* Thom.

Materials and Methods

Alternaria alternata 37/8, *Aspergillus ochraceus* 5/7, *Penicillium chrysogenum* 10/3 were stock cultures of the Department of Microbiology and Genegal Immunology of the ESC "Institute of Biology" of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Tested fungi were isolated from contaminated carrot seeds, stored tomatos and spikelets of wheat.

We have used EO of *Aniba rosaeodora* Ducke obtained from "Aromatika", (Ether-oil seed plant, Alushta, Ukraine) and EOs of *Laurus nobilis* L., *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. &L.M. Perry, *Mentha piperita* L., *Lavandula angustifolia* Mill. obtained from PE firm "Nikitskiy sad" (Yalta, Ukraine) in our experiments.

A.alternata, A.ochraceus and *P. chrysogenum* have been precultured on PDA slant at 28 °C for 14 days.

The assessment of mycelia growth was performed as it was described by Marinelli et al., 2012 [7]. The EOs were dissolved in Tween 80 and then incorporated in the PDA at 0.5; 1.0; 1.5; 3.0; 5.0; 10.0 µl/ml (the concentration of Tween 80 did not exceed 0.1%), were vigorously agitated and poured sterilized Petri dishes. Growth medium for control probes contained 0.1% of Tween 80. PDA with EO as well as control PDA were inoculated with 6 mm plugs from fungi cultures (7 days old). The Petri dishes were subsequently sealed with the use of parafilm and incubated at 28 °C. The fungi growth was recorded after 6, 15 and 21 days. Radial growth of tested fungi was evaluated by the easurement of colony diameter. Growth inhibition was calculated as the percentage of inhibition of radial growth relative to the control probes in which colonia diameter was 90 mm using the Abbott's formula: $T=(D_k - D_e)/D_k \times 100$, where D_k – an average diameter of fungal colony from control samples, D_e – an average diameter of fungal colony from treatment samples [14].

The effect of EO on spore germination was tested in PDA with the use of agar diffusion and vapor assay as it was described earlier with some modifications [6]. Conidia were taken from the slants with the use of sterile saline contained of 0.05% Tween 80. Mycelia were removed by filtration through sterile gauze. One ml of adjusted to $1x10^8$ conidia/ml conidial suspension was added to 100 ml of agar medium containing 1% peptone, 1% glucose, 1% agarose at 50 °C. EOs at the volume of 10, 20, 30, 60, 100 and 200 µl were aseptically pipetted onto sterile 6-mm paper discs

(Becton Dickinson). The EO impregnated paper discs were then aseptically placed in the center of the Petri dish with PDA (20 ml). Agar media containing conidia (10 ml) was then overlaid on the surface of PDA. The Petri dishes were subsequently sealed with the use of parafilm and incubated at 28°. The diameter of inhibition zone was recorded after 6, 14 and 21 days of culturing as well as after 6 month.

All the experiments were performed in quadruplicate. Each experiment was repeated four times. The data are presented as M± SD.

Results and discussion

EOs exerted dose dependent inhibitory effect on mycelial growth of Alt. alternata, *A.ochraceus* and *P. chrysogenum* as it was determined by the agar dilution method (Table 1). EOs of mint and lavender demonstrated weak fungistatic activity towards Alt. alternata and *P. chrysogenum* only at the concentrations of ≥10 μl/ml. EOs of laurel and cloves exerted inhibitory effect for 17 days when they were applied at the concentrations of ≥ 1.5 μl/ml. The most potent fungistatic activity was registered for rosewod EO.

Micromycetes had distinct sensitivity to EOs. Mycelial growth of Alt. alternata and *A. ochraceus* was more sensitive to inhibitory effect of rosewood oil than that of *P. chrysogenum*. *A. ochraceus* was sensitive only to the impact of rosewood and clove EOs. Sessou P. et al. have also demonstrated high fungistatic activity of clove EO against fungal isolates from foodstuff and they regard this EO as the most promising agent to be used as additive in substitution of synthetic chemicals ones to extend shelf life time of cheese [12].

The inhibitory effect of EOs on mycelial growth of tested fungi was weakening with the course of time. Fungistatic effect of EOs of clove, mint and lavender after 15 days of cultivation was 2–2.5 times lower than that after 6 days of cultivation. The inhibitory effect of EOs of rosewood and laurel was more stable over time. Inhibitory effect of rosewood EO was the most prolonged (up to 24 days). However, the effect of this EO used at the concentrations of 0,5 μl/ml and 1,0 μl/ml after 21 days of cultivation was at the average 1.8 times lower than that after 15-day treatment. The mycelial growth of all fungi was inhibited 100% when treated with rosewood EO at the concentration of 1.5 μl/ml independently of the duration of cultivation.

The numerous literature data indicate that EOs are highly effective in vapor phase against micromycetes [4, 6, 15]. Modified agar diffusion and vapor method was developed to minimize the evaporation of volatile fraction of EOs, which was pipetted onto a paper disc. Being applied to the surface of a paper disc EOs of rosewood, laurel and clove inhibited spore germination of all tested fungi (Table 2). The most expressed fungistatic activity was registered for *Aniba rosaeodora* EO. The inhibitory effect of this EO on spore germination detected by modified agar diffusion and vapor method was comparable to those on mycelial growth of tested fungi. Rosewood oil (total volume 30 μl) hampered spore germination of *P. chrysogenum* up to the fourteenth day of cultivation, *A. ochraceus* – up to the 21-th day of cultivation. We did not observe spore germination of Alt. alternata treated with roseewood EO (total volume 30 μl) throughout 6 months.

Table 1

The effect of essential oils of *Aniba rosaeodora, Laurus nobilis, Syzygium aromaticum, Mentha piperita, Lavandula angustifolia* on mycelial growth of *Alt. alternata, A. ochraceus* and *P. chrysogenum* determined by an agar dilution assay

Microorganism	Mycelial growth inhibition (%)														
	***Aniba rosaeodora* essential oil (µl/ml)**			****Laurus nobilis* essential oil (µl/ml)**			****Syzygium aromaticum* essential oil (µl/ml)**			*****Mentha piperita* essential oil (µl/ml)**			******Lavandula angustifolia* essential oil (µl/ml)**		
	0.5	**1.0**	**1.5**	**1.5**	**3.0**	**5.0**	**1.5**	**3.0**	**5.0**	**3**	**5**	**10.0**	**3**	**5**	**10.0**
	After 6 days of cultivation														
Alt. alternata	100	100	100	0	25.4±2.5	79.5±3.5	0	0	21.3±1.9	0	0	40.5±4.3	0	0	0
A. ochraceus	100	100	100	0	0	30.2±1.6	30.8±2.4	67.8±3.6	80.4±3.7	0	0	0	0	0	0
P. chrysogenum	34.6±1.1	100	100	0	44.7±3.6	81.6±4.5	21.3±1.5	54.9±2.3	72.1±2.2	0	0	36.9±2.8	0	0	56.4±3.6
	After 15 days of cultivation														
Alt. alternata	69.7±4.1	81.3±2.6	100	0	14.6±1.8	52.9±2.8	0	0	0	0	0	18.2±2.0	0	0	0
A. ochraceus	70.0±4.6	90.1±3.3	100	0	0	26.2±1.1	16.4±0.9	20.6±2.4	32.2±2.4	0	0	0	0	0	0
P. chrysogenum	25.6±1.5	83.3±4.1	100	0	0	77.3±3.2	16.5±1.8	18.3±2.9	35.4±2.8	0	0	18.4±1.8	0	0	31.2±3.2

Notes: tested micromycetes were cultured on PDA at 28 °C.
*- fungistatic effect of rosewood EO was registered up to 23 days of cultivation.
** – fungistatic effect of these EOs used at the concentrations < 1.5 µl/ml was absent. The inhibitory action leasted for 17 days and has ceased then.
*** – fungistatic effect of these EOs used at the concentrations < 3.0 µl/ml was absent. The inhibitory action leasted for 17 days and has ceased then.

Table 2

The effect of essential oils of *Aniba rosaeodora*, *Laurus nobilis*, *Syzygium aromaticum* on spore germination of *Alt. alternata, A. ochraceus* and *P. chrysogenum* determined by modified agar diffusion and vapor assay

Microorganism	Inhibition zone (mm)								
	Aniba rosaeodora essential oil (µl)			*Laurus nobilis*** essential oil (µl)			*Syzygium aromaticum*** essential oil (µl)		
	10	20	30	20	60	100	20	60	100
Alt. alternata	55.0±1.5	TI*	TI	0	20.0±1.0	47.6±0.5	0	0	15.1±0.6
A. ochraceus	TI	TI	TI	0	0	20.3±0.5	18.2±0.4	45.0±0.7	50.3±0.5
P. chrysogenum	27.0±2.0	55.0±1.0	TI	0	34.5±0.8	40.0±0.6	19.0±2.0	33.4±0.4	49.5±0.5

Notes: confluent growth was registered on the control untreated Petri dishes (diameter 90 mm).
* – TI – total inhibition
** – inhibitory effect of these EOs applied to the surface of paper disc at the volume of < 20 µl was absent.

Conclusion

Thus, EOs of rosewood, laurel and clove inhibited mycelial growth of Alt. alternata, *A. ochraceus* and *P. chrysogenum* that were isolated from contaminated carrot seeds, stored tomatos and spikelets of wheat. Significant inhibition of spore germination of tested fungi was observed in the probes treated with rosewood EO. Moderate inhibitory effect on spore germination was also registered for EOs of clove and laurel. Conidia of Alt. alternata and *A. ochraceus* were less sensitive to EOs than vegetative tissues of these fungi. The most potent fungistatic effect was registered for *Aniba rosaeodora* EO. Our findings support the potential use of essential oils of *Aniba rosaeodora*, *Laurus nobilis* and *Syzygium aromaticum* for natural food protection against mold infestation.

П.П. Зелена[1], Ю.М. Юмина[1], І.В. Домбровська[1], І.М. Малиновська[2], В.В. Шепелевич[1], Л.М. Гриценко[1], Н.В. Яворська[1], В.К. Позур[1], Л.М. Сківка[1]

[1] ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601
[2] Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН України», вул. Машинобудівників, 2-б, смт Чабани, Києво-Святошинський район, Київська обл., 08162, Україна

ВПЛИВ ЕФІРНИХ ОЛІЙ *ANIBA ROSAEODORA*, *LAURUS NOBILIS*, *SYZYGIUM AROMATICUM*, *MENTHA PIPERITA* ТА *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* НА РІСТ МІКРОМІЦЕТІВ

Реферат

Мета: *дослідити вплив ефірних олій (ЕО) трояндового дерева Aniba rosaeodora Ducke, лавра Laurus nobilis L, гвоздики Syzygium aromaticum (L.) Merr. &L.M. Perry,*

м'яти Mentha piperita L. та лаванди Lavandula angustifolia Mill. на ріст міцелію та проростання спор Alternaria alternata (Fr.) Kiessl, Aspergillus ochraceus G. Wilh. and Penicillium chrysogenum Thom. **Методи:** *гриби виділені з інфікованого насіння моркви, зіпсованої плодоовочевої продукції (томати), закладеної на зберігання, та колосся пшениці. У дослідженнях застосовували метод серійних розведень у щільному поживному середовищі та модифікований метод паперових дисків. Результати: ЕО трояндового дерева, лавра та гвоздики справляли сильний дозозалежний гальмівний вплив на ріст міцелію тестованих грибів. Міцелій грибів був більш чутливим до фунгістатичної дії ЕО, ніж їх спори. ЕО трояндового дерева у концентрації 1,5 мкг/мл спричиняла довготривале повне інгібування росту міцелію та проростання спор усіх тестованих грибів.* **Висновок:** *отримані результати свідчать на користь можливості застосування ЕО Aniba rosaeodora, а також ЕО Laurus nobilis та Syzygium aromaticum як природного засобу захисту продуктів харчування від зараження цвільовими грибами.*

Ключові слова: ефірні олії, антимікробна активність, мікроміцети.

П.П. Зеленая[1], Ю.М. Юмина[1], И.В. Домбровская[1], И.М. Малиновская[1], В.В. Шепелевич[1], Л.М. Гриценко[1], Н.В. Яворская[1], В.К. Позур[1], Л.М. Скивка[1]

[1]УНЦ "Институт биологии" Киевского национального университета имени Тараса Шевченко ул. Владимирская, 64/13, Киев, Украина, 01601

[2] Национальный научный центр «Институт земледелия НААН Украины», ул. Машиностроителей, 2-б, пгт Чабаны, Киево-Святошинский район, Киевская обл., 08162, Украина

ВЛИЯНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ *ANIBA ROSAEODORA, LAURUS NOBILIS*, *SYZYGIUM AROMATICUM*, *MENTHA PIPERITA* И *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* НА РОСТ МИКРОМИЦЕТОВ

Реферат

Цель: *исследовать влияние эфирных масел (ЭМ) розового дерева Aniba rosaeodora Ducke, лавра Laurus nobilis L, гвоздики Syzygium aromaticum (L.) Merr. &L.M. Perry, мяты Mentha piperita L. и лаванды Lavandula angustifolia Mill. на рост мицелия и проростание спор грибов Alternaria alternata (Fr.) Kiessl, Aspergillus ochraceus G. Wilh. и Penicillium chrysogenum Thom. Методы: грибы выделены из инфицированных семян моркови, испорченной плодоовощной продукции (томаты), заложенной на хранение, и колосьев пшеницы. В исследованиях применяли метод серийных разведений в плотной питательной среде и модифицированный метод бумажных дисков. Результаты: ЭМ розового дерева, лавра и гвоздики оказывали сильное ингибиторное действие на рост мицелия тестируемых грибов. Мицелий грибов был более чувствителен к фунгистатическому действию ЭМ, чем их споры. ЭМ розового дерева в концентрации 1,5 мкг/мл вызывало продолжительное тотальное угнетение роста мицелия и прорастания спор всех тестированных грибов.* **Вывод:** *полученные результаты свидетельствуют в пользу возможности применения ЭМ Aniba rosaeodora, а также ЭМ Laurus nobilis и Syzygium aromaticum в качестве природного средства защиты продуктов питания от заражения плесневыми грибами.*

Ключевые слова: *эфирные масла, антимикробная активность, микромицеты.*

LITERATURE

1. *Antunes M.D., Gago C.M., Cavaco A.M., Miguel M.G.* Edible coatings enriched with essential oils and their compounds for fresh and fresh-cut fruit // Recent Pat. Food Nutr. Agric. – 2012. – 4(2). – P. 114–122.

2. *Ayala-Zavala J.F., González-Aguilar G.A., del-Toro-Sánchez L.* Enhancing safety and aroma appealing of fresh-cut fruits and vegetables using the antimicrobial and aromatic power of essential oils // J. Food Sci. – 2009. –74(7). – P. 84–91.

3. *Behnam S., Farzaneh M., Ahmadzadeh M., Tehrani A.S.* Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogens // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. – 2006. – 71(3 Pt B). – P. 1321–1326.

4. *Guynot M.E., Ramos A.J., Setó L., Purroy P., Sanchis V., Marín S.* Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products // J. Appl. Microbiol. – 2003. – 94, №5. – P. 893–899.

5. *Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L.* Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components // Front. Microbiol. – 2012. – 3, № 12. – doi: 10.3389/fmicb.

6. *Inouye S., Uchida K., Maruyama N., Yamaguchi H., Abe S.* A Novel Method to Estimate the Contribution of the Vapor Activity of Essential Oils in Agar Diffusion Assay // Jpn. J. Med. Mycol. – 2006. – 47, № 2. – P. 91–98.

7. *Marinelli E, Orzali L., Lotti E., Riccioni L.* Activity of Some Essential Oils against Pathogenic Seed Borne Fungi on Legumes // Asian J. Plant Pathol. – 2012. – № 6. – P. 66–74.

8. *Palou L., Smilanick J.L., Crisosto C.H.* Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit // J. Food. Prot. – 2009. –72, № 5. – P. 1037–1046.

9. *Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R.* Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties- an overview // Forsch. Komplementmed. – 2009. – 16, № 2. – P. 79–90.

10. *Reuveni M., Prusky D.* Improved control of moldy-core decay (Alternaria alternata) in Red Delicious apple fruit by mixtures of DMI fungicides and captan // Eur. J. Plant Pahtol. – 2007. – 118 (4). – P. 349–357.

11. *Sampaio Lde. F., Maia J.G., de Parijós A.M., de Souza R.Z., Barata L.E.* Linalool from rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) oil inhibits adenylate cyclase in the retina, contributing to understanding its biological activity // Phytother. Res. – 2012. – 26, № 1. – P. 73–77.

12. *Sessou P., Farougou S., Ahounou S., Hounnankpon Y., Azokpota P., Youssao I., Sohounhloue D.* Comparative study of antifungal activities of six selected essential oils against fungal isolates from cheese wagashi in Benin // Pak J Biol Sci. – 2013. – 16(23). – P. 1751–1757.

13. *Sienkiewicz M., Kowalczyk E., Wasiela M*. Recent patents regarding essential oils and the significance of their constituents in human health and treatment // Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. – 2012. – 7(2). – P. 133–140.

14. *Sinclair JB., Dhingra OD.* Basic Plant Pathology Methods, 2nd Edition. – Boca Raton; Florida: CRC-Press, 1995. – 448 p.

15. *Tyagi A. K., Malik A*. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against candida albicans: microscopic observations and chemical characterization of cymbopogon citratus // BMC Complement Altern. Med. –2010. – 10; 10: 65.

Стаття надійшла до редакції 27.11.13

УДК 579.61:616.3

О.В. Крисенко, Т.В.Скляр, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
e-mail: microviro@rambler.ru, тел. +38(056) 374 97 34

ОСОБЛИВОСТІ СКЛАДУ МІКРОБНИХ АСОЦІАЦІЙ ТА СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ МІКРОБІОТИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ

Мета. *Вивчити склад мікробіоценозу ротової порожнини в нормі та у хворих на генералізований пародонтит та характеризувати стійкість ізольованих мікроорганізмів до антибіотиків.* ***Методи***. *Проведено бактеріологічне дослідження зразків матеріалу від осіб з генералізованим пародонтитом різного ступеня тяжкості у стадії загострення. Здатність до плівкоутворення ізолятів стафілококів вивчали на пластикових планшетах. Чутливість клінічних штамів до антибіотиків визначали методом дифузії в агар з використанням паперових дисків (НИЦФ, РФ).* ***Результати***. *Показано, що у хворих на генералізований пародонтит мікробіота переважно представлена асоціаціями: S. aureus, S. epidermidis, Bacteroides spp., Actinomyces spp., Candida spp., P. aeruginosa та Streptococcus spp. З виділених при пародонтиті стафілококів біоплівку утворювали 30,4% ізолятів S. aureus, 82,9% – S. epidermidis, 25,0% – S. saprophyticus, що відповідає їх стійкості до лінкоміцину та еритроміцину. Найбільш ефективними щодо мікрофлори пародонтальних кишень були офлоксацин (понад 60 % чутливих штамів, за винятком Veilonella spp., Bacteroides spp.) і кліндаміцин (понад 50 % чутливих штамів, за винятком P. aeruginosa, E. coli, Actinomyces spp., Veilonella spp.), найменш ефективним – еритроміцин (6,7–37,0% чутливих штамів, за винятком стафілококів та стрептококів).* ***Висновки***. *Показано, що при генералізованому пародонтиті асоціації умовно-патогенних мікроорганізмів відіграють провідну роль. Виявлена здатність до плівкоутворення серед ізолятів стафілококів може бути одним із можливих пояснень підвищеного рівня їх стійкості до лінкоміцину та еритроміцину.*

Ключові слова: мікробіота ротової порожнини, чутливість до антибіотиків, біоплівкоутворення.

Порожнина рота є однією з відкритих порожнин тіла людини, яка характеризується можливістю вільного обміну мікроорганізмами із зовнішнім середовищем. Серед бактерій, що потрапляють до порожнини рота, можуть бути не лише сапрофіти, але й умовно-патогенні та патогенні. Входячи до складу асоціацій, ці бактерії можуть колонізувати ротову порожнину, виявляти адгезивні властивості та здатність до плівкоутворення, що в свою чергу зумовлює підвищення колонізаційного потенціалу утворюваних асоціацій, зміни у

© О.В. Крисенко, Т.В.Скляр, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко, 2014

метаболічних процесах, розвиток стійкості до антибіотиків і сприяє розвитку запальних процесів, у тому числі, і пародонтиту.

Захворювання пародонту поширені серед населення багатьох країн світу, а їх етіологія і патогенез до теперішнього часу повністю не розкриті [5, 6]. У розвитку захворювань периодонту важливу роль відводять представникам мікробіоти порожнини рота [1]. Найважливішою ланкою системного та місцевого лікування генералізованого пародонтиту є антибактеріальна терапія [2]. В цьому сенсі значні труднощі викликає вибір лікарських засобів для антибактеріальної терапії, оскільки біоценоз ясенних тканин включає значну кількість видів мікроорганізмів, їх патогенними властивостями і чутливістю до антибіотиків. Відомо, що зростання стійкості до антибіотиків може бути пов'язано з перебуванням бактерій у складі біоплівки. Так, виявлення, наприклад, мікроорганізмів родів *Porphyromonas, Fusobacterium, Eubacterium, Staphylococcus* та ряду інших свідчить на користь можливості існування біоплівки у пародонтальних кишенях [13, 15, 16].

Вирішенню проблеми успішного лікування пародонтиту може сприяти рання ідентифікація мікроорганізмів ясенних тканин та подальше визначення чутливості виділеної мікробіоти до антибіотиків із метою вибору оптимальних засобів лікування [12].

Метою роботи було вивчення складу мікробіоценозу ротової порожнини в нормі та у хворих на генералізований пародонтит, а також характеристика стійкості ізольованих патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів до антибіотиків.

Матеріали і методи

Проведено мікробіологічне дослідження у 60 хворих на генералізований пародонтит різного ступеня тяжкості у стадії загострення. Вік хворих коливався від 24 до 59 років. Дослідження включало: забір клінічного матеріалу (вміст пародонтальних кишень, над'ясенні і під'ясенні зубні відкладення, слина). Контрольну групу склали 35 осіб із клінічно здоровими тканинами пародонту. Для дослідження використовували вміст пародонтальних кишень, у пацієнтів контрольної групи – зубний наліт. Для визначення таксономічної належності ізолятів з пародонтальних кишень і нальоту матеріал висівали на диференційно-діагностичні середовища; інкубацію проводили при 37 °С впродовж 24–72 год. Ідентифікацію виділених чистих культур проводили за переліком культуральних та фізіолого-біохімічних ознак згідно визначника Бергі [14]. Всього було виділено та ідентифіковано 570 штамів мікроорганізмів.

Для виділених штамів стафілококів проводили вивчення здатності до плівкоутворення з використанням експрес-тесту (модифікована методика): у лунках імунологічного планшету протягом 72 год вирощували культуру ізоляту (на 200 мкл м'ясо-пептонного бульйона вносили 1×10^6 КУО/мл суспензії клітин). Після завершення часу культивування видаляли залишки середовища і відмічали характер росту культури: якщо на стінках лунок планшета залишалася плівка, то ізолят вважали плівкоутворювальним [4].

В експерименті визначали чутливість клінічних штамів до антибіотиків відповідно до наказу №167 МОЗ України методом дифузії в агар [9, 11], використовуючи диски з лінкоміцином, кліндаміцином, тетрацикліном, еритроміцином, офлоксацином. Такий вибір антибіотиків ґрунтується на тому, що вони є найбільш використовуваними у клінічній пародонтології препаратами.

Результати та їх обговорення

Відомо, що нормобіоз (еубіоз) здорової ротової порожнини зумовлений наявністю в ній переважно *Lactobacillus spp., Streptococcus sanguis, S. mitis* та інших непатогенних стрептококів, які зустрічаються в усіх суббіотопах ротової порожнини (табл. 1).

Таблиця 1

Основні представники нормобіозу ротової порожнини та їх локалізація

Table 1

The main representatives of oral cavity normal flora and their localization

Вид мікроорганізмів	Слина	Язик	Зубні відкладення	
			над'ясенні	під'ясенні
Streptococcus salivarius	+	+	-	-
Streptococcus sanguis	+	+	+	+
Streptococcus mitis	+	+	+	+
Streptococcus milleri	+	±	±	-
Lactobacillus spp.	+	+	±	±
Actinomyces spp.	+	+	+	±
Fusobacterium spp.	-	-	±	±
Capnocytophaga	-	-	±	±
Treponema spp.	-	-	±	±
Bacteroides spp.	-	-	±	±
Veillonella spp.	±	±	±	±

Примітка: "+" постійно присутні, "±" іноді присутні, "-" відсутні

При вивченні складу мікробіоти ротової порожнини у контингенті контрольної групи та осіб з пародонтитом було виділено 56 штамів *Lactobacillus spp*. та 37 штамів непатогенних *Streptococcus spp*. Лактобацили було виявлено у 94,3% зразків дослідженого матеріалу від здорових осіб та у 38,3% зразків від осіб з пародонтитом, непатогенні стрептококи – у 62,9% зразків від здорових осіб та у 25,0% зразків від осіб з пародонтитом. Загалом, стан мікробіоти здорових ясенних тканин характеризується низькою величиною мікробних

популяцій умовно-патогенних мікроорганізмів, в той час як при розвитку патології периодонту останні починають переважати.

Всього було виділено 477 штамів умовно-патогенних мікроорганізмів, з яких 74 – від здорових осіб, 403 – від хворих на пародонтит. За результатами ідентифікації було встановлено приналежність виділених штамів до родів: *Bacteroides spp.* – 54 штами, *Peptostreptococcus spp.* – 27, *Fusobacterium spp.* – 19, *Actinomyces spp.* – 30, *Candida spp.* – 65, *Veilonella spp.* – 28; видів: *Staphylococcus aureus* – 47, *S. epidermidis* – 45, *S. saprophyticus* – 33, *Streptococcus pyogenes* – 32, *S. mutans* – 77, *Escherichia coli* – 15, *Pseudomonas aeruginosa* – 5.

Отримані нами результати узгоджуються з даними ряду інших авторів [7, 8], але є невеликі розбіжності в кількісному складі мікроорганізмів, що скоріше за все пов'язано з особливостями досліджених груп пацієнтів. Як ми зазначали вище, *Lactobacillus spp*., *S. sanguis, S. mitis* зустрічалися в усіх суббіотопах ротової порожнини та віднесені нами до резидентної мікробіоти, що узгоджується з результатами дослідження А.П. Левицького [7], де *Lactobacillus spp*., *S. sanguis, S. mitis* складали близько 95% та були віднесені до індигенної мікробіоти ротової порожнини. В дослідженнях Мащенко І.С. та Самойленко А.В. [8], вказані бактерії зустрічалися у всіх осіб контрольної групи та були визнані представниками нормобіозу ротової порожнини.

Перелік мікроорганізмів, виділених із пародонтальних кишень хворих на генералізований пародонтит, свідчить про їх різноманітну таксономічнуприналежність. Порівняльний аналіз результатів проведених експериментально-клінічних досліджень представлений в табл. 2.

Як видно із отриманих даних, за частотою виділення мікробів у хворих на генералізований пародонтит у складі мікробних асоціацій переважає група анаеробних бактерій – бактероїди, пептострептококи, вейлонели виділялися відповідно у 85%, 38,3%, 45% хворих. Майже у всіх обстежених хворих на генералізований пародонтит під час дослідження із високою частотою виділяли представників резидентної мікробіоти: непатогенні стрептококи 25% хворих, епідермальні і сапрофітні стафілококи відповідно у 53,3% хворих і у 40% хворих.

Проведено вивчення здатності до утворення біоплівки виділених штамів стафілококів. Встановлено, що з усіх виділених при пародонтиті ізолятів золотистих стафілококів здатністю до плівкоутворення характеризувалися 14 (30,4%). Єдиний ізолят золотистого стафілокока, виділений від здорової особи, не проявляв здатності до утворення біоплівки.

Серед ізолятів епідермального стафілокока відсоток здатних до плівкоутворення був вищим – 77,8% (35 ізолятів). З них виділені від осіб з пародонтитом 29 (82,9%) ізолятів були плівкоутворювальними, натомість серед ізолятів епідермального стафілокока, які були виділені від здорових осіб, частка плівкоутворювальних штамів була меншою – 6 (17,1%), що може свідчити на користь того, що плівкоутворення є додатковим чинником, який ускладнює патологічний процес. Тобто вірогідним є те, що здатність до плівкоутворення може корелювати із розвитком пародонтита, ускладнюючи його перебіг.

Таблиця 2

Частота виділення мікроорганізмів із вмісту пародонтальних кишень у хворих на генералізований пародонтит

Table 2

The frequency of selection of microorganisms containing periodontal pockets in patients with generalized periodontitis

Назва мікроорганізмів	Абсолютна кількість хворих /(%)	
	Контрольна група, n =35	Досліджувана група, n =60
Staphylococcus aureus	1 / 3%	46 / 76,7%
Staphylococcus epidermidis	13 / 37%	32 / 53,3%
Staphylococcus saprophyticus	9 / 26%	24 / 40%
Streptococcus pyogenes	2 / 5,7%	30 / 50%
Streptococcus mutans	27 / 77,1%	50 / 83,3%
Непатогенні *Streptococcus spp.*	22 / 62,9%	15 / 25%
Escherichia coli	4 / 11%	11 / 18,3%
Bacteroides spp.	3 / 8%	51 / 85%
Peptostreptococcus spp.	4 / 11%	23 / 38,3%
Fusobacterium spp.	2 / 6%	17 / 28,3%
Actinomyces spp.	3 / 8%	27 / 45%
Candida spp.	8 / 23%	57 / 95%
Veilonella spp.	1 / 3%	27 / 45%
Pseudomonas aeruginosa	0	5 / 8,3%

Частка ізолятів сапрофітного стафілокока, здатних до плівкоутворення, була значно меншою – 21,2% (7 ізолятів). Серед виділених від здорових осіб плівкоутворювальним був лише 1 ізолят (11,1%), а серед виділених при пародонтиті – 6 (25%) ізолятів.

У 28,3% пацієнтів були виявлені фузобактерії, в той же час серед контингенту контрольної групи фузобактерії були виявлені у 6% хворих**.** Їх протеолітичні ферменти беруть активну участь в розвитку генералізованого пародонтиту, виразково-некротичного гінгівостоматиту [3].

Звертає на себе увагу висока частота виявлення у хворих на генералізований пародонтит дріжджоподібних грибів роду *Candida*. За даними літератури, вони можуть зустрічатися в порожнині рота у 30–50% здорових людей [7, 10]. У даному дослідженні пацієнти контрольної групи були носіями кандид у 23% випадків**.** Високе виявлення (у 95% хворих на генералізований пародонтит)

штамів *Candida* у пародонтальних кишенях може свідчити про зниження неспецифічної резистентності, фагоцитарних реакцій імунітету, також зниження синтезу секреторних імуноглобулінів А [10]. У 8,3% хворих були виявлені *P. aeruginosa*, які найчастіше спричиняють гнійно-запальні процеси і загострення генералізованого пародонтиту.

Отримані результати дозволяють зробити висновок, що такі мікроорганізми як *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacteroides spp., Actinomyces spp., Candida spp., Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococcus spp.* є одними із найголовніших агентів, що спричиняють розвиток генералізованого пародонтиту. Вони є активними продуцентами протеолітичних ферментів, у тому числі колагенолітичних ензимів, гіалуронідази, хондроітинсульфатази. Під дією цих ферментів розщеплюється колаген – основний білок тканин пародонта. Це приводить до руйнування зв'язкового апарату зуба і пародонту в цілому.

Проведені дослідження по визначенню *in vitro* чутливості виділених штамів до найчастіше вживаних у клінічній пародонтології антибіотиків: лікоміцину, кліндаміцину, тетрацикліну, еритроміцину, офлоксацину. Результати досліджень показали, що вказані антибіотики виявляють різну активність щодо виділених мікроорганізмів (рис. 1).

При оцінці чутливості до лінкоміцину виявлена його низька ефективність відносно *S. aureus* – 62% чутливі, ентеробактерій – 0%, *Actinomyces spp.* – 60%, *Bacteroides spp.* – 55,6%, *P. aeruginosa* – 0%. Так, 34,4–40,3% штамів стрептококів, 40% штамів ентеробактерій, 60% *Pseudomonas aeruginosa*, 46,7% *Actinomyces spp.* були стійкі до дії тетрацикліну. Більш вираженою антибактеріальною ефективністю характеризувався офлоксацин, до якого чутливими були: 93,3% ізолятів *Escherichia coli,* 80,9% – *S. aureus,* 78,8% – *S. saprophyticus,* 78,9% – *Fusobacterium spp.* Найменш ефективним виявився еритроміцин, стійкими до дії якого було більше 40% досліджених ізолятів. Виключення становили ізоляти стрептококів, серед яких відсоток чутливих ізолятів становив – 46,9–50,6%. Оцінка антибактеріальної активності кліндаміцину показала, що 33,3 % штамів ентеробактерій були чутливі до його дії, а стрептококи, стафілококи близько 64–90 %, *Bacteroides spp.* – 57,4%, *Actinomyces spp.* – 50%, стрептококи – близько 84–90%.

Для виділених плівкоутворювальних штамів стафілококів виявлено стійкість до лінкоміцину та еритроміцину, що, вірогідно, може бути пояснено даними про функціональний стан клітин у складі плівки. Так, вважається, що ряд клітин (персистери) мають значно знижену активність метаболічних процесів. Для вказаних антибіотиків мішенню дії є 50S-субодиниця рибосоми. Тому висока стійкість до цих препаратів може вказувати на низьку інтенсивність синтезу білка, що в свою чергу може бути пов'язано зі зниженими метаболічними властивостями ряду бактеріальних клітин у складі біоплівки, однак, це питання потребує додаткового вивчення виділених ізолятів. Також на користь існування біоплівки можуть свідчити отримані дані про видовий спектр мікроорганізмів у зубній бляшці, так як склад мікробіоти ясенних карманів, визначений нами

при пародонтиті, відповідає існуючим відомостям про типовий склад бактерій у біоплівці порожнини рота [13, 15, 16].

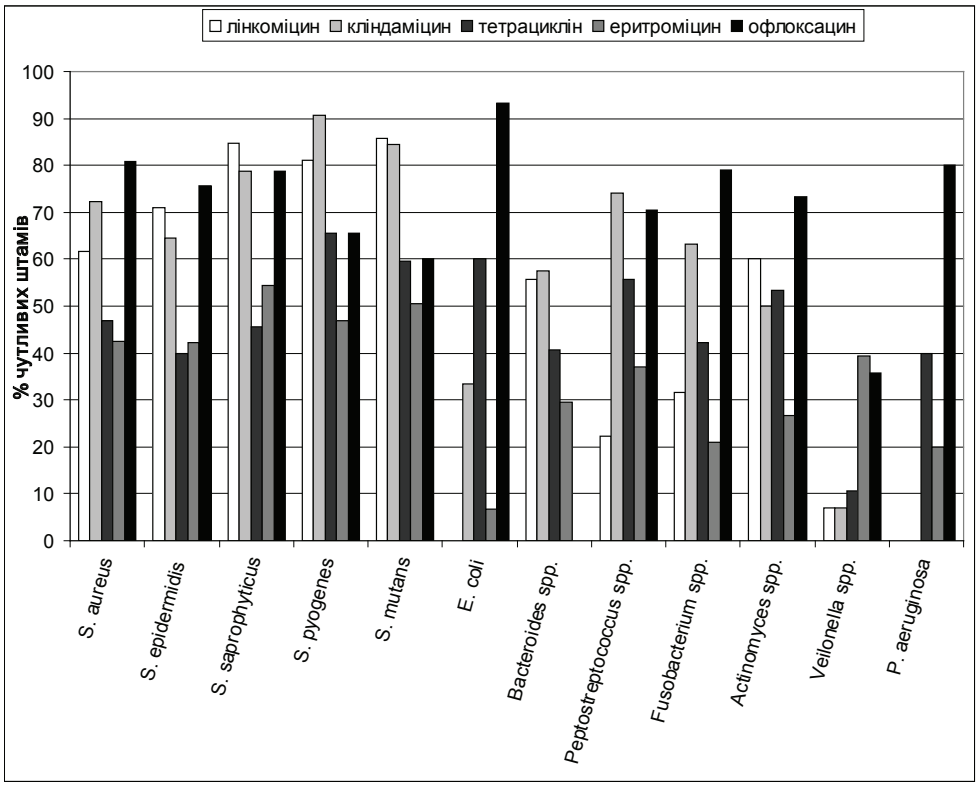


Рис. 1. Частота виявлення чутливих до антибіотиків бактерій (%)

Fig.1. Frequency of isolation of bacteria sensitive to antibiotics (%)

Проаналізувавши дані літератури і власні спостереження, можна зробити висновок, що препаратом вибору для лікування хворих з генералізованим пародонтитом є препарати кліндаміцин та офлоксацин. Перший – це антибіотик групи лінкозамідів, напівсинтетичний дериват лінкоміцина з широким спектром антимікробної дії, ефективною адсорбцією в травному тракті. Кліндаміцин має імуномодулювальну дію, легко проникає у більшість біологічних рідин і тканин організму, створює високі концентрації у ясенній рідині (85% від концентрації в сироватці крові), слині, тканинах пародонту. У ситуаціях, коли не можна провести бактеріологічні дослідження можливо призначати кліндаміцин емпірично. Офлоксацин – це синтетичний препарат з групи фторхінолонів, із певними фармакокінетичними особливостями. Водночас, до застосування цього препарату є ряд обмежень, як, наприклад, вік до 12 років, вплив на нирки тощо [12].

Таким чином, при вивченні патологічних процесів, пов'язаних з інфекційними ураженнями пародонту, слід приділяти увагу асоціаціям умовно-патогенних мікроорганізмів, можливостям їх плівкоутворення, аналізу прояву

ними факторів патогенності, обов'язково вивчати їх стійкість до антибіотиків, що дасть змогу розробляти ефективні методи лікування.

Підсумовуючи проведені дослідження, маємо відмітити наступне: генералізований пародонтит у дослідженої групи осіб характеризувався наявністю асоціацій ряду умовно-патогенних мікроорганізмів, серед яких були *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* та представників родів *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Candida* та *Streptococcus*. Дослідження плівкоутворення ізолятами стафілококів, що виділені при пародонтиті, показало наявність цієї здатності у 30,4% ізолятів золотистого стафілокока, 82,9% – епідермального стафілокока, 25% – сапрофітного стафілокока. Встановлено, що найбільш ефективними по відношенню до мікрофлори пародонтальних кишень були антибіотики офлоксацин (62,5–93,3% чутливих штамів) та кліндаміцин (63,2–90,6% чутливих штамів), найменш ефективним – еритроміцин (6,7–37% чутливих штамів, за винятком стафіло- та стрептококів).

А.В. Крысенко, Т.В. Скляр, О.С. Воронкова, Е.А. Сирокваша, Т.Н. Шевченко

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
e-mail: microviro@rambler.ru, тел. +38(056) 374 97 34

ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА МИКРОБНЫХ АССОЦИАЦИЙ И УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ МИКРОБИОТЫ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

Реферат

Цель. *Изучить состав микробиоценоза ротовой полости в норме и у больных генерализованным пародонтитом и охарактеризовать устойчивость изолированных микроорганизмов к антибиотикам.* **Методы**. *Проведено бактериологическое исследование образцов материала от лиц с генерализованным пародонтитом различной степени тяжести в стадии обострения. Способность к пленкообразованию изолятов стафилококков изучали на пластиковых планшетах. Чувствительность клинических штаммов к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с использованием бумажных дисков (НИЦФ, РФ).* **Результаты**. *Показано, что у больных генерализованным пародонтитом микрофлора преимущественно представлена ассоциациями: S. aureus, S. epidermidis, Bacteroides spp., Actinomyces spp., Candida spp., P. aeruginosa и Streptococcus spp. Среди выделенных при пародонтите стафилококков биопленку образовывали 30,4% изолятов S. aureus, 82,9% – S. epidermidis, 25,0% – S. saprophyticus, что соответствует их устойчивости к линкомицину и эритромицину. Наиболее эффективными по отношению к представителям микробиоты пародонтальных карманов были офлоксацин (более 60% чувствительных штаммов, за исключением Veilonella spp., Bacteroides spp.) и клиндамицин (более 50% чувствительных штаммов, за исключением P. aeruginosa, E. coli, Actinomyces spp., Veilonella spp.), наименее эффективным – эритромицин (6,7–37,0% чувствительных штаммов, за исключением стафилококков и стрептококков).* **Выводы**. *Показано, что при*

генерализованном пародонтите ассоциации условно-патогенных микроорганизмов играют ведущую роль. Обнаруженная способность к пленкообразованию среди изолятов стафилококков может быть одним из возможных объяснений повышенного уровня их устойчивости к линкомицину и эритромицину.

Ключевые слова: микробиота ротовой полости, чувствительность к антибиотикам, биопленкообразование.

O.V. Krysenko, T.V. Skliar, O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha, T.M. Shevchenko

Oles Honchar Dnepropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnepropetrovsk, 49050, Ukraine,
e-mail: microviro@rambler.ru, tel. +38(056) 374 97 34

FEATURES OF MICROBIAL ASSOCIATION COMPOSITION AND ANTIBIOTICRESISTANCE OF ORAL CAVITY MICROFLORA

Summary

Purpose. *To study the composition of the oral cavity microflora in health and in patients with generalized periodontitis, to characterize the resistance of isolated microorganisms to antibiotics.* **Methods**. *Bacteriological examination of the samples of material from the individuals with varying severity generalized periodontitis in the acute stage has been done. The ability to filmformation of staphylococci isolates was studied in plastic plates. The sensitivity of clinical strains to antibiotics was determined by agar diffusion method with paper discs (NICF, Russia).* ***Results***. *It has been shown that under generalized periodontitis microflora is mainly represented by the associations of: S. aureus, S. epidermidis, Bacteroides spp., Actinomyces spp., Candida spp., P. aeruginosa and Streptococcus spp. Among staphylococci, isolated under periodontitis, the ability to biofilmforming had 30.4% of S. aureus isolates, 82.9% – S. epidermidis, 25.0% – S. saprophyticus, that coincided with their resistance to lincomycin and erythromycin. The most effective to microflora of periodontal pockets there were ofloxacin (60 % susceptible strains, except Veilonella spp., Bacteroides spp.) and clindamycin (50% sensitive strains except P. aeruginosa, E. coli, Actinomyces spp., Veilonella spp.), erythromycin was the least effective (6.7–37.0% susceptible strains, except staphylococci and streptococci).* **Conclusions**. *It was shown that under generalized periodontitis the association of opportunistic microorganisms had a key role. The observed ability to filmformation among staphylococci isolates may be one of possible explanation of lincomycin and erythromycin resistance level increasing.*

Key words: microorganisms of the oral cavity, sensitivity to antibiotics, biofilm-forming.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Безрукова И.В.* Быстропрогрессирующий пародонтит / – М.: Медицинская книга, 2004. – 144 с.

2. *Белобородова Н.В. Богданов М.Б., Черненькая Т.В.* Алгоритмы антибиотикотерапии // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 5. – С. 33–40.

3. *Грудянов А.И., Масленникова Г.В., Загнат В.Ф.* Сравнительное изучение эффективности воздействия ряда местных антимикробных препаратов на видовой и количественный состав микробной флоры пародонтальных карманов // Стоматология. – 1992. – Т. 71. – № 1. – С. 25–26.

4. *Коробов В.П., Лемкина Л.М., Филатова Л.Б., Полюдова Т.В.* Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 3, № 5. – С. 156–159.

5. *Косенко К.Н, Чумацкая Ю.Г., Городенко Е.А.* Микробные ассоциации пародонтального кармана у больных генерализованным пародонтитом // Вестник стоматологии. – 2000. – № 2. – С. 10–13.

6. *Косенко К.Н., Терешина Т.П.* Профилактическая гигиена полости рта. – Одесса, 2003. – 288с.

7. *Левицкий А.П.* Физиологическая микробная система полости рта // Вісник стоматології. – 2007. – №1. – С. 6–11.

8. *Мащеко И.С., Самойленко А.В.* Особенности микробиоценоза зубодесневой борозды и обоснование принципов выбора антибактериальной терапии у больных генерализованным катаральным гингивитом // Вісник стоматології. –2005. – №2. – С. 45–49.

9. *Наказ* МОЗ України №167 від 05.04.2007 «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів».

10. *Савичук Н.О., Савичук О.В.* Хронические заболевания слизистой оболочки полости рта и органов системы пищеварения – клинические параллели // Современная стоматология. – 1998. – № 3. – С. 804–812.

11. *Сидоренко С.В., Колупаев В.Е.* Антибиотикограмма: диско-диффузионный метод. Интерпретация результатов. – М., Sanofi Pasteur, 1999. – 32 с.

12. *Царев В.Н., Ушаков Р.В.* Антимикробная терапия в стоматологии. – М.: Медицинское информационное агенство, 2004. – 144 с.

13. *Царёв В.Н., Трефилов А.Г., Клейменова Г.Н., Лёвкин А.В.* Пространственно-временная модель формирования биоплёнки полости рта: взаимосвязь процессов первичной адгезии и микробной колонизации // Стоматология. – 2011. – № 2. – С. 22–27.

14. *Bergey's* Manual of Systematic Bacteriology. – Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. – P. 294–397.

15. *Nishihara T., Koseki T.* Microbial etiology of periodontitis // Periodontol. – 2004. – Vol. 36. – P. 14–26.

16. *Paster B.J.* [et. al] Bacterial diversity in human subgingival plaque // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183/12. – P. 3770–3783.

Стаття надійшла до редакції 06.12.2013 р.

UDC 579.222:579.262

Mukhlis Abedalabas, M.B. Galkin, E.Yu. Pahomova, T.O. Filipova

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

KINETICS OF DIRHAMNOLIPIDS BIOSYNTHESIS AND RHAMNOSYLTRANSFERASE 2 ACTIVITY IN THE PRESENCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SIGNAL QUINOLONE

Aim: *Discovery of P. aeruginosa ATCC 15692 dirhamnolipids biosynthesis and rhamnosyltransferase 2 activity in the presence of Pseudomonas aeruginosa exogenous quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS).* ***Methods.*** *Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692 were cultured in the Giss medium with 2% glucose at 37 °C for 24 h. All the discoveries were performed in «plancton-biofilm» system with using of the «Nunclon» 48-well plates. Dirhamnolipids separation conducted by TLC methods on Alugram Sil G/UV 254 TLC plates. Dirhamnolipids were eluted separately and its content was determined by the orcinol test. Rhamnosyltransferase 2 (RhlC) activity was analysed in P. aeruginosa cell extracts using a rhamnosyltransferase assay specific for the addition of L-rhamnose to monorhamnolipid. 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon synthesized in ONU Biotechnological scientific-educational center.* ***Results****. The synthesis of dirhamnolipids in control culture is activated from the early stationary phase and the content of the biosurfactants is increased fivefold up 10 to 24 hour – up 0.83 to 4.3 mg/ml. Addition of increasing concentrations of PQS did not affect the growth of P. aeruginosa but increased dirhamnolipids content. After 10 h of growth, there were approximately 4.6 times more biosurfactant in the cultures supplemented with PQS compared with the control. After 24 hours its level in culture medium was 20.68 mg/ml in the presence of 80 μM PQS and 4.3 mg/ml in the absence of PQS. The additions of PQS at the time of inoculation are sufficient to induce RhlC activity during the transition to stationary phase. So, after eight hours in the presence of 40, 60 or 80 μM PQS rhamnosyltransferase 2 activity was higher at 40%, 75% and 93%, respectively. After 24 hours this enzymatic activity was 1.6, 1.8 and 2.1 times higher as compared with the control.*

Key words: Pseudomonas aeruginosa, dirhamnolids, PQS, rhamnosyltransferase 2.

Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids have a wide spectra of biological activity, especially antimicrobial and antitumor mode of action [10, 13]. Due to its high emulsifying capacity they can be used in bioremediation of the polluted soil [8] and for oil recovery enhancement [15]. *P. aeruginosa* biosurfactants are the rhamnolipids mixture with different molecular structure that mainly consists of di- and monorhamnolipids, that have two fatty acid residues in their structure, mostly

© Mukhlis Abedalabas, M.B. Galkin, E.Yu. Pahomova, T.O. Filipova, 2014

β-hydroxydodecanoyl-β-hydroxydodecanoat. Dirhamnolipids are more soluble in water and posses the highest emulsifying and antitumor activity [9].

We have previously shown that the exogenous signal quinolon (PQS) increased rhamnolipids biosynthesis and dirhamnolipid/monorhamnolipid ratio, and hypothesized that it was able to activate rhamnosyltransferase 2 [7].

Three enzymatic reactions are required in the final steps of rhamnolipids biosynthesis in *P. aeruginosa* [12]: 1) RhlA is involved in the synthesis of the HAAs, the fatty acid dimers, from two 3-hydroxyfatty acid precursors; 2) the membrane-bound RhlB rhamnosyltransferase 1 uses dTDP-L-rhamnose and an HAA molecule as precursors, yielding monorhamnolipids; 3) these monorhamnolipids are in turn the substrates, together with dTDP-L-rhamnose, of the RhlC rhamnosyltransferase 2 to produce dirhamnolipids. Unfortunately, few works have characterized these three enzymes.

The aim of this study was discovering of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 dirhamnolipids biosynthesis and rhamnosyltransferase 2 activity in presence of the exogenous quorum sensing signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS).

Materials and Methods

All investigations were performed in «plancton-biofilm» system with using of the «Nunclon» 48-well plates. *P. aeruginosa* ATCC 15692 overnight cultures were diluted with sterile saline buffer and were added in the plate wells containing 1 ml of Giss media to final cell concentration equal 10^3 CFU. The plates were incubated from 2 h to 24 h at 37 ^{o}C. Optical density of cultures (λ 540 nm) and dirhamnolipids content were determined each 2 hours during the day.

Rhamnolipids separation was performed with TLC method on Alugram Sil G/UV 254 TLC plates (Germany) in chloroform-methanol-water (65:12:2) mixture [14]. Rhamnolipids spots placement was determined by color reaction with rhamnose and acetic acid–sulphuric acid–anis aldehyde solution (50:1:0.05) and TLC plates were heated at 80 ^{o}C till appearance of pink-orange staining.

Dirhamnolipids were eluted with chlorophorm. The samples were centrifugated at 1500 g for 30 minutes for silica-gel removal. After centrifugation chloroform layer was taken away and evaporated. Residue was diluted at 100 μM and rhamnolipids concentration was determined by using orcinol-assay [5].

Rhamnosyltransferase 2 activity was analysed in *P. aeruginosa* cell extracts using a rhamnosyltransferase assay specific for the addition of L-rhamnose to monorhamnolipid [11]. Cells from stationary phase cultures were washed with 100 mM Tris-100 mM NaCl buffer, pH 7, and ruptured by sonication. Whole-cell extracts were incubated with 0.5 mg of dTDP-L-rhamnose and 1.5 mg of monorhamnolipid for 4 h at 37 ^{o}C. Monorhamnolipid used in the assay was purified from *P. aeruginosa* strain ATCC 9027, which lacks the ability to produce dirhamnolipid [16]. Dirhamnolipid were separated by TLC and determined using orcinol-assay [5]. One transferase unit corresponds to the incorporation of one nmol of rhamnose from TDP-rhamnose into monorhamnolipid per hour.

We have used in this work 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon that was being synthesized in ONU Biotechnological scientific-educational center, TDP-rhamnose was obtained from PhD V. Osetrov. PQS was used at the concentrations of 40, 60 and 80 μM. While choosing the concentrations there were used the data about physiological concentrations of autoinducers.

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

Data are reported as the mean ± standard deviation. Reliability of differences was determined by Student's criterion at a significance level of not less than 95% ($p \leq 0.05$). All the mathematical calculations were performed using the computer program Excel [1].

Results and Discussion

The study of kinetics of planktonic cells growth and diramnolipids biosynthesis of control cultures of *P. aeruginosa* show that dirhamnolipids appear in the culture medium in the late logarithmic growth phase – between 6 and 8 hour of cultivation (Fig. 1).

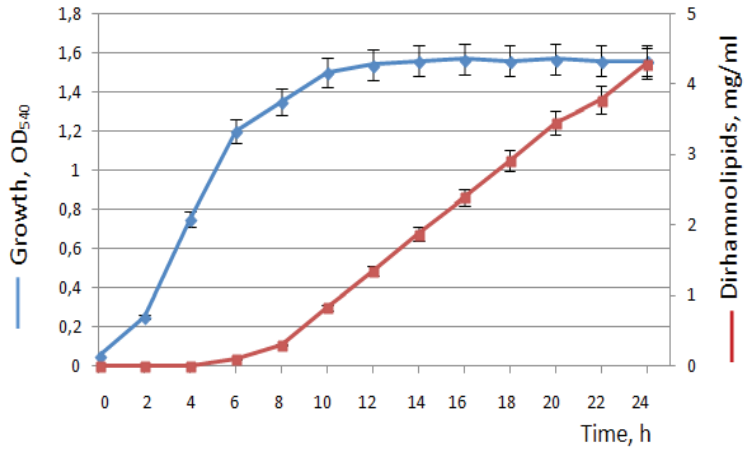


Fig. 1. Kinetics of planktonic bacteria growth and diramnolipids biosynthesis of control cultures of *P. aeruginosa*

The synthesis of dirhamnolipids is activated from the early stationary phase and the content of the biosurfactants is increased fivefold up 10 to 24 hour – up 0.83 to 4.3 mg/ml. McKnight S. et al. have demonstrated that PQS production is also initiated in early stationary phase [6] and production of rhamnolipids are reduced in PQS-deficient mutants [4]. All these data suggest an important role of *P. aeruginosa* quinolone signal in the synthesis of biosurfactants. Therefore, we studied the effect of exogenous PQS on the planktonic cells growth and diramnolipid biosynthesis.

Fig. 2 shows that addition of increasing concentrations of PQS did not affect the growth of *P. aeruginosa* PAO1. These results are consistent with data [4] showed that of exogenously added PQS at concentrations from 10 to 100 μM did not affect the growth of *P. aeruginosa* PAO1 *lecA::lux*.

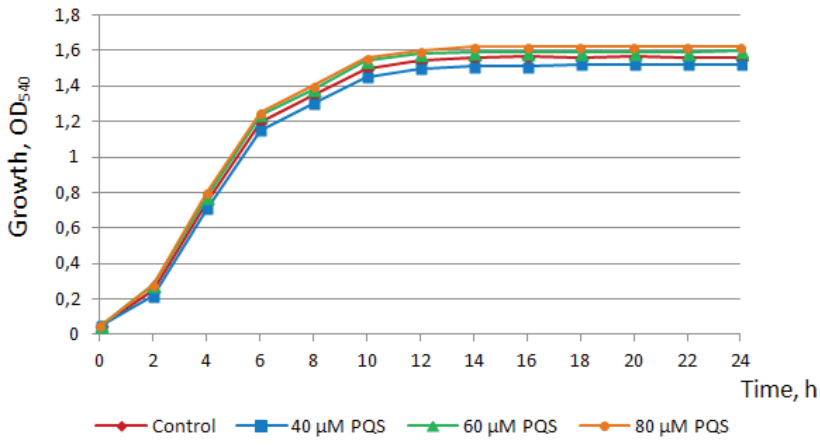


Fig. 2. Kinetics of *P. aeruginosa* planktonic bacteria growth in presence of quinolone signal molecule

Addition of increasing concentrations of PQS enhanced dirhamnolipids content in a concentration-dependent manner (Fig. 3)

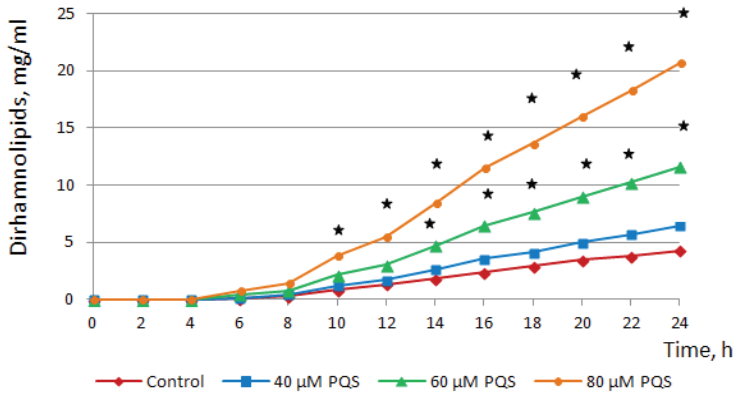


Fig. 3. Kinetics of *P. aeruginosa* diramnolipids biosynthesis in presence of quinolone signal molecule

Note: – distinctions are reliable as compared to control

The results presented in Fig. 3 show that the addition of PQS at concentration 80 µM had the greatest effect on the dirhamnolipids biosynthesis. After 10 h of growth, there is approximately 4.6 times more biosurfactant in cultures supplemented with PQS compared with the control. After 24 hours its level in the culture medium was 20.68 mg/ml in the presence of 80 µM PQS and 4.3 mg/ml in the absence of PQS.

In the presence of 60 µM PQS dirhamnolipids content was 11.6 mg/ml – 2.7 times greater than the control but less than two from the result obtained at adding of 80 µM PQS.

Further there were performed the analysis of activity of rhamnosyltransferase 2 (RhlC), which catalyses the addition of dTDP-L-rhamnose to the monorhamnolipid-accepting molecule [3]. The study was conducted via 8, 16 and 24 hours (Table).

Table

Effect of PQS on rhamnosyltransferase 2 activity in *Pseudomonas aeruginosa* (units/mg protein)

	8 hour	**16 hour**	**24 hour**
Control	**4.2 ± 1.5**	**7.8 ± 1.6**	**10.3 ± 2.8**
PQS 40 μM	5.9 ± 2.0	10.3 ± 2.3	16.6 ± 2.6
PQS 60 μM	7.4 ± 1.8	13.8 ± 2.7	18.7 ± 3.7*
PQS 80 μM	8.1 ± 2.6*	17.2 ± 3.5*	21.5 ± 4.1*

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

The results indicate that the activity of RhlC increases in control cells 2.5 times during cultivation from 8 to 24 hours. This increase in activity was not associated with increased cell contents (Fig. 2) and due to enhanced expression of *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2. The additions of PQS at the time of inoculation are sufficient to induce RhlC activity during the transition to stationary phase. So, after eight hours in the presence of 40, 60 or 80 μM PQS rhamnosyltransferase 2 activity was higher at 40%, 75% and 93%, respectively. After 24 hours this enzymatic activity was 1.6, 1.8 and 2.1 times higher as compared with the control.

As it is known *P. aeruginosa* regulates the transcription of an array of genes by quorum sensing [11]. In the case of rhamnolipids biosynthesis, the product of RhlI is the signal butanoyl-homoserine lactone, C4-HSL, which acts as the activating ligand of the transcriptional regulator RhlR. The RhlR/C4-HSL complex then binds to a specific sequence in the *rhlAB* regulatory region to activate the transcription. The level of expression of *rhlAB* is thus dependent on the local environmental concentration of this signal. The expression of the second rhamnosyltransferase, encoded by *rhlC*, is coordinately regulated with *rhlAB* by the same quorum sensing regulatory pathway. As it has been shown previously, addition of increasing concentrations of exogenous PQS enhanced C4-HSL levels (3.5 times more C4-HSL in presence of 60 mM PQS compared with the control) and the transcription of certain genes in a concentration-dependent manner [4].

Therefore, PQS controls production of rhamnolipids by stimulating the RhlR/C4-HSL quorum sensing system. Additionally, PQS acts as inducing ligands of PqsR regulator and PqsE, which upregulates *rhlAB* transcription [2].

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

КІНЕТИКА БІОСИНТЕЗУ ДИРАМНОЛІПІДІВ ТА АКТИВНІСТЬ РАМНОЗІЛТРАНСФЕРАЗИ 2 ЗА ПРИСУТНОСТІ СИГНАЛЬНОГО ХІНОЛОНУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Мета: *дослідження біосинтезу дірамноліпідів P. aeruginosa ATCC 15692 та активності рамнозілтрансферази 2 за присутності екзогенної сигнальної молекули – 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолону (PQS).* **Методи.** *Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692 культивували у середовищі Гісса с 2% глюкози при 37°С 24 год. Дослідження проводили в системі планктон–біоплівка у 48-лункових планшетах «Nunclon». Виділення дірамноліпідів проводили за використання ТШХ на пластинах Alugram Sil G/UV 254. Дірамноліпіди елюювали з пластин і визначали їх кількісний вміст за допомоги орцинового тесту. Активність рамнозілтрансферази 2 (RhlC) аналізували у безклітинному екстракті за реакцією приєднання L-рамнози до монорамноліпіду. 2-гептил-3-гідроксі-4-хінолон був синтезований у Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І.І. Мечникова.* **Результати.** *Синтез дірамноліпідів активується в контрольній культурі в ранню стаціонарну фазу і вміст дірамноліпідів підвищується п'ятикратно між 10 і 24 годинами – з 0,83 до 4,3 мг/мл. Внесення зростаючих концентрацій PQS не впливало на ріст P. aeruginosa, але підвищувало вміст дірамноліпідів. Через 10 годин він перевищував рівень контролю приблизно у 4,6 рази. Через 24 години вміст біосурфактанту в присутності 80 мкМ PQS становив 20,68 мг/мл проти 4,3 мг/мл за відсутності PQS. Внесення PQS одночасно з інокуляцією суттєво індукувало активність RhlC у порівнянні з контролем. Так, через вісім годин за присутності 40, 60 або 80 мкМ PQS активність рамнозілтрансферазы 2 була вище на 40%, 75% і 93%, відповідно. Через 24 години ферментативна активність перевищувала контроль у 1,6, 1,8 та 2,1 рази, відповідно.*

Ключові слова: Pseudomonas aeruginosa дірамноліпіди, PQS, рамнозілтрансфераза 2.

Мухлис Абедалабас, Н.Б. Галкин, Е.Ю. Пахомова, Т.О. Филиппова

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

КИНЕТИКА БИОСИНТЕЗА ДИРАМНОЛИПИДОВ И АКТИВНОСТЬ РАМНОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ 2 В ПРИСУТСТВИИ СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Цель: *изучение биосинтеза дирамнолипидов P. aeruginosa ATCC 15692 и активности рамнозилтрансферазы 2 в присутствии экзогенной сигнальной молекулы –*

2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS). **Методы.** *Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692 культивировали в среде Гисса с 2% глюкозы при 37 °С 24 часа. Исследования проводили в системе планктон–биоплёнка в 48-луночных планшетах «Nunclon». Выделение дирамнолипидов осуществляли с помощью ТСХ на пластинах Alugram Sil G/UV 254. Дирамнолипиды элюировали с пластин и определяли их количественное содержание с помощью орцинового теста. Активность рамнозилтрансферазы 2 (RhlC) анализировали в бесклеточном экстракте по реакции присоединения L-рамнозы к монорамнолипиду. 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон был синтезирован в Биотехнологическом научно-учебном центре ОНУ имени И.И. Мечникова.* **Результаты.** *Синтез дирамнолипидов активируется в контрольной культуре в раннюю стационарную фазу и содержание дирамнолипидов повышается пятикратно между 10 и 24 часами – с 0,83 до 4,3 мг/мл. Внесение увеличивающихся концентраций PQS не влияло на рост P. aeruginosa, но повышало содержание дирамнолипидов. Через 10 часов оно превышало уровень контроля примерно в 4,6 раза. Через 24 часа содержание биосурфактанта в присутствии 80 мкМ PQS составляло 20,68 мг/мл против 4,3 мг/мл в отсутствии PQS. Внесение PQS одновременно с инокуляцией существенно индуцировало активность RhlC по сравнению с контролем. Так, через восемь часов в присутствии 40, 60 или 80 мкМ PQS активность рамнозилтрансферазы 2 была выше на 40%, 75% и 93%, соответственно. Через 24 часа ферментативная активность превышала контроль в 1,6, 1,8 и 2,1 раза, соответственно.*

Ключевые слова: Pseudomonas aeruginosa, дирамнолипиды, PQS, рамнозилтрансфераза 2.

REFERENCES

1. *Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.

2. *Abdel-Mawgoud A.M., Hausmann R., Lépine F., Müller M.M., Déziel E.* Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production / In: G. Soberorn Charvez (ed.), Biosurfactants. From Genes to Application // Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011,VIII. – P. 13–55.

3. *Burger M.M., Glaser L., Burton R.M.* The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Biol. Chem. – 1963. – V. 238. – P. 2595–2602.

4. *Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Camara M., Williams P.* The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR // Mol. Microbiol. – 2003. – V. 50. – P. 29–43.

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. *McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C.* The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. – P. 2702–2708.

7. *Mukhlis Abedalabas, Galkin N.B., Pachomova E.Yu., Filipova T.O.* Influence of the exogenous quorum sensing autoinducers on *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids biosynthesis // Microbiology & Biotechnology. – 2013. – № 4(24). – P. 38–45.

8. *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.

9. *Peker S., Helvaci S.S., Özdemir G.* Interface-subphase interactions of rhamnolipids in aqueous rhamnose solutions // Langmuir. – 2003. – V. 19. – P. 5838–5845.

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

11. *Rahim R., Ochsner U.A., Olvera C., Graninger M., Messner P., Joseph S. Lam J.S., Soberon-Chavez G.* Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis // Molecular Microbiology. – 2001. – V. 40(3). – P. 708–718.

12. *Soberon-Chavez G., Lepine F., Deziel E.* Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. – V. 68. – P. 718–725.

13.*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.

14. *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.

15. *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.

16. *Wild M., Caro A.D., Miller R.M., Soberon-Chavez G.* Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – V. 153. – P. 279–285.

Стаття надійшла до редакції 15.02.2014 р.

УДК 579.22:579.23

О.С. Радченко[1], Л.Г. Степура[1], Ю.М. Юмина[1], М.О. Борецька[2], П.П. Зелена[1]

[1]Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна, тел.:+38(044) 521 32 31,
e-mail:olga.s.radchenko@gmail.com
[2]Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Д03680, Київ, МСП Україна, тел.:+38(044) 526 11 79,
e-mail: mashapro@ukr.net

ЗМІНА ДЕЯКИХ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ПІД ВПЛИВОМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРІЮ

Мета: *вивчення зміни біологічних властивостей Stenotrophomonas maltophilia під впливом додецилсульфату натрію (ДСН).* ***Методи.*** *Фізіолого-біохімічні властивості та чутливість до антибіотиків S. maltophilia вивчали за допомогою мікробіологічного аналізатора Vitek 2 Compact (Biomerieus, Франція), морфологію клітин – світлової (Zeiss Primo Star, Німеччина) та електронної мікроскопії (Jeol 1400, Японія).* ***Результати.*** *Показано, що короткотривале (впродовж 1–10 пасажів) культивування бактерій S. maltophilia на МПА з синтетичною аніонною поверхнево-активною речовиною (ПАР) ДСН в концентрації 50 мг/л, що наближається до мінімальної інгібувальної (МІК), призводило до зміни низки біологічних показників і властивостей. Бактеріальні клітини вкорочувалися і деформувалися, у цитоплазмі формувалися зони з різною оптичною щільністю, темні та прозорі включення. Деякі фізіолого-біохімічні тести (глутаміл-аріламідаза, кумарат, стійкість до 0/129, виділення меркаптанів, уреаза, асиміляція цитрату натрію і L-малату) давали протилежні результати. МІК дев'яти антибіотиків зростали у 2 рази і більше, а до чотирьох формувалася резистентність. Адгезивні властивості S. maltophilia коливалися залежно від кількості пересівів на середовище з ДСН. Змінені властивості у деяких випадках відновлювалися після десятого пересіву, що свідчить про певну адаптацію культури до ксенобіотика. Оскільки ДСН – це найрозповсюдженіша аніонна ПАР, яка входить до складу практично усіх засобів косметики і побутової хімії, зміни біологічних властивостей бактерій під її впливом, можуть створювати проблеми для ідентифікації клінічно важливих мікроорганізмів.*

Ключові слова: ПАР, додецилсульфат натрію, Stenotrophomonas maltophilia, біологічні властивості, резистентність до антибіотиків.

Поверхнево-активні речовини (ПАР) – це велика група синтетичних хімічних сполук, які завдяки дифільній молекулярній структурі здатні концентруватися на міжфазних поверхнях, змінюючи їх властивості. Вони широко використовуються в промисловості як стабілізатори, гідрофобізатори, модифікатори поверхні, емульгатори, диспергатори, піноутворювачі, миючі засоби,

© О.С. Радченко, Л.Г. Степура, Ю.М. Юмина, М.О. Борецька, П.П. Зелена, 2014

інгібітори корозії, антистатики, дезінфектанти [4]. В силу свого призначення, практично весь об'єм ПАР, що виробляються, надходять у довкілля [8].

ПАР руйнують клітини або змінюють деякі їхні біологічні властивості: змінюють структуру біологічних мембран, зв'язуються з гідрофобними ділянками на поверхні мембран, лізують клітини та вивільнюють білкові молекули у вигляді комплексів з детергентом [12, 13].

Аніонна ПАР додецилсульфат натрію (ДСН) в концентрації 0,05% за кілька хвилин контакту з клітинами *Escherichia coli* викликала руйнування плазматичної мембрани, стискання та переміщення ядерного матеріалу до периферії клітини [14]. Нагрівання клітин *Bacillus subtilis* у 10% ДСН змінювало структуру цитоплазми і призводило до появи ділянок з різною оптичною щільністю [11]. Раніше нами було показано, що за короткотривалого (10 пасажів) культивування на середовищі, яке містило ДСН в концентрації 50 мг/л, бактерії роду *Corynebacterium* змінювали морфологію клітин, забарвлення за Грамом, чутливість до антибіотиків, інтенсивність секреції лізину, антигенні властивості і склад поверхневих білків, деякі фізіолого-біохімічні властивості [2, 9, 7]. Клітини *Staphylococcus aureus*, які впродовж 4 пасажів культивували на МПА з ДСН, змінювали здатності позитивно забарвлюватися за Грамом, з'являлася уреазна активність, не виявлялася β-галактозидаза, вдвічі зменшувалася чутливість до левофлоксацину і лінезоліду [5].

Оскільки ДСН – це найрозповсюдженіша аніонна ПАР, яка входить до складу практично усіх засобів косметики і побутової хімії, зміни біологічних властивостей бактерій під її впливом, можуть створювати проблеми для ідентифікації клінічно важливих мікроорганізмів.

Метою даної роботи було вивчення зміни біологічних властивостей *Stenotrophomonas maltophilia* під впливом додецилсульфату натрію.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження була культура *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642 з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [1]. Її культивували за t 28 °С впродовж 1, 4 та 10 пасажів на МПА з ДСН в концентрації 50 мг/л, яка близька до МІК.

МІК визначали макротитраційним методом на МПБ [3], а накопичення біомаси за зміною оптичної густини на КФК-2-УХЛ42, λ=540 нм, кювета 5 [6]. Для визначення характеру дії ксенобіотика на культуру (бактеріоцидна чи бактеріостатична) по одному мл вмісту пробірок, в яких ріст не був зафіксований, глибинно висівали на МПА.

Фізіолого-біохімічні властивості та чутливість до антибіотиків вивчали за допомогою мікробіологічного аналізатора Vitek 2 Compact (Biomerieus, Франція) [10].

Морфологію клітин визначали на фіксованих препаратах, забарвлених за Грамом у модифікації Бьорка [6] за допомогою світлового мікроскопа Zeiss

Primo Star (Німеччина). Для електронної мікроскопії застосовували мікроскоп Jeol 1400 (Японія). На мідні сіточки з формваром наносили краплю суспензії бактерій та мікроскопіювали без додаткового контрастування.

Адгезивність *S. maltophilia* УКМ 5642 вивчали на предметних скельцях, які занурювали у суспензію клітин добової культури у фізіологічному розчині. Скельця витримували у суспензії 10, 20, 30 та 60 хв за 20 °С. Після відмивання планктонних клітин препарати висушували на повітрі, фіксували жаром та забарвлювали фуксином. Кількість клітин підраховували у 30 квадратах окуляр-мікрометра.

Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значимості не менше 95%. Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми MS Exel.

Результати та їх обговорення

Визначення МІК показало (рис.1), що накопичення біомаси *S. maltophilia* УКМ 5642 суттєво, майже втричі, сповільнювалося за концентрації ДСН понад 60 мг/л та обумовлено бактеріостатичною дією. Наступні дослідження проводили з концентрацією близькою до МІК – 50 мг/л.

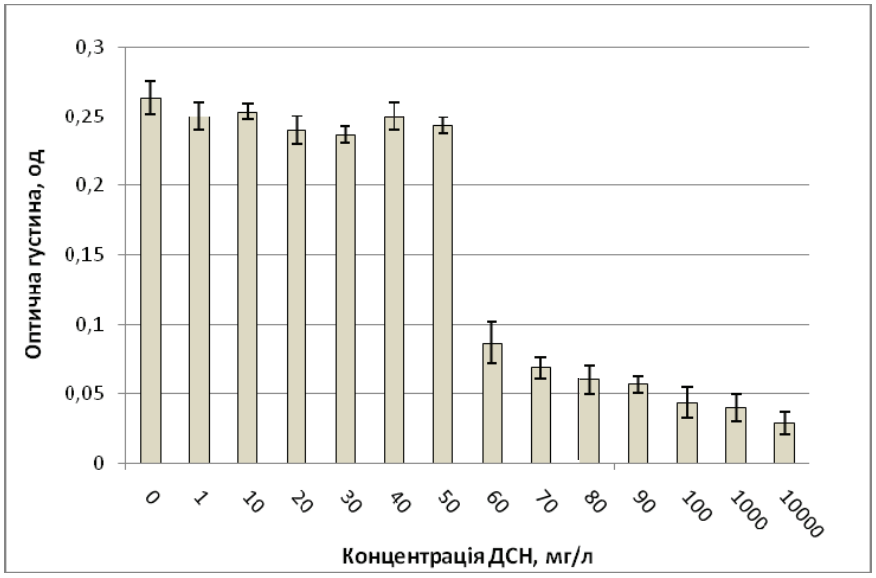


Рис. 1. Вплив додецилсульфату натрію на накопичення біомаси *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642

Fig. 1. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on the biomass increasing of *Stenotrophomonas maltophilia* UKM 5642

Світлова мікроскопія клітин *S. maltophilia* УКМ 5642 показала, що уже після першого пересіву на МПА з ДСН клітини різко змінювали свою морфологію – однорідні, продовгуваті палички вкорочувалися, ставали округлими, і погано забарвлювалися сафраніном. Після четвертого пасажу клітини були

кокоподібні, різної довжини, у них порушувалося розходження при поділі, про що свідчить поява бактерій поєднаних у ланцюжки. Після десятого пасажу на середовище з ДСН довжина клітин залишалася неоднорідною, але спостерігалася тенденція до відновлення морфології.

За допомогою електронної мікроскопії (рис. 2) виявлено вкорочення клітин після першого пасажу з 2,0 до 1,2 мкм, після чотирьох пасажів довжина становила 1,3±0,1 мкм, а після десяти нерівномірно зростала (у деяких клітин до 1,6±0,1 мкм). Товщина клітин практично не змінювалася і коливалася в межах 0,5–0,7 мкм.

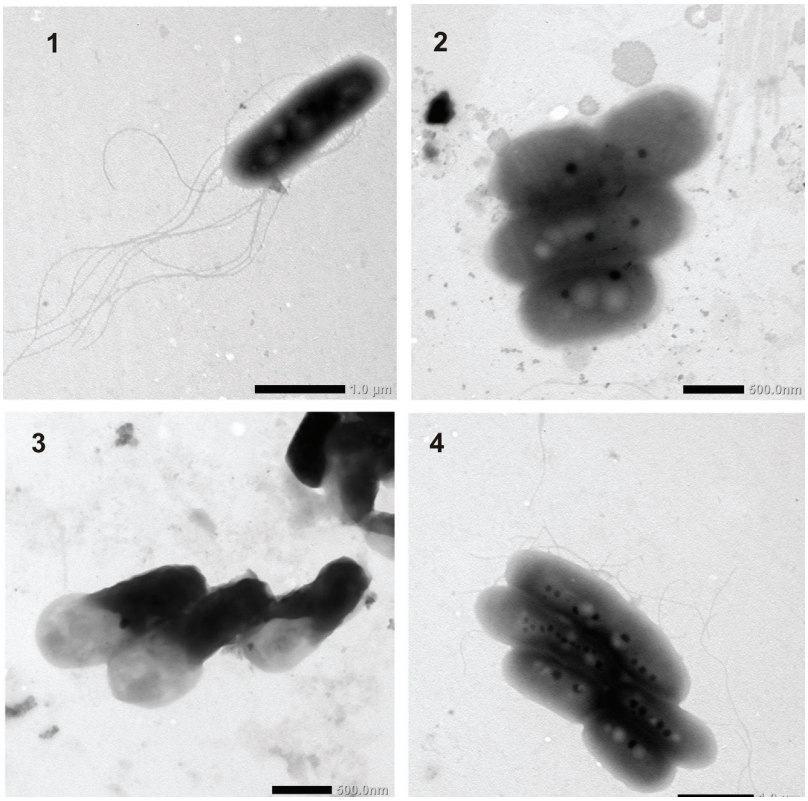


Рис. 2. Морфологія клітин *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642, електронна мікроскопія

Позначення: 1– вихідний штам – клітини однорідні, циліндричної форми зі джгутиками; 2 – після 1 пасажу на МПА з ДСН – клітини вкорочені; 3 – після 4-х пасажів на МПА з ДСН – клітини деформовані, вкорочені; 4 – після 10-и пасажів на МПА з ДСН – клітини різної довжини, але їх морфологія відновлюється; чітко видно темні і прозорі включення .

Fig. 2. Electron microscopic images of *Stenotrophomonas maltophilia* UKM 5642 cell morphology

Notation: 1– the initial strain – cells are similar, cylindricity with flagellums; 2 – after 1 passage on Nutrient agar with SDS – cells are shorter; 3 – after 4 passages on Nutrient agar with SDS – cells are deformed and shorter; 4 – after 10 passages on Nutrient agar with SDS – cells of different length, but theirs morphology is restored, clear visible dark and transparent inclusions.

Після четвертого пасажу клітини *S. maltophilia* УКМ 5642 виглядали деформованими, роздутими з одного кільця, що можливо пов'язано з ушкодженням клітинної стінки ПАР. Виявлено появу у цитоплазмі значних зон з різною оптичною щільністю. Після 10 пересівів на МПА з ДСН виявлено збільшення кількості темних і прозорих округлих включень різного розміру, які розміщувалися вздовж клітин.

Зміна морфології вказує на суттєвий негативний вплив ДСН на клітини *S. maltophilia* УКМ 5642 і на тенденцію до їх поступової адаптації.

В Таблиці наведено 10 з 67 вивчених нами фізіолого-біохімічних властивостей *S. maltophilia* УКМ 5642, які змінилися після контакту з ДСН.

Таблиця

Фізіолого-біохімічні властивості *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642, які зазнали змін за контакту з додецилсульфатом натрію

Table

The physiological and biochemical properties of *Stenotrophomonas maltophilia* UKM 5642 changed after the contact with sodium dodecyl sulfate

Тест	До контакту з ДСН	Після 1 пасажу на МПА з ДСН	Після 4 пасажу на МПА з ДСН	Після 10 пасажу на МПА з ДСН
Глутаміл-аріламідаза	(–)	+	+	(–)
Тирозин-аріламідаза	(–)	–	–	–
Уреаза	+	–	–	–
Цитрат (натрію)	–	+	+	+
Бета-N-ацетил-галактозамінідаза	–	(–)	–	–
L-гістидин	–	(–)	–	–
Кумарат	–	+	–	–
Стійкість до 0/129	–	+	(–)	(–)
L-Малат асиміляція	(+)	+	+	–
Виділення меркаптанів	(–)	+	+	–

Позначення: «+» – реакція позитивна; «(+)» – реакція слабко позитивна; «-» – реакція негативна; «(-)» – реакція слабко негативна

Результати трьох тестів на *L*-гістидин, бета-*N*-ацетил-галактозамінідазу і тирозин-аріламідазу принципово не змінювалися, тільки дещо коливався ступінь прояву реакції.

Тести на глутаміл-аріламідазу, кумарат, стійкість до 0/129 і виділення меркаптанів (реакція з реактивом Еллмана) після першого ж посіву вихідного

штаму *S. maltophilia* УКМ 5642 на середовище з ДСН давали протилежний результат, однак відновлювалися після десятого, а у випадку стійкості до 0/129 – після четвертого пасажу.

Після першого ж пасажу на середовище з ПАР у *S. maltophilia* УКМ 5642 незворотно не виявлявся фермент уреаза і з'являлася здатність рости на цитраті натрію. Здатність утилізувати *L*-малат втрачалася після десятого пересіву.

Культивування у присутності ДСН в концентрації 50 мг/л змінювало чутливість *S. maltophilia* УКМ 5642 до низки антибіотиків. Перевірено дію 21 антибіотика і до чотирьох з них резистентність зростала. Так, до цефалотину бактерії після 4 пасажів на ДСН з чутливих стали помірно резистентними; до цепродоксиму і офлоксацину з помірно резистентних перетворилася на резистентні після першого і четвертого пасажу відповідно; у випадку нітрофурантоїну спостерігали зміну чутливості з помірно резистентної на чутливу після першого пасажу і на резистентну після четвертого. Варто відмітити, що антибіотикочутливість *S. maltophilia* УКМ 5642, яка змінювалася під впливом ДСН, жодного разу не поверталася до попереднього стану.

За росту на ДСН у *S. maltophilia* УКМ 5642 спостерігалася зміна МІК 10 антибіотиків з 21 дослідженого. Це не завжди давало підстави говорити про зміну антибіотикочутливості культури, але чітко вказує на тенденцію формування резистентності. З рис. 3 видно, що уже після першого посіву на МПА з ДСН МІК ампіциліну і цефподоксиму для *S. maltophilia* УКМ 5642 зростала вдвічі з 4 до 8 мг/мл. Подвоювалася після четвертого пасажу також МІК амоксициліну з клавуланатом і офлоксацину (з 4 до 8 мг/мл), цефалотину (з 8 до 16 мг/мл), ципрофлоксацину (з 1 до 2 мг/мл), цефотаксиму (з 16 до 32 мг/мл). МІК амікацину збільшувалася з 2 до 4 мг/мл після 10 пасажу. У випадку нітрофурантоїну МІК антибіотика після першого пасажу *S. maltophilia* УКМ 5642 на МПА з ДСН зменшилася з 64 до 32 мг/мл, але уже після четвертого зростала до 128 мг/мл. Отримані результати вказують на можливість формування антибіотикорезистентності у відповідь на присутність у довкіллі ксенобіотика. Аналогічні результати з *Corynebacterium glutamicum* наведені в роботах [8, 9].

Контакт клітин *S. maltophilia* УКМ 5642 з ДСН змінював їхні адгезивні властивості. Суттєва різниця в кількості клітин, що адгезувалися на склі, до і після культивування на ДСН, спостерігалася за 60 хвилин експозиції. Показано, що чотириразовий пересів штаму на середовище з ДСН збільшував кількість адгезованих клітин з $(3,5\pm0,3)\times10^6$ кл/см^2 до $(4,5\pm0,4)\times10^6$ кл/см^2, але після десяти пасажів вона зменшувалася до $(2,5\pm0,1)\times10^6$ кл/см^2.

Таким чином, показано, що короткотривале (впродовж 1–10 пасажів) культивування бактерій *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642 на МПА з синтетичною аніонної поверхнево-активною речовиною додецилсульфатом натрію в концентрації 50 мг/л, що наближається до мінімальної інгібувальної, призводило до зміни низки біологічних показників і властивостей. Бактеріальні клітини вкорочувалися, у цитоплазмі з'являлися зони з різною оптичною щільністю, формувалися темні та прозорі включення вздовж клітин. Деякі фізіолого-біохімічні тести (глутаміл-аріламідаза, кумарат, стійкість до 0/129,

виділення меркаптанів, уреаза, асиміляція цитрату натрію і *L*-малату) давали протилежний результат. МІК до дев'яти антибіотиків зростала у 2 рази і більше, а до чотирьох з них формувалася резистентність. Адгезивні властивості коливалися залежно від кількості пересівів на середовище з ДСН.

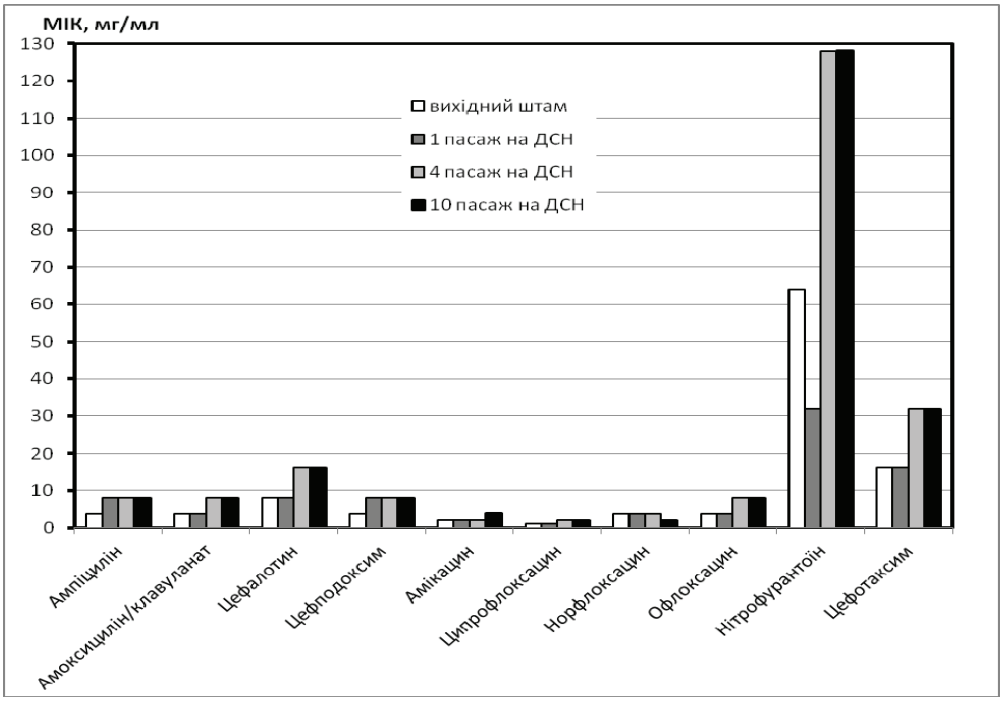


Рис. 3. Мінімальна інгібувальна концентрація антибіотиків для *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642 після культивування у присутності додецилсульфату натрію (50 мг/л)

Fig. 3. Antibiotics minimal inhibitory concentrations (MIC's) against *Stenotrophomonas maltophilia* UKM 5642 after the cultivation in the presence of sodium dodecyl sulfate (50 mg/L)

Змінені властивості у деяких випадках частково відновлювалися після 10-го пересіву, що свідчить про певну адаптацію бактерій *Stenotrophomonas maltophilia* УКМ 5642 до досліджуваного ксенобіотика.

’УДК 579.22:579.23

O. Radchenko[1], L. Stepura[1], Iu. Iumyna[1], M. Boretska[2], P. Zelena[1]

[1]Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01601, tel.:+38(044) 521 32 31, e-mail: olga.s.radchenko@gmail.com
[2]D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, 154, Zabolotniy Str., D03680, Kyiv, Ukraine, tel.:+38(044) 526 11 79, e-mail: mashapro@ukr.net

CHANGING OF SOME *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* BIOLOGYCAL PROPERTIES UNDER EFFECT OF SODIUM DODECYL SULFATE

Summary

Aim: *To study biological abilities changing of Stenotrophomonas maltophilia before and after cultivation on the medium with sodium dodecyl sulfate (SDS).* **Methods.** *The physiological and biochemical properties, antibiotics sensitivity of S maltophilia were studied due to microbiological analyzer Vitek 2 Compact (Biomerieus, France), cells morphology – light microscopy method (Zeiss Primo Star, Germany) and electron microscopy (Jeol 1400, Japan).* **Results.** *The short-time cultivation of S maltophilia (during 1–10 running) in presence of synthetic anionic surfactant SDS in concentration of 50 mg/L that is near minimal inhibition concentration (MIC) results in changing of some biological parameters and properties, e.g. cells became shorter and changed their shape, the different optical density zone were noted in cytoplasm, the dark and transparent inclusion appeared in cells. Some biochemical test results (glutamyl aryl-amidase, tyrosine arylamidase, urease, citrate (sodium), beta-N-acetyl-galactosidase, L-histidine assimilation, coumarate, 0/129 resistance, L-malate assimilation, Ellman) were changed to opposite index. The MIC of 9 antibiotics increased in 2 times and more, to 4 antibiotics there were formed resistance. Adhesion properties of S. maltophilia varied depending upon run times in presence of SDS. The properties which were changed during the experiment sometimes were restored after the 10th run. This fact could speculate about certain culture adaptation toward to antibiotic. Whereas SDS is the most popular surfactant, which is included in almost all cosmetic and household chemicals, the changes of biological activities of bacteria under its influence could provoke the problems with clinical important strains identification.*

Key words: surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), Stenotrophomonas maltophilia, biological characteristics, antibiotic resistance.

УДК 579.22:579.23

О.С. Радченко[1], Л.Г. Степура[1], Ю.М. Юмына[1], М.А. Борецкая[2], П.П. Зеленая[1]

[1]Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина,
тел.:+38(044) 521 32 31, e-mail: olga.s.radchenko@gmail.com
[2]Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Д03680, Киев, МСП Украина, тел.:+38(044) 526 11 79, e-mail: mashapro@ukr.net

ИЗМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ

Реферат

Цель: *изучение изменений биологических свойств Stenotrophomonas maltophilia под действием додецилсульфата натрия (ДСН).* **Методы.** *Физиолого-биохимические свойства и чувствительность к антибиотикам S. maltophilia изучали при помощи микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (Biomerieus, Франция), световой (Zeiss Primo Star) и электронной микроскопии (Jeol 1400, Япония).* **Результаты.** *Показано, что непродолжительное (в течение 1–10 пассажей) культивирование бактерий Stenotrophomonas maltophilia на МПА с синтетическим анионным поверхностно-активным веществом (ПАВ) додецилсульфатом натрия (ДСН) в концентрации 50 мг/л, приближающейся к минимальной ингибирующей (МИК), приводило к изменению ряда биологических показателей и свойств: клетки укорачивались и деформировались, в цитоплазме появлялись зоны с различной оптической плотностью, формировались темные и прозрачные включения; результаты некоторых физиолого-биохимических тестов (глутамил-ариламидаза, кумарат, устойчивость к 0/129, выделение меркаптанов, уреаза, ассимиляция цитрата натрия и L-малата) менялись на противоположные; МИК девяти антибиотиков увеличивалась в 2 раза и более, а к четырем из них формировалась резистентность; адгезивные свойства S. maltophilia колебались в зависимости от количества пересевов на среду з ДСН. Измененные свойства в некоторых случаях частично восстанавливались после 10-го пересева, что свидетельствовало о некоторой адаптации культуры к ксенобиотику. Поскольку ДСН – одно из наиболее распространенных анионных ПАВ и входит в состав практически всех косметических средств и товаров бытовой химии, изменение под его влиянием биологических свойств бактерий может создавать проблемы в идентификации клинически значимых микроорганизмов.*

Ключевые слова: ПАВ, додецилсульфат натрия, Stenotrophomonas maltophilia, биологические свойства, резистентность к антибиотикам.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. *Борецька М.О., Остапчук А.М., Козлова І.П.* Моносахаридний склад екзополімерного комплексу *Thiobacillus thioparus* і *Stenotrophomonas maltophilia*// Укр. Біохімічний Журнал . – 2007. – т. 79, № 5. – С. 140–144.

2. *Михальський Л.О., Фуртат І.М., Радченко О.С., Степура Л.Г.* Вплив синтетичних поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості непатогенних видів роду *Corynebacterium* // Мікробіол. журн. – 2006. – Т. 68, № 3. – С. 52–61.

3. *Наказ* № 167 МОЗ України «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» 05.04.2007.

4. *Поверхностно-активные* вещества: Справочник; под ред. А.А.Абрамзона, Г.М.Гаевого. – Л: Химия. – 1979. – 376 С.

5. *Радченко О.С., Степура Л.Г., Зелена П.П.* Вплив додецилсульфату натрію на деякі біологічні властивості *Staphylococcus aureus* //Вісник Київського університету (серія Біологія). – 2011. – 58. – С. 37–39

6. *Радченко О.С., Степура Л.Г., Домбровська І.В.* та ін. Практикум із загальної мікробіології. – Київ: Фітосоціоцентр, 2011. – 168 с.

7. *Радченко О.С., Степура Л.Г., Зелена П.П.* Вплив додецилсульфату натрію на фізіолого-біохімічні властивості бактерій роду *Corynebacterium* // Вісник Київського університету (серія Біологія). – 2012, вип 60. – С. 13–14.

8. *Ставская С.С., Удод В.М., Таранова Л.А., Кривец И. А.* Микробиологическая очистка воды от поверхностно-активных веществ. – К., 1988. – 184 с.

9. *Фуртат І.М., Ногіна Т.М., Михальський Л.О. та ін.* Вплив поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості *Corynebacterium glutamicum* //Національний університет "Києво-Могилянська Академія" Наукові записки. – 2002. – 20, 2. – С. 435–438.

10. *David H. Pincus D.H.* Microbial Identification Using the bioMérieux VITEK® 2 System in M.J.Miller Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, 2006. – V. 2. – Co-Published PDA Book. – 32 p.

11. *Mendelson N.H., Haag S.M., Cole R.M.* Cellular organization of *Bacillus subtilis*: sodium dodecyl sulfate-induced cell partitioning into zebra structure // Journal of Bacteriology. – 1976. – V. 126, N 3. – P. 1285–1296.

12. *Solheim M., Aakra A., Vebo H., et al.* Transcriptional responses of *Enterococcus faecalis* V583 to bovine bile and sodium dodecyl sulfate //Appl.Environ. Microbiol. – 2007. – V. 73, N 18. – P. 5767–5774.

13. *le Maire M, Champeil P, Moller JV.* Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents // Biochim. Biophys Acta. – 2000. – V. 1508, N1–2. – P. 86–111.

14. *Woldringh C.L., van Iterson W.* Effect of treatment with sodium dodecyl sulfate on the ultrastructure of *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. – 1972. – V. 111, N 3. – P. 801–813.

Стаття надійшла до редакції 27.11.2013 р.

УДК 579.61:616-078

О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, Т.М. Шевченко, О.А. Сірокваша

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

ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ПЛАНКТОННИХ ТА БІОПЛІВКОВИХ КУЛЬТУР *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Мета роботи. *Провести порівняльний аналіз чутливості до антибіотиків планктонних та біоплівкових бактерій 20 штамів Staphylococcus epidermidis.* ***Методи****. Ідентифікацію клінічних штамів стафілококів здійснювали за морфологічними та фізіолого-біохімічними ознаками. Чутливість до 19 антибіотиків визначали диск-дифузійним методом. Здатність до утворення бактеріями біоплівки виявляли візуально у 96-лунковому імунологічному планшеті.* ***Результати.*** *Встановлено, що чутливість планктонних і плівкових форм клінічних ізолятів S. epidermidis до антибіотиків істотно відрізнялася: мінімальні пригнічувальні концентрації (МПК) офлоксацина становили 0,15–3,0 мкг/мл (планктонна форма) і 0,3–5,0 мкг/мл (плівкова форма); для левофлоксацина відповідно 0,3–1,5 і 0,8–3,0 мкг/мл; для доксициклін-гідрохлорида 0,5–2,0 і 1,2–4,5 мкг/мл; для цефтриаксона 8,0–15,0 і 15,0–30,0 мкг/мл і для гентаміцина 4,0–15,0 і 14,0–30,0 мкг/мл.* ***Висновки.*** *МПК антибіотиків щодо планктонних культур були у 2–5 разів вищими в порівнянні з МПК антибіотиків, які гальмували формування біоплівки.*

Ключові слова: біоплівкоутворюючі та небіоплівкоутворюючі штами, Staphylococcus epidermidis, планктонна та біоплівкова культури, мінімальна пригнічувальна концентрація (МПК) антибіотика.

Існування бактерій у формі складно організованного угрупування – біоплівки, об'єднаної єдиним екзополімерним матриксом [13], має місце як у навколишньому середовищі, так і у організмі людини, де може спричиняти виникнення інфекційного процесу [6, 12, 14].

Одними з найбільш відомих бактерій, що формують біоплівки є стафілококи [24], які з одного боку колонізують поверхню шкіри та слизові оболонки, а з іншого – викликають позалікарняні нозокомінальні інфекції [15], захворювання верхніх дихальних шляхів, поверхні шкіри та м'яких тканин, ендокардити, ураження сечовидільної системи тощо. Спричиняють асоційовані на катетері біоплівкові інфекції [5, 8].

Відомо, що біоплівка суттєво підвищує стійкість мікроорганізмів, які входять до їх складу, до впливу імунної системи хазяїна, антимікробних препаратів і впливу навколишнього середовища. Терапевтичні дози антибіотиків, які ефективно впливають на чутливі планктонні культури, можуть виявляти

© О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, Т.М. Шевченко, О.А. Сірокваша, 2014

слабкий антимікробний ефект або бути зовсім неефективними відносно того ж виду бактерій у біоплівці [1].

Метою даної роботи було виділити біоплівкоутворювальні штами *S. epidermidis*, визначити їх чутливість до антибіотиків, порівняти мінімальні пригнічувальні концентрації (МПК) антибіотиків щодо планктонних та біоплівкових культур цього патогена.

Матеріали та методи

В дослідженнях використано 122 клінічних штами стафілококів, які були отримані із лабораторії мікробіології та імунології ДУ Інституту гастроентерології НАМН України. Для подальших досліджень серед них було відібрано 37 штамів, що належать до виду *S. epidermidis*.

Ідентифікацію отриманих штамів здійснювали відповідно до ознак, наведених у визначнику бактерій Берджі [7]. Для визначення приналежності до роду *Staphylococcus* на сольовий агар (10% NaCl) пересівали всі культури, у яких при мікроскопії спостерігали грампозитивні коки, зібрані у грона. Належними до виду *S. epidermidis* вважали коагулазонегативні штами, що утворювали кислоту з сахарози та мальтози в анаеробних умовах, відновлювали нітрати, ферментували глюкозу і лактозу, давали ріст на середовищі Гіса з манітом без утворення кислоти в анаеробних умовах, виявляли чутливість до новобіоцину (мінімальна гальмуюча ріст концентрація <1,6 мкг/мл). Диференціацію стафілококів на коагулазопозитивні та коагулазонегативні проводили з використанням сухої цитратної плазми кролика (ЗАТ «Біолік», Україна) в реакції плазмокоагуляції. Облік результатів здійснювали через 2; 3; 18 та 24 години.

Вивчення здатності до біоплівкоутворення визначали за допомогою модифікованого методу: у кожну лунку 96-лункового стерильного імунологічного планшета (Sarstedt, Німеччина) вносили 0,2 мл м'ясо-пептонного бульона (МПБ) та засівали 50 мкл суспензії клітин добової культури стафілококів, що містила $3{,}2\times10^4$ клітин/мл. За біоплівкоутворенням спостерігали протягом 72 год. По закінченню інкубації залишки поживного середовища обережно відбирали шприцом. Якщо на стінках лунок планшета залишалася біоплівка, то штам вважали біоплівкоутворювальними.

Чутливість до антибіотиків визначали диск-дифузійним методом, для цього використано диски з антибіотиками: цефтриаксоном, цефтазидимом, цефуроксимом, азтреонамом, тетрацикліном, доксициклін гідрохлоридом, сизоміцином, пеніциліном, олеандоміцином, оксациліном, гентаміцином, еритроміцином (Himedia Laboratories Prv. Limited, Індія), ципрофлоксацином, офлоксацином, налідиксовою кислотою, піпемідиновою кислотою, норфлоксацином, левофлоксацином, спарфлоксацином (ТОВ «Аспект», РФ). Антибіотики обирали серед найбільш застосовуваних у клінічній практиці згідно з Наказом МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» з урахуванням механізму їх дії [6].

Для проведення подальших досліджень було взято антибіотики, до яких досліджувані штами виявили найвищу чутливість: цефтриаксон, тетрациклін та гентаміцин. Оскільки вважається, що фторхінолони – одні з найбільш активних антибіотиків, які можуть проникати в біоплівку як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій, для досліджень було також взято обидва антибіотика, що належать до другого та третього покоління фторхінолонів – офлоксацин та левофлоксацин, до яких досліджувані штами *S. epidermidis* виявили чутливість.

Мінімальні пригнічувальні концентрації (МПК) тетрацикліну, цефтриаксону, гентаміцину, офлоксацину та левофлоксацину визначали для планктонної та біоплівкової культур штамів *S. epidermidis*. Визначення МПК, що пригнічує ріст планктонної культури, проводили за допомогою метода серійних розведень. В контрольні пробірки замість антибіотиків додавали ізотонічний розчин (0,5 % NaCl).

МПК антибіотиків, що впливають на біоплівкоутворення визначали на імунологічному планшеті. Для отримання біоплівок стафілококу в лунки 96-лункового імунологічного планшету вносили по 0,2 мл МПБ і відповідні серійні розведення антибіотиків у поживному середовищі. Потім в кожну лунку вносили по 0,05 мл бактеріальної суспензії, яка містила $3{,}3\times10^6$ клітин/мл та інкубували при 37 °С. Облік результатів проводили через 72 год. Остання лунка планшета, в якій не відбувалося формування біоплівки протягом 72 год, відповідала МПК антибіотика.

Результати та обговорення

Серед досліджених 122 клінічних штамів стафілококів до коагулазопозитивних належали 67 штамів, а до коагулазонегативних – 55. За результатами вивчення фізіолого-біохімічних властивостей ізолятів встановлено, що 37 штамів (30,3%) належали до виду *S. epidermidis*. Встановлено, що 54% (20 штамів) з досліджених штамів *S. epidermidis* були біоплівкоутворювальними. Біоплівка формувалася протягом трьох діб, осідала на дно лунок планшета. Вона була тонкою, гладкою, мала сірувато-білий колір.

Встановлення стійкості до антибіотиків здійснювали відповідно до критеріїв рівнів стійкості/чутливості, наведених у наказі № 167 [6].

Вивчення стійкості до антибіотиків показало, що фторхінолони другого та третього покоління (офлоксацин, левофлоксацин) були ефективними проти всіх 20 штамів *S. epidermidis*. Помірночутливих та стійких серед досліджених штамів стафілококів не виявлено.

На відміну від фторхінолонів, до тетрацикліну серед 20 плівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* стійкими виявилися 8 штамів, а до доксициклін гідрохлориду – 7. При використанні дисків з сизоміцином резистентними виявилися 10 біоплівкоутворювальних штамів, а до гентаміцину – 3 штами.

Вплив цефалоспоринів на біоплівкоутворювальні штами *S. epidermidis* досліджували на моделі цефтриаксону, цефуроксиму та цефтазидиму. До цефтриаксону стійкість спостерігали у 4 досліджуваних штамів, до цефуроксиму

стійкість виявили 12, а до цефтазідіму – 11 штамів. До азтреонаму – антибіотика класу монобактамів – стійкість виявили 12 штамів.

Переважна більшість досліджуваних штамів *S. epidermidis* була стійкою до еритроміцину (14 штамів), пеніциліну (17), оксациліну (15) та олеандоміцину (16). Помірної чутливості не спостерігали.

Таким чином, серед антибіотиків, що гальмують ріст біоплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis,* найбільш активними виявилися фторхінолони (ефективною мішенню яких є ферменти ДНК-гіраза та топоізомераза), та тетрацикліни і аміноглікозиди (інгібітори синтезу білка, що впливають на 30S-субодиницю бактеріальної рибосоми). Найменш ефективним виявився вплив β-лактамних антибіотиків та ряду макролідів.

Серед досліджуваних біоплівкоутворювальних штамів спостерігали стійкість до пеніциліну у 85% культур, оксациліну – у 75%, олеандоміцину – у 80% та еритроміцину – у 70%. Відомо, що мікроорганізми, які здатні до біоплівкоутворення, мають додаткові гени та є носіями плазмід, які роблять їх стійкими до більшості антибіотиків. Відповідно, можна припустити наявність у вивчених штамів плазмідних або хромосомних детермінант стійкості до названих антибіотиків.

Одержані нами дані в цілому співпадають з даними літератури. Так, в роботах різних авторів [3, 4, 9] до ципрофлоксацину чутливість виявляли 100% біоплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis*. До гентаміцину чутливість варіювала від 35,7 до 100% штамів, що співпадає з даними отриманими нами – 100% та 85%, відповідно. До еритроміцину у різних дослідженнях було показано різну чутливість: від 46,4 до 78,3%. В наших дослідженнях навпаки, встановлено більш низький показник: лише 30% штамів були чутливі. До антибіотиків з класу цефалоспоринів чутливість виявляли від 20 до 70% штамів [3, 4], що підтверджено і у наших дослідженнях: чутливість виявляли 35–60% штамів залежно від антибіотика. За даними літератури найвищій відсоток стійких штамів спостерігали до β-лактамних антибіотиків – чутливих штамів по різним даним від 10–40% [3, 4], наші дослідження також довели низьку ефективність даного класу антибіотиків.

Для встановлення МПК антибіотиків щодо планктонних та біоплівкових культур штамів *S. epidermidis*, були відібрані найбільш ефективні препарати – офлоксацин, левофлоксацин, доксциклін гідрохлорид, цефтріаксон та гентаміцин (табл. 1). В ході дослідження встановлено, що МПК офлоксацину для планктонної культури порівняно з МПК, що пригнічує формування біоплівки, менше у 2,3 разу (табл. 1). Найменшою МПК, що пригнічувала ріст планктонної культури було 0,15 мкг/мл, а для біоплівкової культури – 0,3 мкг/мл, найбільшою – 3,0 мкг/мл для планктонної культури і 5,0 мкг/мл – для біоплівкової.

При вивченні МПК левофлоксацину найменшим показником для планктонної культури була концентрація антибіотика 0,3 мкг/мл, а для біоплівкової культури – 0,8 мкг/мл. Найвища МПК – для планктону складала – 1,5 мкг/мл, а для біоплівки – 3,0 мг/мл. МПК, визначені для планктонних культур були меншими порівняно з МПК, що пригнічували формування біоплівки у 2,4 разу.

Таблиця 1

МПК антибіотиків різних класів щодо планктонних та біоплівкових культур *S. epidermidis* (мкг/мл)

Table 1

MIC of different classes antibiotics for plankton and biofilm cultures of *S. epidermidis* (µg/ml)

Назва АБП / Ізолят	Офлоксацин		Левофлоксацин		Доксициклінa гідрохлорид		Цефтриаксон		Гентаміцин	
	планктон	біоплівка	планктон	біоплівка	планктон	біоплівка	планктон	біоплівка	планктон	біоплівка
S. epidermidis 1	0,25	0,5	0,4	1,2	-	-	10,0	15,0	4,0	16,0
S. epidermidis 2	0,4	1,9	1,2	2,2	1,2	3,4	10,0	20,0	-	-
S. epidermidis 3	0,4	0,7	0,8	2,2	-	-	-	-	10,0	30,0
S. epidermidis 4	3,0	5,0	0,6	1,2	-	-	12,0	22,0	-	-
S. epidermidis 5	0,3	0,7	0,5	1,0	-	-	15,0	30,0	15,0	30,0
S. epidermidis 6	0,15	0,3	0,3	0,8	1,5	4,5	-	-	5,5	20,0
S. epidermidis 7	0,5	1,1	1,0	2,0	1,2	2,0	10,0	30,0	-	-
S. epidermidis 8	0,7	1,6	0,4	0,9	2,0	4,0	-	-	10,0	30,0
S. epidermidis 9	0,2	0,4	0,6	1,2	1,0	2,5	15,0	30,0	8,0	20,0
S. epidermidis 10	0,25	0,5	0,7	1,4	1,0	2,0	10,0	15,0	5,0	15,0
S. epidermidis 11	0,3	0,6	0,75	1,5	0,7	1,5	12,0	18,0	8,0	22,0
S. epidermidis 12	0,3	1,2	1,5	3,0	0,5	1,2	9,0	20,0	7,0	14,0
S. epidermidis 13	0,4	0,8	0,8	1,6	1,0	2,0	10,0	15,0	8,0	16,0
S. epidermidis 14	0,3	0,6	0,7	1,4	-	-	8,0	16,0		
S. epidermidis 15	0,25	0,5	1,0	2,0	1,2	2,0	10,0	15,0	6,0	18,0
S. epidermidis 16	0,5	1,0	0,5	1,0	1,5	4,5	10,0	20,0	15,0	30,0
S. epidermidis 17	0,3	0,6	0,6	1,2	-	-	9,0	18,0	6,0	18,0
S. epidermidis 18	0,4	0,8	0,7	1,5	2,0	4,0	12,0	22,0	7,0	18,0
S. epidermidis 19	0,5	1,0	0,4	0,9	1,0	2,5	12,0	20,0	10,0	30,0
S. epidermidis 20	0,35	0,7	0,8	1,6	-	-	-	-	5,5	20,0

МПК доксициклін гідрохлориду, що пригнічують ріст планктонних культур біоплівкоутворювальних штамів *S. epidermidis*, порівняно з МПК для пригнічення формування біоплівки були меншими у 2,3 разу. Найменшою МПК антибіотика для планктонної культури була доза 0,5 мкг/мл, а для біоплівкової культури – 1,2 мкг/мл. Найвища МПК для планктону складала – 2,0 мкг/мл, а для біоплівки – 4,5 мг/мл.

Встановлено, що найменшою МПК цефтриаксону для планктонної культури була кількість, яка становила 8,0 мкг/мл, а для біоплівкової культури – 15,0 мкг/мл. Найвища МПК для планктону складала – 15 мкг/мл, а для біоплівки – 30 мг/мл. МПК, визначених для планктонних культур були меншими порівняно з МПК, що пригнічували формування біоплівки у 1,7 разу.

При вивченні гентаміцину найменшою МПК антибіотику для планктонної культури була доза, яка становила 4,0 мкг/мл, а для біоплівкової – 14,0 мкг/мл. Найвища МПК для планктону складала – 15,0 мкг/мл, а для біоплівки – 30,0 мг/мл. МПК, визначених для планктонних культур були меншими порівняно з МПК, що пригнічували формування біоплівки у 2,7 разу.

Особливість дії антибіотиків на чутливі до них бактерії у біоплівках в значній мірі залежить від здатності препарату проходити крізь поверхневі оболонки і позаклітинний матрикс біоплівки, до складу якого входять білки, полісахариди, ліпіди та нуклеїнові кислоти. Тому МПК антибіотиків для планктонних та плівкових культур одного і того ж штаму можуть значно відрізнятися.

За даними літератури пригнічення формування біоплівки бактеріями відбувалося за концентрації фторхінолонів, що перевищували їх МПК у 5,0 разів, а за іншими даними – навіть у 50–100 разів порівняно з планктонними формами [10, 11]. За результатами наших досліджень максимально МПК фторхінолонів для планктонних та біоплівкових культур відрізнялися у 5,0 разів.

В умовах тісного контакту в середині біоплівки показана можливість передачі генів стійкості до ванкоміцину та тетрацикліну від *E. faecium* до *S. aureus* [11]. За результатами досліджень інших авторів, МПК доксицикліну для біоплівки може перевищувати МПК для планктону у 50 разів. МПК цефалоспоринів для планктонних та біоплівочних культур відрізнялися у 100 разів. В результаті наших досліджень встановлено незначні відмінності між МПК доксицикліну та МПК цефтриаксону для планктону та біоплівки: МПК досліджуваних антибіотиків для біоплівки перевищували у 3,0 рази МПК для планктону.

Показано, що негативно заряджені екзополісахариди доволі ефективно захищають клітини біоплівки від гідрофільних та позитивно заряджених антибіотиків, наприклад аміноглікозидів [17, 18]. За даними літератури МПК антибіотиків з класу аміноглікозидів для планктонних культур бактерій у 15 разів менші за МПК для бактерій біоплівки [16]. За результатами наших досліджень МПК гентаміцину для планктонних та біоплівкових культур відрізнялися у 4,0 рази.

Таким чином, визначено, що із 122 досліджених клінічних штамів стафілококів 37 штамів належали до *S. epidermidis*, з яких 20 були біоплівкоутворювальними.

Встановлено, що серед 19 використаних антибіотиків найвищу ефективність щодо досліджених штамів *S. epidermidis* виявили 5 антибіотиків: офлоксацин, левофлоксацин, цефтриаксон, доксициклін гідрохлорид та гентаміцин. Для даних антибіотиків встановлено різницю між МПК щодо планктонних та біоплівкових культур *S. epidermidis*.

МПК антибіотиків для бактерій, що входять до складу біоплівок була у 5 разів вищою за МПК для планктонних культур *S. epidermidis*.

Усі біоплівкоутворювальні штами були чутливими до офлоксацину і левофлоксацину, 85% виявили чутливість до гентаміцину, 80% – до цефтриаксону та 65% – до доксициклін гідрохлориду, при цьому 80% були стійкими до β-лактамних антибіотиків і 70% – до еритроміцину. МПК цих антибіотиків, які пригнічували ріст планктонних культур, були в середньому у 2 рази менші порівняно з МПК, що пригнічували формування біоплівки.

Досліджено, що найбільша різниця між МПК офлоксацина для планктонної та біоплівкової культури становила 4,5 рази, різниця МПК левофлоксацина – у 5,0 разів, різниця МПК доксициклін гідрохлорида та МПК цефтриаксона – у 3,0 рази, МПК гентаміцина – 4,0 рази.

Отже, проведені дослідження показали, що бактерії штамів *S. epidermidis* у складі біоплівки стійкіші до впливу антибіотиків, ніж ті ж штами у планктонній формі.

УДК 579.61:616-078

О.И. Сидашенко, О.С. Воронкова, Т.Н. Шевченко, Е.А. Сирокваша

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

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ КУЛЬТУР *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Реферат

Цель работы. *Провести сравнительный анализ чувствительности к антибиотикам планктонных и биопленочных бактерий 20 штаммов S. epidermidis.* **Методы.** *Идентификацию клинических штаммов стафилококков проводили по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам. Чувствительность к 19 антибиотикам определяли с помощью диск-диффузионного метода. Способность к биопленкообразованию определяли визуально в 96-луночном иммунологическом планшете.* **Результаты.** *Определено, что чувствительность планктонных и биопленочных форм клинических изолятов S. epidermidis к антибиотикам существенно отличаются: МПК для офлоксацина составляла 0,15–3,0 мкг/мл (планктонная форма) и 0,3–5,0 мкг/мл (биопленочная форма), для левофлоксацина соответственно 0,3–1,5 и 0,8–3,0 мкг/мл; для доксициклин-гидрохлорида 0,5–2,0 и 1,2–4,5 мкг/мл; для цефтриаксона 8,0–15,0 и 15,0–30,0 мкг/мл и для гентамицина 4,0–15,0 и 14,0–30,0 мкг/мл.* **Выводы.** *Определено, что*

МПК антибиотиков, которые угнетают рост планктонных культур в среднем в 2–5 раз меньше сравнительно с МПК, что угнетают формирование биопленки.
Ключевые слова: биопленкообразующие и небиопленкообразующие штаммы, Staphylococcus epidermidis, планктонная и биопленочная культуры, минимальная подавляющая концентрация антибиотика (МПК).

O.I. Sidashenko, O.S. Voronkova, T.M. Shevchenko, O.A. Sirokvasha

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

SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF PLANKTON AND BIOFILM CULTURE OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Summary

The aim *was to conduct the comparative analysis of the sensitivity of 20 S. epidermidis strains of plankton and biofilm to antibiotics.* **Methods.** *Identification of clinical strains of staphylococci was performed using morphological, physiological and biochemical characteristics. Sensitivity to 19 antibiotics was determined using the disc-diffusion method. The study tested the ability for film formation in 96-well plate immunoassay.* **Results.** *There were established that the sensitivity of planktonic and biofilm forms clinical isolates of S. epidermidis to antibiotics was significantly different: MIC for ofloxacin was 0.15–3.0 µg/ml (planktonic form) and 0.3–5.0 µg/ml (biofilm form); for levofloxacin respectively 0.3–1.5 µg/ml and 0.8–3.0 µg/ml; for doxycycline hydrochloride 0.5–2.0 µg/ml and 1.2–4.5 µg/ml; for ceftriaxone 8.0–15.0 µg/ml and 15.0–30.0 µg/ml; for gentamicin 4.0–15.0 µg/ml and 14.0–30.0 µg/ml.* **Conclusion.** *It is determined that MIC antibiotics that inhibit the growth of plankton cultures on average are 2–5 times less compared to MIC, inhibiting biofilm formation.*
Key words: film-forming strains, non-film-formation strains, S. epidermidis, plankton and biofilm cultures, minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н.* Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. – 2011. – Т. 61, № 3. – С. 119–125.

2. *Гостев В.В., Сидоренко С.В.* Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4–15.

3. *Коленчукова О.А.* Проблема приобретения устойчивости к антибиотикам популяции штаммов *Staphylococcus epidermidis* в зависимости от техногенной нагрузки // Антибиотики и химиотерапия. – 2007. – Т. 9–10, №. 52. – С. 41–44.

4. *Коленчукова О.А., Савченко А.А.* Дозозависимое влияние пенициллина на активность метаболических ферментов штаммов *Staphylococcus epidermidis* // Антибиотики и химиотерапия. – 2005. – Т. 4., № 50 – С. 3–6.

5. *Коробов В.П.* Анализ чувствительности процессов формирования биопленок *Staphylococcus epidermidis* 33 к некоторым факторам внешней среды // Вестник пермского университета. Биологи. – 2010. – Т. 1, № 1. – С. 59–63.

6. *Наказ* МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – К: МОЗ України, 2007. – 63 с.

7. *Определитель бактерий Берджи*: пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – Москва «Мир», 1997. – 555 с.

8. *Сидоренко С.В.* Роль бактериальных биопленок в патологии человека // Инфекции в хирургии. – 2004. – Т. 2, № 3. – С. 16–20.

9. *Скоробогатых Ю.И., Перунова Н.Б., Курлаева П.П., Бухарин О.В.* Экспериментальное изучение комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на образование биопленок условно-патогенными бактериями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – №6. – С. 3–7.

10. *Тец В.В.* Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб.: КЛЕ-Т. – 2006. – С. 128.

11. *Чернявский В. И.* Бактериальные биопленки и инфекции (лекции). // Аннали мечниковского института – 2013. – № 1. – С. 86–90.

12. *Beveridge T.J.* Visualizing bacterial cell walls and biofilms // Microbe. – 2006. – V. 1. – 6. – P. 1–6.

13. *Davey M.E., O'Toole G.A.* Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – № 64. – P. 847–867.

14. *Donlan R.M., Costerton J.W.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – V. 15. – P. 167–193.

15. *Gomes F., Teixeira P., Cerca N.* Effect of Farnesol on Structure and Composition of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Matrix // Current Microbiology – 2002. – V. 63, № 4. – P. 354–359.

16. *Hatch, R. A., and N. L. Schiller.* Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa //* Antimicrob. Agents Chemother. – 1998. – V. 42. – P. 974–977.

17. *Ishida, H., Y. Ishida, Y. Kurosaka, T. Otani, K. Sato, and H. Kobayashi.* In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Psendomonas aeruginosa* // Antimicrob. Agents Chemother. – 1998. – V. 42. – P. 1641–1645.

18. *Nichols, W. W., M. J. Evans, M. P. E. Slack, and H. L. Walmsley.* 1989. The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* // J. Gen. Microbiol. – V. 135. – P. 1291–1303

Стаття надійшла до редакції 28.01.2014 р.

УДК 544:395:544:723

**Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Бєляєва,
О.Г. Горшкова, І.В. Пузирьова, В.О. Іваниця**

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

ВИДАЛЕННЯ БРОМІДУ ГЕКСАДЕЦИЛПІРИДИНІЮ ІЗ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS* ЗА ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З ГЛИНИСТИМ МІНЕРАЛОМ ТА ХІТОЗАНОМ

Мета. *Удосконалення способу видалення найпоширенішого представника катіонних поверхнево-активних речовин (КПАР) – біологічно "жорсткого" броміду гексадецилпіридинію (БГДП) з водних розчинів нафтоокиснювальними бактеріями роду Pseudomonas за їх взаємодії з природними сорбентами (глинистим мінералом та хітозаном).* ***Методи.*** *Непатогенні бактерії P. fluorescens ONU328, P. maltophilia ONU329, P. cepacia ONU327 культивували в поживному середовищі М-9 з додаванням 0,5% пептону при pH 7,2–7,4. Після сорбції залишковий вміст КПАР у розчинах визначали колориметричним методом.* ***Результати.*** *У результаті проведених досліджень встановлено, що використання бактерій P. cepacia ONU327, P. fluorescens ONU328 і P. maltophilia ONU329 за їх взаємодії з природними сорбентами (глинистим мінералом та хітозаном 1:1 по масі) дозволяє у нейтральному середовищі підвищити ступінь видалення БГДП із водних розчинів до 98,0–99,5% при вихідній концентрації КПАР 100 мг/л та скоротити оптимальний час контактування з сорбентами з 60 хв за відсутності мікроорганізмів до 20 хв за їх присутності. Одним грамом змішаного сорбенту із розчину видаляється до 24,9 мг КПАР.* ***Висновок****. Використання біологічно модифікованих природних сорбентів забезпечує глибоке очищення води від КПАР, зокрема від солей алкілпіридинію, стадію сорбції КПАР рекомендовано включати в комплексну екологічно безпечну біотехнологію водоочищення.*

Ключові слова: бромід гексадецилпіридинію, видалення, водні розчини, бактерії роду Pseudomonas, глинистий мінерал, хітозан.

Бромід гексадецилпіридинію є типовим представником катіонних поверхнево-активних речовин (КПАР), які використовуються у промисловості як змочувачі, диспергатори, емульгатори і як антистатичний засіб при прядінні штучного шовку, а також при виробництві пластмас, косметичних і синтетичних миючих засобів, у хімічному аналізі, у процесі емульсійної полімеризації, у текстильній, нафтодобувній, нафтопереробній промисловостях та інших галузях [1].

Із даних літератури [7] відомо, що вміст КПАР у стічних водах залежно від виду виробництва коливається в широких межах. Так, тільки вміст іоногенних

© Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Бєляєва, О.Г. Горшкова, І.В. Пузирьова, В.О. Іваниця, 2014

ПАР у стоках деяких текстильних фабрик знаходиться у межах 5–50 мг/л, крупних механізованих пралень – 200 мг/л. Бромід гексадецилпіридинію (БГДП) ($[C_{16}H_{33}N^{+}C_{5}H_{5}]Br^{-}$) виявляє у порівнянні з первинними, вторинними і третинними алкіламінами більш основні властивості, в досить широкому діапазоні значень pH середовища знаходиться в іонній формі [12].

Широке використання ПАР неминуче призводить до забруднення ними відкритих водойм і ставить на порядок денний питання вибору ефективного методу очищення технологічних водних розчинів і стічних вод перерахованих вище виробництв і промислових підприємств.

На сьогодні досить ефективними методами видалення КПАР із водних розчинів вважаються методи осаджувальної флотації, флотофлокуляції, флотосорбції, що забезпечують у кислому і лужному середовищах 85% ступінь їх видалення при вихідній концентрації $C \leq 100$ мг/л [2, 8].

Однак для здійснення флотаційного видалення катіонних ПАР із відпрацьованих водних розчинів необхідно додатково оснащувати підприємства флотаційними механічними збирачами піни або вводити певні не менш токсичні реагенти для підвищення ступеня їх видалення і суттєвого зменшення об'єму утвореного пінного продукту [11].

Із усіх спеціальних методів очищення води від катіонних ПАР сорбційний метод є найпростішим, менше вартісним при використанні природних легкодоступних, дешевих і екологічно безпечних сорбентів (активоване вугілля, цеоліт, глина, хітозан), простим у здійсненні та, найголовніше, енергонезалежним [10, 13].

Підвищити ефективність сорбції можливо шляхом хімічної модифікації поверхні сорбентів або біологічним шляхом за рахунок використання бактерій за їх контактної взаємодії з частками природних сорбентів.

Метою даної роботи було вивчення видалення броміду гексадецилпіридинію з водних розчинів бактеріями роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітозаном.

Матеріали і методи

У роботі використано непатогенні штами бактерій роду *Pseudomonas* – *P. cepacia* ONU327*, P. fluorescens* ONU328*, P. maltophilia* ONU329, що зберігаються в колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Штами *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 вилучено з морського середовища, *P. cepacia* ONU327 – з забрудненого нафтопродуктами ґрунту. Ці культури бактерій є деструкторами біорезистентних органічних сполук (органічних барвників, вуглеводнів нафти та інш.) [3].

Бактерії вирощували на рідкому мінеральному середовищі М-9 з додаванням 0,5% пептону (pH 7,2–7,4) при 28 °С впродовж 48 год. У експериментах використовували дешевий та легкодоступний в Україні глинистий мінерал групи монтморилоніту (бентонітову глину ТУ У 320.00136751.032-99) і хітозан, що мають підвищену іонообмінну та сорбційну здатність щодо ПАР.

Контактну взаємодію бактерій з частками глинистих мінералів і хітозаном (1:1 по масі) здійснювали при температурі 28 °С. Для цього 2,0 г глинистого мінералу змішували з 2,0 г хітозану, заливали сорбенти суспензією (100 мл) бактерій у концентрації 1×10^9 мк/мл. Після перемішування (50 об/хв) суспензії бактерій з глинистим мінералом і хітозаном впродовж 60 хв суміш залишали в статичному стані на 60 хв для формування осаду, потім надосадову рідину зливали. Інокульовані осади на дві доби заливали 8,5% водним розчином NaCl при температурі 28 °С і в подальшому використовували у вологому вигляді.

В даній роботі проведено дослідження з видалення із водних розчинів КПАР броміду гексадецилпіридинію (БГДП) із вихідною концентрацією 100 мг/л. Модельні розчини готували шляхом розчинення 0,1 г (БГДП) у 1 л дистильованої води за температури 45 °С.

Видалення БГДП із водних розчинів здійснювали за температури 20 °С, у нейтральному середовищі (pH 7,0), яке встановлювали за допомогою 0,1 н розчинів HCl і NaOH. У скляні колби ємністю 250 мл вносили по 100 мл водного розчину катіонної ПАР (з концентрацією 100 мг/л, що є в два рази меншою за критичну концентрацію міцелоутворення [1, 2]), додавали 0,4 г вологого сорбенту (глинистого мінералу та хітозану) з бактеріями, щільно закривали гумовим корком і струшували протягом 20–60 хв.

Для порівняння у контрольні проби з БГДП додавали 0,4 г сорбенту (0,2 г глинистого мінералу і 0,2 г хітозану), не інокульованого бактеріями.

Для досягнення сорбційної рівноваги давали пробам відстоятися. Використаний сорбент відфільтровували через фільтрувальний папір і в фільтраті визначали залишкову рівноважну концентрацію КПАР колориметрично в присутності метилоранжу за стандартною методикою [1].

Ступінь видалення БГДП з води розраховували за рівнянням:

$\alpha = [(C_0 - C)/C_0]\times100\%$, де C_o і C – вихідна і залишкова рівноважна концентрації катіонної ПАР у воді, відповідно.

Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента на рівні значимості не менше 95% ($p\leq0,05$). Обробку даних здійснювали за допомогою програми Excel.

Результати та їх обговорення

В результаті досліджень встановлено (таблиця), що використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з природними сорбентами (глинистим мінералом та хітозаном 1:1 по масі) для очищення води від броміду гексадецилпіридинію інтенсифікує процес сорбції КПАР у нейтральному середовищі [6].

Порівняльний аналіз показав, що за взаємодії бактерій *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 з природними сорбентами через 20 хвилин експозиції залишковий вміст БГДП складав відповідно 2,0±0,20 і 2,0±0,18 мг/л. При цьому ступінь видалення становив 98,0% .

При використанні для інокуляції змішаних природних сорбентів штаму *P. cepacia* ONU327 ступінь очищення води від БГДП через 20 хвилин експозиції

сягав 99,5%. Залишкова концентрація броміду гексадецилпіридинію у водному розчині не перебільшувала 0,5 мг/л, що відповідає нормативним вимогам [4].

Збільшення експозиції до 60 хвилин приводило до незначного збільшення ступеню видалення БГДП (на 0,2–0,5%) сумішшю глини з хітозаном та бактеріями *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329. Таким чином, за одного граму змішаного сорбенту видаляється із розчину 24,5–24,9 мг КПАР.

Таблиця

Видалення броміду гексадецилпіридинію із водних розчинів бактеріями роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітозаном

Table

Remove of hexadecylpyridinium bromide from aqueous solutions by bacteria of the genus *Pseudomonas* in their interaction with clay mineral and chitosan

Штам	Залишковий вміст БГДП, мг/л	Ступінь видалення (α) БГДП, %
Експозиція 20 хв.		
P. fluorescens ONU 328	2,0±0,20*	98,0
P. maltophilia ONU 329	2,0±0,18*	98,0
P. cepacia ONU 327	0,5±0,08*	99,5
Контроль	22,0±1,70*	78,0
Експозиція 60 хв.		
P. fluorescens ONU 328	1,5±0,12*	98,5
P. maltophilia ONU 329	1,5±0,14*	98,5
P. cepacia ONU 327	0,3±0,07*	99,7
Контроль	17,0±1,18	83,0

Примітка: – вихідна концентрація БГДП становила 100,0 мг/л;
- концентрація сорбенту – 4,0 г/л;
* різниця у порівнянні з контролем достовірна, $p \leq 0,05$

Note: – output concentration of HDPBr was 100.0 mg/l;
- sorbent concentration – 4.0 g/l
* distinction is reliable as compared to control, $p \leq 0,05$

Проведені дослідження по сорбції БГДП із водних розчинів на природних сорбентах (суміш глинистого мінералу з хітозаном у відсутності мікроорганізмів) показали меншу ефективність проведення процесу очищення води від КПАР. У контролі через 20 хвилин експозиції залишковий вміст БГДП у водному розчині складав 22,0±1,70 мг/л, ступінь очищення води не перебільшував 78,0%, а через 60 хвилин – 83,0% (при pH 7).

Використання бактерій роду *Pseudomonas* з природними сорбентами збільшує (на 16,7–21,5%) ступінь сорбції броміду гексадецилпіридинію при зменшені оптимального часу контактування порівняно з контролем. Крім того, на біологічно модифікованих змішаних природних сорбентах, хоча і повільно, але відбувається деструкція ПАР на більш прості нетоксичні речовини. Аналогічну деструкцію біологічно жорстких ПАР спостерігали автори робіт [5, 9].

Отримані результати досліджень показали, що використання бактерій роду *Pseudomonas* та суміші природного неорганічного сорбенту глинистого мінералу з природним полімером хітозаном може бути перспективним в комплексних схемах екологічно безпечного очищення багатокомпонентних стічних вод, забруднених катіонними поверхнево-активними речовинами, зокрема біологічно «жорстким» бромідом гексадецилпіридинію.

Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.А. Беляева, О.Г. Горшкова, И.В. Пузырева, В.А. Иваница

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

УДАЛЕНИЕ БРОМИДА ГЕКСАДЕЦИЛПИРИДИНИЯ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS* ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ГЛИНИСТЫМ МИНЕРАЛОМ И ХИТОЗАНОМ

Реферат

Цель. *Усовершенствование способа удаления наиболее распространенного представителя катионных поверхностно-активных веществ (КПАВ) – биологически "жесткого" бромида гексадецилпиридиния (БГДП) из водных растворов нефтеокисляющими бактериями рода Pseudomonas при их взаимодействии с природными сорбентами (глинистым минералом и хитозаном).* **Методы.** *Непатогенные бактерии P. fluorescens ONU-328, P. maltophilia ONU329, P. cepacia ONU327 культивировали в питательной среде М-9 с добавлением 0,5% пептона при pH 7,2–7,4. После сорбции остаточное содержание КПАВ в растворах определяли колориметрическим методом.* **Результаты.** *В результате проведенных исследований установлено, что использование бактерий P. cepacia ONU327, P. fluorescens ONU328 и P. maltophilia ONU329 при их взаимодействии с природными сорбентами (глинистым минералом и хитозаном 1:1 по массе) позволяет в нейтральной среде повысить степень удаления БГДП из водных растворов до 98,0–99,5% при исходной концентрации КПАВ 100 мг/л и сократить оптимальное время контактирования с сорбентами с 60 мин в отсутствии микроорганизмов до 20 мин при их присутствии. С помощью 1 г смешанного сорбента удаляется из раствора 24,5–24,9 мг КПАВ.* **Вывод**. *Использование биологически модифицированных природных сорбентов обеспечивает глубокую очистку воды от КПАВ, в частности от солей алкилпиридиния, стадию сорбции КПАР рекомендуется включать в комплексную экологически безопасную биотехнологию водоочистки.*

Ключевые слова: бромид гексадецилпиридиния, удаление, водные растворы, бактерии рода Pseudomonas, глинистый минерал, хитозан.

T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.A. Beliaeva, O.G. Gorshkova, I.V. Puzyreva, V.O. Ivanytsia

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

REMOVE OF HEXADECYLPYRIDINIUM BROMIDE FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* IN THEIR INTERACTION WITH CLAY MINERAL AND CHITOSAN

Summary

The aim. *Improvement of the method of removing the most common representative of cationic surfactants – biologically hard hexadecylpyridinium bromide (HDPBr) from aqueous solutions of oil oxidative bacteria of the genus Pseudomonas in their interaction with the natural sorbents (clay mineral and chitosan).* **Methods.** *Non-pathogenic bacteria P. fluorescens ONU328, P. maltophilia ONU329, P. cepacia ONU327 were cultivated in nutrient medium M-9 with the addition of 0.5% peptone at pH of 7.2 to 7.4. After sorbtion the residual content of cationic surfactants in solutions was determined by the colorimetric method.* **Results.** *In result of studies it is established that the use of bacteria P. cepacia ONU327, P. fluorescens ONU328 and P. maltophilia ONU329 in their interaction with the natural sorbents (clay mineral and chitosan 1:1 by weight) allows to increase in neutral environment a degree of removal HDPBr from aqueous solutions to 98.0–99.5% at the initial concentration of cationic surfactant 100 mg/l and to reduce the optimal time contact with the sorbents from 60 min in the absence of microorganisms to 20 minutes at their presence. With help of 1 g of mixed sorbent it is removed 24.5–24.9 mg of cationic surfactant from the solution.* **Conclusion.** *Using of biologically modified natural sorbents provides deep water purification from cationic surfactant, from salts alkylpyridinium in particular, and the stage of sorbtion is recommended to includ in a comprehensive, ecologically safe biotechnology of water purification.*

Key words: hexadecylpyridinium bromide, remove, aqueous solutions, bacteria of the genus Pseudomonas, clay mineral, chitosan.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Файнгольд С.И.* Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение: Учеб. пособие для вузов. – Л. : Химия, 1988. – 200 с.

2. *Волювач О.В.* Колоїдно-хімічні закономірності вилучення солей гексадецилпіридинію із водних розчинів : Дис. …канд. хім. наук : 02.00.11 – Київ, 2006. – 135 с.

3. *Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Конуп І.П., Бухтіяров А.Є., Лісютін Г.В., Пузирьова І.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О.* Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013, № 4. – С. 72–80.

4. *ДСТУ* 3812-98. Охорона довкілля та раціональне поводження з ресурсами. Контроль оперативних стічних вод очисних споруд міст і промислових

підприємств : Загальні положення. – Введ. 1999.07.01. – Офіц. вид. – К. : Держстандарт України, 1999. – IV. 6 с.

5. *Заец С.Н., Таранова Л.А.* Бактериальная деструкция алкилнафталинсульфоната // Химия и технология воды. –1998, № 5. – С. 550–555.

6. *Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Конуп І.П., Горшкова О.Г.* Біохімічний метод очищення промислових стічних вод від поверхнево-активних речовин // Екологічні проблеми Чорного моря, Одеса: ІНВАЦ. – 01–02 листопада 2012 р. – С. 7–8.

7. *Поверхностно*-активные вещества. Свойства, технология, применение, экологические проблемы / Под ред. П.С. Белова. – М. : Изд-во ВЗПИ, 1992. – 171 с.

8. *Свиридов В.В., Свиридов А.В., Никифоров А.Ф.* Физико-химические основы процессов микрофлотации. – Екатеринбург : ГОУ ВПО УГЛТУ-УПИ, 2006. – 578 с.

9. *Сопрунова О.Б., Утепешева А.А., Виет Тиен Нгуен.* Микроорганизмы – деструкторы ПАВ в водных средах // Водные биоресурсы и их рациональное использование. Вестник АГТУ. Сер. : Рыбное хозяйство. – 2013. – № 1. – С. 83–90.

10. *Тарасевич Ю.И.* Природные сорбенты в процессах очистки воды. – К. : Наук. думка, 1981. – 208 с.

11. *Холмберг К., Йенссон Б., Кронберг Б., Линдман Б.* Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. – 528 с.

12. *Bunting J.W.* Advances in heterocyclic chemistry / Ed by. A.R. Katritzky, A.J. Boulton. – 1975. – Vol. 25. – N.Y. – 467 p.

13. *Патент* України на винахід № 95593 А. Спосіб очистки води від катіонних поверхнево-активних речовин / Стрельцова О.О., Волювач О.В., Пузирьова І.В., Єгорцева В.О. / Опубл. : 10.08.2011. Бюл. № 15/2011.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2014 р.

УДК 579.26:581.1

І.В. Жерносєкова, О.А. Тимчук, В.П. Ткаченко, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна,
тел.: +38 (056) 760 85 14, e-mail: microviro@rambler.ru

ВПЛИВ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ *STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS* НА РІСТ ПРОРОСТКІВ ОВОЧЕВИХ КУЛЬТУР

Мета. *Вивчити вплив препарату ГЗХ штаму Streptomyces recifensis var. lyticus 2435 і супернатанту культуральної рідини (СКР) штаму Streptomyces recifensis var. lyticus 2Р-15 на ріст проростків овочевих культур та порівняти активність їх дії із регуляторами росту рослин емістимом і гетероауксином.* ***Методи.*** *Проведено дослідження біометричних і біохімічних змін у проростків кабачків, огірків, томатів, редису за дії мікробних препаратів та регуляторів росту рослин. Вивчали змінення показників енергії проростання насіння, довжини коріння, протеїназної, пероксидазної, поліфенолоксидазної активності.* ***Результати.*** *Згідно біометричних даних (енергія проростання, довжина коріння) показано, що для прискорення росту проростків кабачків, огірків, томатів, редису найбільш ефективною була дія СКР і препарату ГЗХ, які стимулювали дані показники на 8–30% і 5–20%, емістим стимулював тільки довжину коренів на 10–40% і не впливав позитивно на енергію проростання насіння. Виявлено, що гетероауксин пригнічує біометричні показники на 12–50%. Стимуляцію протеїназної активності насіння ефективно здійснювали емістим (стимуляція в 1,5–5,0 рази) і СКР (1,3–2,9 рази); пероксидазної активності коренів –емістим (1,3–3,5 рази) і СКР (1,4–3,0 рази); поліфенолоксидазної активності листків – СКР (1,3–4,0 рази) і емістим (1,2–3,8 рази).* ***Висновки.*** *Дослідження дії мікробних препаратів і регуляторів росту рослин на проростках овочевих культур показало, що позитивні зміни біометричних показників та ферментативних активностей, які відбуваються у проростків є відповідною реакцією на дію біотичних факторів і залежать від типу препарату і виду овочевої культури. Виявлена стимуляція біометричних і біохімічних ознак у проростків овочевих культур, за дії препаратів, може бути основою для використання СКР, ГЗХ та емістиму для прискорення їх росту.*

Ключові слова: Streptomyces recifensis var. lyticus, емістим, гетероауксин, протеїназна, пероксидазна, поліфенолоксидазна активність, стимулятор росту рослин.

Фітогормони та біопрепарати, як біостимулятори, беруть участь у координації різноманітних фізіологічних процесів у рослин, тим самим, сприяють стимуляції їх росту і розвитку, захищають від фітопатогенів, посилюють імунний статус [9, 10, 19, 24]. Використання у рослинництві нетоксичних, безпечних, економічно-ефективних біостимуляторів дозволить суттєво збільшити врожаї сільськогосподарських культур та отримати якісну продукцію.

© І.В. Жерносєкова, О.А. Тимчук, В.П. Ткаченко, А.І. Вінніков, 2014

Перспективним для сільськогосподарської практики є мікробний препарат лізорецифін на основі метаболітів *Streptomyces recifensis var. lyticus*, розроблений колективом кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології. Препарат проявляє стимулюючу активність до рослин та антимікробну дію завдяки синтезу стрептоміцетом стимулятора росту та комплексу екстрацеллюлярних літичних ферментів [21, 26].

Необхідно зазначити, що препаратів стимулювальної дії із стрептоміцетів, що використовуються в технології вирощування рослин не багато [2, 12]. Найчастіше стрептоміцети входять до складу комплексних або монопрепаратів бактеріальних пестицидів [7].

В літературі існують відомості, що збільшувати продуктивність сільськогосподарських рослин можливо за дії природних та синтетичних регуляторів їх росту [7, 16, 19]. В цьому сенсі , особливої уваги заслуговує природний регулятор емістим С – продукт біотехнологічного вирощування грибів-ендофітів з кореневої системи лікарських рослин, який підвищує схожість насіння багатьох сільськогосподарських культур [10]. Крім того, є повідомлення, що емістим позитивно впливає на продуктивність фосфатмобілізувальної бактерії *E. nimipressuralis* [20]. Із синтетичних регуляторів росту відомим є гетероауксин, отриманий на основі природної речовини – калійної солі індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК). Ця речовина синтезується багатьма мікроорганізмами, належить до фітогормонів ауксинового ряду, які відповідають за поділення, розтяжіння та диференціацію рослинних клітин і тканин, посилюючи проростання насіння, коренеутворення та ін. [23, 24, 25].

Метою даної роботи було вивчення впливу продуктів метаболізму *Streptomyces recifensis var. lyticus* (мікробний препарат Г3Х та супернатант культуральної рідини (СКР) на ріст проростків овочевих культур та порівняння активності їх дії із регуляторами росту рослин емістимом та гетероауксином.

Матеріали і методи

В роботі використовували мікробний ферментний препарат лізорецифін Г3Х у концентрації 0,006% за сухою вагою, а також СКР 72-годинної культури рифампіциностійкого варіанту у концентрації 0,004% за об'ємом. Дослідно-промислова партія лізорецифіну Г3Х, яка вироблена на Ладижинському підприємстві ВО «Ензим», ТУ 2066744-37-01-90, являє собою висушену культуральну рідину штама *S. recifensis var. lyticus* 2435 з наповнювачем. Препарат містить комплекс літичних (п'ять ендопептидаз, дві глікозидази) та супутніх ферментів (протеази, амілази), а також стимулюючий фактор глікопептидної природи [21, 26]. У дослідах використовували рифампіциностійкий штам *S. recifensis var. lyticus* 2Р-15, який вигідно відрізняється від штама 2435 здатністю синтезувати ендопептидази, глікозидази і фактор росту за літичною та стимулюючою активностями вище вихідного штаму в 2,5–5,0 рази [5].

Рифампіциностійкий штам стрептоміцету вирощували при 220 об/хв, температурі 28 °С у колбах об'ємом 750 мл, що містили по 50 мл ферментацій-

ного середовища наступного складу (%): соєве борошно – 0,6; $CaCO_3$ – 0,42; $CaCl_2$ – 0,2; $FeSO_4$ – 0,005; $MgCl_2$ – 0,056; $ZnSO_4$ – 0,00002; $MnCl_2$ – 0,0015; NH_4NO_3 – 0,152; K_2HPO_4 – 0,027; глюкоза – 1,18. СКР відокремлювали від клітин центрифугуванням протягом 15 хв при 7000 об/хв. Природний регулятор росту емістим С виробництва МНТЦ «Агробіотех» (Україна) застосовували у рекомендованій виробником для проростання насіння концентрації 0,1%. Як хімічний регулятор росту досліджували гетероауксин – препарат, що містить 850 г/кг калійної солі індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) також у рекомендованій виробником ЗАТ «ТПК Техноекспорт» (Росія) концентрації 0,002%.

При проведенні лабораторних дослідів препаратами – біостимуляторів оброблювали насіння овочевих культур: кабачків сорту Грибовський; огірків сорту Конкурент; томатів сорту Новачок та редису скоростиглого. Насіння у кількості 30 шт. знезаражували сумішшю етилового спирту 96% та перекису водню 3% (1:1) протягом 15 хв., відмивали 2 рази стерильним фізіологічним розчином. В чашках Петрі на стерильному фільтрувальному папері розміщали 30 шт. насіння та вносили розчини препаратів об'ємом 5 мл на чашку. Тривалість обробки складала 24 год. при температурі 22 °С. Дію препаратів припиняли, замінюючи фільтрувальний папір на новий та продовжували пророщувати насіння з використанням дистильованої води. У випадку дослідження ГЗХ, емістиму та гетероауксину контролем слугувало насіння, яке зволожували водою, а у випадку супернатанта культуральної рідини – насіння зволожене вихідним поживним середовищем, яке було розведене до концентрації, використаної у дослідних зразках.

Ефективність дії препаратів на насіння овочевих культур оцінювали за біометричними та біохімічними показниками проростків: енергією проростання насіння та довжиною коріння. Крім того, визначали протеїназну активність насіння за методом Segundo [22]. Пероксидазну активність (КФ 1.11.1.7) коріння проростків, в якій за присутності перекису водню каталізовано ферментом реакцію окислювання бензидину з утворенням продуктів окиснення синього кольору, вивчали на 7-у добу і виражали у відносних одиницях густини Е/хв·г сирої речовини [18]. Поліфенолоксидазну активність (КФ 1.10.3.1) листків проростків, в якій каталізовано ферментом реакцію окислення дифенолів киснем повітря, де о-дифенол пірокатехін перетворювався на о-хінон, визначали на 10-у добу і виражали у мкМоль/г сирої речовини [18].

Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням методів варіаційної статистики [8]. Різницю середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p<0,05$.

Результати та їх обговорення

Попередня обробка насіння кабачків сорту Грибовський біопрепаратом ГЗХ та СКР обумовила статистично достовірне збільшення енергії проростання насіння на 5% та 8%. Крім того, спостерігали також стимулювання росту коренів проростків на 20% і 30% в порівнянні з показниками контролю (табл.).

Таблиця

Біометричні показники проростків овочевих культур після впливу біостимуляторів (n=3)

Table

Biometric parameters of vegetable sprouts after influence of biostimulants (n=3)

Овочева культура	Варіант обробки насіння	Енергія проростання		Довжина коріння, % до контролю
		Штук	% до контрою	
Кабачок сорту Грибовський	Контроль (вода)	25,0±0,12	100,0	100,0
	ГЗХ	26,3±0,23*	105,2	120,1
	СКР	27,1±0,27*	108,4	130,2
	Емістим	24,8±0,53	99,2	126,7
	Гетероауксин	12,6±0,36*	50,4	80,6
Огірок сорту Конкурент	Контроль (вода)	22,1±0,21	100,0	100,0
	ГЗХ	22,8±0,30	103,2	142,3
	СКР	24,5±0,25*	110,8	115,2
	Емістим	20,0±0,15*	90,5	139,8
	Гетероауксин	17,3±0,42*	78,3	116,3
Томат сорту Новачок	Контроль (вода)	25,6±0,11	100,0	100,0
	ГЗХ	28,8±0,20*	112,5	85,5
	СКР	29,1±0,25*	113,6	116,6
	Емістим	16,1±0,58*	62,8	111,1
	Гетероауксин	12,7±0,63*	50,0	81,1
Редис скоростиглий	Контроль (вода)	24,3±0,12	100,0	100,0
	ГЗХ	24,6±0,20	101,2	98,9
	СКР	28,2±0,21*	116,0	119,7
	Емістим	20,2±0,58*	83,1	110,3
	Гетероауксин	20,0±0,43*	82,3	59,6

Примітка:* – різниця достовірна у порівнянні з контролем
Note: * – distinction is reliable as compared to control

В той же час, синтетичний препарат гетероауксин достовірно сприяв зниженню енергії проростання насіння на 50% та довжини коренів на 20%. За умов дії емістиму на насіння кабачків достовірних показників не отримали.

Використання мікробних препаратів для обробки насіння огірків сорту Конкурент призвело до збільшення біометричних показників проростків лише за дії СКР. Так, достовірне підвищення енергії проростання насіння отримано

на рівні 11%, а довжини коренів на 15% у порівнянні з контролем. Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, в яких підвищення енергії проростання насіння того ж сорту огірків на рівні 18% зафіксовано за дії культуральної рідини бактерій *B. subtilis* ІМВ-7023 [7]. Відмічено, що дія цих мікроорганізмів на енергію проростання насіння є важливим критерієм оцінки ефективності впливу бактеріальних препаратів на розвиток рослин [7]. Стимуляцію росту коренів та енергії проростання насіння огірків відмічали також інші автори при використанні препарату аверком із стрептоміцету [3]. Збільшення довжини коренів в межах від 7% до 33% у різних сортів огірків найчастіше автори спостерігали при використанні бактеріальної суспензії *Beijerinckia mobilis и Clostridium sp.* [14]. Як видно з таблиці, за умов дії емістиму та гетероауксину, отримано достовірне зниження на 10% і 12% енергії проростання насіння огірків, проте спостерігали позитивний вплив регуляторів росту на довжину коренів.

Стимулювальний ефект біометричних показників при використанні ГЗХ та СКР отримано на насінні томатів сорту Новачок. Так, нами відмічено збільшення енергії проростання насіння на 12% та 13% за дії ГЗХ та СКР, відповідно, проте довжина коренів була більшою за контроль на 16% тільки при використанні СКР стрептоміцету. Препарати емістим та гетероауксин, навпаки, сприяли низькому рівню енергії проростання насіння, який склав 63% та 50% до контролю. Насамперед, природний регулятор росту емістим забезпечував збільшення довжини коренів на 11%. За даними літературних джерел показано, що енергія проростання насіння томатів різних сортів при використанні СКР *B. subtilis* була вище контрольних значень на 12,9% та 13,6%, а за дії СКР різних штамів *A. vinelandii* – на 4–19% [7]. Інші автори показали, що метаболіти стрептоміцетів підвищували енергію проростання томатів сорту Факел на більш високому рівні – на 20,6–38,3% [13].

В дослідах з насінням редису скоростиглого спостерігали стимуляцію енергії проростання на 16% та довжини коріння на 20% за умов використання СКР. Препарати емістим та гетероауксин достовірно знижували енергію проростання насіння, як і у випадку інших овочевих культур, проте нами зафіксовано збільшення на 10% довжини коренів лише за дії емістиму. Про зростання енергії проростання насіння редису та довжини його коренів повідомляють Білявська Л.О. та співавт. за використання стрептоміцетного препарату аверком [3] або культур *Beijerinckia* та *Clostridium* [14].

Резюмуючи дані наведені в таблиці, можемо констатувати, що у всіх експериментальних овочевих культур СКР забезпечив достовірну стимуляцію процесів біометричних даних в межах від 8% до 30%. Препарат дослідної партії стрептоміцету ГЗХ виявляв активність в менших межах від 5% до 20% у відношенні кабачків і томатів. Позитивний ефект емістиму виявлено у відношенні стимуляції довжини кореневої системи огірків, томатів, редису на 10–40% в порівнянні з контрольними проростками. Гетероауксин достовірно знижував біометричні показники експериментальних культур на 12–50%. Подібне зниження, за умов використання гетероауксину, енергії проростання

насіння пшениці отримано Кузнецовою О.В. [6]. За даними Громаковського І.К. регулятор росту гетероауксин сприяє утворенню більшої кількості коренів і був ефективним на практиці при підготуванні черенків підвою винограду до щеплень [11].

Дія мікробного препарату ГЗХ, СКР та регуляторів росту не обмежувалася стимуляцією біометричних показників проростків овочевих культур. Нами виявлено також зміни ферментативних активностей, а саме: протеїназної, пероксидазної, поліфенолоксидазної.

Найвище збільшення протеїназної активності (рис. 1) в 1,5–5,0 разів в порівнянні з контролем спостерігали за умов використання природного регулятора росту емістиму на насінні огірків, томатів і кабачків. Відмічали також стимуляцію на рівні менших значень – в 1,3 та 2,9 рази на томатах і кабачках при використанні СКР стрептоміцету, а за дії ГЗХ та гетероауксину підвищення активності не встановлено. Отже, стимуляція протеїназної активності досліджуваними препаратами була неоднозначною і залежала від типу препаратів та виду овочевої культури. Деякі автори таку реакцію протеїнази пояснюють не тільки інтенсифікацією гідролізу запасних білків у насінні на початкових етапах проростання, а також активацією реакції переамінування аспарагінової та глютамінової амінокислот, що забезпечує проросток пластичним матеріалом [15].

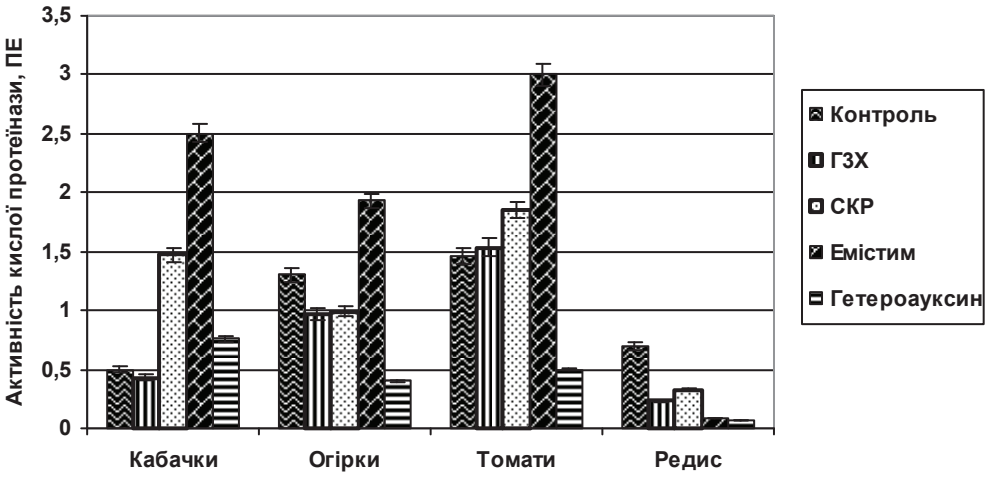


Рис. 1. Кисла протеїназна активність насіння овочевих культур оброблених біостимуляторами (n=3)

Fig. 1. Acid proteinase activity of vegetable seeds treated by biostimulators (n=3)

При дослідженні пероксидазної активності коренів (рис. 2) у проростків спостерігали максимальну її стимуляцію у 2,0–3,5 рази за дії всіх препаратів на культурі кабачків.

На овочевих культурах огірків, томатів і редису підвищення пероксидазної активності у порівнянні з контролем коливалося в межах 32–49%, 10–63%, 8 –48% відповідно. Тобто, більш чутливою рослиною до дії стимуляторів була

культура кабачків. Відомо, що пероксидаза реагує на будь-які зміни навколишнього середовища та будь-які стресові ситуації, крім того це важливий білок як для вищих, так і для нижчих організмів. Деякі автори підкреслюють, що активність і спектр дії пероксидази змінюється під дією біологічних та небіологічних агентів. Цей фермент зустрічається у рослинах часто у високих концентраціях [1,18]. Отримані нами дані, щодо підвищення пероксидазної активності біопрепаратами, узгоджуються з даними літератури. Так, препарати на основі екстрактів хвойних рослин активують пероксидазу 7-добових проростків пшениці на 25–45%. Позитивну дію препаратів автори пояснюють стимулюванням захисних реакцій рослин. Підкреслено, що зростання активності ферментів залежить від концентрації та імунного статусу рослин [4].

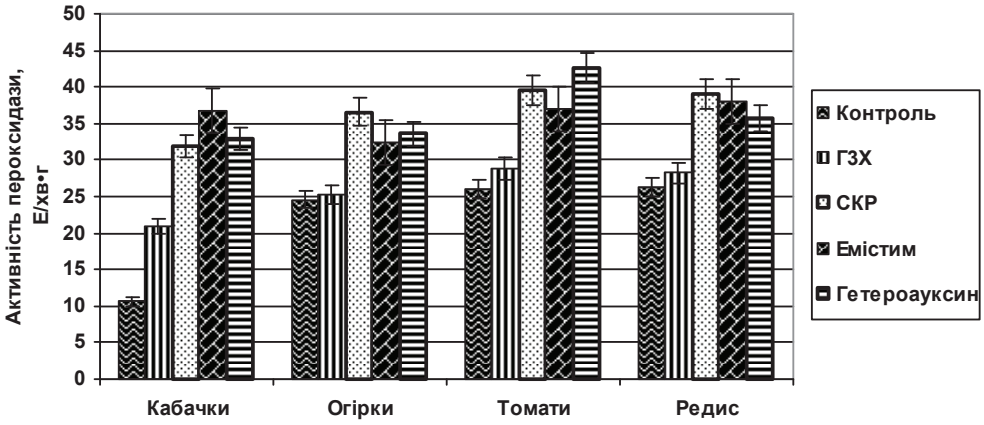


Рис. 2. Пероксидазна активність коренів 7 добових проростків овочевих культур за впливу біостимуляторів (n=3)

Fig. 2. Peroxidase activity of 7 days roots of vegetable sprouts under the influence of biostimulants (n=3)

При дослідженні поліфенолоксидазної активності листків (рис. 3) спостерігали найбільший її рівень на культурі кабачків за дії всіх біостимуляторів. Стимуляція ферментативної активності була вище за контрольні значення в 2,1–4,0 рази. У проростків огірків, томатів і редису дана активність була вище контролю на 15–39%, 20–43%, 21–36%, відповідно. Можна припустити, що отримані нами дані, щодо активації ферментативної активності пероксидази та поліфенолоксидази за дії використаних в досліді біостимуляторів є відповідною реакцією рослин на дію біотичних факторів. Наше припущення співпадає з даними літератури, щодо окиснювально-відновлювальних ферментів пероксидази та поліфенолоксидази, які беруть безпосередню участь у передачі сигналів, що забезпечують формування відповіді рослинної клітини на дію біотичних факторів [17].

Можна констатувати, що у дослідах з овочевими культурами препарат ГЗХ та СКР виявляли рістрегулюючу активність. Так, біометричні показники проростків збільшувалися за дії препарату ГЗХ на 5–20% на овочевих культурах кабачків, томатів, за дії СКР на 8–30% у тих самих культур та огірків і редису, а за дії емістиму на 10–40% збільшувалася лише тільки довжина коріння. За умов дії гетероауксину біометричні показники проростків не підвищувалися. За умов дії емістиму виявлено підвищення протеїназної активності у огірків, томатів і кабачків в 1,5, 2,0 та 5,0 рази, а під впливом СКР в 2,9 рази тільки у кабачків. Пероксидазну активність підвищено в 3,0–3,5 рази у кабачків за присутності СКР і препаратів емістиму, гетероауксину, а поліфенолоксидазну в 4,0; 3,8; 2,0 рази, відповідно.

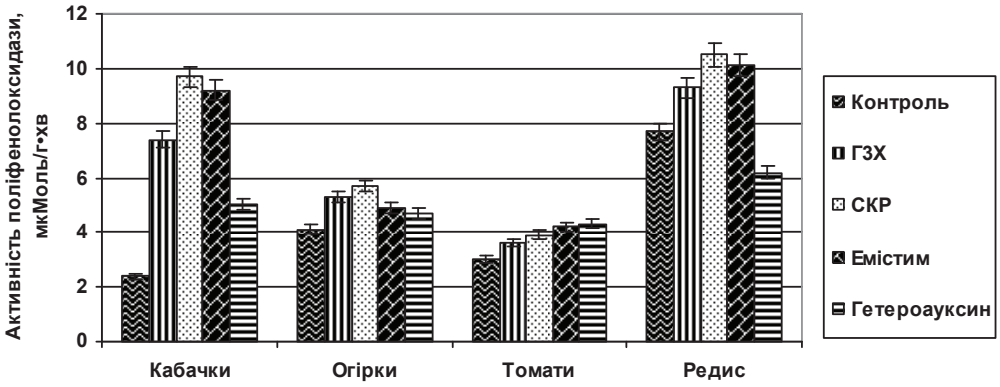


Рис. 3. Поліфенолоксидазна активність листків 10 добових проростків овочевих культур за впливу біостимуляторів (n=3)

Fig. 3. Polyphenoloxidase activity of 10 days leaves of vegetable sprouts under the influence of biostimulants (n=3)

В наших дослідженнях препарати ГЗХ та СКР стрептоміцетів за біометричними показниками дії достовірно відрізняються від регуляторів росту емістиму та гетероауксину тим, що не тільки збільшують довжину коріння, а й додатково енергію проростання насіння, яка є певною характеристикою ефективності впливу активних речовин стрептоміцетів на рослини. Крім того, показано, що за умов дії СКР поліфенолоксидазна активність була найвищою у порівнянні з дією регуляторів росту. Отже, виявлені зміни біометричних та біохімічних показників у проростків, що відбуваються за дії препаратів, є відповідною реакцією рослини на дію біотичних факторів і залежать від типу препарату і виду овочевої культури. Отримана стимуляція біометричних і біохімічних параметрів на проростках овочевих культур, за дії мікробних препаратів і регуляторів росту, дозволяє стверджувати про можливість використання СКР, ГЗХ та емістиму для росту рослин.

УДК 579.26:581.1

I.V. Zhernosekova, A.A. Tymchuk, V.P. Tkachenko, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine,
tel.: +38 (056) 760 85 14, e-mail: microviro@rambler.ru

EFFECT OF METABOLIC PRODUCTS *OF STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS* ON THE VEGETABLES SPROUTS GROWTH

Summary

Purpose. *To study the effect of the preparation P3X of strain Streptomyces recifensis var. lyticus 2435 and supernatant cultural liquid (SCL) of strain Streptomyces recifensis var. lyticus 2R -15 on the vegetables sprouts growth and compare with the action of plant growth regulators emistym and heteroauxin.* **Methods.** *Biometric and biochemical changes of sprouts of squashes, cucumbers, tomatoes, radishes for the actions of microbial preparations and plant growth regulators were investigated. Changing of germination energy of seeds, roots length, proteinase, peroxidase, poliphenoloxidase activity was studied.* **Results.** *It was shown that the action of SCL and P3X was the most effective for accelerate the growth of sprouts of squashes, cucumbers, tomatoes, radishes. These preparations stimulated germination energy and length of roots on 8–30% and 5–20%. Emistym stimulated only the length of roots on 10–40% and did not affect positively to germination energy of seeds. It was found that heteroauxin inhibited biometric indicators on 12–50%. Stimulation of proteinase activity of seeds was effectively carried by emistim (stimulation in 1.5–5.0 times) and SCL (1.3–2.9 times); peroxidase activity of roots – emistim (1.3–3.5 times) and SCL (1.4–3.0 times); polyphenoloxidase activity of leaves – SCL (1.3–4.0 times) and emistym (1.2–3.8 times).* **Conclusions.** *Study of microbial preparations and plant growth regulators of sprouts of vegetables showed that positive change of biometric parameters and enzymatic activities that occur in sprouts is a response to the action of biotic factors and it depends on the a type of preparation and a type of vegetable. Stimulation of biometric and biochemical parameters which was observed for the sprouts after action of preparations SCL, P3X and emistym may be used to accelerate growth of plants.*

Key words: Streptomyces recifensis var. lyticus, emistym, heteroauxin, proteinase, peroxidase, polyphenoloxidase activity, growth stimulator of plants.

УДК 579.26:581.1

И.В. Жерносекова, А.А. Тымчук, В.П. Ткаченко, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
пр. Гагарина 72, Днепропетровск, 49010, Украина,
тел.:+38 (056) 760 85 14, e-mail: microviro@rambler.ru

ВЛИЯНИЕ ПРОДУКТОВ *МЕТАБОЛИЗМА STREPTOMYCES RECIFENSIS VAR. LYTICUS* НА РОСТ ПРОРОСТКОВ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Реферат

Цель. *Изучить влияние препарата Г3Х штамма Streptomyces recifensis var. lyticus*

2435 и супернатанта культуральной жидкости (СКЖ) штамма Streptomyces recifensis var. lyticus 2P–15 на рост проростков овощных культур и сравнить активность их действия с регуляторами роста растений эмистимом и гетероауксином. **Методы.** *Проведено исследование биометрических и биохимических изменений, выявленных на проростках кабачков, огурцов, помидоров, редиса в результате действия микробных препаратов и регуляторов роста растений. Изучали изменения показателей энергии прорастания семян, длины корней, протеиназной, пероксидазной, полифенолоксидазной активности.* **Результаты.** *Согласно биометрическим данным (энергия прорастания, длина корней) показано, что для ускорения роста проростков кабачков, огурцов, помидоров, редиса наиболее эффективным было действие СКЖ и препарата ГЗХ, которые стимулировали эти показатели на 8–30% и 5–20%, эмистим стимулировал только длину корней на 10–40% и не влиял положительно на энергию прорастания семян. Обнаружено, что гетероауксин, угнетает биометрические показатели на 12–50%. Стимуляцию протеиназной активности семян эффективно осуществляли эмистим (стимуляция в 1,5–5,0 раз) и СКЖ (1,3–2,9 раз); пероксидазной активности корней – эмистим (1,3–3,5 раз) и СКЖ (1,4–3,0 раза); полифенолоксидазной активности листьев – СКЖ (1,3–4,0 раза) и эмистим (1,2–3,8 раз).* **Выводы.** *Исследования действия микробных препаратов и регуляторов роста растений на проростках овощных культур показало, что положительные изменения биометрических показателей и ферментативных активностей, которые происходят у проростков, являются соответствующей реакцией на действие биотических факторов и зависят от типа препарата и вида овощной культуры. Обнаруженная стимуляция биометрических и биохимических признаков у проростков овощных культур, при действии препаратов, может быть основанием для использования СКЖ, ГЗХ и эмистима для ускорения их роста.*

Ключевые слова: Streptomyces recifensis var. lyticus, эмистим, гетероауксин, протеиназная, пероксидазная, полифенолоксидазная активность, стимулятор роста растений.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Андреева В.А.* Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений. – М.: Наука, 1988. – 128 с.

2. *Белявская Л.А., Козырицкая В.Е., Волагурова Е.В., Иутинская Г.А.* Биологически активные вещества препарата аверком // Микробиол. журн.–2012. – Т. 74, № 3. – С. 10–15.

3. *Білявська Л.О., Калмикова Н.О., Козирицька В.Є., Волагурова О.В., Іутинська Г.О.* Вплив Streptomyces avermitilis та його авермектинового комплексу на мікроорганізми та рослини // Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія: Зб.наук.праць. – К.: ДАУ, 2005. – С. 252–257.

4. *Евтушенко Е.В., Сапрыкин В.А., Галицын М.Ю., Чекуров В.М.* Влияние биологически активных веществ из хвойных на активность L-фенилаланин-аммоний-лиазы и пероксидазы в листьях пшеницы // Прикл. биохим. и микробиол. – 2008. – Т. 44, № 1. – С. 123–128.

5. *Жерносєкова І.В.* Мінливість продуцента літичних ферментів Streptomyces recifensis var. lyticus та його селекція. Автореф. дис. … канд. біол. наук. – К., 2002. – 20 с.

6. *Кузнецова О.В.* Использование природных и синтетических рострегуляторов растений в промышленной микологии и солодоращении // Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія. – 2010. – Вип. 18, Т. 1. – С. 86–91.

7. *Курдиш І.К.* Інтродукція мікроорганізмів у агроекосистеми. – К.: Наук. думка, 2010. – 255 с.

8. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.

9. *Волкогон В.В., Надкернична О.В., Ковалевська Т.М. та ін.* Мікробні препарати у землеробстві; за ред.. В.В.Волкогона – К.:Аграр.наука, 2006. – 311 с.

10. *Мусіяка В.К., Григорюк Т.І.* Вивчення фізіологічної активності різних партій регулятора росту емістиму // Физиология и биохимия культ. растений. – 2001. – Т. 33, № 1. – С. 3–9.

11. *Новое* в виноградном питомниководчестве ВНР и МССР / И.К. Громаковский, И.А. Шандру и др.; Под ред. А.С. Субботовича. Кишенев, 1984. – С. 231–251.

12. *Пат.* 2261902 Россия МПК 7 С 12 №1/20, А 01 N Штамм актиномицета Streptomyces lateritius 19/97-М, используемый для стимулирования роста и защиты сеянцев хвойных от возбудителей болезней, вызываемых грибами родов Fusarium и Alternaria / Т.И. Громомвых, Ю.А. Литовка, В.С. Садкова.-№20003100579/13 Заяв.08.01.2003; Опубл. 10.10.2005 // Бюл. № 28.

13. *Перевалов Р.Г., Растимешина И.О., Тодераш А.Ф., Бурцева С.А.* Влияние метаболитов актиномицетов на всхожесть семян томата // Междунар. науч. практ. конф. «Селекция и семеноводство овощных культур в XXI веке», Москва. – 2000. – Т. 2. – С. 127–128.

14. *Полянская Л.М., Ведина О.Т., Лисак Л.В., Звягинцева Д.Г.* Стимуляция роста растений культурами Beijerinckia и Clostridium // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 1.– С. 123–129.

15. *Рябченко Н.А., Коцюбинская Н.П., Домашнева Е.В.* Адаптогенез растений к пестицидам. – Д.: Пороги, 2000. – 193 с.

16. *Сельскохозяйственная* біотехнологія /В.С. Шевелуха, Е.А. Калашников, Е.С. Воронин и др. / Под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высш.шк., 2003. – 469 с.

17. *Січкар С.В., Коробова К.С.* Активність окислювальних ферментів рослинних клітин за умови експериментального мікоплазмозу // Мікробіол. журн. – 2001. – Т. 73, № 2. – С. 38–43.

18. *Физиологические* и биохимические методы анализа растений: практикум /автор-сост. Г.Н. Чупахина. – Калининград, 2000. – С. 25–30.

19. *Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.* Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикл.биохимия и микробиология. –2006. – 42, № 2. – С. 133–143.

20. *Чайковская Л.А., Баранская М.И.* Влияние агростимулина, биолана и эмистима С на рост и фосфатазную активность Enterobacter nimipressuralis 32 – 3 // Мікробіол. і біотехнол. – 2009, № 4. – С. 70–74.

21. *Чорногор Н.П.* Дослідження рістстимулюючих властивостей лізоензимного препарату Streptomyces recifensis var.lyticus. Автореф. дис. … канд. біол. наук. – К., 1998. – 20 с.

22. *Segundo B.S., Casacuberta J.M., Puigdomenech P.* Sequential expression and differential hormonal regulation of proteolytic activities during germination in Zea mays L // Planta. – 1990. – 181. – P. 467–474.

23. *Haptmann A., Singh M., Klingmiiller etal.* Isolation and characterization of Azospirillum mutants excreting high amounts of indoleacetic acid // Can. J. Microbiol. – 1983. – V. 29, № 8. – P. 916–923.

24. *New plant* growth regulators: basic research and technologies of application . Monograph / Ed. S.P. Ponomarenko, G.O. Iutynska. – Kyiv: Nichlava, 2011. – 211 p.

25. *Ratten C.L., Glick B.R.* Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can. J. Microbiol. – 1996. – V. 42. – P. 207–220.

26. *Sokolova I.E., Kylochek T.P., Vinnikov A.I.* A biosynthesis activity of Streptomyces recifensis var. lyticus // Мікробіол. журн. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 10–17.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2014 р.

УДК 579.873:631.461

О.В. Сищикова

Криворізький ботанічний сад НАН України, вул. Маршака, 50, Кривий Ріг, 50089, Україна,
тел.: +38 (0564) 38 44 74, e-mail: oksana741015@rambler.ru

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА ТАКСОНОМІЧНИЙ СКЛАД СТРЕПТОМІЦЕТІВ ПРИРОДНИХ ҐРУНТІВ ТА ТЕХНОЗЕМІВ КРИВОРІЖЖЯ

Мета. *Виділити з техногенно-порушених та природних ґрунтів Криворіжжя стрептоміцети, встановити їх таксономічний склад і провести ідентифікацію та оцінити структуру угруповання стрептоміцетів.* ***Методи.*** *Чисті культури стрептоміцетів виділяли на крохмало-аміачному агарі. Ідентифікацію ізолятів стрептоміцетів проводили за 36 морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями, діагностичними ознаками з використанням методичних вказівок визначника актиноміцетів Г.Ф. Гаузе, опису видів роду Streptomyces та комп'ютерної програми їх ідентифікації StmId, розробленої співробітниками Інституту мікробіології та вірусології НАН України.* ***Результати.****. За даними морфології спор 63,8% досліджених культур мають гладку поверхню спор, 24,1% – з шиповидними виростами, 8,6% – з горбистими виростами [3]. Більшість виділених з ґрунтів стрептоміцетів мають прямі спороносці, розташовані моноподіально. Встановлено, що за шкалою кольорів О.С. Бондарцева на мінеральному агарі Гаузе-1 кількість ізолятів з білим та сірим повітряним міцелієм становила по 29%. Для субстратного міцелію багатьох ізолятів характерні відтінки коричневого та бурого кольорів. Серед виділених штамів мікроорганізмів 40% здатні утворювати розчинні пігменти, 64% – меланоїдні. Встановлено, що майже всі ізоляти добре ростуть на середовищі з глюкозою і цукрозою. Найменш придатним для росту бактерій є середовище з ксилозою. Встановлено, що процес дезамінування амінокислот з утворенням аміаку здійснюють 64% вивчених культур, а до утилізації сірковмісних амінокислот, з утворенням сірководню здатні 57% ізолятів. Всі вивчені культури з різною інтенсивністю проявляють амілолітичну, целюлозолітичну та протеолітичну активність.* ***Висновки.*** *З'ясовано видовий склад угруповань стрептоміцетів техногенно-порушених та природних ґрунтів Криворіжжя. Встановлено, що в ценозі стрептоміцетів природних ґрунтів переважали Streptomyces. violaceomaculatus, S. sporoherbeus, S. aerionidulus, S. enduracidicus та S. grisinus, в той час як в техноземах – S. dayalbaghensis, S. sporostellatus, S. conganensis, S. violobrunneus і S. albocrustosus.*

Ключові слова: стрептоміцети, мікробіоценоз, техногенно-порушені і природні ґрунти.

Проблема зростаючого забруднення навколишнього середовища важкими металами потребує від ґрунтової мікробіології і агроекології вивчення їх впливу на ґрунт і ґрунтові мікроорганізми [1, 13]. Техногенний вплив призводить до

© О.В. Сищикова, 2014

формування специфічного комплексу стрептоміцетів, який значно відрізняється від угруповань природних екосистем і може бути використаний для вирішення деяких прикладних питань екології мікроорганізмів і біології ґрунтів. Зважаючи на це, для регіонів України з розвиненою промисловістю важливим і практично не дослідженим є встановлення структурних перебудов мікробіоценозу ґрунтів (зокрема, стрептоміцетів) як при хімічному забрудненні, так і за інших видів антропогенного впливу. Високий ступінь адаптаційної пластичності стрептоміцетів дозволяє їм успішно існувати і в ґрунтах за різного ступеня техногенного навантаження, про що свідчить спроможність угруповання стрептоміцетів ґрунту в умовах забруднення важкими металами утворювати протеолітичні ферменти, меланоїдні пігменти, лектини, антибіотики та інші біологічно активні речовини [8, 9, 14, 16]. Спираючись на літературні дані, можливо припустити перспективність використання стрептоміцетів як одного з показників в системі мікробної біоіндикації забруднених важкими металами ґрунтів та продуцентів біологічно активних сполук, які можуть використовуватися для потреб біотехнології.

Метою досліджень було проведення ідентифікації ґрунтових стрептоміцетів, встановлення структури їх угруповання, що відображає просторово-часове співвідношення деяких таксонів міцеліальних прокаріотних організмів і сприяє виявленню загальних закономірностей їх розповсюдження в природних і техногенно-порушених субстратах.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктом досліджень були 58 ізолятів стрептоміцетів, виділених з природних ґрунтів регіону: чорнозем звичайний малопотужний суглинистий прибалкова ділянка балки Власова (Петровський р-н Кіровоградська обл), чорнозем південний солонцюватий середньопотужний, солончак гідроморфний і солонець автоморфний, які розташовані в районі балки Свистунова (м. Кривий Ріг) та едафотопів відвалів і хвостосховищ публічного акціонерного товариства (ПАТ) "Північний гірничозбагачувальний комбінат" м. Кривий Ріг. Для мікробіологічного посіву і подальшого виділення стрептоміцетів готували ґрунтову суспензію, яку висівали на крохмало-аміачний агар. Чисті культури стрептоміцетів отримували методом виснажувального штриха з подальшим перенесенням культури з ізольованої колонії в пробірку [12]. Ізоляти стрептоміцетів ідентифікували за 36 діагностичними ознаками:

а) морфологічні – характер поверхні оболонки спор та тип галуження спороносців за допомогою сканувального електронного мікроскопа JEOL JSM-6060 LA (Японія);

б) культуральні – візуально за характером росту і забарвлення повітряного і субстратного міцелію, а також за наявністю розчинних і меланоїдних пігментів на поживних середовищах: вівсяний агар, крохмало-аміачний агар, мінеральний агар Гаузе-1, гліцерин-нітратний агар, гліцерин-аспарагіновий агар, глюкозо-аспарагіновий агар, глюкозо-нітратний агар, цукрозо-нітратний

агар, середовище Ваксмана (забарвлення повітряного та субстратного міцелію) за А.С. Бондарцевим [2];

в) фізіолого-біохімічні – за здатністю утилізувати вуглеводи (глюкоза, цукроза, арабіноза, ксилоза, фруктоза, рафіноза, рамноза), поліцукри (целюлоза), багатоатомні спирти (маніт, сорбіт), відновлювати нітрати до нітритів і/або молекулярного азоту, утворювати сірководень і аміак, синтезувати позаклітинні ферменти (амілаза, колагеназа) за О.В. Валагуровою [3, 7, 10, 15].

Ідентифікацію ізольованих представників роду *Streptomyces* здійснювали за методичними вказівками визначника актиноміцетів Г.Ф. Гаузе [11], опису видів актиноміцетів роду *Streptomyces* [3] та комп'ютерної програми для їх ідентифікації StmId, розробленої співробітниками Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Результати та їх обговорення

У результаті вивчення біологічних ознак 58 штамів стрептоміцетів ізольованих з техногенно-порушених та природних ґрунтів Криворіжжя та комп'ютерної програми їх віднесено до 36 видів роду *Streptomyces* (табл. 1).

Таблиця 1

Результати ідентифікації виділених культур стрептоміцетів

Table 1

Results of identification of streptomycetes abstracted cultures

Вид	Штам	%
S. acidiscabies Lambert et Doria, 1989	11	95,1
S. aerionidulus Krasil'nikov, 1970	7, 14, 47, 51, 55, 60, 62	89,5
S. albocrustosus Krasil'nikov, 1970	3	87,3
S. alboflaveolus Krasil'nikov, 1970	35	92,3
S. atratus[v] Shibata, Higaside, Yamamoto et Nakazawa, 1962	17, 61	87,9
S. brasiliensis-1 (Spencer, 1921), Waksman, 1961	4, 25	97,2
S. caelestis[v] de Boer, Dietz, Wilkins et al., 1955	40	96,0
S. canadensis Miller, Stapley et Woodruff, 1967	27, 29	87,5
S. cinereorectus[v] (Ghugasova, Terekhova, et Fedorova, 1974) Terekhova et Preobrazhenskaya, 1983	38	88,9
S. conganensis Linder, Wallhausser et Weidenmuller, 1960	6	95,9
S. curacoi[v] Cataldi, 1962	65	91,5
S. dayalbaghensis Sinha et Sharma, 1981	18, 20, 46, 64	97,0
S. ederensis[v] Lindner, Wallhausser et Huber, 1962	1, 13	85,1

Вид	Штам	%
S. enduracidicus Krasil'nikov, 1970	23	89,9
S. fragmentosporus[v] Henssen, 1969	9, 19	89,6
S. globosus[v] (Krasil'nikov, 1941), Waksman, 1953	53, 54, 56	92,0
S. grisinus (Krasil'nikov 1958), Pridham, 1970	21, 30, 45	94,5
S. hirsutus[v] Ettlinger, Corbaz et Hutter, 1958	44	87,5
S. hofunensis Yamamoto et Wara, 1977	34	94,8
S. lactogriseus Krasil'nikov, 1970	8, 36	97,3
S. luteolucescens (Yen, 1956), Pridham, 1970	2	95,0
S. marinolimosus (ZoBell et Uphan, 1944), Waksman, 1961	15, 26, 59	97,8
S. nidulosus Krasil'nikov, 1970	43	96,5
S. nigriaromaticus (Berestnev, 1897), Krasil'nikov, 1970	63	87,9
S. ravulus Krasil'nikov, 1970	12	89,8
S. salmonicolor Millard et Burr, 1926	58	94,3
S. septisporus Krasil'nikov, 1970	48	96,7
S. spitsbergensis Wieczorek, Mordarska, Zakrzewska-Cerwinska et al, 1993	52	89,1
S. sporocaneris Krasil'nikov, 1970	49	91,5
S. sporoherbeus Krasil'nikov, 1970	33	98,7
S. spororutilis Krasil'nikov, 1970	41	85,8
S. sporostellatus Krasil'nikov, 1970	31	88,8
S. subhalophilus Zhou Peijin, Wang Dazhen, 1983	16, 50	96,7
S. tateyamensis Miyairi, Miyoshi, Aoki et al, 1970	28	95,0
S. violaceomaculatus Yen et Zhang, 1965	37	97,3
S. violobrunneus Krasil'nikov, 1970	10	98,0

Примітка: [v] – вид входить до складу схвалених назв (valid names), % – відсоток збігу з колекційними культурами Інституту мікробіології і вірусології НАН України

Note: [v] – the species is included into the list of the approved names (valid names),
% – percentage of coincidence with collection cultures of the Institute of Microbiology and Virology of NASU

Вивчення морфології спор у 58 виділених з ґрунтів штамів стрептоміцетів за допомогою сканувального електронного мікроскопа показало, що вони мають форму від округлої до прямокутної і розташовані як поодиноко, так і зібрані у вигляді ланцюжків. Окрім цього, 63,8% досліджених штамів мають гладку поверхню спор (рис. а), 24,1% – з шиповидними виростами (рис. б), 8,6% – з горбистими виростами. Для *S. grisinus* 30 характерна наявність волосків на поверхні оболонки спор (рис. в). У всіх ізолятів спори на повітряному міцелії зібрані в ланцюжки різної форми. Більшість виділених з ґрунтів стрептоміцетів мають прямі спороносці, розташовані моноподіально. Тільки у штамів *S. acidiscabies* 11, *S. subhalophilus* 16, *S. dayalbaghensis* 20 та *S. canadensis* 27 прямі спороносці зібрані в кільця або в несправжні кільця. У той час як для штаму *S. canadensis* 29 характерна пряма форма спороносців, які зібрані в первинні та вторинні кільця. Ізоляти зі спіральною формою ланцюжків спор, що розташовані моноподіально, становлять 17,2% від загальної кількості досліджуваних культур. У ізолятів *S. fragmentosporus* 19, *S. enduracidicus* 23 та *S. dayalbaghensis* 64 спостерігається формування спороносців у вигляді недовершених спіралей, зібраних в кільця.

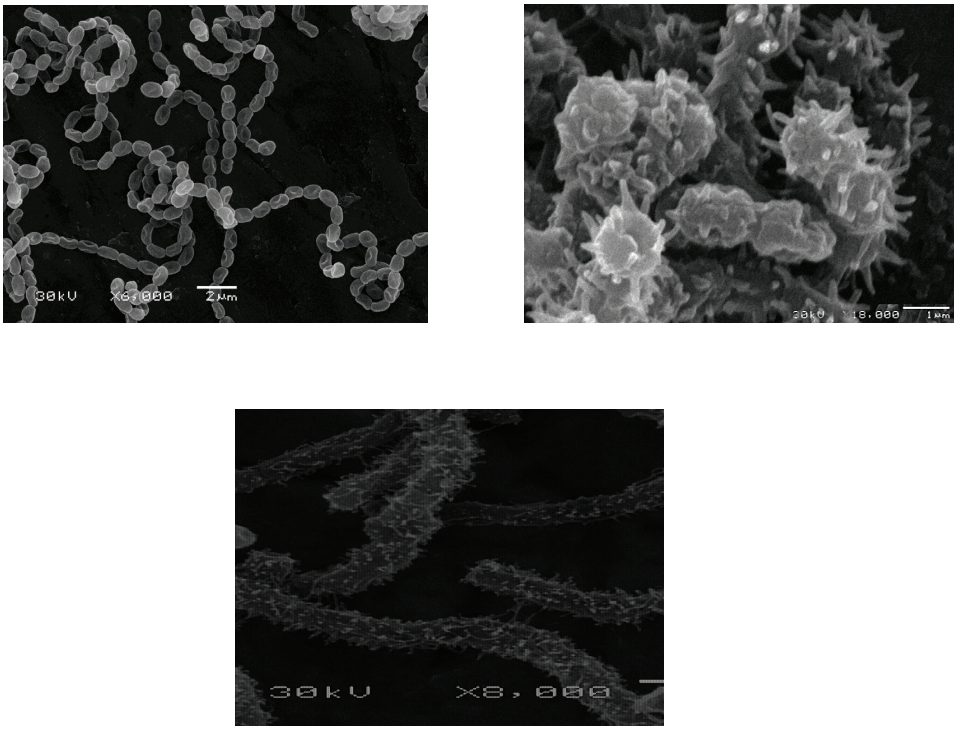


Рис. Характер поверхні оболонки спор:

а – гладка (*S. brasiliensis-1*), б – з шиповидними виростами (*S. curacoi*), в – з волосовидними виростами (*S. grisinus*)

Fig. Character of spore surface:

a – smooth (*S. brasiliensis-1*), б – aculeiform (*S. curacoi*), в – with hairs (*S. grisinus*)

Колір повітряного міцелію зумовлюється забарвленням оболонки спор, яке за Г.Ф. Гаузе найхарактерніше проявляється на синтетичних середовищах [11]. Так, за шкалою кольорів А.С. Бондарцева [2], на мінеральному агарі Гаузе-1 кількість ізолятів з білим повітряним міцелієм становила 29,3%. Така ж кількість ізолятів має сірий колір і його відтінки. Решта мають колір повітряного міцелію кремовий, рожево-ліловий, оранжево-ліловий, палевий, рожево-фіолетовий, каштановий. Для субстратного міцелію багатьох ізолятів характерні відтінки коричневого та бурого кольорів. Різні відтінки фіолетового має 24,1% штамів, а жовтого і оранжевого – 17,3%. У п'яти штамів субстратний міцелій сірий або свинцево-сірий, а у штамів *S. canadensis* 27 – іржавий та *S. hirsutus* 44 – червоний. Аналогічні дані різноманітності спектру забарвлення повітряного та субстратного міцелію стрептоміцетів отримані H. Maleki [17].

Встановлено, що 40% штамів мають здатність утворювати розчинні пігменти. Серед них 11 ізолятів – утворюють пігменти коричневого, червоно-коричневого та бурого кольорів, 4 – рожевого, 2 – бордового, штами *S. ederensis* 1, 13 – фіолетового, *S. grisinus* 21 і *S. globosus* 54 – зеленого і *S. fragmentosporus* 19 – лимонно-жовтого на мінеральному агарі Гаузе-1.

Здатність ізолятів утворювати меланоїдні пігменти з'ясовували на пептоно-дріжджовому агарі з ферумом. Серед вивчених ізолятів 64% від загальної кількості виділених ізолятів здатні утворювати меланоїдні пігменти темно-зелено-бурого, бурого або чорного кольору.

Встановлено, що використовувати як джерело вуглецю глюкозу та цукрозу здатні майже всі виділені штами, що також показано іншими дослідниками [3, 10, 15]. Разом з цим, у ізолятів *S. marinolimosus* 59 та *S. salmonicolor* 58 на середовищі з глюкозою і у останнього – з цукрозою ріст не відмічено (табл. 2). Найменш придатним середовищем для росту виділених стрептоміцетів є середовище з ксилозою, тому що майже у 38% ізолятів ріст відсутній. На середовищах з фруктозою, рамнозою, арабінозою та рафінозою відмічена візуально різна швидкість росту культур стрептоміцетів (табл. 2). Так, при використанні фруктози як джерела вуглецю більше ніж 55% ізолятів добре росли, і лише у 11 ізолятів відмічено слабкий ріст (штам *S. violaceomaculatus* 37), водночас у 14 культур – ріст відсутній. Середовище із рамнозою є досить придатним для росту стрептоміцетів, оскільки відсутність росту спостерігали лише у 5 штамів. Використання арабінози та рафінози як джерела вуглецю показало наявність схожої тенденції. Так, нездатними до утилізації цих вуглеводів є штами *S. aerionidulus* 55, *S. marinolimosus* 59, *S. aerionidulus* 62 та *S. nigriaromaticus* 63, в той час як штами *S. tateyamensis* 28, *S. salmonicolor* 58, *S. atratus* 61 та *S. curacoi* 65 не утилізують рафінозу і тільки один ізолят *S. lactogriseus* 36 – арабінозу. Для більшості ізолятів притаманна властивість утилізації багатоатомних спиртів (сорбіт, маніт, інозит).

Для багатьох культур характерний дуже добрий або добрий ріст на середовищах з цими спиртами. Водночас у деяких ізолятів спостерігається слабкий ріст на середовищі з будь-яким з трьох спиртів і його відсутність на середовищі з двома іншими спиртами (табл. 2).

Таблиця 2

Ріст на середовищі з різними джерелами вуглецю

Table 2

Growth on mediums with different sources of carbon

Штам	Фруктоза	Ксилоза	Глюкоза	Сахароза	Арабіноза	Рафіноза	Сорбіт	Маніт	Інозит
S. ederensis 1	+++	–	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
*S. ederensis*13	–	–	+++	+++	+	+++	++	+++	+++
S. luteolucescens 2	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	–
S. albocrustosus 3	+++	++	+++	++	+++	+++	+	+++	+++
S. brasiliensis-1 4	+++	+++	+++	++	+	++	++	+++	–
S. brasiliensis-1 25	+	–	+++	+++	+	++	++	+++	++
S. conganensis 6	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++
S. aerionidulus 7	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
S. aerionidulus 14	+++	+++	+++	+++	+	+	–	+++	++
S. aerionidulus 47	+++	+++	+++	+	+++	+	++	+++	+
S. aerionidulus 51	++	+	++	++	+++	+++	++	+++	+++
S. aerionidulus 55	+++	+++	+++	++	–	–	+	–	–
S. aerionidulus 60	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
S. aerionidulus 62	+++	+++	++	+++	–	–	++	–	++
S. lactogriseus 8	+++	+++	++	+++	+++	+	+	+++	+++
S. lactogriseus 36	–	–	++	+++	–	+	+	+++	+++
S. fragmentosporus 9	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	++
*S. fragmentosporus*19	–	+	+	++	+	++	++	++	+++
S. violobrunneus 10	–	–	+++	+++	++	+++	+	+++	++
S. acidiscabies 11	+++	+++	+++	++	+	+	++	+++	+++
S. ravulus 12	+	+	+++	+	++	+++	+	+	++
S. marinolimosus 15	+	–	++	+	+	+	++	+	+++
S. marinolimosus 26	+	+	++	++	+	+	–	+	++
S. marinolimosus 59	–	–	–	+	–	–	+	++	+++
S. subhalophilus 16	++	–	++	+++	+	+++	++	++	+++
S. subhalophilus 50	++	–	++	++	+	+	++	++	+++
S. atratus 17	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
S. atratus 61	+	+	+	+++	++	–	++	++	+
S. dayalbaghensis 18	+	–	+++	+++	++	+++	++	+++	+++

Штам	Фрук-тоза	Кси-лоза	Глю-коза	Саха-роза	Ара-біноза	Рафі-ноза	Сор-біт	Ман-ніт	Іно-зит
S. dayalbaghensis 20	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	–	–
S. dayalbaghensis 46	–	–	+++	++	+++	+++	+	++	–
S. dayalbaghensis 64	++	+	++	+++	++	+++	–	+++	+++
S. grisinus 21	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+++
S. grisinus 30	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+	++
S. grisinus 45	++	–	++	++	++	+++	+	+++	+++
S. enduracidicus 23	–	+	++	+++	++	+++	+	+++	++
S. canadensis 27	+	++	++	+	++	+	++	++	+++
S. canadensis 29	++	–	+++	+++	++	+++	+	+	–
S. tateyamensis 28	+	–	+	+	++	–	+	–	–
S. sporostellatus 31	–	–	+++	++	++	+++	–	++	++
S. sporoherbeus 33	+	+	+++	+++	++	+++	+	+++	+
S. hofunensis 34	–	+	+++	++	+	+++	+	+	–
S. alboflaveolus 35	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	–
S. violaceomaculatus 37	+	–	+++	+++	+	+++	++	+++	+
S. cinereorectus 38	+++	–	+++	++	+	+	+	++	–
S. caelestis 40	+++	++	+++	+++	++	+++	+	+	+++
S. spororutilis 41	+	–	+++	+++	++	+++	+	+++	+++
S. nidulosus 43	–	–	++	+	+	+	+	++	+++
S. hirsutus 44	+++	++	+	+++	+++	+++	–	++	++
S. septisporus 48	–	–	+	+++	++	+++	+	+	++
S. sporocaneris 49	–	–	++	++	+++	++	+	+	–
S. spitsbergensis 52	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
S. globosus 53	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++
S. globosus 54	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+
S. globosus 56	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
S. salmonicolor 58	–	+++	–	–	+++	–	++	–	+
S. nigriaromaticus 63	–	–	++	+	–	–	–	+	–
S. curacoi 65	++	+	+	++	+++	–	–	+++	++

Примітка: +++ дуже добрий ріст, ++ добрий ріст, + слабкий ріст, – відсутність росту

Note: +++ very good growth or reaction, ++ good growth or reaction, + weak growth or reaction, – lack of growth or reaction

Так, наприклад, штами *S. dayalbaghensis* 20, *S. tateyamensis* 28 та *S. aerionidulus* 55 мають слабкий ріст на середовищі з сорбітом і не здатні утилізувати всі інші спирти, а штам *S. nigriaromaticus* 63 має слабкий ріст у варіантах дослідів з манітом та відсутність росту за використання сорбіту та інозиту і *S. aerionidulus* 14, *S. marinolimosus* 26, *S. sporostellatus* 31, *S. hirsutus* 44, *S. dayalbaghensis* 64 та *S. curacoi* 65 не утилізують тільки сорбіт. Всі інші ізоляти погано засвоюють тільки один зі спиртів, а на середовищах з іншими мають дуже добрий або добрий ріст. Так, ізолят *S. albocrustosus* 3 практично не росте на середовищі з сорбітом, але успішно утилізує інші спирти.

Переважна кількість стрептоміцетів здатна засвоювати азотоорганічні сполуки, наприклад пептони і білки. Проведені дослідження дозволили встановити, що процес дезамінування амінокислот з утворенням аміаку здійснюють 64% вивчених культур, а до розщеплення сірковмісних амінокислот, з утворенням сірководню здатні 57% ізолятів. Деякі стрептоміцети здатні використовувати як кінцевий акцептор електронів не кисень, а нітрати. Висока активність нітратредуктази, яка зумовлює відновлення нітратів притаманна 18 культурам, поряд з цим менша інтенсивність її властива 7 ізолятам, тоді як 57% культур не здатні використовувати нітрати як акцептори електронів. Молекулярний азот утворювали лише 12 культур.

Всі вивчені культури проявляють амілолітичну, целюлозолітичну та протеолітичну активність, проте інтенсивність продукування цих ферментів різна (табл. 3). Так, продукувати амілазу і коллагеназу здатні майже всі вивчені ізоляти, за винятком культур *S. atratus* 61, *S. aerionidulus* 62 і *S. nigriaromaticus* 63, які не гідролізують крохмаль, а *S. atratus* 61, *S. aerionidulus* 62 і *S. curacoi* 65, що не розріджують желатин. Вивчення целюлозолітичної активності показало, що 57% ізолятів мають дуже добрий або добрий ріст на фільтрувальному папері, зануреному в рідке поживне середовище (м'ясо-пептонний бульйон) і тільки 3 штами його руйнують (*S. marinolimosus* 15, 26, 59).

Мікроорганізми, які виділяють протеолітичні ферменти (протеази), через декілька днів викликають коагуляцію і пептонізацію молока, що супроводжується розчиненням казеїну та випаданням осаду і просвітленням молочної сироватки. Коагуляцію молока і протеоліз казеїну здійснюють також ізоляти *S. conganensis* 6, *S. aerionidulus* 7, *S. alboflaveolus* 35, *S. spitsbergensis* 52, *S. globosus* 54 і 56, а слабка позитивна реакція спостерігається у 13 культур. Повна відсутність протеолітичних ферментів відмічена лише у двох культур *S. atratus* 61 і *S. curacoi* 65, а у ізолятів *S. aerionidulus* 60 і 62 зафіксовано дуже слабке виділення лише одного з трьох ферментів в середовище.

Таким чином, проведені дослідження уможливили вперше з'ясувати видовий склад угруповання стрептоміцетів в ґрунтах, порушених діяльністю підприємств гірничорудної промисловості і природних ґрунтах Криворіжжя. Встановлено, що в ценозі стрептоміцетів природних ґрунтів переважали *S. violaceomaculatus*, *S. sporoherbeus*, *S. aerionidulus*, *S. enduracidicus* та *S. grisinus*, в той час як в техноземах – *S. dayalbaghensis*, *S. sporostellatus*, *S. conganensis*, *S. violobrunneus* і *S. albocrustosus*.

Таблиця 3

Здатність штамів стрептоміцетів до утворення ферментів

Table 3

Ability of streptomycetes strains to formation of enzymes

Штам	Амілолітична активність	Целюлозолітична активність		Протеолітична активність		
		Ріст	Руйнування	Розрідження желатину	Протеоліз казеїну	Коагуляція молока
1	2	3	4	5	6	7
S. ederensis 1	++	++	–	+++	–	+++
S. ederensis 13	+	+++	–	+++	–	–
S. luteolucescens 2	+++	+++	–	+++	–	++
S. albocrustosus 3	++	++	–	+++	–	+++
S. brasiliensis-1 4	+++	+++	–	+++	–	+++
S. brasiliensis-1 25	++	++	–	++	++	+
S. conganensis 6	+++	+++	–	+++	+++	++
S. aerionidulus 7	+++	–	–	+++	+++	+++
S. aerionidulus 14	++	–	–	+++	–	+++
S. aerionidulus 47	+++	–	–	+++	–	+
S. aerionidulus 51	+++	–	–	++	–	+
S. aerionidulus 55	+++	–	–	++	–	–
S. aerionidulus 60	–	–	–	+	–	–
S. aerionidulus 62	++	–	–	–	–	+
S. lactogriseus 8	+	–	–	+++	–	++
S. lactogriseus 36	+++	–	–	+++	–	+
S. fragmentosporus 9	+++	++	–	+++	–	++
*S. fragmentosporus*19	+	+	–	+++	–	++
S. violobrunneus 10	+	+	–	+++	++	+
S. acidiscabies 11	+++	+++	–	+++	–	+
S. ravulus 12	+++	–	–	+++	+	+
S. marinolimosus 15	++	+	+	+++	+	+
S. marinolimosus 26	++	++	++	+++	+	–
S. marinolimosus 59	++	+	+	+++	+	+
S. subhalophilus 16	+++	–	–	+++	–	–
S. subhalophilus 50	++	–	–	++	–	–
S. atratus 17	+++	+++	–	++	++	+
S. atratus 61	–	–	–	–	–	–

Продовження таблиці 3

1	2	3	4	5	6	7
S. dayalbaghensis 18	++	++	–	++	++	+
S. dayalbaghensis 20	+++	+++	–	+++	+	+
S. dayalbaghensis 46	++	+++	–	+++	+	++
S. dayalbaghensis 64	+++	++	–	++	+	+
S. grisinus 21	+++	–	–	+++	+	–
S. grisinus 30	+	–	–	++	–	+
S. grisinus 45	+++	+++	–	+++	–	–
S. enduracidicus 23	+++	–	–	+++	–	+++
S. canadensis 27	+++	+++	–	+++	+++	+
S. canadensis 29	+++	–	–	+++	+++	–
S. tateyamensis 28	+	–	–	++	–	–
S. sporostellatus 31	+++	–	–	+++	–	–
S. sporoherbeus 33	+	++	–	+++	–	+
S. hofunensis 34	+	–	–	+++	–	–
S. alboflaveolus 35	+++	–	–	+++	+++	++
S. violaceomaculatus 37	++	++	–	+++	++	–
S. cinereorectus 38	++	–	–	++	–	–
S. caelestis 40	++	+	–	+++	–	–
S. spororutilis 41	+	+	–	+++	+	–
S. nidulosus 43	+++	+++	–	+++	+++	–
S. hirsutus 44	++	+++	–	++	–	++
S. septisporus 48	+++	–	–	+++	–	+
S. sporocaneris 49	++	+	–	++	+	+
S. spitsbergensis 52	+++	+++	–	+	+++	+
S. globosus 53	+++	++	–	++	–	–
S. globosus 54	+++	++	–	++	+++	+++
S. globosus 56	+++	+++	–	++	+++	+
S. salmonicolor 58	+++	–	–	+	+	+
S. nigriaromaticus 63	–	–	–	+++	+	–
S. curacoi 65	+++	++	–	–	–	–

Примітка: +++ дуже добрий ріст, ++ добрий ріст, + слабкий ріст, – відсутність росту

Note: +++ very good growth or reaction, ++ good growth or reaction, + weak growth or reaction, – lack of growth or reaction

О.В. Сыщикова

Криворожский ботанический сад НАН Украины,
ул. Маршака, 50, Кривой Рог, 50089, Украина, тел.: +38 (0564) 38 44 74,
e-mail: oksana741015@rambler.ru

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ СТРЕПТОМИЦЕТОВ ПРИРОДНЫХ ПОЧВ И ТЕХНОЗЕМОВ КРИВОРОЖЬЯ

Реферат

Цель. *Выделить из техногенно-нарушенных и природных почв Криворожья стрептомицеты, установить их таксономический состав, провести идентификацию и оценить структуру сообщества стрептомицетов.* **Методы.** *Выделение чистых культур стрептомицетов проводили на крахмало-аммиачном агаре. Идентификацию изолятов стрептомицетов проводили по 36 диагностическим признакам с использованием методических указаний определителя актиномицетов Г.Ф. Гаузе, описания видов рода Streptomyces и компьютерной программы их идентификации StmId, разработанной сотрудниками Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.* **Результаты.** *Проведена идентификация выделенных штаммов бактерий по морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим свойствам. По данным морфологии спор 63,8% исследованных культур имеют гладкую поверхность спор, 24,1% – с шиповидными выростами, 8,6% – с бугорчатыми выростами. Большинство выделенных из почв стрептомицетов имеют прямые спороносцы, расположенные моноподиально. Установлено, что по шкале цветов А.С. Бондарцева на минеральном агаре Гаузе-1 количество изолятов с белым и серым воздушным мицелием составляло по 29%. Для субстратного мицелия многих изолятов характерны оттенки коричневого и бурого цветов. Среди выделенных штаммов микроорганизмов 40% способны к образованию растворимых пигментов, 64% – меланоидных. Установлено, что практически все изоляты хорошо растут на среде с глюкозой и сахарозой. Наименее пригодной для роста бактерий является среда с ксилозой. Установлено, что процесс дезаминирования аминокислот с образованием аммиака осуществляют 64% изученных культур, а к расщеплению серусодержащих аминокислот, с образованием сероводорода способны 57% изолятов. Все изученные культуры с разной интенсивностью проявляют амилолитическую, целюлозолитическую и протеолитическую активность.* **Выводы.** *Установлен видовой состав сообщества стрептомицетов техногенно-нарушенных и природных почва Криворожья. Установлено, что в ценозе стрептомицетов природных почв преобладали S. violaceomaculatus, S. sporoherbeus, S. aerionidulus, S. enduracidicus и S. grisinus, тогда как в техноземах – S. dayalbaghensis, S. sporostellatus, S. conganensis, S. violobrunneus и S. albocrustosus.*

Ключевые слова: стрептомицеты, микробоценоз, техногенно-нарушенные и природные почвы.

O.V. Syshchykova

Kryvyi Rig botanical garden, NASU, 50, Marshaka str., Kryvyi Rig, 50089, Ukraine,
tel.: +38 (0564) 38 44 74, e-mail: oksana741015@rambler.ru

STREPTOMYCETES BIOLOGICAL PROPERTIES AND TAXONOMICAL STRUCTURE FROM NATURAL SOILS AND TECHNOZEMS OF KRYVYI RIG AREA

Summary

Aim *to select the streptomycetes from technogenic-disturbed and natural soils of Kryvyi Rig area, to establish their taxonomical structure, to carry out their identification and to assess the structure of the streptomycetes community.* **Methods.** *Allocation of streptomycetes pure culture performed on starch-ammonia agar. Identification of streptomycetes isolates was performed by 36 diagnostic signs using H.F. Hauze guidelines actinomycetes determinant, the description of the genus Streptomyces and computer program of their identification StmId, developed by the employees of Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine.* **Results.** *There were carried out the identification of bacterial strains based on morphological, cultural and physiological-biochemical properties. According to the morphology of spores 63.8% of surveyed cultures with smooth surface of spores, 24.1% – with thorns, 8.6% – with hillocks. The most streptomycetes isolated from soil have direct sporophores located monopodial. On the scale of colors of A.S. Bondartsev there were established that on mineral agar of Gauze-1 the amount of isolates with white and grey air mycelium made on 29%. For substrate mycelium of many isolates the shades of brown color are characteristic. Among the selected strains of microorganisms of 40% are capable to formation of soluble pigments 64% – melanoid. It is established that practically all isolates well grow on medium with glucose and sucrose. The least suitable for bacterial growth is medium with xylose. It is determined that the process of desamination of amino acids to form ammonia carry 64% of the studied cultures, and the cleavage of sulfur-containing amino acids to form hydrogen sulfide are able 57% of isolates. All studied cultures exhibit amylolytic, cellulolytic and proteolytic activity with varying intensity.* **Conclusions.** *The specific structure of streptomycetes community from technogenic-disturbed and natural soils of Kryvyi Rig area is established. It is determined that S. violaceomaculatus, S. sporoherbeus, S. aerionidulus, S. enduracidicus and S. grisinus prevailed in streptomycetes cenosis of natural soils whereas in the technozems – S. dayalbaghensis, S. sporostellatus, S. conganensis, S. violobrunneus and S. albocrustosus.*

Key words: streptomycetes, microbocenosis, technogenic-disturbed and natural soils.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ананьева Н.Д.* Оценка устойчивости микробных комплексов почв к природным и антропогенным воздействиям / Н.Д. Ананьева, Е.В. Благодатская, Т.С.Демкина // Почвоведение. – 2002. – № 5. – С. 580–587.

2. *Бондарцев А.С.* Шкала цветов / Бондарцев А.С. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1954. – 27 с.

3. *Валагурова Е.В.* Актиномицеты рода Streptomyces, описание видов и компьютерная программа их идентификации / Валагурова Е.В., Козырицкая В.Е., Иутинская Г.А. – К.: Наукова думка, 2003. – 618 с.

5. *Евдокимова Г.А.* Микроорганизмы тундровых и лесных подзолов Кольского Севера / Г.А. Евдокимова, Н.П. Мозгова. – Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2001. – 184 с.

7. *Закалюкина Ю.В.* Почвенные ацидофильные актиномицеты / Ю.В. Закалюкина, Г.М. Зенова, Д.Г. Звягинцев // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 3. – С. 399–403.

8. *Зенова Г.М.* Разнообразие актиномицетов в наземных экосистемах / Г.М. Зенова, Д.Г. Звягинцев. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – 122 с.

9. *Иутинская Г.А.* Математическое моделирование в микробиологическом мониторинге почв, загрязненных тяжелыми металлами / Г.А. Иутинская // Почвоведение. – 2005. – № 5. – С. 594–599.

10. *Калакуцкий Л.В., Агре Н.С.* Развитие актиномицетов / Л.В. Калакуцкий, Н.С. Агре. – М.: Наука, 1977. – 287 с.

11. *Определитель* актиномицетов. Роды Streptomyces, Streptoverticillum, Chainia / [Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А. и др.]. – М.: Наука, 1983. – 248 с.

12. *Руководство* к практическим занятиям по микробиологии : учеб. пособие [3-е изд., перераб. и доп.] / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 224 с.

13. *Гришко В.Н.* Структурно-функциональные особенности сообщества актиномицетов в некоторых черноземах и засоленных почвах Украины / О.В. Сыщикова// Почвоведение. – 2010. – № 2 – С. 221–228.

14. *Функціонування* мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження / [Андріюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін.]. – К.: Обереги, 2001. – 233 с.

15. *Anderson A.S.* The taxonomy of *Streptomyces* and related genera / A.S. Anderson, E.M.H. Wellington // Int. J. Syst. Evolu. Microbiol. – 2001. – Vol. 51. – P. 797–814.

16. *Kelly J.J.* Effects of heavy metal contamination and remediation on soil microbial communities in the vicinity of a zinc smelter as indicated by analysis of microbial community phospholipid fatty acid profiles / J.J. Kelly, M.M. Haggblom, R.L. Tate // Biol. Fert. Sols. – 2003. – Vol. 38, № 2. – P. 65–71.

17. *Maleki H.* Isolation and molecular identification of Streptomyces spp. with antibacterial activity from northwest of Iran / H. Maleki, A. Dehnad, S. Hanifian, S. Khani // BioImpacts. – 2013. – Vol. 3, Iss. 3. – P. 129–134.

Стаття надійшла до редакції 11.07.2013 р.

АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» у 2013 році

Автори	№ вип.	№ стор.
Авдєєва Л.В. див. *Драговоз І.В.*	3	84
Бабенко Д.О. див. *Мерліч А.Г.*	3	31
Басюл О.В. див. *Коротаєва Н.В.*	2	6
Бєляєва Т.О. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Білоіваненко С.О., Бухтіяров А.Є. Резистентність *Rhodotorula rubra* G2/1 до важких металів та їх адсорбція	1	81
Білявська Л.О. див. *Іутинська Г.О.*	1	48
Болотін В.І. див. *Горайчук І.В.*	3	6
Бондаренко В.І. див. *Фесенко А.Ю.*	2	25
Бухтіяров А.Є. див. *Білоіваненко С.О.*	1	81
Бухтіяров А.Є. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Бучацький Л.П. див. *Матвієнко Н.М.*	4	46
Варбанець Л.Д. див. *Нідялкова Н.А.*	2	15
Васильєва Н.Ю. див. *Мерліч А.Г.*	3	31
Васильєва Н.Ю., Коротаєва Н.В., Панченко М.М., Іваниця В.О. Математичний аналіз та оптимізація складу поживного середовища для штаму *Lactobacillus plantarum* ONU87	2	52
Васюта С.О. див. *Тряпіцина Н.В.*	1	89
Велигодська А.К., Федотов О.В. Вміст меланінів у базидіальних грибів порядків *Polyporales* та *Agaricales*	3	72
Виноград Н.О. див. *Юрченко О.О.*	1	20
Вінніков А.І. див. *Воробєй Є.С.*	1	6
Вінніков А.І. див. *Сідашенко О.І.*	2	86
Водзінська Н.С., Галкін Б.М., Водзінський С.В., Філіпова Т.О. Антифагова активність асиметрично-заміщених піридилпорфіринів	3	94
Водзінський С.В. див. *Водзінська Н.С.*	3	94
Волошко Т.Є., Федотов О.В. Вплив деяких мікроелементів на активність оксидоредуктаз базидіоміцетів	1	68
Волювач О.В. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Воробєй Є.С., Воронкова О.С., Маліновська І.В., Вінніков А.І. Бактеріофаги та їх вплив на бактеріальні біоплівки	1	6
Воронкова О.С. див. *Воробєй Є.С.*	1	6
Воронкова О.С. див. *Сідашенко О.І.*	2	86
Вортман М.Я. див. *Чуєнко А.І.*	2	97

Автори	№ вип.	№ стор.
Галкін Б.М. див. *Водзінська Н.С.*	3	94
Галкін М.Б., Іваниця В.О. Синтез піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* за впливу вісмутових метало-комплексів порфіринів та аутоіндукторів системи *quorum sensing*	1	29
Галкін М.Б. див. *Мухліс Абедалабас*	2	32
Галкін М.Б. див. *Мухліс Абедалабас*	4	38
Герілович А.П. див. *Горайчук І.В.*	3	6
Гнатуш С.О., Лаврик С.В. Характеристика пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas palustris* з озера Яворівське (Україна)	4	81
Горайчук І.В., Герілович А.П., Солодянкін О.С., Болотін В.І. Розробка рекомбінантного позитивного контролю вірусу діареї великої рогатої худоби I та II типу для використання в ПЛР	3	6
Горішний М.Б., Гудзь С.П. Нагромадження білка у клітинах *Chlorobium limicola* IMB K-8 за різних умов мінерального та органічного живлення	3	64
Горшкова О.Г. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Конуп І.П., Бухтіяров А.Є., Лісютін Г.В., Пузирьова І.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas*	4	72
Гудзь С.П. див. *Горішний М.Б.*	3	64
Гудзь С.П. див. *Шоляк К.В.*	2	66
Демченко Н.Р., Курмакова І.М., Третяк О.П. Особливості корозійно активного мікробного угруповання феросфери газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті	4	90
Дерябін О.М. див. *Матвієнко Н.М.*	4	46
Драговоз І.В., Леонова Н.О., Жукова Д.А., Авдєєва Л.В. Фітостимулювальна активність екзометаболітів штама-антагоніста *Bacillus amyloliquefaciens* IMB B-7404	3	84
Дубіна Д.О. див. *Юрченко О.О.*	1	20
Жукова Д.А. див. *Драговоз І.В.*	3	84
Златогурська М.А. див. *Мерліч А.Г.*	3	31
Золотарьова О.К. див. *Степанов С.С.*	4	63
Іваниця В.О. див. *Васильєва Н.Ю.*	2	52
Іваниця В.О. див. *Галкін М.Б.*	1	29
Іваниця В.О. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Іваниця В.О. див. *Коротаєва Н.В.*	2	6
Іваниця В.О. див. *Мерліч А.Г.*	3	31
Іутинська Г.О., Циганкова В.А., Білявська Л.О., Козирицька В.Є. Вплив нових біопрепаратів на основі Аверкому на розвиток і продуктивність рослин та експресію генів синтезу si/miРНК	1	48

Автори	№ вип.	№ стор.
Коваленко Н.К. див. *Полтавська О.А.*	4	6
Козирицька В.Є. див. *Іутинська Г.О.*	1	48
Кондратюк Т.В. див. *Коротаєва Н.В.*	2	6
Конуп І.П. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Коротаєва Н.В. див. *Мерліч А.Г.*	3	31
Коротаєва Н.В., Кондратюк Т.В., Басюл О.В., Крилова К.Д., Ямборко Г.В., Іваниця В.О., Ліманська Н.В. Вплив *Lactobacillus plantarum* ОНУ 87 у суміші з автолізатом ервіній на утворення пухлин, спричинене *Rhizobium radiobacter* C58	2	6
Коротаєва Н.В. див. *Васильєва Н.Ю.*	2	52
Крилова К.Д. див. *Коротаєва Н.В.*	2	6
Курдиш І.К. див. *Скороход І.О.*	1	59
Курдиш І.К. див. *Скороход І.О.*	2	41
Курмакова І.М. див. *Демченко Н.Р.*	4	90
Курченко І.М., Циганенко К.С. Порівняльна характеристика комплексу трихотеценових мікотоксинів штамів *Fusarium poae* (PECK) Wollenw різних трофічних груп	3	40
Курченко І.М., Павличенко А.К., Юр'єва О.М. Ростові характеристики ендофітних та фітопатогених штамів *Alternaria alternata* і *Ceratocystis* sp.	2	77
Кушкевич І.В. Дисиміляційне відновлення сульфатів різними штамами *Desulfovibrio* sp. кишечника людини	3	50
Лаврик С.В. див. *Гнатуш С.О.*	4	81
Лейбенко Л.В., Поліщук В.П., Радченко Л.В., Міроненко А.П. Філогенетичний аналіз вірусів грипу людей A(H3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011–2012 років	1	37
Леонова Н.О. див. *Драговоз І.В.*	3	84
Ліманська Н.В. див. *Коротаєва Н.В.*	2	6
Ліманська Н.В. див. *Мерліч А.Г.*	3	31
Лісютін Г.В. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Маліновська І.В. див. *Воробєй Є.С.*	1	6
Матвієнко Н.М., Бучацький Л.П., Дерябін О.М. Застосування зворотно-транскриптазної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ – ПЛР) для виявлення та ідентифікації вірусу інфекційного панкреатичного некрозу райдужної форелі *(Oncorhynchus mykiss)*	4	46
Мацелюх О.В. див. *Нідялкова Н.А.*	2	15
Медведєва Т.В. див. *Тряпіцина Н.В.*	1	89
Мерліч А.Г., Іваниця В.О., Коротаєва Н.В., Златогурська М.А., Васильєва Н.Ю., Бабенко Д.О., Ліманська Н.В. *Lactobacillus plantarum* в суслі винограду, що культивується на півдні України	3	31

Автори	№ вип.	№ стор.
Мєлєнтьєв О.І. див. *Скороход І.О.*	2	41
Міроненко А.П. див. *Лейбенко Л.В.*	1	37
Мухліс Абедалабас, Галкін М.Б., Пахомова Є.Ю., Філіпова Т.О. Вплив екзогенних аутоіндукторів quorum sensing на синтез рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa*	4	38
Мухліс Абедалабас, Галкін М.Б., Семенець А.С., Філіпова Т.О. Утворення біоплівки і синтез рамноліпідів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 за присутності сигнального хінолону та його синтетичних аналогів	2	32
Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Субстратна специфічність пептидази 2 *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324	2	15
Павличенко А.К. див. *Курченко І.М.*	2	77
Панченко М.М. див. *Васильєва Н.Ю.*	2	52
Парижак С.Я. Конструювання штамів – надпродуцентів формальдегідредуктази термотолерантних метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*	3	14
Пахомова Є.Ю. див. *Мухліс Абедалабас*	4	38
Перетятко Т.Б. див. *Шоляк К.В.*	2	66
Позур В.К. див. *Фесенко А.Ю.*	2	25
Позур В.К. див. *Фесенко А.Ю.*	4	24
Полішко Т.М. див. *Сідашенко О.І.*	2	86
Поліщук В.П. див. *Лейбенко Л.В.*	1	37
Поліщук В.П. див. *Руднєва Т.О.*	4	55
Полтавська О.А., Коваленко Н.К. Пребіотики вуглеводної природи і перспективи їх використання	4	6
Пузирьова І.В. див. *Гудзенко Т.В.*	4	72
Радченко Л.В. див. *Лейбенко Л.В.*	1	37
Рой А.О. див. *Скороход І.О.*	2	41
Руднєва Т.О., Шевченко Т.П., Цвігун В.О., Поліщук В.П. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей	4	55
Семенець А.С. див. *Мухліс Абедалабас*	2	32
Сідашенко О.І., Воронкова О.С., Полішко Т.М., Вінніков А.І. Вивчення біологічних властивостей плівкоутворювальних і неплівкоутворювальних штамів *Staphylococcus epidermidis*	2	86
Скороход І.О., Курдиш І.К. Вплив наночасточок діоксиду кремнію та вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *Bacillus subtilis* IMB B-7023	1	59
Скороход І.О., Рой А.О., Мєлєнтьєв О.І., Курдиш І.К. Вплив біологічно активних речовин фосфатмінералізуючих штамів роду *Bacillus* на насіння рослин, яке зазнало оксидативного стресу	2	41
Солодянкін О.С. див. *Горайчук І.В.*	3	6

Автори	№ вип.	№ стор.
Степанов С.С., Золотарьова О.К. Фотосинтез, дихання та ріст мікроводорості *Chlamydomonas reinhardtii* в присутності етанолу	4	63
Третяк О.П. див. *Демченко Н.Р.*	4	90
Тряпіцина Н.В., Удовиченко К.М., Васюта С.О., Медведєва Т.В., Ярушников В.В., Удовиченко В.М. Виявлення ізолятів вірусу шарки сливи в насадженнях Східного Степу України	1	89
Удовиченко В.М. див. *Тряпіцина Н.В.*	1	89
Удовиченко К.М. див. *Тряпіцина Н.В.*	1	89
Федотов О.В. див. *Велигодська А.К.*	3	72
Федотов О.В. див. *Волошко Т.Є.*	1	68
Фесенко А.Ю., Позур В.К. Поліомієліт: перешкоди на шляху ерадикації	4	24
Фесенко А.Ю., Позур В.К., Бондаренко В.І. Стан вакцинопрофілактики проти поліомієліту в Україні	2	25
Філіпова Т.О. див. *Водзінська Н.С.*	3	94
Філіпова Т.О. див. *Мухліс Абедалабас*	2	32
Філіпова Т.О. див. *Мухліс Абедалабас*	4	38
Фоміна М.О. Вплив джерела нітрогену на хімічне зв'язування купруму ектомікоризним грибом *Rhizopogon rubescens*	3	23
Цвігун В.О. див. *Руднєва Т.О.*	4	55
Циганенко К.С. див. *Курченко І.М.*	3	40
Циганкова В.А. див. *Іутинська Г.О.*	1	48
Чуєнко А.І., Вортман М.Я., Шевченко В.В. Фунгіцидна активність гуанідинвмісних олігомерів, перспективних до застосування в гумовій промисловості	2	97
Шевченко В.В. див. *Чуєнко А.І.*	2	97
Шевченко Т.П. див. *Руднєва Т.О.*	4	55
Шоляк К.В., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Сульфатвідновлювальні бактерії, стійкі до підвищених концентрацій шестивалентного хрому	2	66
Юр'єва О.М. див. *Курченко І.М.*	2	77
Юрченко О.О., Дубіна Д.О., Виноград Н.О. Молекулярно-генетична характеристика вірусу кліщового енцефаліту, якій циркулює в Північно-Західному Причорномор'ї	1	20
Ямборко Г.В. див. *Коротаєва Н.В.*	2	6
Ярушников В.В. див. *Тряпіцина Н.В.*	1	89

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють 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 абревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

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

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

Розділ «Результати досліджень та їх обговорення» має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-

результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки (чітко, синьою або чорною ручкою неправильне 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, диагностикумів, 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, Resuts 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.

Верстка В.Г. Вітвицька

Підписано до друку 31.03.2014 р. Формат 70х100/16.
Умов.-друк. арк. 9,4. Тираж 100 прим.
Зам. № 915.

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