

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

# МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

# MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

**№ 4(28)**  
**2014**

Одеса  
ОНУ  
2014

Засновник  
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
Свідоцтво про державну реєстрацію: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

**ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР**  
В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

**ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА**  
Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

**ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР**  
Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**

Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р.А. Волков (Чернівці, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П.І. Гвоздяк (Київ, Україна), С.П. Гудзь (Львів, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Ю.П. Зайцев (Одеса, Україна), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), О.А. Кіпріанова (Київ, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), І.П. Метеліцина (Чикаго, США), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немятловський (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), Л.М. Сківка (Київ, 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*

Затверджено до друку Вченою радою  
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.  
Протокол № 9 від 30.09.2014 р.

**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

Establisher  
by Odesa National Mechnykov University.  
Registration of state certification: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

**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), L.M. Skivka (Kyiv, Ukraine), I.A. Tykhonovych (St.-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*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University.  
Minutes No 9, 30.09.2014

**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)**

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2014

## З М І С Т

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

<b>О.П. Лівінська, О.М. Василенко, Т.В. Томила, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко</b> ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ФІЗИЧНИХ ТА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ .....	6
<b>Т.О. Руднєва, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун, І.Г. Будзанівська, В.П. Поліщук</b> ФІЛОГЕНЕТИЧНА СПОРІДНЕНІСТЬ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ КАВУНА 2 .....	15
<b>І.В. Кушкевич, Г.Л. Антоняк, Р.В. Фафула</b> АКТИВНІСТЬ І КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ <i>DESULFOVIBRIO PIGER</i> VIB-7 ТА <i>DESULFOMICROBIUM</i> SP. ROD-9 .....	26
<b>Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця</b> ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ <i>ERWINIA</i> , <i>RALSTONIA</i> , <i>AGROBACTERIUM</i> , ВИЗНАЧЕНІ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ ....	36
<b>Н.І. Адамчук-Чала, Є.П. Копилов</b> УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ АПКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ПІД ДІЄЮ ІНОКУЛЯЦІЇ БАКТЕРІЯМИ ШТАМУ <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> 102 .....	44
<b>О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, І.Й. Сейфулліна, В.О. Лерер</b> ВПЛИВ ПОХІДНИХ ІЗОНІАЗИДУ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЛАКТАМАЗАПРОДУКУВАЛЬНИХ <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ДО ПЕНІЦИЛІНУ .....	52
<b>І.О. Герасименко, І.К. Курдиш</b> ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ІМВ В-7023 .....	61
<b>С.В. Кузьмішина, С.О. Гнатуш, В.І. Баранов</b> МІКРОБІОТА ПОРОДНОГО ВІДВАЛУ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ЗБАГАЧУВАЛЬНОЇ ФАБРИКИ ЧЕРВОНОГРАДСЬКОГО ГІРНИЧОПРОМИСЛОВОГО РАЙОНУ ЗА ВНЕСЕННЯ ЗОЛИ .....	69
<b>І.В. Драгвоз, Н.О. Леонова, С.В. Лапа, Л.А. Данкевич, С.Ф. Падалко, Л.В. Бобик, Л.В. Авдєєва</b> ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНА, АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТА БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ШТАМУ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ІМВ В-7243 .....	77
<b>М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, В.В. Івах, О.О. Тітлянов</b> ПРОДУКЦІЯ СИДЕРОФОРІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i> ..... ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	88 96

## CONTENTS

### EXPERIMENTAL WORKS

<b>O.P. Livinska, O.M. Vasilenko, T.V. Tomila, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko</b> PHYSICAL AND IMMUNOBIOLOGICAL STUDIES OF TEICHOIC ACIDS OF PROBIOTIC LACTOBACILLI STRAINS .....	6
<b>T.O. Rudnieva, T.P. Shevchenko, V.O. Tsigun, I.G. Budzanivska, V.P. Polischuk</b> PHYLOGENETIC HOMOLOGY OF UKRAINIAN ISOLATES OF WATERMELON MOSAIC VIRUS 2 .....	15
<b>I.V. Kushkevych, H.L. Antonyak, R.V. Fafula</b> ACTIVITY AND KINETIC PROPERTIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE OF THE SULFATE-REDUCING BACTERIA <i>DESULFOVIBRIO PIGER</i> V IB-7 AND <i>DESULFOMICROBIUM</i> SP. ROD-9 .....	26
<b>Zh. Sergieieva, V. Ivanytsia</b> PHYTOPATHOGENIC BACTERIA OF GENERA <i>ERWINIA</i> , <i>RALSTONIA</i> , <i>AGROBACTERIUM</i> PLASMID PROFILES STUDIED BY DIFFERENT METHODS .....	36
<b>N.I. Adamchuk-Chala<sup>1</sup>, Ye.P. Kopylov</b> ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF APICAL MERISTEMS IN SPRING WHEAT SEEDLINGS UNDER INOCULATION WITH BACTERIA OF <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> 102 NEW STRAIN .....	44
<b>O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.Y. Seifullina, V.O. Lerer</b> INFLUENCE OF IZONIAZIDE DERIVATIVES ON LACTAMASE- PRODUCING <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SENSITIVITY TO PENICILLIN .....	52
<b>I.O. Herasymenko, I.K. Kurdish</b> INFLUENCE OF PHYSICOCHEMICAL FACTORS ON DEHYDROGENASE ACTIVITY OF <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IMB B-7023 .....	61
<b>S.V. Kuzmishyna, S.O. Hnatush, V.I. Baranov</b> MICROBIOTA OF THE CENTRAL ENRICHMENT PLANT WASTE HEAPS OF CHERVONOGRAD MINING REGION AFTER COAL ASH APPLYING .	69
<b>I.V. Dragovoz, N.O. Leonova, S.V. Lapa, L.A. Dankevich, S.F. Padalko, L.V. Bobyk, L.V. Avdeeva</b> PHYTOSTIMULATING, ANTAGONISTIC ACTIVITY AND BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF STRAIN <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IMB B-7243 .....	77
<b>M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, T.O. Filipova, V.V. Ivah, O.O. Titlianov</b> THE SIDEROPHORE PRODUCTION BY <i>PSEUDOMONAS</i> BACTERIA .....	88
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	96

UDC 579.234.864: 663.1: 57.063.8 (043.5)

**O.P. Livinska<sup>1</sup>, O.M. Vasilenko<sup>2</sup>, T.V. Tomila<sup>3</sup>, I.L. Garmasheva<sup>1</sup>,  
N.K. Kovalenko<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine  
e-mail: teichoic@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NASU

<sup>3</sup> Frantsevich Institute for Problems of Materials Science, NASU

## PHYSICAL AND IMMUNOBIOLOGICAL STUDIES OF TEICHOIC ACIDS OF PROBIOTIC LACTOBACILLI STRAINS

***Aim.** The aim of this study was to establish the chemical structure of teichoic acids of probiotic lactobacilli strains and to investigate their influence on murine macrophages phagocytosis and proliferation of the murine macrophages cell line J 774. **Methods.** Physical (infrared spectroscopy methodology, <sup>1</sup>H, and <sup>13</sup>C NMR experiments), immunobiological and statistical methods were used. **Results.** It was shown that cell walls of *Lactobacillus plantarum* 11/16 and *Lactobacillus plantarum* 195D contained glycerol teichoic acids with unusually high number of sugar elements. The teichoic acid of the strain *L. plantarum* 11/16 had 9 different pyranoses and furanoses sugars in alfa-configuration and *L. plantarum* 195D had 4 hexosopyranoses. The teichoic acids of *L. plantarum* 195D and 11/16 increased the percent phagocytosis by 15.00±5.72% and 13.75±4.65% respectively. Both teichoic acids in the doses of 32 and 64 µg/ml stimulated cell proliferation of murine macrophage cell line by 35–53%. It was not observed any considerable effect of studied teichoic acids on phagocytic index, spontaneous and stimulated NBT-test of peritoneal macrophages of mice.*

*Key words:* teichoic acids, NMR spectroscopy, infrared spectroscopy, phagocytosis, probiotics.

The role of teichoic acids (TA) of grampositive bacteria in many functions related to mechanical stability, adhesive properties, biofilm formation ability, cation balance and immune activity is widely discussed. These biopolymers are of interest as patogenicity factor of causative agents of infectional diseases and as bioactive molecules. At the same time TA of normal human microbiota representatives and its impact to bacteria biological activity have not been enough studied yet. Nowadays a large part of modern investigations in the area of health keeping is devoted to probiotics and functional foods. Traditionally probiotics are represented by lactic acid bacteria, particularly, belonging to genus *Lactobacillus*. *Lactobacillus plantarum* is a lactic acid bacteria that is widely isolated from the environment and home-made foods and used in industrial productions of various fermented foods [17]. Probiotic

© O.P. Livinska, O.M. Vasilenko, T.V. Tomila, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko, 2014



effects are contributed by antagonistic effects against pathogenic microorganisms and immune system stimulation. However, very little has been known about the molecular mechanisms by which health-promoting probiotic bacteria act as the host cell modulators [7, 10]. As bacterial envelope components are the first to establish bacterial-host cell interactions are very little-studied TA may play an essential role.

The aim of this study was to establish the chemical structure of TA of probiotic lactobacilli strains and to investigate their biological effects.

### Materials and methods

**Strains.** The objects of the study were probiotic strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* 11/16 and *L. plantarum* 195D. These strains were obtained from Ukrainian collection of microorganisms of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine. The studied strains attract the scientific interest due to the source of isolation and the high biological activity as well [3].

Teichoic acids were obtained from native cells by trichloroacetic acid extraction and purified using ion exchange chromatography and dialysis as it was previously described [9].

To perform NMR analysis lyophilized material (20 mg) was dissolved in 0.5 ml deuterium oxide. NMR spectra were recorded using a Bruker Avance DRX500 spectrometer at ambient temperature 20 °C with dioxan ( $^1\text{H}$  (3,75) and  $^{13}\text{C}$  (67,19) as the internal standard and frequencies 500 MHz and 125 MHz. Spectra processing was performed with standard software Bruker Top Spin, Version 2.1.

Infrared spectra were obtained with a IR Fourier spectrometer FSM-1202 in the wavenumber range of 4000-600 $\text{cm}^{-1}$ . To perform measurements the lyophilized samples were mixed with KBr (1:300) mg and pressed into transparent tablets (d = 13 mm) [14].

The effect of TA on the phagocytic and cytotoxic activities (nitro-blue tetrazolium (NBT-test)) of peritoneal macrophages was studied on albino mice aged 18-20 weeks. Due to the fact that the value of functional activity of macrophages is specific for every macroorganism only the degree of its change in the experiments was assessed. Also in order to implement the most general and the most appropriate assessment of influence of substances on studied parameters nonlinear animals (males and females equally) were used. All mouse experiments were conducted following bioethics guidelines and were in full accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes.

To obtain macrophage the mice were euthanized by cervical dislocation and the peritoneal fluid was collected in 5 ml of modified 199 medium (containing 10% bovine serum) after gentle massage of the abdomens of the animals. Portion of the peritoneal cell suspension containing  $10^6$  cells per ml was used for *in vitro* phagocytosis assays.

In order to investigate the influence of TA on phagocytosis peritoneal macrophages TA were added to the cells before the incubation (0.1, 1, 2 mkg/ml). To measure phagocytosis activity aliquots of peritoneal macrophages ( $10^6$  cells per ml)





were incubated for 30 min at 37 °C with the same volume of latex suspension (latex particles;  $10^7$  particles per ml). The percentage of macrophages that had ingested latex particles (percent phagocytosis) and the average number of ingested latex particles (phagocytosis index) were estimated with the Zeiss microscope immersion method by counting 100 cells.

To estimate cytotoxic activity (nitro-blue tetrazolium (NBT-test)) the macrophages were incubated in 0.2% NBT PBS solution at 37 °C for 30 min. The percent of cells containing diformazan granules was calculated [8].

In order to investigate the influence of teichoic acids on cell proliferation the murine macrophage cell line J 774 was used. The cells were cultivated in DMEM medium in the presence of 10% newborn calf serum (PAA, Austria) at the temperature of 37 °C in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in the humid atmosphere. After the monolayer had been formed the cells were passaged every 3–4 days using trypsin-versen solution (Sigma, USA) at a ratio of 1:10. Suspension of cells was incubated with TA (500 mkg/ml) for 48 hours at the same conditions.

The estimation of the results was performed by colorimetric test with vital stain MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) use. The percentage of living cells was measured by determining of optical density on spectrophotometer MCC-340 (Labsystem, Finland) at 540 nm.

**Statistical Techniques.** Data for phagocytosis and cell proliferation are represented as the mean  $\pm$  standard deviation of means. All data were tested for significance by analysis of variance with the Statistica Program, release 5.0. The level of significance tested in each instance was  $P < 0.05$ .

## Results

In order to be able to clarify the possible mechanisms of biological activity and, in particular, probiotic action of TA their chemical structure was studied. When both teichoic acid preparations were examined by infrared spectroscopy, specific absorbencies were observed at the bands of 839, 870, 964, 1022, 1146, 1148, 1216, 1336, 1509, 1640, 1750 cm<sup>-1</sup>. The absorption bands  $\nu$ ~3500 cm<sup>-1</sup> and  $\nu$ ~1640 cm<sup>-1</sup> are specific for stretching and deformation vibrations of OH bonds (Fig. 1 a, c).

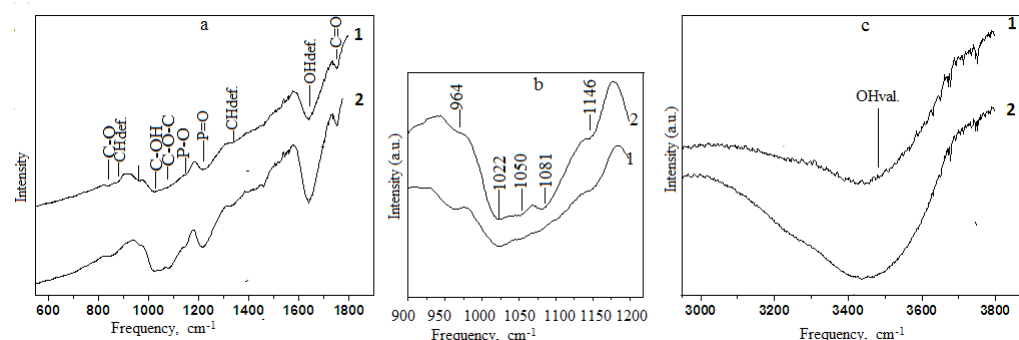


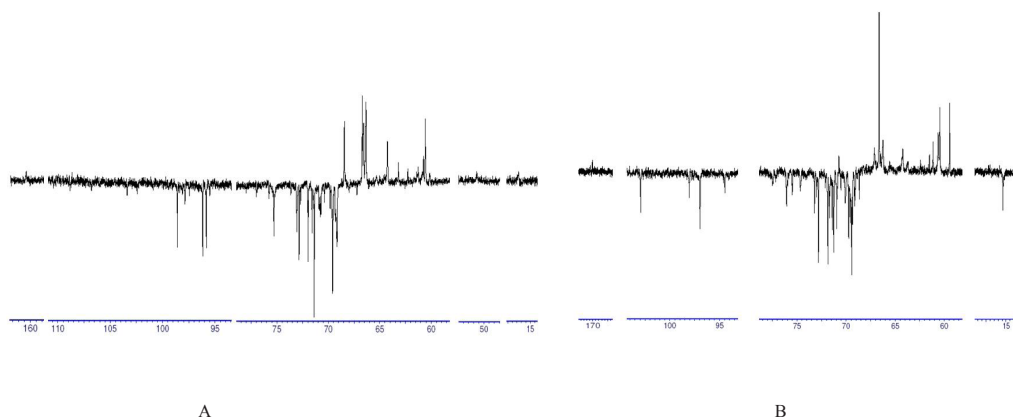
Fig. 1. Infrared spectra of teichoic acids from *Lactobacillus plantarum* 11/16 (1) and *Lactobacillus plantarum* 195D (2)



The signals  $\nu\sim 2870$ ,  $1336$  and  $964\text{ cm}^{-1}$  belong to stretching and deformation vibrations respectively of CH bonds. Absorption band in the  $\nu\sim 1750\text{ cm}^{-1}$  corresponds to the C=O bonds. There were intense bands ( $1250\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ ) which can correspond either to stretching vibrations C-O-C of ester group, or to C-O vibrations of COOH. The interpretation difficulties of this area occurred due to the proximity and overlay of these groups signals. The absorption bands at  $\nu\sim 870$ ,  $1022\text{ cm}^{-1}$ , corresponding C-O, C-OH, respectively, were also observed (Fig. 1) [1, 12, 13].

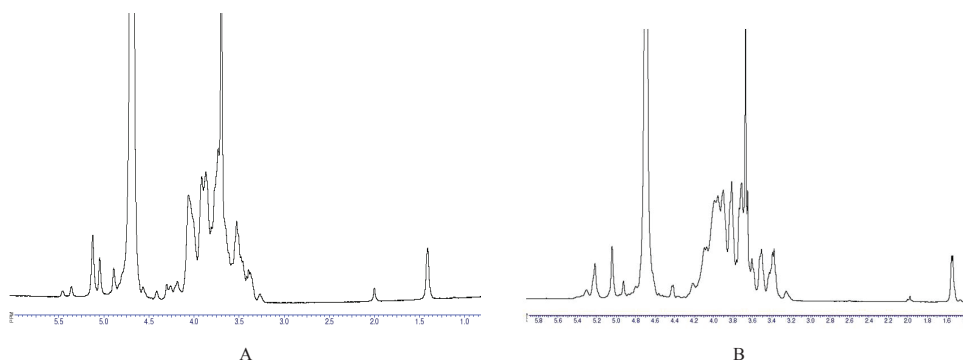
The significant disparity in the spectra was the different intensity at  $3500\text{ cm}^{-1}$  (-OH group), indicating their different amounts in the samples – TA of the strain *L. plantarum* 195D contained more OH-groups than TA of the strain *L. plantarum* 11/16. In addition, the range  $1200\text{--}900$ , corresponding to the C-O-C and C-O bonds was also different, which may indicate the differences in the carbohydrate components of the investigated substances. Thus, all functional groups, that are specific for the TA, were identified. These data formed the basis for further studies using NMR analysis.

$^{13}\text{C}$  spectra revealed chemical shifts specific for glycerol and  $\alpha$ -hexose containing compounds. The signals were partly expanded or split into duplets or triplets due to interaction with phosphorus. Glycerol residues were identified by signals in the characteristic areas (chemical shifts corresponding to 1,3polyglycerol phosphate links –  $61.15$  and  $66.84\text{ ppm}$  – for *L. plantarum* 11/16; and  $61.11$ ,  $66.81\text{ ppm}$  – for *L. plantarum* 195D –  $\text{CH}_2$ -atoms according to APT-spectra;  $71.87\text{ ppm}$  – for *L. plantarum* 11/16 and  $71.82$  in case *L. plantarum* 195D – CH-atoms, according to APT-spectra (Fig. 2 A, B).



**Fig. 2. Carbon NMR-spectra of teichoic acids from *Lactobacillus plantarum* 11/16 (A) and *Lactobacillus plantarum* 195D (B)**

$^1\text{H}$ -spectroscopy also showed the presence of the signals characteristic for polyglycerol chain –  $3.79\text{ ppm}$ ,  $3.97\text{ ppm}$  and  $3.92\text{ ppm}$  for the spectra of the strain *L. plantarum* 11/16, and  $3.79\text{ ppm}$ ,  $3.97\text{ ppm}$  and  $3.89\text{ ppm}$  – for *L. plantarum* 195D with specific splits because of interaction with phosphorus (Fig. 3).



**Fig. 3. Proton NMR-spectra of teichoic acids from *Lactobacillus plantarum* 11/16 (A) and *Lactobacillus plantarum* 195D (B)**

Sugar components identification was complicated due to signal overload of the spectra. Nonetheless we can definitely make a conclusion about the presence, quantity and configuration of the sugar components. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra contained anomeric signals corresponding to  $\alpha$ -atoms of the sugar residues. The spectra of TA of the strain *L. plantarum* 11/16 revealed the presence of 9 sugar units the two of which were represented by furanose configuration (signals 107.26 and 109.33 ppm) and seven – pyranoses (95.97, 96.31, 96.66, 97.91, 98.35, 99.07, 103.88 ppm). The difference of signal intensity indicated the different amount of these substituents. The domination of three  $\alpha$ -pyranoses with chemical shifts (96.31, 96.66, 99.07 ppm) was observed. This also has been reflected in  $^1\text{H}$  spectrum, where some of peaks could not be observed.

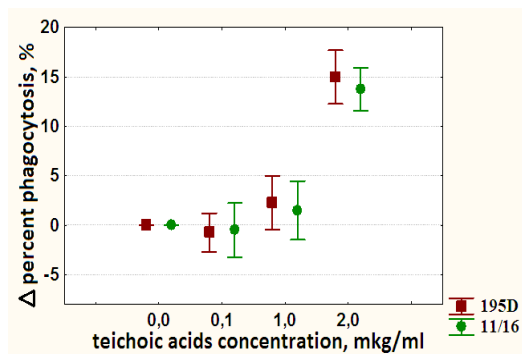
The  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  spectra of the TA obtained from *L. plantarum* 195D strain showed 4 anomeric signals indicating the presence of 4  $\alpha$ -hexose substitution in the polymer (chemical shifts are 95.14, 97.51, 98.60 and 103.50 ppm and 4.50, 5.00, 5.12, 5.30 ppm, respectively).

When the ability of the teichoic acids to activate macrophages *in vitro* was tested, only the concentration of 2 mkg/ml was able to cause statistically significant influence on phagocytic activity.

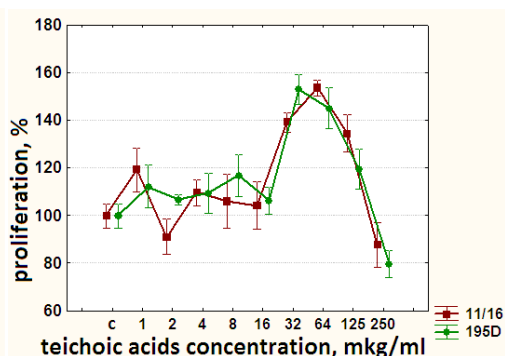
TA of *L. plantarum* 195D and 11/16 increased the percent phagocytosis by  $15,00 \pm 5,72\%$  and  $13,75 \pm 4,65\%$ , respectively (Fig. 4). Other doses of teichoic acids had no statistically significant effect on the value of percent phagocytosis.

None of the studied TA concentrations had significant impact on phagocytic index of mice peritoneal macrophages. There was no detected effect of the TA on the spontaneous and stimulated NBT-test.

The study of the lactobacilli TA effect on the proliferation of murine macrophage cell line J774 has demonstrated a dose-dependent effect of both investigated substances on the cells. TA of *L. plantarum* 11/16 and 195D in doses 32 and 64  $\mu\text{g/ml}$  stimulated cell proliferation by  $35,25 \pm 23,64\%$ ,  $53,54 \pm 23,26\%$  and  $53,03 \pm 17,13\%$ ,  $44,97 \pm 18,16\%$ , respectively (Fig. 5). The rest of the studied doses of teichoic acids has not significantly effected the level of macrophage proliferation.



**Fig. 4.** The effect of teichoic acids from *Lactobacillus plantarum* 11/16 and 195D on the mice peritoneal macrophages percent phagocytosis change



**Fig. 5.** The effect of teichoic acids from *Lactobacillus plantarum* 11/16 and 195D on the cell proliferation of cell line J774 mice macrophages.

## Discussion

The use of infrared spectroscopy in this study was aimed to determine the functional groups in the TA molecules of tested strains and compare them with each other. Infrared spectroscopy has rather limited use in studies of most organic compounds due to their high molecular weight. Nevertheless we have found that all absorption bands characteristic for TA functional groups were present in the obtained spectra.

The biological role of teichoic acids has drawn great attention since it is known to be a key molecule that triggers a range of diseases by pathogens and immunity in case of “beneficial” bacteria as well. Among lactobacilli, wall teichoic acids (WTA) ultrastructures of *L. plantarum* are the most studied. It is known that *L. plantarum* is the only lactobacilli species which can contain either polyribitolphosphate or polyglycerophosphate in its WTA [15, 17]. Our data showed the presence of polyglycerophosphate in WTA of the tested strains.

The glycosyl residues of teichoic acids are commonly represented by multiple glucose residues in a range of configurations [15], but usually no more 1 or 2 kinds per molecule [5, 6, 11]. However our study revealed the presence of unusually high number of sugar units (up to 9). So it is not clear yet whether our finding may contribute to investigation of biological activity of lactobacilli. It was suggested that such high structural diversity is important for their lifestyle [16]. It was also discussed that the sugar components could be responsible for biological characteristics of these molecules [4]. There is further necessity in detailed and comprehensive study of molecular structure of TA and its connection with biological activity of probiotic bacteria.

It is known that TA of gram-positive bacteria can demonstrate biological activity and influence upon host immune system parameters. Teichoic acids of the pathogenic bacteria can act as pathogenicity factors in the infectious process whereas the role of these polymers in probiotic properties of lactic acid bacteria is poorly understood.

It is known that oral and parenteral administration of TA of lactobacilli to laboratory animals can cause increase of the functional activity of macrophages including

results of NBT-test [2]. In our work we have investigated the effect of teichoic acids of *Lactobacillus plantarum* 195D and *L. plantarum* 11/16 on the functional activity of murine macrophages in *in vitro* system.

The obtained results have indicated that the TA of the studied lactobacilli strains indeed showed some biological effects in particular increased the percent phagocytosis of murine macrophages and stimulated proliferation of macrophage cell line. Such effects were dose-dependent. The teichoic acids stimulating effect on proliferation of macrophage cell line J 774 is of special interest, because such data have not been found in the available sources. Moderate increasing of percent phagocytosis can be considered as one of the mechanisms of probiotic properties of investigated lactobacilli.

#### Acknowledgments

The authors express their gratitude to Dr. Marina Fomina, Department of Physiology of Industrial Microorganisms of Zablotny Institute of Microbiology and Virology, NASU for the inspiration and her assistance in preparing the manuscript.

УДК 579.234.864: 663.1: 57.063.8 ( 043.5)

О.П. Лівінська<sup>1</sup>, О.М. Василенко<sup>2</sup>, Т.В. Томила<sup>3</sup>, І.Л. Гармашева<sup>1</sup>,  
Н.К. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ,  
вул. Заболотного, 154, Київ, Д 03680 МСП Україна, e-mail: teichoic@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ

<sup>3</sup>Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАНУ

## ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ ЛАКТОБАЦИЛ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ФІЗИЧНИХ ТА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ

### Реферат

**Мета.** Метою роботи було встановити хімічну будову тейхоєвих кислот пробіотичних штамів лактобацил та дослідити їх вплив на фагоцитоз макрофагів мишеї та проліферацію макрофагів клітинної лінії J 774. **Методи.** Було використано фізичні (інфрачервона спектроскопія та спектроскопія ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), імунобіологічні та статистичні методи. **Результати.** Показано, що клітинні стінки *Lactobacillus plantarum* 11/16 і *Lactobacillus plantarum* 195D містять гліцепротейхоєві кислоти із нехарактерно великою кількістю глікозильних залишків. Тейхоєві кислоти штаму *L. plantarum* 11/16 містили 9 різних піраноз та фураноз в альфа-конфігурації, *L. plantarum* 195D – 4 гексозопіранози. Тейхоєві кислоти штаму *L. plantarum* 195D та 11/16 підвищували показник фагоцитозу на 15,00±5,72% та 13,75±4,65%, відповідно. Обидва препарати тейхоєвих кислот у дозах 32 та 64 мкг/мл стимулювали проліферацію макрофагів мишеї клітинної лінії на 35–53%. Не спостерігалось впливу тейхоєвих кислот лактобацил на фагоцитарне число та показники функціональної активності макрофагів, отримані за допомогою індукованого та не індукованого НСТ-тесту.

**Ключові слова:** тейхоєві кислоти, ЯМР спектроскопія, інфрачервона спектроскопія, фагоцитоз, пробіотики.



УДК 579.234.864: 663.1: 57.063.8 ( 043.5)

**Е.П. Ливинская<sup>1</sup>, А.Н. Василенко<sup>2</sup>, Т.В. Томила<sup>3</sup>, И.Л. Гармашева<sup>1</sup>,  
Н.К. Коваленко<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ,  
ул. Заболотного, 154, Киев, Д 03680 МСП Украина,  
e-mail: teichoic@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии и нефтехимии НАНУ

<sup>3</sup> Институт проблем материаловедения им. И.Н. Францевича НАНУ

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕЙХОЕВЫХ КИСЛОТ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ С ПРИМЕНЕНИЕМ ФИЗИЧЕСКИХ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

### **Реферат**

**Цель.** Целью работы было установить химический состав тейхоевых кислот пробиотических штаммов лактобацилл и исследовать их влияние на фагоцитоз макрофагов мышей и пролиферацию макрофагов клеточной линии J 774. **Методы.** Было использовано физические (инфракрасная спектроскопия и спектроскопия ЯМР <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C), иммунобиологические и статистические методы. **Результаты.** Показано, что клеточные стенки *Lactobacillus plantarum* 11/16 и *Lactobacillus plantarum* 195D содержат глицепротеихоеви кислоты с нехарактерно большим количеством гликозильных остатков. Тейхоевые кислоты штамма *L. plantarum* 11/16 содержали 9 различных пираноз и фураноз в альфа-конфигурации, *L. plantarum* 195D – 4 гексозопиранозы. Тейхоевые кислоты штамма *L. plantarum* 195D и 11/16 повышали показатель фагоцитоза на  $15,00 \pm 5,72\%$  и  $13,75 \pm 4,65\%$ , соответственно. Оба препарата тейхоевых кислот в дозах 32 и 64 мкг/мл стимулировали пролиферацию макрофагов мышей клеточной линии на 35–53%. Не наблюдалось влияния тейхоевых кислот лактобацилл на фагоцитарное число и показатели функциональной активности макрофагов, полученные с помощью индуцированного и не индуцированного НСТ-теста.

**Ключевые слова:** тейхоевые кислоты, ЯМР спектроскопия, инфракрасная спектроскопия, фагоцитоз, пробиотики.

### **REFERENCES**

1. Васильев А.В., Гриненко Е.В., Щукин А.О. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений // Учебное пособие, СПбГЛТА. – 2007. – 54 с.
2. Єлинська Н. О., Кур'ята Н.В., Філіпова Т.О., Іваниця В.О. Вплив лактобацилл на функціональну активність макрофагів на реакцію гіперчутливості сповільненого типу у мишей // Мікробіол. журн. – 2003. – Т. 65, № 4. – С. 23–28.
3. Коваленко Н.К., Тиньянова Н.З., Качалай Д.П., Любенко П.Х., Соболева Л.П. Использование молочнокислых бактерий для повышения биологической ценности свекольного сока. // Микробиол. Журн, – 1990. – Т. 52, № 6 – С. 53–59.
4. Шарон Н., Лис Х. Углеводы в клеточном распознавании // В мире науки. – 1993. – № 2–3. – С. 104–112.



5. Ambrosini V., Gonzalez S., Perdigon G., Holgado A. Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species // Chem. Pharm. Bull. – 1996. – Vol. 44, № 12. – P. 2263–2267.
6. Bychowska A., Theilacker C., Czerwicka M., Marszewska K., Huebner J., Holst O., Stepnowski P., Kaczyński Z. Chemical structure of wall teichoic acid isolated from *Enterococcus faecium* strain U0317 // Carbohydr. Res. – 2011. – Vol. 346, № 17. – P. 2816–2819.
7. Kleerebezem M., Vaughan E.E. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity // Annu Rev Microbiol. – 2009. – № 63. – P. 269–290.
8. Kuriyama T., Machida K., Suzuki K. Importance of correlations between phagocytic activity and superoxide production of neutrophils under conditions of voluntary exercise and stress // J Clin Lab Anal. – 1996. – № 10. – P. 458–464.
9. Livinska O.P., Harmasheva I.L., Vasyl'iev V.M., Kovalenko N.K. Methodical approaches to isolation of teichoic acids from native cells of lactic acid bacteria probiotic strains // Mikrobiol. Z. – 2012. – Vol. 74, № 2 – P. 35–41.
10. Marco M.L., Pavan S., Kleerebezem M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. // Curr. Opin. Biotechnol. – 2006. – Vol. 17, № 2. – P. 204–210.
11. Mukai T. Y., Onose Y., Toba T., Itoh T. Presence of glycerol teichoic acid in the cell wall of *Lactobacillus* // Letters in Appl. Microbiol. – 1992. – № 15. – P. 29–31.
12. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology encyclopedia of analytical chemistry // John Wiley & Sons Ltd, Chichester – 2000. – P. 102–131.
13. Ofek I., Beachey E., Jefferson W., Campbell G. Cell membrane-binding properties of group A Streptococcal lipoteichoic acid // The Journ. of experimental medicine. – 1975. – № 141. – P. 990–1003.
14. Ohtomo T., Yoshida K., Clemente C. Relationship of capsular type to biochemical and immunological properties of teichoic acid preparations from unencapsulated strains of *Staphylococcus aureus* // Infection and Immunity. – 1976. – P. 1113–1118.
15. Tomita S., Irisawa T., Tanaka N., Nukada T., Satoh E., Uchimura T., Okada S. Comparison of components and synthesis genes of cell wall teichoic acid among *Lactobacillus plantarum* strains // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2010. – Vol. 74, № 5. – P. 928–933.
16. Tomita S., Furihata K., Tanaka N., Satoh E., Nukada T., Okada S. Determination of strain-specific wall teichoic acid structures in *Lactobacillus plantarum* reveals diverse  $\alpha$ -D-glucosyl substitutions and high structural uniformity of the repeating units. // Microbiology. – 2012, – Vol. 158, № 11 – P. 2712–2723.
17. Tomita S., Urihata K., Ukada T., Satoh E., Chimura T. Structures of two monomeric units of teichoic acid prepared from the cell wall of *Lactobacillus plantarum* NRIC 1068 // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2009. – Vol. 73, № 3 – P. 530–535.

Стаття надійшла до редакції 25.10.2014 р.





Т.О. Руднєва<sup>1</sup>, Т.П. Шевченко<sup>2</sup>, В.О. Цвігун<sup>1,2</sup>, І.Г. Будзанівська<sup>2</sup>,  
В.П. Поліщук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут агроєкології і природокористування НААН,  
вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна,

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирівська, 64, Київ, 01033, Україна,  
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuana@bigmir.net

## ФІЛОГЕНЕТИЧНА СПОРІДНЕНІСТЬ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ МОЗАЇКИ КАВУНА 2

**Мета.** Встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМК 2 з відомими штамами та ізолятами ВМК 2 за нуклеотидною послідовністю гену капсидного білка. **Методи.** Філогенетичну спорідненість українських ізолятів ВМК 2 WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з відомими штамами і ізолятами ВМК 2 встановлювали шляхом порівняння ділянки нуклеотидного сиквенсу, що відповідає гену капсидного білка вірусу. Аналіз нуклеотидного сиквенсу проводили за допомогою програми MEGA 5. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей використовували метод CLUSTAL W. Побудову філогенетичних дерев проводили за допомогою програми MEGA 5, використовуючи метод Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій). **Результати.** Філогенетичний аналіз на основі вирівнювання в CLUSTAL W показав, що українські ізоляти подібні між собою на 99,1%. Відсоток гомології між українськими ізолятами та штамами і ізолятами з Генбанку становив від 90,7 до 99%. Найбільший відсоток гомології за геном капсидного білка українські ізоляти мали, з європейськими ізолятами з Іспанії, Італії та Франції, а також зі штамами і ізолятами з Близького Сходу, що можливо, пояснюється джерелом їх походження. **Висновки.** Отже, коло найвірогідніших країн, звідки можуть походити або, навпаки, куди були завезені українські ізоляти досить широке і включає Іспанію, Італію, Францію, а також Іран, Туреччину, Ізраїль та Саудівську Аравію. Така ситуація може бути пояснена експортно-імпортними відносинами України з країнами Середземномор'я та Близького Сходу і активним обміном сільськогосподарською продукцією.

**Ключові слова:** вірус мозаїки кавуна 2, ізоляти, сиквенування, філогенетична спорідненість.

Вірус мозаїки кавуна 2, ВМК 2 (Watermelon mosaic virus 2, WMV-2) належить до роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*. Вірус простий з ротаційно-трансляційним типом симетрії розміром 730–765x11нм [14]. Віріон містить одну молекулу лінійної одноланцюгової +РНК розміром 10035 нт, до 5' – кінця якої ковалентно приєднаний Vpg білок, а до 3' – послідовність polyA. Геном





представників родини *Potyviridae* містить одну відкриту рамку зчитування (ORF). У результаті зчитування утворюється один великий поліпротеїн, який потім нарізається вірусними протеазами на неструктурні і структурні білки. Ділянка геному, що кодує капсидний білок, знаходиться біля 3' – кінця геномної РНК, безпосередньо перед ділянкою, що не транлюється, приблизно в 250 нт і послідовністю polyA [10].

У експериментальних умовах вірус мозаїки кавуна 2 уражує більш ніж 170 видів рослин з 26 різних родин. Однак, основними рослинами –хазяями для ВМК 2 є рослини родини гарбузових (*Cucurbitaceae*). Вірус уражує представників родини гарбузових як відкритого, так і закритого ґрунту, індукуючи різні симптоми залежно від ізоляту вірусу та сорту рослин. На листках рослин вірус мозаїки кавуна 2 викликає симптоми мозаїки, пухирчасті здуття, появу смуг вздовж жилок та різноманітні деформації аж до нитковидності листової пластинки. На вірусінфікованих плодах рослин спостерігається яскраво виражена деколоризація і слабка деформація.

Окрім представників родини гарбузових, у природних умовах вірус уражує горох, моркву та рослини з родини орхідних. ВМК 2 інфікує також багато видів бур'янів які, однак, у природних умовах не проявляють симптомів вірусної інфекції. Вірус передається неперсистентно щонайменше 35 видами попелиць з 19 родів [8]. Також вірус мозаїки кавуна 2 передається з соком рослин при механічному контакті.

На території України ВМК 2 зустрічається лише на рослинах відкритого ґрунту, головним чином на кабачках, гарбузах, цукіні, динях і огірках. Окрім моноінфекції, вірус мозаїки кавуна 2 часто циркулює у вигляді змішаної інфекції, зазвичай представленої сумішшю вірусів огіркової мозаїки (ВОМ), вірусу жовтої мозаїки цукіні (ВЖМЦ) та вірусу пожовтіння огірка, що передається попелицями (ВПО) [4]. За результатами наших попередніх досліджень вірус мозаїки кавуна 2 циркулює у агроценозах України зі змінною періодичністю [3]. При активації розвитку вірусної інфекції кількість хворих рослин та відсоток їх ураження різко збільшується, що в свою чергу призводить до отримання низькоякісної продукції та значних втрат врожаю. Оскільки вірус мозаїки кавуна 2 – патоген широко розповсюджений у світі, важливо проаналізувати спорідненість українських ізолятів з уже відомими ізолятами і штамми вірусу, а також з'ясувати можливі шляхи походження українських ізолятів.

Метою роботи було встановлення філогенетичної спорідненості українських ізолятів ВМК 2, виділених із рослин кабачків, з відомими штамми та ізолятами ВМК 2, шляхом порівняння нуклеотидної послідовності гену капсидного білка віріона. Оскільки ген, що кодує капсидний білок, найбільш часто використовують для вивчення генетичної різноманітності потівірусів [9] то аналізували ступінь дивергенції за нуклеотидною послідовністю саме цього гену.



## Матеріали і методи

Зразки відбирали з рослин відкритого ґрунту шляхом візуального обстеження їх на наявність вірусних симптомів. Для досліджень використовували листки середнього або верхнього ярусу та плоди рослин [2]. Таким чином, з 2005 по 2013 роки, нами було обстежено агроценози наступних регіонів: Автономної республіки Крим (АРК), Вінницької, Дніпропетровської, Донецької, Житомирської, Запорізької, Київської, Кіровоградської, Миколаївської, Одеської, Полтавської, Сумської, Харківської, Херсонської, Черкаської та Чернігівської областей.

Зразки на наявність вірусних антигенів аналізували імуноферментним аналізом (ІФА) у модифікаціях «сендвіч» та «непрямий». Аналіз проводили у полістиролових планшетах «Labsystem». Результати реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм [1,5].

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

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

Для виділення тотальної РНК використовували рослини кабачків з агроценозів Автономної Республіки Крим і Полтавської області, які в ІФА позитивно реагували з тест – системою до ВМК 2.

Виділення тотальної РНК зі зразків здійснювали за допомогою RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Великобританія). Аналіз проводили згідно рекомендацій виробника [9]. Виділення тотальної РНК контролювали за допомогою електрофорезу нуклеїнових кислот у 1,5% агарозному гелі.

Для проведення зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) було використано специфічні праймери до ділянки РНК, яка кодує капсидний білок французького штаму ВМК 2 WMV-2-Fr [15]:

- forward праймер – 5'GAATCAGTGTCTCTGCAATCAGG-3';
- reverse праймер – 5'ATTCACGTCCCTTGCAAGTGTG-3'

Дані праймери комплементарні ділянкам нуклеотидів 8926–8948 і 9727–9747 геному і ампліфікують фрагмент розміром 825 п.о., який відповідає гену капсидного білка вірусу [15].

Візуалізацію результатів ПЛР здійснювали за допомогою горизонтального електрофорезу у 1,5% агарозному гелі, використовуючи стандартний набір маркерів Gene Ruller 100 bp RNA Ladder plus (Fermentas, США). [6]. Продукти ампліфікації (кДНК) виділяли з гелю і очищали за допомогою Gel Using Mini Elute Columns (Qiagen, Великобританія).



Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на аналізаторі Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 (Applied Biosystems, USA).

Філогенетичну спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2 WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з відомими штамми і ізолятами ВМК 2 встановлювали шляхом порівняння ділянки нуклеотидного сиквенсу, що відповідає гену капсидного білка вірусу. Послідовності штамів та ізолятів ВМК 2 було взято з Генбанку. Нами було проаналізовано 32 ізоляти з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (табл. 1)

Аналіз нуклеотидного сиквенсу проводили за допомогою програми MEGA 5 [13]. Для вирівнювання нуклеотидних послідовностей використовували метод CLUSTAL W. Побудову філогенетичних дерев ізолятів проводили за допомогою програми MEGA 5, використовуючи метод Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei [13]. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій) [7].

### Результати та їх обговорення

На території України вірус мозаїки кавуна 2 уражує рослини родини *Cucurbitaceae* виключно у агроценозах відкритого ґрунту [12]. Впродовж дев'ятирічного моніторингу агроценозів України на предмет ВМК 2 було показано, що вірус поширений на культурах гарбузів, кабачків, цукіні, динь та огірків переважно у вигляді змішаної інфекції у поєднанні з вірусом жовтої мозаїки цукіні, вірусом огіркової мозаїки чи вірусом пожовтіння огірка, що передається попелицями [3]. Моноінфекція ВМК 2 на рослинах траплялася значно рідше. Зазвичай, на рослинах уражених ВМК 2, симптоми проявлялися у вигляді темно-зеленої прижилкової мозаїки листкової пластинки або ж темно-зеленої мозаїки з пухирчастим здуттям (рис. 1).



а

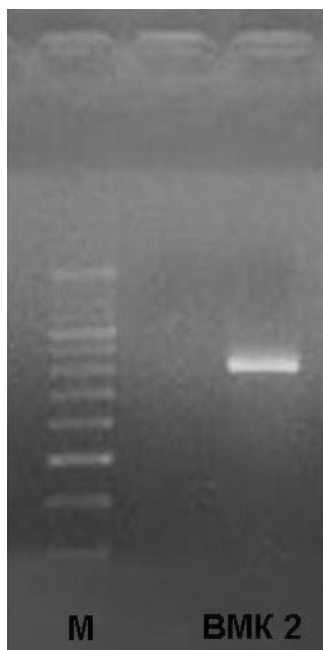


б

Рис. 1 а, б. Темно-зелена прижилкова мозаїка листкової пластинки на рослинах кабачків, індукована вірусом мозаїки кавуна 2.

Fig. 1 а, б. Dark green mosaics along the veins of marrow leaves induced by *Watermelon mosaic virus 2*.

За результатами імуноферментного аналізу вірус мозаїки кавуна 2 було детектовано у агроценозах Автономної Республіки Крим, Вінницької, Запорізької, Київської, Кіровоградської, Полтавської та Черкаської областей на рослинах кабачків, гарбузів, огірків та динь.



**Рис. 2. Електрофореграма отриманих продуктів кДНК українських ізолятів ВМК 2.**

М – маркер молекулярних мас Fermentas, 100 п.о.;  
ВМК 2 – кДНК капсидного білка вірусу 825 п.о.

**Fig. 2. Visualization of electrophoretic separation of amplified cDNAs of Ukrainian WMV-2 isolates.**

М – markers Fermentas, 100 bp; ВМК 2 (WMV-2) – cDNA of CP gene of WMV-2 (825 bp)

Для виділення тотальної РНК використовували рослини кабачків з агроценозів АРК і Полтавської області. Після візуалізації тотальної РНК проводили зворотнотранскрипційну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ–ПЛР).

У результаті проведення ЗТ–ПЛР було отримано продукти ампліфікації розміром 825 п.о., що відповідає за розміром ділянці геному, яка кодує капсидний білок вірусу (рис. 2).

Після сиквенування кДНК українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2 проводили порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей капсидного білка українських ізолятів WMV 2–2g–Ukr і WMV 2–2k–Ukr між собою та з такими ж відомих штамів і ізолятів ВМК 2. Послідовності штамів та ізолятів ВМК 2 було взято з Генбанку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Нами було проаналізовано 32 ізоляти з Генбанку (табл. 1).

До першого, найбільш багаточисельного кластеру 1К, увійшло три субкластери. Перший субкластер об'єднує 3 штами і 14 ізолятів ВМК 2. Як видно з філограми, українські ізоляти WMV 2– 2g– Ukr і WMV 2– 2k– Ukr розмістились у першому субкластері. Філогенетичний аналіз на основі вирівнювання в CLUSTAL W показав, що українські ізоляти подібні між собою на 99,1%, що свідчить про низький рівень варіабельності геному українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2.

Найбільший відсоток гомології 98–99,6% українські ізоляти мали з європейськими та близькосхідними ізолятами. Серед згаданих вище – два французьких ізоляти FMFOO – LL2 і CO5–337, італійський ІТАОО–G, іспанський MAL99.4, турецькі ізоляти TURK91 і W2 та іранські ізоляти Gonbad 68 і KER.KE.1. Сюди ж увійшов і французький штам WMV–Fr.

Необхідно відмітити, що український ізолят з АРК, – WMV 2–2k–Ukr виявився більш близькоспорідненим з європейськими ізолятами ніж з українським ізолятом з Полтавської обл. WMV 2–2g–Ukr. Відсоток гомології кримського

ізоляту відносно європейських складав від 99,3 до 99,6% і був найбільшим з французьким ізолятом FMFOO – LL2, – 99,6%.

Таблиця 1

Штами і ізоляти ВМК 2 з Генбанку, які використовували у філогенетичному аналізі

Table 1

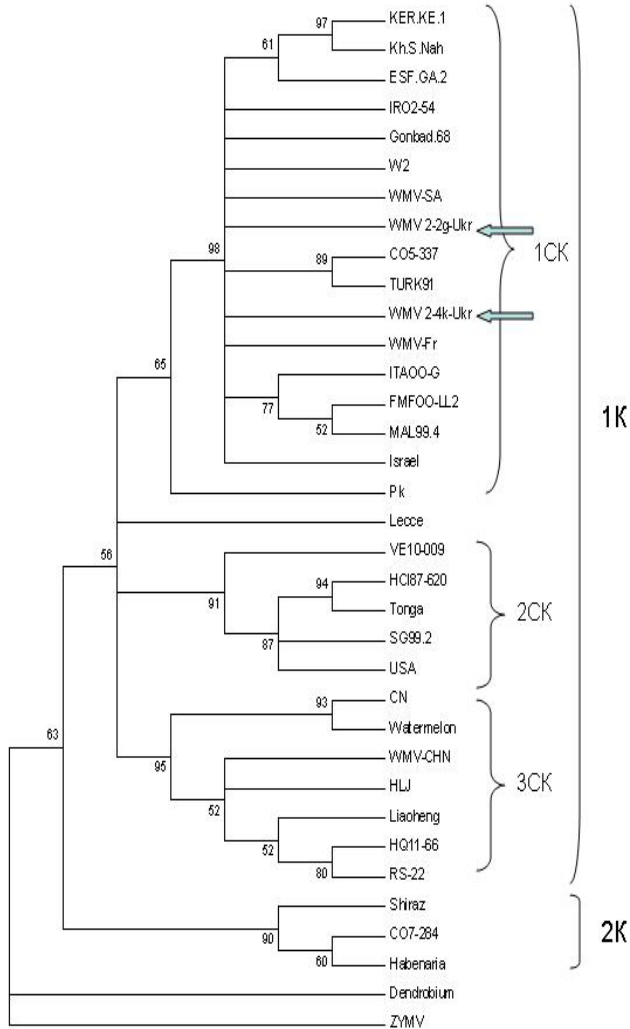
## Strains and isolates of WMV-2 used for phylogenetic analysis

Назва штаму/ ізоляту	Регістраційний номер послідовності	Джерело виділення	Країна
штам WMV-Fr	AY437609		Франція
штам Israel	AF322376	<i>Cucumis melo</i>	Ізраїль
штам Dendrobium	HQ384216	<i>Dendrobium anosmum</i> (orchid)	США
штам РК	AB218280	<i>Cucumis melo</i>	Пакистан
штам WMV-CHN	DQ399708	<i>Citrullus lanatus</i>	Китай
штам Tonga	L22907	<i>Cucumis melo</i>	Тонга
штам Watermelon	AB369278	<i>Cucumis melo</i>	Південна Корея
штам Habenaria	AB001994	<i>Habenaria radiata</i>	Японія
ізолят HLJ	AY464948	Snake gourd	Китай
ізолят Liaocheng	EF122550	pumpkin	Китай
ізолят Shiraz	CQ421161	Summer squash	Іран
ізолят KER.KE.1	EU667644	<i>Cucumis melo</i>	Іран
ізолят Kh.S.Nah	JN166711	<i>Cucumis melo</i>	Іран
ізолят Gonbad 68	GQ421157	<i>Cucurbita pepo</i>	Іран
ізолят ESF.GA.2	EU667634	<i>Cucurbita maxima</i>	Іран
ізолят IRO2-54	EU660584		Іран
ізолят MAL99.4	AJ579523	<i>Cucumis melo</i>	Іспанія
ізолят SG99.2	AJ579518	<i>Cucumis melo</i>	Іспанія
ізолят WMV-SA	KC447295	<i>Citrullus lanatus</i>	Саудівська Аравія
ізолят USA	D13913		США
ізолят RS-22	JX028595	<i>Cucurbita pepo</i> , var.texana	США
ізолят HQ11-16	JX028594	<i>Cucurbita pepo</i> , var.ozarkana	США
ізолят FMFOO-LL2	EU660578		Франція
ізолят CO5-337	EU660589		Франція
ізолят CO7-284	JF273468	zucchini	Франція
ізолят WMV-CN	FJ628395	<i>Cucurbita pepo</i>	Польща
ізолят TURK91	EU660579		Туреччина
ізолят W2	KF021298	<i>Cucumis sativus</i>	Туреччина
ізолят VE10-099	KC292915	<i>Cucumis anguria</i>	Венесуела
ізолят Lecce	FJ823122	<i>Citrullus lanatus</i>	Італія
ізолят ITA00-G	EU660590		Італія
ізолят CHI87-620	EO660580		Чилі





Побудова комплексного (консенсусного) філогенетичного дерева дозволила згрупувати досліджувані штами і ізоляти ВМК 2 у два окремі кластери (рис. 3).



**Рис. 3. Комплексне (консенсусне) філогенетичне дерево побудоване за результатами аналізу нуклеотидних послідовностей гену капсидного білка штамів та ізолятів ВМК 2 методом Maximum Likelihood на основі моделі Tamura-Nei, 1000 бутстреп реплікацій.**

Числа показують відсоток бутстрепа. Величини бутстрепа більші ніж 50% показано у вузлах дерева, менші 50% – конденсовано. СК– субкластер, К – кластер. В якості кореня філограми використано ізолят Nt-2 (JF7924410) вірусу жовтої мозаїки цукіні (*Zucchini yellow mosaic virus*, ZYMV).

**Fig. 3. Complex (consensus) phylogenetic tree based on the analysis of nucleotide sequences of CP gene of WMV-2 strains and isolates using Maximum Likelihood (ML) method based on Tamura-Nei model (1000 bootstrap replications).**

The numbers indicate the percentage of bootstrap. Bootstrap values exceeding 50% are shown on the tree nodes, smaller bootstrap values are condensed. CK – subcluster, K – cluster. The tree root is represented by Nt-2 isolate (JF7924410) of ZYMV.

Дещо менший відсоток гомології з українськими ізолятами, а саме 97%, мали ізоляти з Ірану (**Kh.S.Nah, IRO2-54**), **Саудівської Аравії (WMV-SA)**, а також ізраїльський штам Israel. Найменший відсоток гомології у даному кластері відносно українських ізолятів був з пакистанським штамом PK – 96%.

До другого субкластеру увійшли ізоляти з Південної та Північної Америки, а саме ізоляти з Чилі (CHI87– 620), Венесуели (VE10– 099), США (USA), а також штам з Тонга (Tonga), один ізолят з Іспанії (SG99.2) та один італійський ізолят Лессе. Відсоток гомології з українськими ізолятами складав 93–93,7% окрім ізолята Лессе, у якого гомологія з українськими ізолятами становила 95%.

Стосовно третього субкластеру, то в ньому розмістилися штами і ізоляти з США (RS – 22, HQ11–16), Китаю (Liaocheng, HLJ, WMV–CHN), Південної Кореї (Watermelon) та Польщі (CN). Відсоток гомології з українськими ізолятами був у межах 93–94%.

Другий окремий кластер 2К склали японський штам (*Habenaria*), виділений з рослини *Habenaria radiate* родини орхідних, французький ізолят (CO7– 284) та іранський ізолят (Shiraz) з відсотком гомології відносно українських ізолятів 91 – 93%. Згрупованість даних ізолятів в один кластер зі штамом *Habenaria* свідчить про високу ймовірність походження французького і іранського вище зазначених ізолятів від даного штаму.

На відміну від представників другого кластеру, штами і ізоляти першого кластеру було ізольовано з рослин родини гарбузових, що і пояснює їх згрупованість на філогенетичному дереві у окремий кластер.

Найнижчий відсоток гомології 90,7% з українськими ізолятами був у штаму *Dendrobium* з США, ізольованого з рослини *Dendrobium anosmum* родини орхідних. Як видно з філограми, даний штам утворює окрему філогенетичну гілку.

Отже, виходячи з отриманих результатів можна сказати, що коло найвірогідніших країн, звідки можуть походити або, навпаки, куди були завезені українські ізоляти досить широке і включає Іспанію, Італію, Францію, а також Іран, Туреччину, Ізраїль та Саудівську Аравію. Така ситуація може бути пояснена експортно-імпортними відносинами України з країнами Середземномор'я та Близького сходу і активним обміном сільськогосподарською продукцією.

Таким чином, результати нуклеотидного сиквенсу гену капсидного білка українських ізолятів вказують на високу подібність їх між собою і з уже відомими штамми і ізолятами ВМК 2. Відсоток гомології між українськими ізолятами та штамми і ізолятами з Генбанку становив від 90,7 до 99%. Найбільший відсоток гомології за геном капсидного білка українські ізоляти мали, переважно, з європейськими ізолятами з Іспанії, Італії та Франції, а також зі штамми і ізолятами з Близького Сходу, що, можливо, пояснюється джерелом їх походження. Відтак, вірус мозаїки кавуна 2 міг потрапити до України з країн Середземномор'я чи Близького Сходу або ж, навпаки, міг бути занесений туди з України. Таким чином, схожість чи навпаки, різниця у нуклеотидній послідовності ізолятів, пов'язані саме з їх географічним розташуванням, що є одним із детермінуючих факторів штамоутворення.





Т.А. Руднева<sup>1</sup>, Т.П. Шевченко<sup>2</sup>, В.А. Цвигун<sup>1,2</sup>, И.Г. Будзанивська<sup>2</sup>,  
В.П. Полищук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт агроэкологии и природопользования НААН,  
ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143, Украина,

<sup>2</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,  
ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина,  
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tatuana@bigmir.net

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РОДСТВО УКРАИНСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА МОЗАИКИ АРБУЗА 2

### Реферат

**Цель.** Определение филогенетического родства украинских изолятов ВМА 2 с известными штаммами и изолятами ВМА 2 по нуклеотидной последовательности гена капсидного белка. **Методы.** Филогенетическое родство украинских изолятов ВМА 2 WMV 2–2g–Ukr и WMV 2–2k–Ukr между собой и с уже известными штаммами и изолятами ВМА 2 определяли путем сравнения участка нуклеотидного сиквенса, соответствующего гену капсидного белка вируса. Анализ нуклеотидного сиквенса осуществляли с помощью программы MEGA 5. Нуклеотидные последовательности выравнивали методом CLUSTAL W. Для построения филогенетических деревьев использовали программу MEGA 5, метод Maximum Likelihood модель Tamura-Nei. Достоверность полученных деревьев проверяли бутстрэп анализом (1000 репликаций). **Результаты.** С помощью филогенетического анализа, на основании выравнивания в CLUSTAL W, было показано идентичность украинских изолятов между собой на 99,1%. Процент гомологии украинских изолятов, а также штаммов и изолятов с Генбанка составлял от 90,7 до 99%. Самый высокий процент гомологии по гену капсидного белка украинских изолятов с европейскими: Испании, Италии и Франции, а также штаммами и изолятами с Ближнего Востока, что, вероятно, объясняется путем их происхождения. **Выводы.** Итак, диапазон наиболее возможных стран откуда могут происходить или, наоборот, куда были завезены украинские изоляты является достаточно широким и объединяет Испанию, Италию, Францию, а также Иран, Турцию, Израиль и Саудовскую Аравию. Такая ситуация обусловлена активными сельскохозяйственными экспортно-импортными отношениями Украины со странами Средиземноморья и Ближнего Востока.

**Ключевые слова:** вирус мозаики арбуза 2, изоляты, сиквенирование, филогенетическое родство.



**T.O. Rudnieva<sup>1</sup>, T.P. Shevchenko<sup>2</sup>, V.O. Tsigun<sup>1,2</sup>, I.G. Budzanivska<sup>2</sup>,  
V.P. Polischuk<sup>2</sup>**

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

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

**PHYLOGENETIC HOMOLOGY OF UKRAINIAN ISOLATES  
OF WATERMELON MOSAIC VIRUS 2**

**Summary**

**Aim.** This work is focused on establishing phylogenetic homology of Ukrainian isolates of WMV-2 with known viral strains and isolates by comparing nucleotide sequence of the CP gene. **Methods.** Phylogenetic relationships of Ukrainian isolates of Watermelon mosaic virus 2, WMV 2-2g-Ukr and WMV 2-2k-Ukr (both among themselves and with other known virus strains and isolates) were estimated by comparing sequenced CP gene region. The analysis of the nucleotide sequences of sequenced amplicons (cDNA of CP gene of WMV-2) was done using MEGA 5 software. To align the nucleotide sequences, CLUSTAL W approach was used. Phylogenetic trees reflecting evolutionary relationships of studied isolates with published ones were constructed using MEGA 5 software and **Maximum Likelihood (ML) method based on Tamura-Nei model**. **Bootstrap analysis** (1000 replications) was employed for validation of the trees. **Results.** Phylogenetic analysis based on alignment using CLUSTAL W approach showed that the level of homology between these Ukrainian isolates reached 99,1%, indicating low degree of genome variability of the virus. The percentage of homology between Ukrainian WMV-2 isolates and strains/isolates available in the Genbank was 90,7-99%. Ukrainian WMV-2 isolates showed the highest degree of homology mostly with European isolates of this virus found in Spain, Italy and France, as well as with those strains/isolates reported from the Middle East (that may be explained by their origin). **Conclusions.** Basing on the obtained results we can say that the list of candidate countries from where the Ukrainian WMV-2 isolates may have originated (or where they could be brought in) is rather long and includes Spain, Italy, France as well as Iran, Turkey, Israel and Saudi Arabia. This situation may be explained by export-import trade between Ukraine and Mediterranean/Middle East countries involving the active exchange of agricultural production.

*Key words:* Watermelon mosaic virus 2, isolates, **sequencing, phylogenetic relationships.**

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гнущова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений / Раиса Васильевна Гнущова. – М.: Наука, 1993. – 301 с.
2. Омелюта В.П. Облік шкідників і хвороб сільськогосподарських культур / В.П. Омелюта, І.В. Григорович, В.С. Чабан. – К.: Урожай, 1986. – 296 с.
3. Руднієва Т.О. Моніторинг вірусу мозаїки кавуна 2 у агроценозах Київської та Полтавської областей / Т.О. Руднієва, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун, В.П. Поліщук // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 55–62.



4. Руднева Т.О. Поширення вірусних захворювань рослин родини *Cucurbitaceae* на території України / Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, А.С. Бисов, В.П. Поліщук // *Агроєкологічний журнал*. – 2008. – № 2. – С. 62–66.
5. *Crowther J.R.* (Ed.) *ELISA. Theory and practice*, Humana Press, N.Y. – 1995. – p. 223.
6. *Dijkstra J.* *Practical Plant Virology: Protocols And Exercises* / J. Dijkstra, Cees P. de Jager. – Berlin; – Springer. Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. – 459 p.
7. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
8. *Lecoq Herve* **Viruses and Virus Diseases of the Vegetables in the Mediterranean Basin** / Herve Lecoq and Cecile Desbiez . – Academic Press, – 2012. – 592 p.
9. *Molecular* criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae / M.J. Adams, J.F. Antoniw, C.M. Fauquet // *Archives of Virology*. – 2005. – N 150, –P. 459–479.
10. *Nucleotide* sequence, serology and symptomatology suggest that vanilla necrosis potyvirus is a strain of watermelon mosaic virus 2 / Y.Y. Wang, D.L. Beck, R.C Gardner [et al.] // *Archives of Virology*. – 1993. – N 129. – P. 93–103.
11. *QIAGEN*. One step RT-PCR Kit Handbook. – Quiagen, 2002. –39p.
12. *Rudneva T.O.* Virus diseases of Cucurbitaceae plants on the territory of Ukraine / T.O. Rudneva., T.P. Shevchenko, I.G. Budzanivska, O.V. Shevchenko, V.P. Polischuk // *Plant science*. – 2006. – № 6 ,– P. 508–510.
13. *Tamura K.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution* – 1993 – Vol. 10 – P. 512–526.
14. *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* [A. King, M. Adams, E. Lefkowitz et al.]. – London: Academic Press, 2012. – 1327 p.
15. *Zohren Moradi* Diagnosis and molecular variability of Watermelon mosaic virus isolates from North, East, North-East, and North-West regions of Iran // *Asian Journal of Plant Pathology*. – 2011. – V. 5, – N 3, –P. 115–125.

Стаття надійшла до редакції 20.10.2014 р.



UDC: 579.846.2:22

**I.V. Kushkevych<sup>1</sup>, H.L. Antonyak<sup>2</sup>, R.V. Fafula<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Animal Biology of NAAS of Ukraine, V.Stus St 38, Lviv 79034, Ukraine

<sup>2</sup>Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevsky St. 4, 79005, Lviv, Ukraine

<sup>3</sup>Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Pekarska St 69, Lviv 79010, Ukraine

e-mail: ivan.kushkevych@gmail.com

## **ACTIVITY AND KINETIC PROPERTIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE OF THE SULFATE-REDUCING BACTERIA *DESULFOVIBRIO PIGER* VIB-7 AND *DESULFOMICROBIUM* SP. ROD-9**

*The aim of our work was to study superoxide dismutase activity of cell-free extracts of Desulfovibrio piger Vib-7 and Desulfomicrobium sp. Rod-9 isolated from the human large intestine and to carry out the analysis of the enzyme reaction kinetic properties. Methods. Microbiological, biochemical, biophysical methods, and methods of statistical processing of the results were used. Results. Specific activity of superoxide dismutase from the sulfate-reducing bacteria was studied. The influence of different temperature, pH and substrate concentration on the activity of studied enzymes was showed. The analysis of the kinetic properties of the superoxide dismutase in the bacterial strains, based on experimental data, was carried out. The initial (instantaneous) reaction rate ( $V_0$ ), maximum rate of the enzyme reaction ( $V_{max}$ ), and Michaelis constants ( $K_m$ ) of the superoxide dismutase reaction for both strains was calculated. Conclusion. The kinetic parameters of superoxide dismutase reaction in both bacterial strains were not statistically different. The obtained data on optimum of pH (7.5–9.5) on the activity of the enzyme were consistent to the environment conditions of the human large intestine. These conditions can provide the intensive growth of the bacterial strains, process of the dissimilatory sulfate reduction and, thus, the accumulation of hydrogen sulfide in the gut.*

*Key words: sulfate-reducing bacteria, superoxide dismutase activity, kinetic properties.*

Superoxide dismutase is considered to be an important enzyme in protection of aerobes against oxidant damage, and increased tolerance to oxidant stress is associated with induction of this enzyme. The superoxide dismutase eliminates  $O_2^-$  by dismutation to  $H_2O_2$  and  $O_2$ . The presence of superoxide dismutase activity in anaerobic bacteria has been demonstrated for the first time in *D. desulfuricans* and *Desulfotomaculum nigrificans* [4, 5]. The studied sulfate-reducing bacteria carry out dissimilatory sulfate reduction to hydrogen sulfide [13]. These bacteria are strictly anaerobic microorganisms and they are present in anoxic environments with high sulfate concentrations [12]. The aerobic conditions inhibit dissimilatory sulfate reduction in the most of the sulfate-reducing bacteria [2]. They can grow using sulfate

© Ivan V. Kushkevych, Halyna L. Antonyak, Roman V. Fafula, 2014



only in the absence of molecular oxygen. Such anaerobic conditions are available in the intestine of humans and animals [12].

In the previous researches it has been shown that studied *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 strains can accumulate hydrogen sulfide and acetate in the human intestine. These compounds are cytotoxic and carcinogenic to intestinal cells, they can cause inhibition of cytochrome oxidase, oxidation processes butyrate by colonocytes, destruction of epithelial cells, develop ulcers, inflammation with subsequent development of colon cancer [2, 12]. In view of the facts, it is interesting to study one of the antioxidant systems of the isolated anaerobic bacterial strains. The data about superoxide dismutase activity and the kinetic properties of the enzyme of sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 isolated from the human large intestine have never been well-characterized and has not been studied yet.

The aim of our work was to study superoxide dismutase activity of cell-free extracts of the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 isolated from the human large intestine and to carry out the analysis of the kinetic properties of the enzyme reaction.

### Materials and methods

The objects of the study were the strains of the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 isolated from the human large intestine [13, 14].

*Bacterial growth and cultivation.* The bacteria were grown in nutrition modified Kravtsov-Sorokin's liquid medium [13]. The sterile 10N solution of NaOH (0.9 ml/l) was used to provide the final pH 7.2 in the medium. The medium was heated in boiling water for 30 min in order to obtain an oxygen-free system, and cooled to +30 °C temperature. The bacteria were grown for 72 hours at +37°C under anaerobic conditions. The tubes were brim-filled with medium and closed to provide anaerobic conditions.

*Obtaining cell-free extracts.* The cells were collected at the beginning of the stationary phase, suspended at +4 °C in buffer containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and 10<sup>-5</sup>M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) to bind heavy metal ions. 10<sup>-5</sup>M PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), functioning at a pH higher 7.0, was added for inhibition of proteases. After that, a suspension of cells (50–100 mg/ml) was obtained. The cells were homogenized using the ultrasonic disintegrator at 22 kHz for 5 minutes at 0 °C to obtain the cell-free extracts. The extracts were centrifuged at +4 °C for 10 min at 15,000 × g; the pellet was then used as sedimentary fraction, and the supernatant obtained was termed the soluble fraction. This extract was subjected to further centrifugation at 180,000 × g for 1 h to totally eliminate the membrane fraction. A clear supernatant, containing the soluble fraction, was then used as the cell-free extract. Protein concentration in the cell-free extracts was determined by the Lowry method [15].

*Measuring superoxide dismutase activity.* The activity of superoxide dismutase is determined based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction in the





presence of NADH and phenazine methosulfate (PMS). The incubation mixture contained 1  $\mu$ l EDTA ( $10^{-5}$ M), 1 mg of gelatin (10% solution), 0.3 ml NBT (0.407 mM), 0.1 ml PMS (1.8  $\mu$ M), 0.1 ml of 1 mM NADH. The supernatant was added to the incubation mixture in a volume of 0.1 ml that causes the inhibition NBT reduction. The total volume of the incubation mixture to general 3 ml was adjusted by 0.15 M phosphate buffer (pH 7.8). The control samples contained the same components except the supernatant, there was added the same amount of buffer in the tube. The launch of the reaction occurs by adding 0.1 ml of NADH (1 mM) in the experimental and control samples. The incubation was carried out for 10 min in the darkness at room temperature. Optical density of experimental and control samples was determined on a spectrophotometer (Biospectrophotometer, Eppendorf, USA) at a wavelength of 540 nm [3].

*Kinetic analysis.* The study of the kinetic properties of the enzyme reaction was carried out in a standard incubation medium, modified by physical and chemical characteristics or the relevant components (the incubation time, substrate concentration, temperature and pH). The kinetic parameters characterizing the product accumulation (NADH-phenazine methosulfate nitroblue tetrazolium formazan) are initial (instantaneous) reaction rate ( $V_0$ ), maximum rate of the reaction ( $V_{\max}$ ), maximum amount of the reaction product ( $P_{\max}$ ) and characteristic reaction time (time half saturation,  $\tau$ ) was determined. The kinetic parameters characterizing superoxide dismutase reactions are Michaelis constant ( $K_m$ ) and maximum reaction rate of product formation were determined by Lineweaver-Burk plot [10]. The dependence of the rate of product formation on the substrate concentration was constructed in the coordinates  $\{1/V \text{ on } 1/S\}$ , where S is the concentration of the substrate, and V is the rate of product formation at a substrate concentration.

*Statistical analysis.* Kinetic and statistical calculations of the results were carried out using the MS Office software and OriginPro 8.0 computer programs. The research results were treated by the methods of variation statistics using Student *t*-test. The equation of the straight line that the best approximates the experimental data was calculated by the method of the least squares. The absolute value of the correlation coefficient *r* was from 0.90 to 0.99. The statistical significance of the parameters was tested by the Fisher's *F*-test. The accurate approximation was when  $P \leq 0.05$  [1].

## Results and Discussion

The activity of superoxide dismutase in the different fractions including cell-free extract, soluble, and sedimentary was studied (Table 1). Our results have demonstrated that the highest level of the enzyme activity was in cell-free extracts ( $1326.43 \pm 142.76$  and  $1120.72 \pm 88.56 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$  protein for *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively). Considerably less activity was measured in the soluble fraction compared to the cell-free extracts. The lowest superoxide dismutase activity was found in sedimentary fraction, it the values equal to  $125.27 \pm 15.13$  and  $99.55 \pm 8.92 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$  protein.



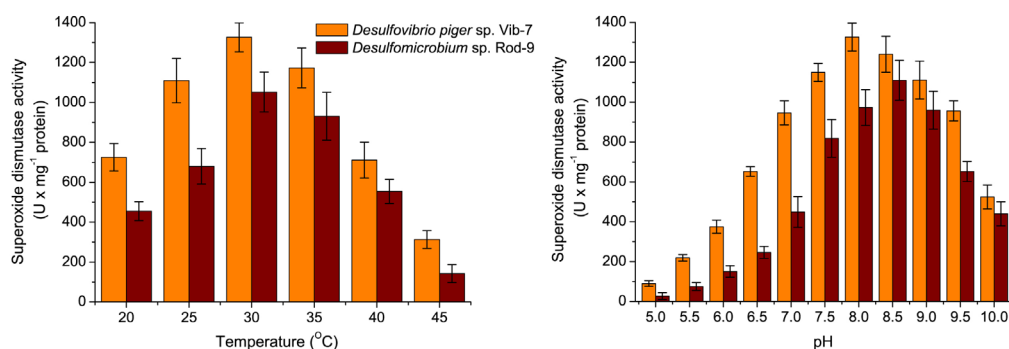
Table 1

**Superoxide dismutase activity in the different fractions prepared from *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 cells**

Fractions	Superoxide dismutase activity ( $U \times mg^{-1}$ protein)	
	<i>Desulfovibrio piger</i> Vib-7	<i>Desulfomicrobium</i> sp. Rod-9
Cell-free extract	$1326.43 \pm 142.76$	$1120.72 \pm 88.56$
Individual fractions:		
soluble	$889.76 \pm 77.12$	$741.62 \pm 67.69$
sedimentary	$125.27 \pm 15.13$	$99.55 \pm 8.92$

**Comment:** Enzyme activity is determined at ten-minute incubation.

From the literature data it is known that the activity of all enzymes depends on temperature and pH [4, 5]. That's why, the next our task was to determine the activity of the studied enzyme in the cell-free extracts under the influence of temperature and pH (Fig. 1). The maximum superoxide dismutase activity for both bacterial strains was determined at +30 °C temperature. An increase or decrease in the temperature of incubation led to a decrease of the enzyme activity in the cell-free bacterial extracts.



**Fig. 1. Effect of temperature and pH on superoxide dismutase activity in cell-free extracts of *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9.**

The intestinal sulfate-reducing bacteria can grow, dissimilating sulfate, in the human gut at pH 8.0...9.0. The influence of this factor on superoxide dismutase activity of intestinal sulfate-reducing bacteria has not been studied yet. The pH values were slightly expanded and the superoxide dismutase activity was determined over a wide pH range from 5 to 10. The enzyme activity was maximum under pH range from 7.5–9.5. The highest activity was measured in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 at pH 8.0 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 at pH 8.5.

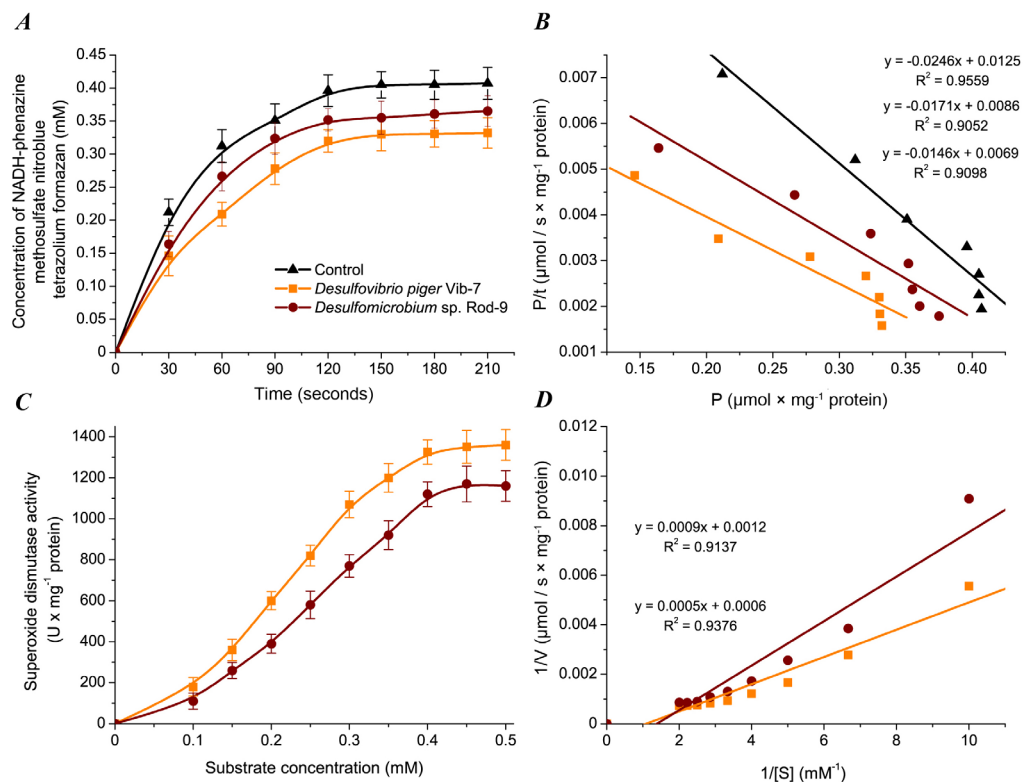
To study the characteristics and mechanism of superoxide dismutase reaction, the initial (instantaneous) reaction rate ( $V_0$ ), maximum rate of the reaction ( $V_{max}$ ),



maximum amount of reaction product ( $P_{\max}$ ) and reaction time ( $\tau$ ) were defined. The dynamic of the product formation in the cell-free extracts to study the kinetic superoxide dismutase reaction was investigated (Fig. 2).

Our experimental data showed that the kinetic curves of superoxide dismutase reaction have tendency to saturation (Fig. 2A). Analysis of the results allows to reach the conclusion that the kinetics of superoxide dismutase activity in cell-free extracts of the studied bacteria was consistent to the zero-order reaction in the range of 0–60 sec (the graph of the dependence of product on the incubation time was almost linear in this interval of time). Therefore the duration of the incubation of bacterial cells extracts was 60 sec in subsequent experiments.

The amount of product in the superoxide dismutase reaction from *D. piger* Vib-7 was higher compared to *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 in the entire range of time factor. The basic kinetic properties of superoxide dismutase reaction in the cell-free extracts of the sulfate-reducing bacteria were calculated by linearization of the data in {P/t; P} coordinates (Fig. 2B, Table 2).



**Fig. 2. Kinetic parameters of the superoxide dismutase activity in cell-free extracts**

A – dynamics of product accumulation ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ ); B – linearization of the curves of the product formation in {P/t; P} coordinates ( $n = 3$ ;  $R^2 > 0.9$ ;  $F < 0.02$ ); C – the effect of substrate concentration on superoxide dismutase activity ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ ); D – linearization of concentration curves, shown in fig. 2C, in the Lineweaver-Burk plot, where V is the rate of superoxide dismutase reaction and S is substrate concentration ( $n = 3$ ;  $R^2 > 0.95$ ;  $F < 0.005$ ).



The kinetic parameters of superoxide dismutase reaction in cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 were not statistically different. The values of initial (instantaneous) rate ( $V_0$ ) for superoxide dismutase reaction in both bacterial strains were calculated by the maximal amount of the product reaction ( $P_{max}$ ). As shown in Table 2,  $V_0$  for superoxide dismutase was higher in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 ( $0.0086 \pm 0.00073 \mu\text{mol/s} \times \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ) compared to *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 ( $0.0069 \pm 0.00055 \mu\text{mol/s} \times \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ). Based on these data, we suppose that the *D. piger* Vib-7 bacterial cells can be more resistant to molecular oxygen effect compared to *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 cells.

Table 2

**Kinetic parameters of the product formation in cell-free extracts of *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9**

Kinetic parameters	Sulfate-reducing bacteria	
	<i>Desulfovibrio piger</i> Vib-7	<i>Desulfomicrobium</i> sp. Rod-9
$V_0$ ( $\mu\text{mol/s} \times \text{mg}^{-1} \text{protein}$ )	$0.0086 \pm 0.00073$	$0.0069 \pm 0.00055$
$P_{max}$ ( $\mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \text{protein}$ )	$0.503 \pm 0.045$	$0.473 \pm 0.037$
$\tau$ (seconds)	$58.579 \pm 5.22$	$69.493 \pm 7.12$

**Comment:**  $V_0$  is initial (instantaneous) reaction rate;  $P_{max}$  is maximum amount (plateau) of the product of reaction;  $\tau$  is the reaction time (half saturation period). Statistical significance of the values  $M \pm m$ ,  $n = 3$ .

The kinetic analysis of superoxide dismutase reaction depending on the substrate concentration was carried out. According to the obtained results, the product formation increasing in the concentrations range from 0.1 until 0.5 mM provided a monotonic increase of studied enzyme activity and its output to the plateau (Fig. 2C). Curves of the dependence  $\{1/V; 1/[S]\}$  were different by tangent slope and intersect the vertical axis in one point (Fig. 2D). The basic kinetic parameters of superoxide dismutase reaction in cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 was identified by linearization of the data in the Lineweaver-Burk plot (Table 3).

Table 3

**Kinetic parameters of the product formation in the cell extracts depending on substrate concentration in the incubation medium**

Kinetic parameters	Sulfate-reducing bacteria	
	<i>Desulfovibrio piger</i> Vib-7	<i>Desulfomicrobium</i> sp. Rod-9
$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/s} \times \text{mg}^{-1} \text{protein}$ )	$1666.67 \pm 174.92$	$833.33 \pm 88.54^{**}$
$K_m$ (mM)	$0.833 \pm 0.071$	$0.750 \pm 0.068$

**Comment:**  $V_{max}$  is maximum rate of the enzyme reaction;  $K_m$  is Michaelis constant which was determined by substrate. Statistical significance of the values  $M \pm m$ ,  $n = 3$ ;  $^{**}P < 0.01$ , compared to the *Desulfovibrio piger* Vib-7 strain.



The  $K_m$  values are in millimolar concentration range which is consistent with similar constants from the literature data [8]. Calculation of the kinetic parameters of superoxide dismutase reaction indicates that the maximum rate ( $V_{max}$ ) of the product formation in the cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 was statistically different ( $P < 0.01$ ). However, the Michaelis constants ( $K_m$ ) of superoxide dismutase reaction in the cell-free extracts of both bacterial strains were close to each other:  $0.833 \pm 0.071$  and  $0.750 \pm 0.068$  mM for *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively. The  $K_m$  was slightly different in values while  $V_{max}$  was significantly different (in 2.0 times) for the both bacterial strains.

Thus, based on the obtained studies results and according to the kinetic parameters of the superoxide dismutase reaction determined for both bacterial strains, we concluded that the *D. piger* Vib-7 was more resistant to the action of molecular oxygen compared to *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. The activity of superoxide dismutase,  $V_0$  and  $V_{max}$  was significantly higher in the *D. piger* Vib-7 cells than *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. According to these data, *Desulfomicrobium* sp. Rod-9 strain can be more sensitive. Probably, this sensitivity makes impossible for survival of studied bacteria in environmental conditions where the effect of molecular oxygen is toxic. Therefore, the bacteria of *Desulfomicrobium* genus is less isolated from feces of humans and animals compared to the *Desulfovibrio* bacteria.

It is well known that sulfate-reducing bacteria are strict anaerobes, their growth is suppressed by low concentrations of  $O_2$  caused not only by generation of reactive oxygen species but also by its competition with  $SO_4^{2-}$  as an acceptor of electrons [9]. The results of our study are consistent to previous kinetic constants that characterize the enzymes activity of antioxidant systems of various microorganisms [8]. However, many sulfate reducers are aerotolerant. Moreover, in some *Desulfovibrio* (*D. vulgaris* and *D. desulfuricans*)  $O_2$  is reduced to water during respiration [7, 16]. The *Desulfovibrio* strains generally exhibit  $O_2$  reduction rates comparable to those of aerobes, but these rates often decrease by increasing the  $O_2$  concentration and slow down after repeated oxygen additions [4, 5, 6, 11].

In summary, the highest activity of superoxide dismutase in cell-free extract of the intestinal strains *D. piger* and *Desulfomicrobium* sp. was measured for the first time. The maximal enzyme activity for both bacterial strains was determined at +30 °C. The optimum pH 8.0 and pH 8.5 for activity of the studied enzyme was measured in cell-free extracts of *D. piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, respectively. The obtained data on optimal pH on activity of the enzyme is consistent to conditions of the human large intestine where range of pH is 8.0...9.0. Such conditions can provide the intensive growth of the bacterial strains, dissimilatory sulfate reduction and, respectively, accumulation of hydrogen sulfide in the gut. The superoxide dismutase activity,  $V_0$  and  $V_{max}$  was higher in the *D. piger* Vib-7 cells than *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. These studies might help in predicting the



development of diseases of the gastrointestinal tract, by providing further details on the etiology of bowel diseases which are very important for the clinical diagnosis of these disease types. Understanding the role of sulfate-reducing bacteria in colonic conditions would be enhanced by the ability to inhibit the number of the sulfate-reducing bacteria and/or reduce the production of sulfide.

**І.В. Кушкевич<sup>1</sup>, Г.Л. Антоняк<sup>2</sup>, Р.В. Фафула<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Інститут біології тварин НААН України, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна

<sup>2</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського 4, 79005 Львів, Україна

<sup>3</sup>Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького,  
вул. Пекарська 69, 79010 Львів, Україна

## АКТИВНІСТЬ І КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ *DESULFOVIBRIO PIGER* VIB-7 ТА *DESULFOMICROBIUM* SP. ROD-9

### Реферат

**Метою роботи** було дослідження активності супероксиддисмутази безклітинних екстрактів *Desulfovibrio piger* Vib-7 і *Desulfomicrobium* sp. Rod-9, виділених з товстого кишечника людини, і проведення аналізу кінетичних властивостей ензиматичної реакції. **Методи.** Використано мікробіологічні, біохімічні, біофізичні методи досліджень і методи статистичної обробки результатів. **Результати.** Досліджено питому активність супероксиддисмутази сульфатвідновлювальних бактерій. Показано вплив різної температури, рН та концентрації субстрату на активність досліджуваного ензиму. На основі експериментальних даних, проведено аналіз кінетичних властивостей супероксиддисмутази досліджуваних бактеріальних штамів. Розраховано початкову (миттєву) швидкість реакції ( $V_0$ ), максимальну швидкість ензиматичної реакції ( $V_{max}$ ), і константи Міхаеліса ( $K_m$ ) реакції супероксиддисмутази для обох штамів. **Висновок.** Кінетичні параметри реакції супероксиддисмутази обох штамів бактерій статистично не відрізнялися. Отримані дані про вплив оптимуму рН (7,5–9,5) на активність ферменту узгоджуються зі значенням рН у товстому кишечнику людини. Ці умови забезпечують інтенсивний ріст бактеріальних штамів, процес дисимільційного відновлення сульфату і, відповідно, накопичення гідроген сульфїду у кишечнику.

**Ключові слова:** сульфатвідновлювальні бактерії, активність супероксиддисмутази, кінетичні властивості.



**І.В. Кушкевич<sup>1</sup>, Г.Л. Антоняк<sup>2</sup>, Р.В. Фафула<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Институт биологии животных НААН Украины, ул. В. Стуса, 38, Львов, 79034, Украина

<sup>2</sup>Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского 4, 79005 Львов, Украина

<sup>3</sup>Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого,  
ул. Пекарская 69, 79010 Львов, Украина

**АКТИВНОСТЬ И КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ  
DESULFOVIBRIO PIGER VIB-7 И DESULFOMICROBIUM SP. ROD-9**

**Реферат**

**Целью работы** было исследовать активность супероксиддисмутазы бесклеточных экстрактов *Desulfovibrio piger* Vib-7 и *Desulfomicrobium sp. Rod-9*, выделенных из толстого кишечника человека и провести анализ кинетических свойств энзиматической реакции. **Методы.** Использованы микробиологические, биохимические, биофизические методы исследований и методы статистической обработки результатов. **Результаты.** Исследована удельная активность супероксиддисмутазы сульфатвосстанавливающих бактерий. Показано влияние разной температуры, рН и концентрации субстрата на активность исследуемого фермента. На основе экспериментальных данных проведен анализ кинетических свойств супероксиддисмутазы исследуемых бактериальных штаммов. Рассчитана начальная (мгновенная) скорость реакции ( $V_0$ ), максимальная скорость энзиматической реакции ( $V_{max}$ ) и константа Михаэлиса ( $K_M$ ) реакции супероксиддисмутазы для обоих штаммов. **Вывод.** Кинетические параметры реакции супероксиддисмутазы обоих штаммов бактерий статистически не отличались. Полученные данные о влиянии оптимума рН (7,5–9,5) на активность фермента согласуются со значением рН в толстом кишечнике человека. Такие условия обеспечивают интенсивный рост бактериальных штаммов, процесс диссимиляционного восстановления сульфата и, соответственно, накопление гидроген сульфиду в кишечнике.

*Ключевые слова:* сульфатвосстанавливающие бактерии, активность супероксиддисмутазы, кинетические свойства.

**References**

1. Bailey N.T.J. Statistical Methods in Biology. Cambridge University Press. – 1995. – 255 p.
2. Barton L.L., Hamilton W.A. Sulphate-Reducing Bacteria. Environmental and Engineered Systems. Cambridge: Cambridge University Pres. – 2010. – 553 p.
3. Beavchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // Anal. Biochem. – 1971. – 44(1). – P. 276–287.
4. Brioukhanov A.L., Thauer R.K., Netrusov A.I. Catalase and Superoxide Dismutase in the Cells of Strictly Anaerobic Microorganisms // Microbiology. – 2002. – 71(3). – P. 330–335.



5. Brioukhanov A.L., Netrusov A.I. Catalase and Superoxide Dismutase: Distribution, Properties, and Physiological Role in Cells of Strict Anaerobes // *Biochemistry*. – 2004. – 69(9). – P. 949–962.
6. Dannenberg S., Kroder M., Dilling W., Cypionka H. Oxidation of H<sub>2</sub>, organic compounds and inorganic sulfur compounds coupled to reduction of O<sub>2</sub> or nitrate by sulfate-reducing bacteria // *Arch. Microbiol.* – 1992. – 158. – P. 93–99.
7. Fridovich I. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – 64. – P. 97–112.
8. Gudelj M., Fruhwirth G.O., Paar A. et al. A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents // *Extremophiles*. – 2001. – 5. – P. 423–429.
9. Ito T., Nielsen J.L., Okabe S., Watanabe Y., Nielsen P.H. Phylogenetic identification and substrate uptake patterns of sulfatereducing bacteria inhabiting an oxic-anoxic sewer biofilm determined by combining microautoradiography and FISH // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – 68. – P. 356–364.
10. Keleti T. Basic Enzyme Kinetics. – Akademiai Kiado. – 1988. – 422 p.
11. Krekeler D., Teske A., and Cypionka H. Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1998. – 25(2). – P. 89–96.
12. Kushkevych I.V. Sulfate-reducing bacteria of the human intestine. II. The role in the diseases development // *Sci. Int. J. Biological studies/Studia Biologica*. – 2012. – 6 (2). – P. 221–250. (in Ukrainian)
13. Kushkevych I.V. Identification of sulfate-reducing bacteria strains of human large intestine // *Sci. Int. J. Biological studies/Studia Biologica*. – 2013. – 7(3). – P. 115–124.
14. Kushkevych I.V., Bartoš M., Bartošová L. Sequence analysis of the 16S rRNA gene of sulfate-reducing bacteria isolated from human intestine // *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* – 2014. – 3(2). – P. 239–248.
15. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein determination with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – 193. – P. 265–275.
16. Sies H. Strategies of antioxidant defense // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – 215. – P. 213–219.

Стаття надійшла до редакції 25.10.2014





**Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,  
Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

## **ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ РОДІВ *ERWINIA*, *RALSTONIA*, *AGROBACTERIUM*, ВИЗНАЧЕНІ РІЗНИМИ МЕТОДАМИ**

**Метою** дослідження було вивчення плазмідних профілів та ефективності виділення плазмід грамнегативних фітопатогенних бактерій різними методами. **Методи.** Використано штами фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum*. Виділення плазмідних ДНК з клітин бактерій здійснювали лужним методом Кадо і Ліу, модифікованим лужним методом Кадо і Ліу, модифікованим методом Дженсена та методом Кроса. Плазмідну ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. **Результати.** Показано, що в середньому від 13% до 30% вивчених штамів фітопатогенних бактерій утримують позахромосомні генетичні елементи. Встановлено, що з клітин бактерій, які виростили на рідкому селективному середовищі (пектин або картопляне середовище), позахромосомні ДНК виділяються набагато ефективніше і бактеріальна хромосома краще елінується. **Висновок.** Для виділення плазмідної ДНК з клітин штамів грамнегативних фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* найбільш універсальним є модифікований для фітопатогенних бактерій лужний метод Кадо і Ліу.

**Ключові слова:** *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, фітопатогени, плазмід.

Для більшості бактеріальних фітопатогенів встановлено наявність кільцевих плазмідних ДНК, але для значної кількості виявлених плазмід не встановлено їх функції [3]. Здебільшого плазмідні складують від 2% до третини бактеріального геному. Бактерії *Rhizobium meliloti* та *Ralstonia solanacearum* мають мегаплазмід, розмір деяких з них складає більше 1000 т.п.н.. Усі вірулентні штами *Erwinia stewartii* мають щонайменше вісім плазмід, а в більшості випадків 11–13 плазмід розміром від 4,1 до 320 т.п.н. [3, 10].

Мегаплазмід бактерій роду *Agrobacterium* відомі перш за все своєю причетністю до трансформації рослинних клітин. Вірулентність *A. tumefaciens* та *A. rhizogenes* є наслідком наявності у них Ті і Рі плазмід. Розмір більшості Ті та Рі плазмід складає приблизно від 200 до 800 т.п.н. Рі плазмід завжди утворюють коінтеграції з іншими плазмідами [4, 7, 10].

Бактерії роду *Erwinia* населяють поверхню рослин, ґрунт і воду як симбіотичні мікроорганізми, та можуть бути збудниками хвороб рослин-хазяїв. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*) та близькоспоріднена *E. carotovora*

© Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця, 2014





subsp. *atroseptica* (*Eca*) є агентами, які спричиняють м'яку гниль коренів рослин, в тому числі картоплі та моркви. Інші види ервіній (*E. amylovora*, *E. herbicola*, *E. toxica*) також є фітопатогенами, наприклад, *E. amylovora* викликає некротичне захворювання — бактеріальний опік яблунь, груш та споріднених видів рослин [1, 2].

Дослідження плазмідного складу штамів *E. carotovora* показало, що 30% відсотків з них мають позахромосомні ДНК різного розміру — від 2,5 до 129 т.п.н. Серед цих штамів також виявлено множинне утримання плазмід, деякі з них несуть від 2 до 5 плазмід різного розміру. Вивчення кореляції між наявністю позахромосомних ДНК та стійкістю до антибіотиків показало, що криптичні плазміди *E. carotovora* не є R-плазмідами [1, 2].

У бактерій виду *Ralstonia solanacearum* можуть зустрічатися невеликі за розміром плазміди <50 т.п.н., а також мегаплазміди, які можуть утримувати генетичні детермінанти патогенності. Однак, наявність невеликих плазмід у *R. solanacearum* не є поширеним явищем, крім того вони присутні у клітині у невеликій кількості копій, і через це їх досить важко виділити [8].

Плазмідні профілі це практично важлива характеристика, представлена специфічним набором плазмід. Штами можуть втрачати деякі плазміди, але характерний для певного виду базовий набір залишається незмінним. Існують різні методи виділення позахромосомних генетичних елементів бактерій, але добір адекватного методу для отримання відтворюваних та достовірних результатів для окремих груп бактерій досі залишається актуальним.

Тому метою нашого дослідження було вивчення плазмідних профілів та ефективності виділення плазмід грамнегативних фітопатогенних бактерій різними методами.

### Матеріали і методи

В дослідженнях використовувалися штами *Agrobacterium tumefaciens* ОНУ 310, ОНУ 424, *Erwinia carotovora* ОНУ 317, ОНУ 318, ОНУ 319, ОНУ 320, ОНУ 321, ОНУ 322, ОНУ 323, ОНУ 324, ОНУ 325, ОНУ 326, *Ralstonia solanacearum* ОНУ 366, ОНУ 369, ОНУ 374, ОНУ 375, ОНУ 376, ОНУ 377, ОНУ 378, ОНУ 379, ОНУ 380, ОНУ 381, ОНУ 382, ОНУ 383, ОНУ 384, ОНУ 386, ОНУ 387 з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Усі бактерії вирощували за температури 25–30 °С впродовж 16–18 год у 2 мл рідкого середовища LB, картопляного середовища, та на відповідних агаризованих середовищах. *E. carotovora* культивували також в рідкому та на агаризованому середовищі з пектином [1, 2].

Виділення плазмідної ДНК проводили оригінальним та модифікованими для фітопатогенних бактерій лужним методом Кадо і Ліу, методом Кроса та модифікованим методом Дженсена.

*Лужний метод Кадо і Ліу* [6]. Біомасу бактерій, отриману осадженням клітин 16–18 годинної культури, ресуспендували в 100 мкл буфера Е (40мМ



трис-НСІ, 2мМ ЕДТА рН 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо (трис-НСІ – 609 мг, додецилсульфат натрію (SDS) – 3 г, Н<sub>2</sub>О – 100 мл, 2М NaOH – 2,2 мл). Зразки інкубували при 60–68 °С впродовж 30–45 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували 15 хв за 8000g. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем, переносили у чисту пластикову пробірку, додавали один об'єм хлороформу, перемішували і знов центрифугували 15 хв за 8000g.

*Модифікований лужний метод Кадо і Ліу* [2]. Біомасу бактерій ресуспендували в 100 мкл буфера Е. До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо. Зразки інкубували при 58–60 °С впродовж 60 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували 5 хв за 8800g. **За необхідності центрифугування проводили двічі або тричі.**

*Модифікований метод Дженсена* [5]. Стандартні лужні методи з кип'ятінням більш ефективні для виділення малих плазмід, але майже або зовсім не підходять для виділення великих плазмід. Цей протокол є добре відтворюваним і дає повноцінну картину плазмідних профілів мегаплазмід.

Біомасу бактерій ресуспендували в 100 мкл буфера Е з сахарозою (15% сахарози, 40мМ трис-НСІ, 2мМ ЕДТА рН 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера (3% SDS, 50мМ трис-НСІ рН 12,5). Зразки інкубували при 60 °С впродовж 30 хв. Після цього до лізату додавали 5 U протеїнази К і перемішували 20 раз. Далі інкубували 90 хв за температури 37 °С. Після цього додавали один мілілітр суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували 40 разів до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі 15 хв за 8800g.

*Метод Кроса* [9]. Біомасу бактерій ресуспендували в 2 мкл буфера ТЕ (0,05М трис-НСІ рН 8,0, 0,01М ЕДТА), центрифугували і знов ресуспендували в 40 мкл буфера ТЕ. До суспензії додавали 600 мкл буфера ТЕ з 4% SDS (рН 12,5). Зразки інкубували при 37 °С впродовж 20 хв. Після цього до лізату додавали 30 мкл 2М трис-НСІ буфера рН 7,0, а після цього 240 мкл 5М NaCl, інкубували 4 год на льоду. Зразки центрифугували 10 хв за 8800g. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем і додавали подвійний об'єм (800 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували за 8000g 15 хв.

У всіх методах верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем. Верхню фазу зі зразками отриманої плазмідної ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозних гелях. Препарати плазмідних ДНК зберігали за 4 °С.



### Результати та їх обговорення

Вивчення складу плазмід штамів *E. carotovora*, *A. tumefaciens* та *R. solanacearum* різного походження за допомогою модифікованого лужного методу Кадо і Ліу показало, що частина штамів ервіній має позахромосомні генетичні елементи. (рис. 1 і 2). Розміри виділених плазмід ервіній знаходяться у діапазоні від 1,8 до 20 т.п.н. Штами *E. carotovora* ОНУ 320, ОНУ 323 і ОНУ 324 утримують декілька позахромосомних генетичних елементів. У штаму *A. tumefaciens* ОНУ 310 виявлена мегаплазміда Ті розміром 188 т.п.н. (рис. 1).

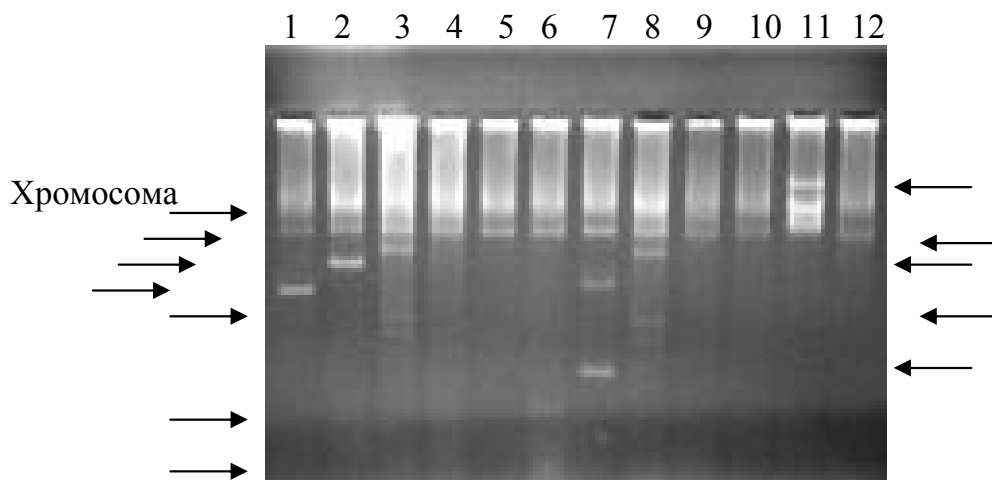


Рис. 1. Плазмідні профілі *E. carotovora*:

ОНУ 317 (pCA25 9,8 т.п.н.) (1), ОНУ 318 (pCA25::Tn9 12,5 т.п.н.) (2), ОНУ 320 (3), ОНУ 319 (4), ОНУ 321 (5), ОНУ 322 (6), ОНУ 323 (7), ОНУ 324 (8) ОНУ 325 (9), ОНУ 326 (10); *A. tumefaciens* ОНУ 310 (11), ОНУ 424 (12). Агароза — 0,75 %, 60В, 3,5 години. Тут і надалі стрілками вказані позахромосомні ДНК.

Fig. 1. Plasmid profiles of *E. carotovora*:

ONU 317 (pCA25 9.8 t.p.n.) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12.5 t.p.n.) (2), ONU 320 (3), ONU 319 (4), ONU 321 (5), ONU 322 (6), ONU 323 (7), ONU 324 (8) ONU 325 (9), ONU 326 (10); *A. tumefaciens* ONU 310 (11), ONU 424 (12). Agarose — 0.75%, 60V, 3.5 hours. Here and further extrachromosomal DNAs are indicated by the arrows.

Мегаплазміда розміром 180 т.п.н. виявлена у штаму *R. solanacearum* ОНУ 381. Дві плазміди: одна – мегаплазміда, розміром 100 т.п.н., а інша невелика плазміда розміром 7 т.п.н. у штаму *R. solanacearum* ОНУ 382 (рис. 2).

Серед фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* для подальших досліджень були відібрані штами, які утримували плазміди, а саме *E. carotovora*: ОНУ 317, ОНУ 318, ОНУ 320, ОНУ 323, ОНУ 324; *R. solanacearum*: ОНУ 381, ОНУ 382; *A. tumefaciens* ОНУ 310.

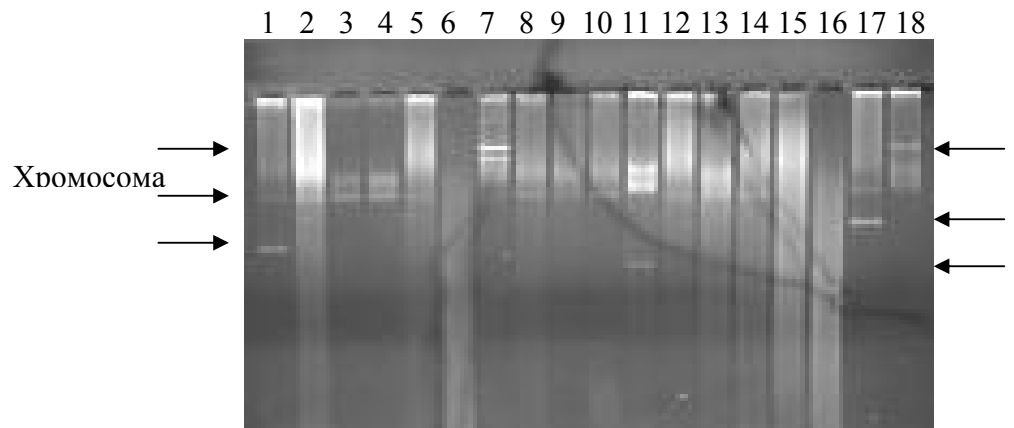


Рис. 2. Плазмідні профілі *R. solanacearum* ONU 387 (2), ONU 376 (3), ONU 377 (4), ONU 378 (5), ONU 386 (6), ONU 381 (7), ONU 384 (8), ONU 383 (9), ONU 380 (10), ONU 382 (11) ONU 379 (12), ONU 366 (13) ONU 369 (14), ONU 374 (15), ONU 375 (16); *E. carotovora* ONU 317 (pCA25 9,8 т.п.н.) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12,5 т.п.н.) (17) і *A. tumefaciens* ONU 310 (188 т.п.н.) (18). Агароза — 0,75 %, 60В, 3,5 години.

Fig. 2. Plasmid profiles of *R. solanacearum* ONU 387 (2), ONU 376 (3), ONU 377 (4), ONU 378 (5), ONU 386 (6), ONU 381 (7), ONU 384 (8), ONU 383 (9), ONU 380 (10), ONU 382 (11) ONU 379 (12), ONU 366 (13) ONU 369 (14), ONU 374 (15), ONU 375 (16); *E. carotovora* ONU 317 (pCA25 9,8 kb) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12,5 kb) (17); *A. tumefaciens* ONU 310 (188 kb) (18). Agarose — 0.75%, 60V, 3.5 hours.

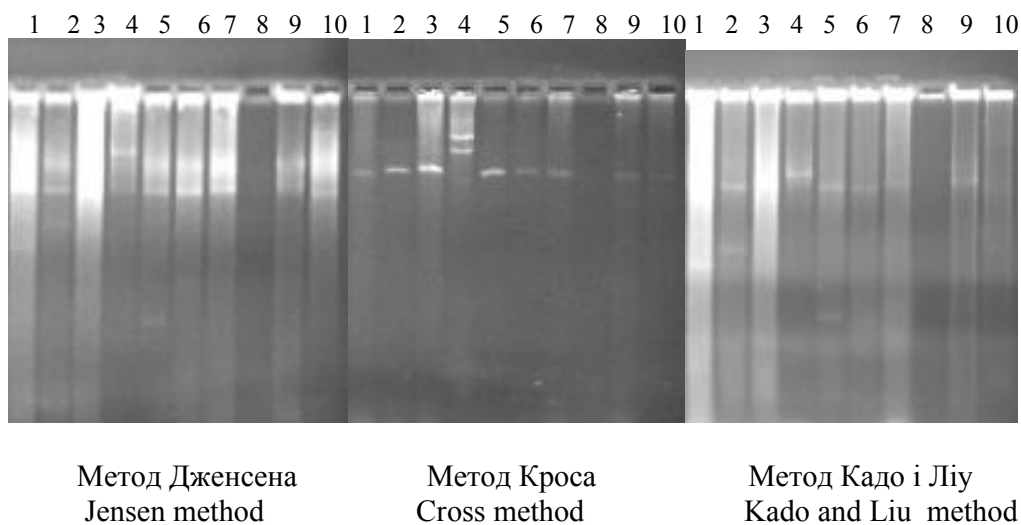
Для порівняльного аналізу різних методів для якісного виділення плазмід різного розміру та вивчення складу плазмід досліджуваних фітопатогенних бактерій використали оригінальний лужний метод Кадо і Ліу, метод Кроса і модифікований метод Дженсена (рис. 3).

Як показали наші дослідження найефективнішими виявилися методи Кадо і Ліу (без модифікацій) і Дженсена (з модифікаціями). Хоча метод Кроса є універсальним і щодо вибору бактерій, і щодо розмірів позахромосомних генетичних елементів, однак він включає невиправдано довгі експозиції та є малоінформативним через збільшений об'єм дослідного зразка порівняно з іншими методами. Тобто плазмідні присутні у виділених зразках, але у значно меншій кількості на одиницю об'єму, тому цей метод можна використовувати лише з метою подальшої концентрації плазмідних ДНК у зразках. Метод Дженсена взагалі більше підходить для роботи з великими плазмідами, а оригінальний метод Кадо і Ліу з плазмідами невеликого розміру.

Саме тому можна зробити висновок, що для виділення плазмідних ДНК з клітин штамів *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* найбільш універсальним є модифікований для фітопатогенних бактерій лужний метод Кадо і Ліу.

До особливостей виділення позахромосомних ДНК також можна віднести вплив різних поживних середовищ для культивування бактерій на якість плазмідних зразків. Після порівняння результатів виділення плазмідних ДНК з бактеріальних клітин, які росли на повноцінних агаризованих і рідких поживних

середовищах відзначено, що зразки виділені з рідкого поживного середовища утримують більше плазмідного матеріалу, порівняно із зразками позахромосомних ДНК, отриманих з агаризованих поживних середовищ. Однак, слід зазначити той факт, що вихід плазмідного матеріалу збільшується тільки у випадку виділення невеликих плазмід. Що стосується виділення мегаплазмід з клітин, що виростили на пектині або на картопляному середовищі, то має місце лише менша кількість домішок хромосомної ДНК у зразках, порівняно з такими, виділеними з культур, що росли на чашках.



**Рис. 3.** Плазмідні профілі *E. carotovora* ONU 317 (pCA25 9,8 т.п.н.) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12,5 т.п.н.) (2), ONU 320 (3), ONU 323 (5), ONU 324 (6) ONU 325 (7); *R. solanacearum* ONU 381 (4 і 8), ONU 382 (9); *A. tumefaciens* ONU 310 (10). Агароза — 0,75%, 60В, 4,5 години.

**Fig. 3.** Plasmid profiles of *E. carotovora* ONU 317 (pCA25 9,8 kb) (1), ONU 318 (pCA25::Tn9 12,5 kb) (2), ONU 320 (3), ONU 323 (5), ONU 324 (6) ONU 325 (7); *R. solanacearum* ONU 381 (4 і 8), ONU 382 (9); *A. tumefaciens* ONU 310 (188 kb) (10). Agarose — 0.75%, 60V, 4.5 hours.

При подальшому використанні для виділення плазмідних ДНК клітин, які виростили на рідкому селективному середовищі (пектин або картопляне середовище), було встановлено, що набагато краще виділяються позахромосомні ДНК, а бактеріальна хромосома краще елімінується. На рисунках 1, 2 і 3 представлені результати, отримані при виділенні плазмідних ДНК з бактеріальних клітин після культивування на відповідних рідких селективних середовищах.

Таким чином, показано, що в середньому від 13% до 30% вивчених штамів фітопатогенів утримують позахромосомні генетичні елементи. Встановлено, що для виділення плазмідних ДНК з клітин досліджуваних штамів фітопатогенних бактерій *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* найбільш універсальним є модифікований лужний метод Кадо і Ліу.

**Zh. Sergieieva, V. Ivanytsia**

Odesa Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str.,  
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

**PHYTOPATHOGENIC BACTERIA OF GENERA *ERWINIA*,  
*RALSTONIA*, *AGROBACTERIUM* PLASMID PROFILES STUDIED BY  
DIFFERENT METHODS**

**Summary**

The **aim** of the study was to compare the results of the Gram-negative phytopathogenic bacteria plasmid isolation efficiency by various methods. **Methods.** The strains of phytopathogenic bacteria *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* were used. Plasmids isolation from the cells was carried out using alkaline Kado and Liu method, modified alkaline Kado and Liu method, modified Jensen method and Cross method. Plasmid DNA was analysed using electrophoresis in agarose gel. **Results.** On average, between 13% and 30% of the studied phytopathogenic strains contained extrachromosomal genetic elements. It was found that the extrachromosomal DNAs were isolated much better and bacterial chromosome was better eliminated using bacterial cells, grown on liquid selective medium (pectin or potato medium). **Conclusion.** The modified for phytopathogenic bacteria alkaline Kado and Liu method was the most suitable for plasmid DNA isolation from Gram-negative phytopathogenic bacteria *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* strains cells.

*Key words:* *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, phytopathogens, plasmids, plasmid profiles.

**Ж.Ю. Сергеева, В.А. Иваныця**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова ул. Дворянская, 2,  
Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: sergeeva.zh@onu.edu.ua

**ПЛАЗМИДНЫЕ ПРОФИЛИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ  
РОДОВ *ERWINIA*, *RALSTONIA*, *AGROBACTERIUM*, ВЫЯВЛЕННЫЕ  
РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ**

**Реферат**

**Целью** исследования было сравнение результатов эффективности выделения плазмид грамотрицательных фитопатогенных бактерий различными методами. **Методы.** Использовались штаммы фитопатогенных бактерий *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum*. Выделение плазмид из клеток осуществлялось щелочным методом Кадо и Лиу, модифицированным щелочным методом Кадо и Лиу, модифицированным методом Дженсена и методом Кросса. Плазмидную ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозных гелях. **Результаты.** В среднем, от 13% до 30% изученных нами штаммов фитопатогенов содержат внехромосомные генетические элементы. Установлено, что из клеток бактерий, которые выросли в жидкой питательной среде (пектин или картофельная сре-





да), внехромосомные ДНК выделяются намного лучше, и также бактериальная хромосома лучше элиминируется. **Вывод.** Для выделения плазмидных ДНК из клеток штаммов грамотрицательных фитопатогенных бактерий *E. carotovora*, *A. tumefaciens*, *R. solanacearum* наиболее универсальным является модифицированный для фитопатогенных бактерий щелочной метод Кадо и Луу.

*Ключевые слова:* *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, фитопатогены, плазмиды, плазмидные профили.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Сергеева Ж.Ю.* Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // Доп. НАН України. – 2008. – № 12. – С. 149–153.
2. *Товкач Ф.И.* Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* / Ф.И. Товкач // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 804–810.
3. *Coplin D.L.* Plasmids and their role in the evolution of plant pathogenic bacteria / D.L. Coplin // Ann. Rev. Phytopathol. – 1989. – V. 27. – P. 187–212.
4. *Couturier M.* Identification and classification of bacterial plasmids / M. Couturier, F. Vex, P. L. Bergquist [et al.] // Microbiol. Rev. – 1988. – V. 52, № 3. – P. 375–395.
5. *Jensen G.B.* The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis is located on the large conjugative plasmid pXO16. / G. B. Jensen et al. // J. Bacteriol. – 1995. – V. 177. – P. 2914–2917.
6. *Kado C.J.* Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids / C. J. Kado, S.-T. Liu // J. Bacteriol. – 1981. – V. 145, № 3. – P. 1365–1373.
7. *Kado C.I.* Origin and evolution of plasmids / C.I. Kado // Antonie van Leeuwenhoek. – 1998. – V. 73, № 1. – P. 117–126.
8. *Reyes-Ramirez A.* Plasmid Patterns of *Bacillus thuringiensis* Type Strains. / A. Reyes-Ramirez, J. E. Ibarra // Applied And Environmental Microbiology. – 2008. – V. 74, № 1. – P. 125–129.
9. *Rohde C.* Plasmid isolation from bacteria: some fast procedures / C. Rohde // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1995. – V. 11, Issue 3. – P. 367–369.
10. *Vivian A.* The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? / A. Vivian, J. Murillo, R.W. Jackson // Microbiology. – 2001. – V. 147, № 4. – P. 763–780.

Стаття надійшла до редакції 09.09.2014 р.



Н.І. Адамчук-Чала<sup>1</sup>, Є.П. Копилов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ, ДО3680, Україна, e-mail: m\_nv@mail.ru  
<sup>2</sup> Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН,  
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна,  
e-mail: evhenykopilov@rambler.ru

## УЛЬТРАСТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ПІД ДІЄЮ ІНОКУЛЯЦІЇ БАКТЕРІЯМИ ШТАМУ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 102

**Метою** роботи було дослідити ультраструктурну організацію клітин апікальних меристем рослин пшениці ярої, інокульованих діазотрофними бактеріями роду *Azospirillum*. **Методи.** Вивчення формування ендоситної асоціації *A. brasilense* 102 з рослинами пшениці ярої (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) сорту Рання 93 проводили у лабораторних дослідках за стерильних умов. Електронно-мікроскопічні дослідження клітин апікальних меристем проводили в трансмісійному електронному мікроскопі Jeol JSM 1200-EX. Обрахунок вівся за 50-ти зразками електроннограм клітин 5-ти апексів пагону для кожного із варіантів. **Результати.** В ході електронно-мікроскопічного дослідження апікальних меристем пагону пшениці ярої, вирощеної на стерильному субстраті із інокульованих бактеріями *Azospirillum brasilense* 102 зернівок, досліджено ультраструктурну організацію ізодіаметричних клітин ініціальної зони апексу. Під дією інокуляції збільшувався пул меристем, зменшувалося ядерно-цитоплазматичне співвідношення, збільшувалися розміри пластид і мітохондрій, кількість мітохондрій меристематичних клітин, крист в мітохондріях. У клітинах меристем рослин, інокульованих *A. brasilense* 102, виявлено збільшення числа і розмірів пластид, мітохондрій і пероксисом, порівняно з контролем, спостерігався більший розвиток системи крист в мітохондріях. **Висновки.** Збільшення числа і розмірів пластид, мітохондрій і пероксисом, в дослідних варіантах вказує на високий рівень клітинного дихання у рослин, інокульованих штамом *A. brasilense* 102. Крайній розвиток системи крист в мітохондріях може свідчити про високу енергетичну активність органел інокульованих рослин.

**Ключові слова:** ультраструктура клітин, *Azospirillum brasilense* 102, меристема, пластиди, пшениця яра.

Біологічна фіксація молекулярного азоту здійснюється ґрунтовими мікроорганізмами, що активно накопичуються в ризосфері [5] і здатні колонізувати тканини і органи рослин [8, 6, 11]. Ризосферні бактерії роду *Azospirillum*



продукують біологічно активні речовини, під впливом яких активізується хлоропластогенез [4], поліпшується ріст і розвиток рослин [3]. У нашій попередній роботі було досліджено дію інокуляції різними штамми бактерій роду *Azospirillum* на структурно-функціональну організацію клітин меристеми проростків пшениці ярої [1]. У клітинах меристеми рослин, інокульованих *Azospirillum brasilense* 102, виявлено збільшення числа хлоропластів, мітохондрій і пероксисом, порівняно з іншими варіантами, що вказує на високий рівень клітинного дихання у інокульованих цим штамом рослин.

Відомо, що клітини апікальних меристем першими реагують на стимулювальну дію зовнішнього чинника збільшенням кількості поділів клітин і цитоплазматичних органел, що має особливе значення в процесі росту і розвитку рослинних клітин, набутті клітинами своєї спеціалізації [2].

Метою нашої роботи було дослідити ультраструктурну організацію клітин апікальних меристем рослин пшениці ярої, інокульованих діазотрофними бактеріями роду *Azospirillum*.

### Матеріали і методи

Штам *Azospirillum brasilense* 102 вирощували на картопляному агарі з малатом протягом трьох діб за температури 26–27 °С.

Вивчення формування ендоситної асоціації *A. brasilense* 102 з рослинами пшениці ярої (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) сорту Рання 93 проводили у лабораторних дослідах за стерильних умов. Для цього насіння рослин стерилізували 0,1% розчином  $\text{AgNO}_3$  протягом 3-х хвилин і поміщали в колби Ерленмейера ємністю 500 мл, в яких містився річковий пісок в кількості 200 г. Пісок спочатку промивали водою, висушували за температури 50–60 °С. Висушений пісок промивали концентрованою соляною кислотою, потім водою і знову висушували. Промитий сухий пісок поміщали в колби Ерленмейера, зволожували поживним розчином Кнопа (60% від повної вологості піску) і стерилізували в режимі – 1 атм, 20 хв.

Інокуляцію насіння пшениці ярої штамом *A. brasilense* 102 здійснювали бактеріальною суспензією із розрахунку 200 тис. бактеріальних клітин на одну насінину.

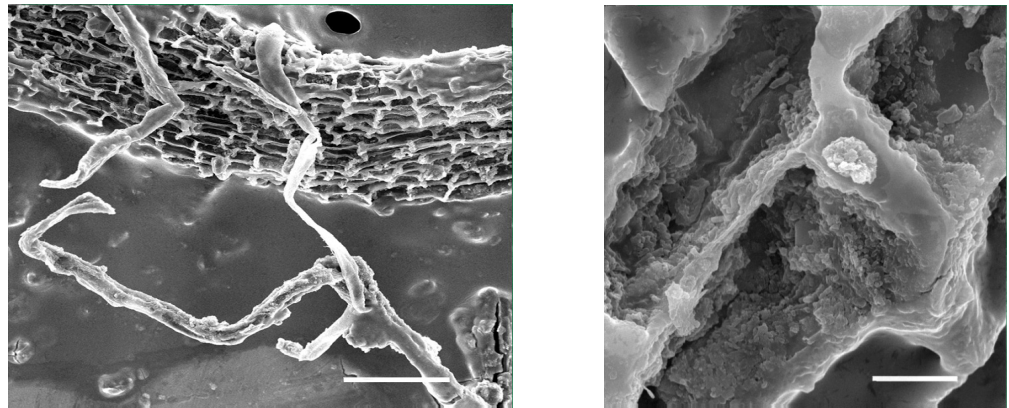
Електронно-мікроскопічні дослідження клітин апікальних меристем проводили за методикою [7] в трансмісійному електронному мікроскопі Jeol JSM 1200-EX. Обрахунок вівся за 50-ти зразками електроннограм клітин 5-ти апексів пагону для кожного із варіантів. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення обчислювали відношенням об'єму клітини до об'єму ядра мінус об'єм вакуолей. Ступінь вакуолізації клітин оцінювали за кількістю і розмірами клітинних вакуолей. Середній об'єм пластид, мітохондрій і пероксисом визначали за формулою еліпсоїда обертаня.

Статистичне опрацювання даних для визначення довірчого інтервалу співвідношення об'ємів компартментів клітин апікальної меристеми та параметрів цитоплазматичних органел здійснювали за допомогою програми STAT.



### Результати та обговорення

За допомогою методу трансмісійної електронної мікроскопії було виявлено, що азотфіксувальні бактерії штаму *A. brasilense 102* здатні активно колонізувати ризосферну поверхню коренів, а також проникати у внутрішні тканини пшениці ярої (рис. 1).



**Рис. 1.** Колонізація ризосферної поверхні коренів азотфіксувальними бактеріями штаму *Azospirillum brasilense 102*

**Fig. 1.** Colonization of the rhizospheric root surface by nitrogenfixing bacterial strain *Azospirillum brasilense 102*

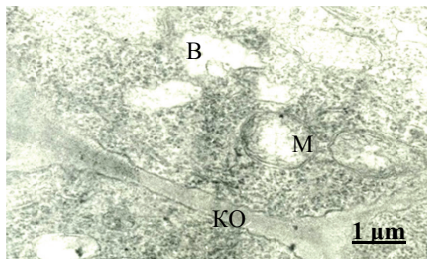
Клітини азоспірил при їх інтродукції в кореневу зону рослин були виявлені в муцигелі поверхні кореневих волосків, всередині паренхіми кореня пшениці і міжклітинному просторі всисної зони кореня [9]. Також виявлено позитивний вплив *A. brasilense 102* на ріст і розвиток рослин.

В ході електронно-мікроскопічного дослідження апікальних меристем пагону пшениці ярої, вирощеної на стерильному субстраті із інокульованих бактеріями штаму *A. brasilense 102* зернівок, нами було визначено, що діаметр і основні максимальні фази пластохрону склали в контролі біля 90 мкм, а в дослідному варіанті – 120 мкм. Кількість клітин при цьому залишалася незмінною. Ультраструктурна організація ізодіаметричних клітин ініціальної зони апексу пшениці була типовою для верхівкових меристем пагону (рис. 2).

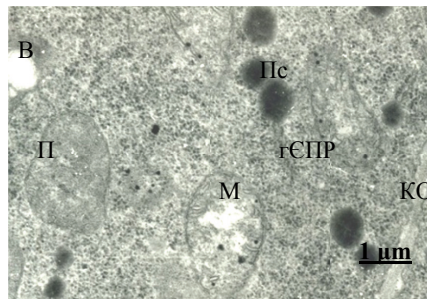
Як в контролі, так і в дослідному варіанті ядерний компартмент на серединних зрізах досліджуваних клітин займав проксимальне положення і складав чверть клітинного об'єму. Різниця між варіантами виявлялася за ступенем вакуолізації (рис. 3) та ядерно-цитоплазматичним співвідношенням. У клітин інокульованих проростків ядерно-цитоплазматичне співвідношення дорівнювало 2,4 та було меншим порівняно із контрольним значенням 3,1.

Три чверті клітинного об'єму належало цитозоллю із клітинними органелами: пластидами-еопластами, кулястими мітохондріями, диктіосомами, каналцями гранулярного і агранулярного ендоплазматичного ретикулуму. В клітинах інокульованих рослин утворювалися електроннощільні пероксисоми (рис. 2Б).

Порівняльний аналіз цитоплазматичних органел виявив відмінність числа і розмірів органел (табл.) ініціальних клітин апікальної меристеми вегетативного пагону та розвитку їх субструктур.



Контроль



Інокуляція *Azospirillum brasilense* 102

**Рис. 2. Фрагмент клітини апікальної меристеми пшениці ярої**

А – контроль, Б – інокуляція, КО – клітинна оболонка, П – пластида, М – мітохондрія, гЕПР – гранулярний ендоплазматичний ретикулум, Пс – пероксисома, В – вакуоль.

**Fig. 2. Detail of apical meristem cells of spring wheat**

A – control, B – inoculation, CA – cell membrane, P – plastids, M – mitochondria, hEPR – granular endoplasmic reticulum, Ps – peroxisomes, V – vacuole.

Об'єм пластидому приблизно відповідав об'єму хондріому досліджуваних клітин меристем. Клітинна оболонка і поодинокі вакуолі посідали 1/10 від загального об'єму клітин. Клітинна оболонка із нерівним контуром у середньому досягала завтовшки 360 нм і була вкрита кутикулярним шаром в 30 нм.

Таблиця

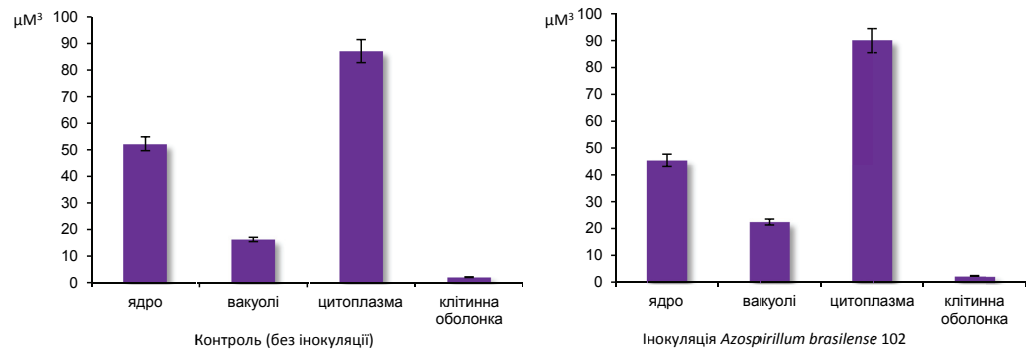
**Параметри цитоплазматичних органел клітин апікальної меристеми вегетативного пагону рослин пшениці ярої**

Table

**Measurements of cytoplasmic organelles cell apical meristem of vegetative shoots of spring wheat plants**

Параметри	Контроль без інокуляції	Дія бактерій нового штаму <i>Azospirillum brasilense</i> 102
Кількість пластид у клітині	10,36 ± 1,40	12,33 ± 1,63
Об'єм пластиди, мкм <sup>3</sup>	11,15 ± 0,30	12,30 ± 0,83
Кількість мітохондрій у клітині	17,76 ± 1,43	22,34 ± 0,76
Діаметр мітохондрій, мкм	1,70 ± 0,33	2,60 ± 0,23
Об'єм мітохондрій, мкм <sup>3</sup>	3,50 ± 0,33	5,64 ± 0,20
Кількість крист у мітохондрії	1,50 ± 0,07	3,50 ± 0,02





**Рис. 3. Співвідношення об'ємів компартментів клітин апікальної меристеми вегетативного пагону рослин пшениці ярої**

**Fig. 3. The relation of apical meristem cells compartment volume in vegetative shoots of spring wheat plants**

Одержані результати узгоджуються з літературними даними щодо позитивної дії азоспірил на рослини. При дослідженні мікроасоціативної взаємодії було показано спосіб проникнення азотфіксувальних бактерій роду у міжклітинний простір кореня та їх існування як стабільної діазотрофної популяції [8, 9], що для живлення використовує продуковані рослиною органічні речовини [12]. Головним чином це накопичена в макроергічних зв'язках АТФ енергія, що використовується мікроорганізмами для фіксації азоту. Таким чином, відбувається тісна взаємодія мікро- і макропартнера, що уможливорює обмін сигнальними молекулами та метаболітами. Так, від діазотрофів у рослину безпосередньо надходять фіксований азот і фітогормони. В свою чергу, вступаючи в тісну взаємодію з ендofітними діазотрофами, рослини значно розширюють свої екологічні можливості і завдяки комплексу морфолого-анатомічних змін рослин та ультраструктурних перебудов клітин, набувають нових метаболічних функцій [10].

Таким чином, нами встановлено, що під дією біогенного чинника збільшується пул меристем, зменшується ядерно-цитоплазматичне співвідношення на тлі зростання числа поодиноких вакуолей, збільшується розмір пластид і мітохондрій, кількість мітохондрій меристематичних клітин та крист в мітохондріях.



**Н.И. Адамчук-Чалая<sup>1</sup>, Е.П. Копылов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев, ДО3680, Украина, e-mail: m\_nv@mail.ru

<sup>2</sup>Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН,  
ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина,  
e-mail: evhenykopilov@rambler.ru

**УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ АПИКАЛЬНЫХ  
МЕРИСТЕМ ПРОРОСТКОВ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ ПОД  
ДЕЙСТВИЕМ НОВОГО ШТАММА  
*AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 102**

**Реферат**

**Целью** работы было исследовать ультраструктурную организацию клеток апикальных меристем растений яровой пшеницы, инокулированных диазотрофами рода *Azospirillum*. **Методы.** Изучение формирования эндофитной ассоциации *A. brasilense* 102 с растениями яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) сорта Ранняя 93 проводили в лабораторных опытах в стерильных условиях. Электронно-микроскопические исследования клеток апикальных меристем проводили в трансмиссионном электронном микроскопе Jeol JSM 1200-EX. Подсчёт осуществлялся в 50-ти образцах электронограмм клеток 5-ти апексов побега для каждого варианта. **Результаты.** В ходе электронно-микроскопического исследования апикальных меристем побегов яровой пшеницы, выращенной на стерильном субстрате из инокулированных бактериями *Azospirillum brasilense* 102 зерновок, мы исследовали ультраструктурную организацию изодиаметрических клеток инициальной зоны апекса. Под действием инокуляции увеличивался пул меристем, уменьшалось ядерно-цитоплазматическое отношение, увеличивались размеры пластид и митохондрий, количество митохондрий меристематических клеток и крист в митохондриях. В клетках меристем растений, инокулированных *A. brasilense* 102, обнаружено увеличение числа и размеров пластид, митохондрий и пероксисом, по сравнению с контролем, наблюдалось более интенсивное развитие систем крист в митохондриях. **Выводы.** Увеличение числа и размеров пластид, митохондрий и пероксисом, по сравнению с контролем указывает на высокий уровень клеточного дыхания у растений, инокулированных штаммом *A. brasilense* 102. Лучший уровень развития системы крист в митохондриях может свидетельствовать о высокой энергетической активности органелл инокулированных растений.

**Ключевые слова:** ультраструктура клеток, *Azospirillum brasilense* 102, меристема, пластиды, яровая пшеница.



**N.I. Adamchuk-Chala<sup>1</sup>, Ye.P. Kopylov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Virusology after D.K. Zabolotny NASU, 154, str. Zabolotny, DO3680, Kyiv, Ukraine, e-mail: m\_nv@mail.ru

<sup>2</sup>Institute of Agricultural Microbiology and Agricultural Production NAAS, 97, st. Shevchenko, Chernigiv, 14027, Ukraine, e-mail: evhenykopilov@rambler.ru

**ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION OF APICAL MERISTEMS IN SPRING WHEAT SEEDLINGS UNDER INOCULATION WITH BACTERIA OF *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* 102 NEW STRAIN**

**Summary**

**The aim of study** was to investigate the ultrastructural organization of apical meristem cells of spring wheat plants inoculated by diazotrophic bacteria of *Azospirillum* genus.

**Methods.** The research of endophytic associations formation between *A. brasilense* 102 and spring wheat plants (*Triticum aestivum* L. (*T. Vulgare* Vill)) sort Rannia 93 were carried out under sterile conditions. Electron microscopic study of cells apical meristems was performed in the transmission electronic microscope Jeol JSM 1200-EX. For each variant the calculation was made among 50 samples in 5 stem apex.

**Results.** During the electron microscopic study of shoot apical meristematic cells of spring wheat grown on sterile substrate inoculated with bacteria *Azospirillum brasilense* 102, we have investigated the ultrastructural organization of izodiametric cells of initiative apex zone. Under the influence of inoculation the pool of meristems increased, the nuclear – cytoplasmic ratio decreased, the size of mitochondria and plastids increased, mitochondria number of meristematic cells, cristae in mitochondria increased. In cells of mesophyllous plants inoculated by *A. brasilense* 102 strain, there were revealed an increase in the number and size of plastids, mitochondria and peroxisomes compared with controls, there were indicating higher level of cellular respiration in the plants inoculated by this strain. Given the inoculation system cristae in mitochondria was more developed, which may indicate high energy activity of organelles in the inoculated plants. **Conclusions.** Increasing the number and size of the plastids, mitochondria, peroxisomes, as compared to control indicates a high level of cellular respiration in plants, inoculated by *A. brasilense* 102 strain. The best level of development of cristae in mitochondria may be evidence of high energy activity of organelles of inoculated plants.

*Key words:* cell ultrastructure, *Azospirillum brasilense* 102, meristems, plastids, spring wheat.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Адамчук-Чала Н.И. Морфо-функциональные изменения растений пшеницы яровой при взаимодействии с азоспириллами / Н.И. Адамчук-Чала // Микробиол. журн. – 2012, т. 74. – 6. – С. 1–8.
2. Аналіз росту і розвитку нетреби (*Xanthium*). / Р.М. Максимович Наукове товариство ім. Шевченка, Львів. – 2003, 195 с.
3. Антонюк Л.П. Почвенные ассоциативные симбиозы бактерий и злаков: от фундаментальных исследований к практическому использованию / Л.П. Антонюк, В.В. Игнатов // Фундаментальные и прикладные исследования



саратовських учених для Росії і Саратовської губернії. – Саратов Издательство Саратов. ун-та, 1999. – С. 153–155.

4. Белорукова О.К. Оценка характера взаимодействия озимой пшеницы с ассоциативными азотфиксирующими бактериями / О.К. Белорукова // Вісн. Харків. держ. аграрн. ун-ту. Сер. «Рослинництво»/ Збірн. наук. праць. – Харків 1998. – С. 32–38.

5. Биорегуляция микробно-растительных систем. / Г.А. Иутинская, С.П. Пономаренко, Е.И. Андреев и др. – К.: Ничлава, 2010. – 464 с.

6. Біологічний азот / В.П. Патики, С.Я. Коць, В.В. Волкогон та ін.: – К.: Світ, 2003. – 424 с.

7. Васильев А.Е. Динамика клеточных компонентов листа *Populus deltoids* (Salicaceae) в ходе жизненного цикла. 1. Апикальная меристема побега / А.Е. Васильев, Л.Е. Муравник // Ботанический журнал. – 1997, т. 82, № 7, С. 1–13.

8. Волкогон В.В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы / В.В. Волкогон // Микробиология. – 2000. – Т. 62, № 2. – С. 51–68.

9. Копилов Є.П. Ґрунтовий сапрофітний гриб *Chaetomium cochleodes* Palliser як біотичний чинник формування ефективних асоціацій азоспірил з рослинами пшениці ярої / Є.П. Копилов, С.П. Надкерничний, Н.І. Адамчук-Чала // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. – Серія Біологія. – 2010. – вип. 1(19). – С. 91–100.

10. Проваров И.А. Происхождение и эволюция бобово-ризобиального симбиоза / И.А. Проваров // Изд. Академии наук СССР. Сер. биологическая. – 1991, – № 3. – С. 77–87.

11. Ocon Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots / Y. Ocon, Y. Kapulnik // Plant and Soil. – 1986. – V. 90, № 1. – P. 3–16.

12. Steenhout O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects / O. Steenhout, J. Venderleyden // FEMS Microbiol. Rev. – 2000. – V. 24, N 4. – P. 487–506.

Стаття надійшла до редакції 03.03.2014 р.



**О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, І.Й. Сейфулліна, В.О. Лерер**

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

## **ВПЛИВ ПОХІДНИХ ІЗОНІАЗИДУ НА ЧУТЛИВІСТЬ ЛАКТАМАЗПРОДУКУВАЛЬНИХ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ДО ПЕНІЦИЛІНУ**

**Мета.** Виявлення здатності до синтезу  $\beta$ -лактамаз у штамів *S. aureus*, виділених з верхніх дихальних шляхів людей, а також визначення впливу ізонікотиноїлгідрозон *n*-диметиламінобензальдегіду та комплексу стануму (IV) з ізонікотиноїлгідрозоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду на чутливість цих штамів до пеніциліну. **Методи.** В роботі використовували мікробіологічні методи: диско-дифузійний, метод подвійних дисків та серійних розведень, а також статистичні методи аналізу даних. **Результати.** З верхніх дихальних шляхів здорових людей виділено 33 штами *S. aureus*, у яких найбільший рівень резистентності спостерігався до пеніцилінів і цефалоспоринів 3–4 покоління. У п'яти штамів виявлено продукцію  $\beta$ -лактамаз. Показано, що за присутності досліджуваного гідрозону та комплексу стануму (IV) МІК пеніциліну для штаму *S. aureus* 17, стійкого до II з використаних  $\beta$ -лактамів, знижувалася в 32 рази. **Висновки.** Досліджений гідрозон та комплекс Sn (IV) мають потенційну здатність до подолання стійкості грампозитивних бактерій до  $\beta$ -лактамних антибіотиків.

**Ключові слова:** резистентність,  $\beta$ -лактамаза, *Staphylococcus aureus*, мінімальна інгібувальна концентрація (МІК), інгібітор, ізоніазид, гідрозони, комплекси стануму (IV).

Провідною групою антибіотиків, що застосовуються в клініці, є  $\beta$ -лактами. Саме  $\beta$ -лактами стали першими антибактеріальними препаратами, до яких у мікроорганізмів виникли захисні механізми. На сьогодні найбільш поширеним механізмом стійкості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків є їх ферментативна інактивація в результаті гідролізу одного із зв'язків  $\beta$ -лактамного кільця ферментами лактамазами [7].

Останнім часом до 90% стійких штамів бактерій, виділених від пацієнтів, здатні до вироблення  $\beta$ -лактамаз. В Україні ситуація погіршується вільним доступом населення до антибіотиків в аптечній мережі та досить частим неналежним їх використанням [2].

Одним із шляхів подолання бактеріальної резистентності, пов'язаної з ферментативною інактивацією антибіотиків, є застосування комбінованих препаратів, до складу яких поряд з діючою речовиною входить інгібітор лактамази.



Зазвичай інгібітором виступає антибіотик з групи  $\beta$ -лактамів, у якого відсутня або слабка антибактеріальна активність, але останнім часом почався пошук інгібіторів серед сполук з іншою хімічною будовою, зокрема, гідразонів [12–14].

Раніше нами було досліджено вплив похідних ізоніазиду – ізонікотиноїлгідразонів ароматичних альдегідів і нових відповідних комплексів стануму (IV) на ріст умовно-патогенних бактерій [1] та виявлено серед них дві сполуки, які виявляють низьку антибактеріальну активність щодо стандартного штаму *S. aureus* ATCC 25923. Це є важливим фактором, оскільки визначення інгібувальної дії на  $\beta$ -лактамази сполук з високою антибактеріальною активністю щодо тест-штамів неможливе внаслідок пригнічення росту бактеріальних культур.

Метою даної роботи було виявлення здатності до синтезу  $\beta$ -лактамаз у штамів *S. aureus*, виділених з верхніх дихальних шляхів людей, а також визначення впливу ізонікотиноїлгідразон *n*-диметиламінобензальдегіду та комплексу стануму (IV) з ізонікотиноїлгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду на чутливість цих штамів до пеніциліну.

### Матеріали та методи

Виділення стафілококів проводили з поверхні мигдаликів та порожнини носа здорових осіб. Ідентифікацію проводили за стандартною схемою [8]. Визначення чутливості виділених штамів до  $\beta$ -лактамних антибіотиків здійснювали диско-дифузійним методом [11].

Для виявлення синтезу виділеними штамми лактамаз використовували метод подвійних дисків [7]. В центрі чашки Петрі з агаром Мюлера-Хінтона, засіяного суспензією тест-штаму, розміщували диск з амоксициліном/клавуланатом, з боків від нього – диски з цефотаксимом і цефепімом (рис. 1). Про синтез  $\beta$ -лактамаз свідчила поява розширених зон пригнічення росту між одним або декількома дисками з  $\beta$ -лактамами і диском, який містив клавуланову кислоту.

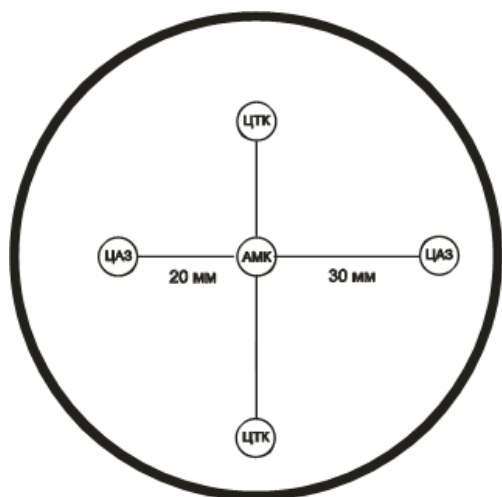


Рис. 1. Схема розташування дисків при постановці тесту з виявлення продукції БЛРС методом «подвійних дисків».

Примітка: АМК – амоксицилін/клавуланат; ЦТК – цефотаксим; ЦАЗ – цефепім.

Fig. 1. The scheme of arrangement of the disks with antibiotics

Note: АМК – amoxicillin/clavulanate, ЦТК – cefotaxime, ЦАЗ – cefepime.

В роботі використовували ізонікотиноїлгідрозон 4-N, N-диметиламіно-бензальдегіду (сполука I), отриманий реакцією конденсації гідразиду ізонікотинової кислоти “осч” с альдегідом “хч” за методикою [9] (рис. 2). Його чистоту та індивідуальність контролювали методом тонкошарової хроматографії і за тпл. Комплекс стануму (IV) з ізонікотиноїлгідрозоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (сполука II) синтезовано на кафедрі загальної хімії та полімерів ОНУ імені І.І. Мечникова доц. Шматковою Н.В. за загальною розробленою методикою [5] (рис. 2). Його склад і будова доведені сукупністю фізико-хімічних методів дослідження, а молекулярну та кристалічну структуру встановлено рентгено-структурним аналізом [4].

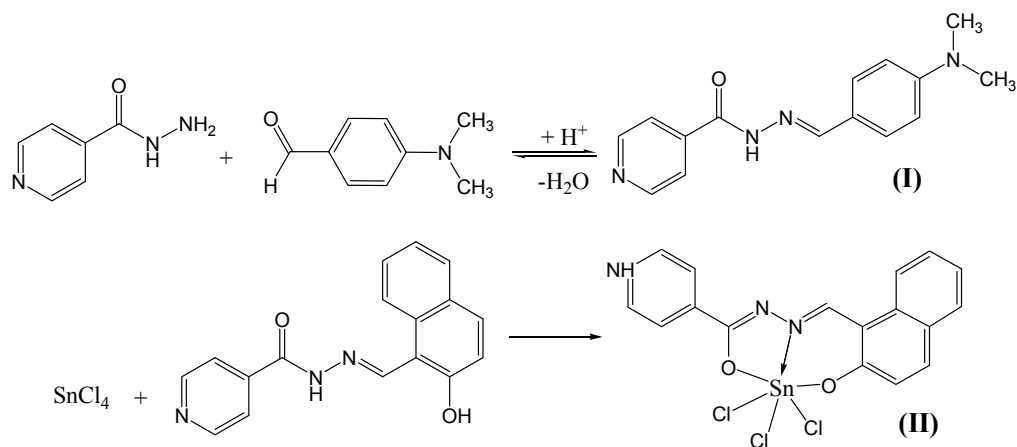


Рис. 2. Схема синтезу та будови сполук I і II

Fig. 2. The scheme of synthesis and structure of compounds I and II

Для визначення комбінованого впливу досліджуваних сполук I, II та антибіотиків на ріст мікроорганізмів попередньо визначали мінімальні інгібувальні концентрації антибіотиків та I, II методом серійних розведень [8].

У подальшому вивчали сумісну дію антибіотиків та сполук I, II. Для цього тест-мікроорганізми вирощували у середовищі Гісса з індикатором Андреде, до якого одночасно додавали антибіотики та I, II у концентраціях, менших за МК. Кількість паралелей у кожному експерименті дорівнювала 5, експерименти повторювали тричі.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Розраховували середні значення показників ( $\bar{X}$ ) та їх стандартну помилку ( $S_{\bar{X}}$ ). Вірогідність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95 % ( $p \leq 0,05$ ) [3].

Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.





### Результати дослідження та їх обговорення

У ході дослідження з поверхні мигдаликів та носової порожнини 76 здорових людей виділено 33 штами *S. aureus*, чутливі до іміпенему, меропенему, цефазоліну, цефаклору, цефоперазону/сульбактаму, тикарциліну/клавуланату та амоксициліну/клавуланату (рис. 3).

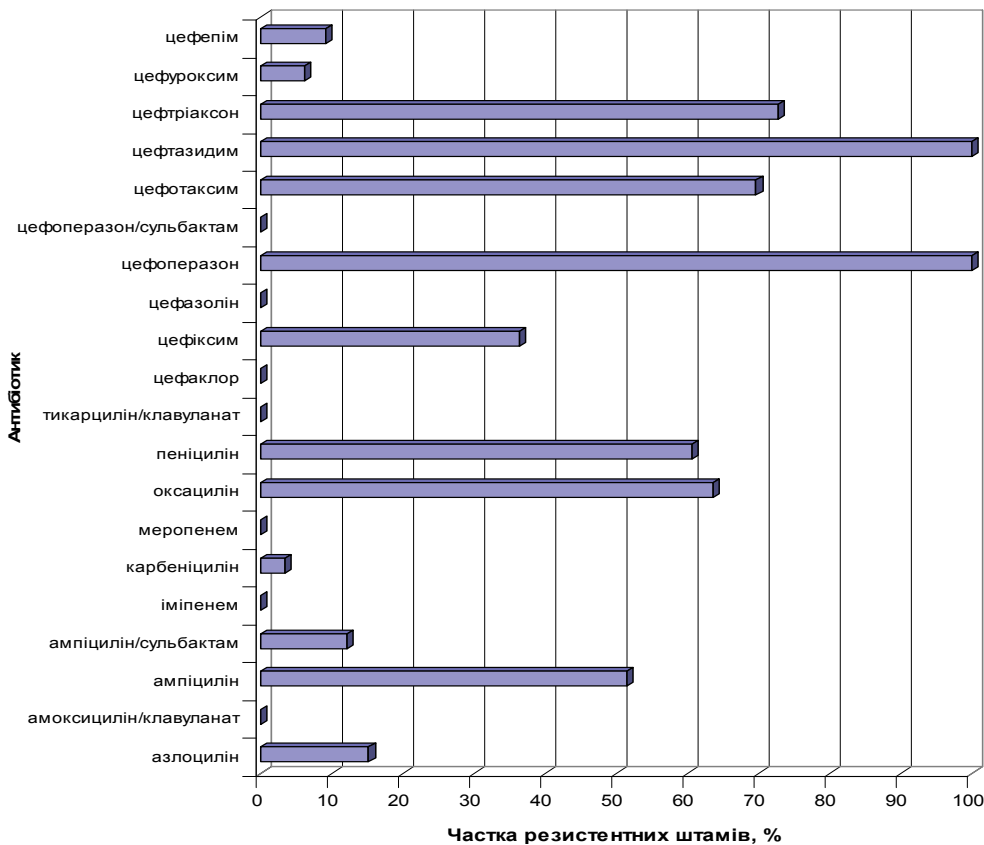


Рис. 3. Резистентність виділених штамів *S. aureus* до  $\beta$ -лактамних антибіотиків

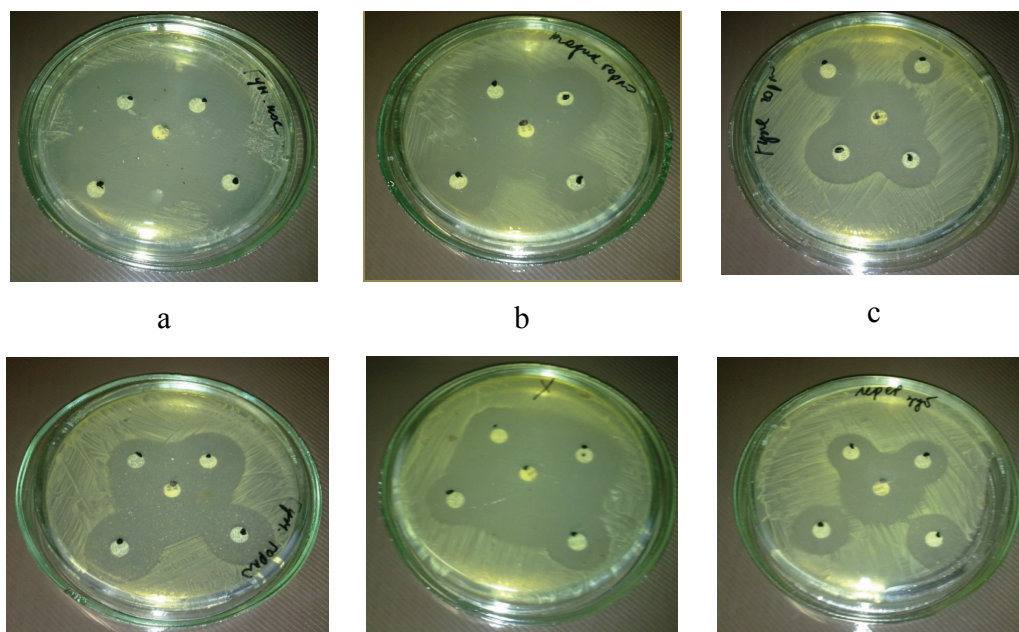
Fig. 3. Resistance of isolated *S. aureus* strains to  $\beta$ -lactam antibiotics

Серед виділених культур 15,2% були резистентні до азлоциліну, 51,5% – до ампіциліну, 12,1% – до ампіциліну/сульбактаму, 3,3% – до карбеніциліну, 63,6% – до оксациліну, 60,6% – до пеніциліну, 36,4% – до цефіксиму, 100% – до цефоперазону, 69,7% – до цефотаксиму, 100% – до цефтазидіму, 72,7% – до цефтріаксону, 6,1% – до цефуроскиму, 9,1% – до цефепіму (рис. 3).

Таким чином, найбільший рівень резистентності спостерігався до пеніцилінів і цефалоспоринів 3–4 покоління. До цефалоспоринів 1 та 2 поколінь, карбапенемів та інгібіторозахищених  $\beta$ -лактамів були чутливі 100% культур.

Для визначення у виділених штамів здатності до синтезу  $\beta$ -лактамаз відібрали культури, резистентні щонайменш до третини використаних антибіотиків. Таких культур було шість.

При визначенні продукції  $\beta$ -лактамаз методом подвійних дисків позитивний результат показали 5 штамів (рис. 4, а–е), негативним був лише один (рис 4, f)



**Рис. 4.** Визначення здатності до синтезу  $\beta$ -лактамаз у виділених штамів *S. aureus*  
Примітка: а–е – позитивний результат тесту, f – негативний результат тесту, схема розташування дисків наведена на рис. 1.

**Fig. 4.** The detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in isolated *S. aureus* strains  
Note: a–e – positive result of the test, f – negative result of the test, the scheme of disk arrangement is shown on Fig. 1.

Розширені зони пригнічення росту між одним або декількома дисками з  $\beta$ -лактамами і диском, який містить клавуланову кислоту, вказує на вироблення  $\beta$ -лактамаз. Незалежно від абсолютних значень діаметрів зон пригнічення росту штамми, які продукують подібні ферменти, вважаються резистентними до всіх пеніцилінів, цефалоспоринів (за виключенням цефаміцинів) і монобактамів [6].

Для подальших досліджень відібрали штам *S. aureus* 17, який виявив резистентність до 11 використаних  $\beta$ -лактамів. Як тест-антибіотик було обрано пеніцилін. Показано, що МІК пеніциліну для тест-штаму складала 48 мкг/мл. МІК сполуки I дорівнювала 160 мкМ, сполуки II – 80 мкМ.

Культуру тест-штаму вирощували за присутності комбінацій різних концентрацій пеніциліну, які були меншими за МІК, та досліджуваних сполук I і II в концентраціях 10 та 20 мкМ. У результаті цих досліджень було визначено комбінації, які викликали повне пригнічення росту *S. aureus* 17.

Установлено, що за присутності досліджуваних сполук МІК пеніциліну знижувалася до 1,5 мкг/мл, тобто, у 32 рази (рис. 5).



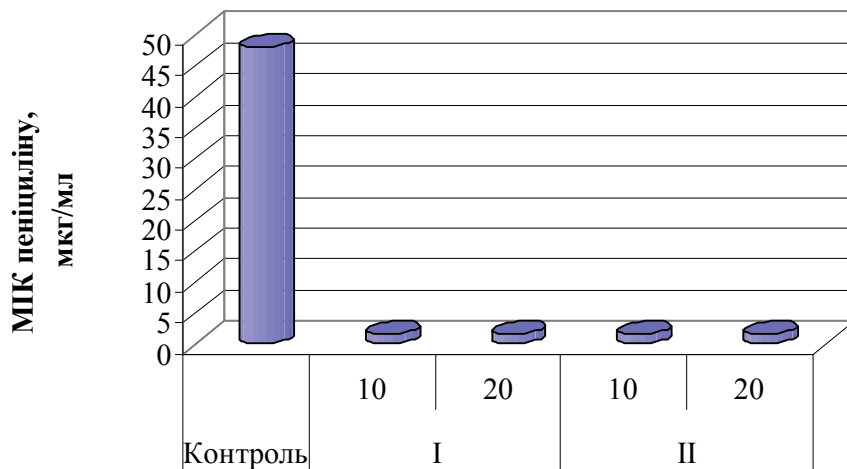


Рис. 5. Вплив досліджуваних сполук на МІК пеніциліну щодо тест-штаму *S. aureus* 17

Примітка: I, II – сполуки I та II,  
10, 20 – концентрація сполук I та II, мкМ.

Fig. 5. The influence of studied compounds on MIC of penicillin for test-strain *S. aureus* 17

Note: I, II – compounds I and II,  
10, 20 – the concentration of compounds I and II, μM.

На сьогоднішній день коло інгібіторів, здатних пригнічувати ферментативну інактивацію β-лактамних антибіотиків, дуже обмежене. Крім того, за своєю хімічною будовою інгібітори належать до β-лактамів, що може викликати виникнення у мікроорганізмів здатності до руйнування й самої молекули інгібітора [10]. У зв'язку з цим пошук інгібіторів серед сполук з принципово іншим типом будови цілком виправданий. У роботах Siemann та співавт. [15] доведено ефективність аурилсульфонілгідразонів як інгібіторів метало-β-лактамаз. Цими дослідниками показано здатність гідразонів проявляти афінитет до атому цинку, тобто, блокувати активний центр ферменту. Наявність подібної активності у комплексу стануму (IV) з ізонікотиноїлгідразоном 2-гідроксинафталдегіду також цілком ймовірна.

Крім того, відомо, що гени, які кодуєть лактамази грампозитивних бактерій, зазвичай іммобілізовані на позахромосомних генетичних елементах [6, 10], тому іншим вірогідним механізмом підвищення чутливості тест-штаму до пеніциліну є взаємодія з плазмідною ДНК.

Таким чином, в ході дослідження з верхніх дихальних шляхів здорових людей виділено 33 штами *S. aureus*, у яких найбільший рівень резистентності спостерігався до пеніцилінів і цефалоспоринів 3-4 покоління. У п'яти штамів виявлено здатність до синтезу β-лактамаз. Показано, що за присутності дослідженого гідразону та комплексу стануму (IV) МІК пеніциліну для штаму

*S. aureus* 17, стійкого до 11 з використаних β-лактамів, знижувалася в 32 рази. Отже, використані в роботі сполуки N-диметиламінобензальдегіду (сполука I), комплекс стануму (IV) з ізонікотиноілгідрозоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (сполука II) мають потенційну здатність до подолання стійкості грампозитивних бактерій до β-лактамних антибіотиків.

УДК 615.012.1:547.789/.793

**О.Ю. Зинченко, Н.В. Шматкова, И.И. Сейфуллина,  
В.А. Лерер**

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

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИЗОНИАЗИДА  
НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЛАКТАМАЗПРОДУЦИРУЮЩИХ  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* К ПЕНИЦИЛЛИНУ**

**Реферат**

**Цель.** Выявление способности к синтезу β-лактамаз у штаммов *S. aureus*, выделенных из верхних дыхательных путей людей, а также определение изоникотиноилгидразона *n*-диметиламинобензальдегида и комплекса олова с изоникотиноилгидразоном 2-гидрокси-1-нафтальдегида на чувствительность этих штаммов к пенициллину. **Методы.** В работе использовали микробиологические методы: диско-диффузионный, метод двойных дисков и серийных разведений, а также статистические методы анализа данных. **Результаты.** Из верхних дыхательных путей здоровых людей выделены 33 штамма *S. aureus*, у которых самый высокий уровень резистентности наблюдался к пенициллинам и цефалоспорином 3–4 поколения. У пяти штаммов выявлена способность к выработке β-лактамаз. Показано, что в присутствии исследуемого гидразона и комплекса олова (IV) МИК пенициллина для штамма *S. aureus* 17, устойчивого к II из использованных β-лактамов, снижается в 32 раза. **Выводы.** Исследованный гидразон и комплекс олова (IV) обладают потенциальной способностью преодолевать устойчивость грамположительных бактерий к β-лактамным антибиотикам.

**Ключевые слова:** резистентность, β-лактамаза, *Staphylococcus aureus*, минимальная ингибирующая концентрация (МИК), ингибитор, гидразоны, комплексы олова (IV).



**O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.Y. Seifullina, V.O. Lerer**

Odesa Mechnykov Naional University,  
2, Dvorjanska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: farmikr@ukr.net

## INFLUENCE OF IZONIAZIDE DERIVATIVES ON LACTAMASE-PRODUCING *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SENSITIVITY TO PENICILLIN

### Summary

**Aim.** The detection of the ability of *S. aureus* strains isolated from human upper airways to  $\beta$ -lactamase production and determination of the effect of *p*-dimethylaminobenzaldehyde isonicotinoylhydrazone and Sn(IV) complex with 2-hydroxyinaphthaldehyde isonicotinoylhydrazone on the sensitivity of lactamase-producing strains to penicillin.

**Methods.** We have used the microbiological methods: disc-diffusion, double-disc and serial dilution methods and statistical data analysis. **Results.** 33 *S. aureus* strains with the highest resistance to penicillins and III-IV generation cephalosporins have been isolated from the upper airways of healthy people. The ability to synthesize  $\beta$ -lactamases has been detected in 5 strains. It has been shown 32-fold decrease of MIC of penicillin for *S. aureus* 17 in the presence of studied hydrazone and Sn (IV) complex. **Conclusions.** Studied hydrazone and Sn (IV) complex have the potential ability to overwhelm the resistance of Gram-positive bacteria to  $\beta$ -lactam antibiotics.

*Key words:* resistance,  $\beta$ -lactamase, *Staphylococcus aureus*, minimum inhibitory concentration (MIC), inhibitor, hydrazone, Sn (IV) complex.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зинченко О.Ю., Шматкова Н.В., Сейфуллина И.И., Галкин Б.Н., Филлипова Т.О. Антимикробная активность производных изоникотиновой кислоты и комплексов олова(IV) на их основе // Микробиология и биотехнология. – 2013. – № 2. – С. 69–78.
2. Лазоришинець В.В., Мрієвський В.Ф., Салманов А.Г. та ін. Антибіотикорезистентність клінічних штамів *Enterobacter spp.* в хірургічних стаціонарах України в 2010 році // Ліки України. – 2011. – № 2 (5). – С. 34–38.
3. Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.
4. Сейфуллина И.И., Шматкова Н.В. Новый этап в развитии координационной химии ароил-(пиридиноил)гидразонов замещенных бенз-(1-нафт)альдегидов // Вісник ОНУ. – 2008. – Т. 13, № 2. – С. 5–26.
5. Сейфуллина И.И., Шматкова Н.В., Зубатюк Р.И., Шишкин О.В., Мазена А.В. Комплексы Sn(IV) с пикотиноилгидразонами 2-гидроксибенз-(2-гидроксинафт)альдегидов ( $H_2Ps$ ,  $H_2Pnf$ ). Кристаллическая структура  $[SnCl_3(Ps\ H)]CH_3OH$  и  $[SnCl_3(Pnf\ H)]CH_3OH$  // Журнал неорган. химии. – 2013. – Т. 58, № 1. – С. 29–35.



6. Сидоренко С.В. Метициллинрезистентные стафилококки // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – № 11. – С. 57–69.
7. Сидоренко С.В. β-лактамазы расширенного спектра: клиническое значение и методы детекции // Инфекция и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 15–28.
8. Унифицированные схемы методов лабораторных исследований при выделении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. – Оренбург: МЗ СССР, 1988. – С. 42.
9. Шматкова Н.В., Сейфулліна И.И., Зинченко О.Ю. Синтез, строение и противомикробная активность хелатов  $\text{SnCl}_4$  с пиридинойгидразонами ароматических альдегидов // Укр. хим. журнал. 2013. – Т. 79, № 3. – С. 33–39.
10. Bradford P. Extended-Spectrum-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat // Clinical Microbiology Reviews. – 2001. – Vol. 14, No. 4. – P. 933–951.
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement // CLSI document M100-S17. – 2007. – Vol. 27, No. 1. – 180 p.
12. Gunjan J., Bhadauria R.S., Diwaker A.K. Synthesis, spectral and biological valuation of some hydrazone derivatives // IJARPB. – 2012. – Vol. 1, № 1. – P. 25–38.
13. López-Torres E., Zani F., Mendiola M.A. Antimicrobial activity of organotin(IV) complexes with the ligand benzil bis(benzoylhydrazone) and 4,4'-bipyridyl as coligand // J. Inorg. Biochem. – 2011. – Vol. 105. – P. 600–608.
14. Rashan L.J., Aziz A.A., Sulayman K.D. Antibacterial activity of diorganotin (IV) complexes of some Schiff-base derivatives // Asian J. Chem. – 1998. – Vol. 10. – P. 338–341.
15. Siemann S., Evanoff D.P., Marrone L., Clarke A.J., Viswanatha T., Dmitrienko G.I. N-arylsulfonyl hydrazones as inhibitors of IMP-1 metallo-beta-lactamase // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. – Vol. 46, No. 8. – P. 2450–2457.

Стаття надійшла до редакції 07.07.2014 р.





**І.О. Герасименко, І.К. Курдиш**

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
тел.: +38(044)526 90 11, e-mail:Kurdish@serv.imv.kiev.ua

## **ВПЛИВ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА ДЕГІДРОГЕНАЗНУ АКТИВНІСТЬ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023**

**Мета.** Дослідження впливу деяких фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023. **Методи:** бактерії вирошували в умовах періодичного культивування. Дегідрогеназну активність оцінювали за відновленням в анаеробних умовах 2,3,5-трифенілтетразолій хлориду до трифенілформазану, вміст якого визначали фотоколориметрично. **Результати:** Встановлено, що найвищих значень дегідрогеназна активність набуває у *Bacillus subtilis* IMB B-7023 за температури 37 °С в середовищі, що має рН 7,0. Найбільш високі показники дегідрогеназної активності були отримані за вмісту в ньому 10 г/л глюкози. Встановлено, що іони  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$  стимулювали дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023, а іони  $Fe^{3+}$ , навпаки, пригнічували її. **Висновки.** Висока чутливість дегідрогеназного комплексу цих бактерій до фізико-хімічних факторів середовища може використовуватися для прогнозування активності даного штаму за дії певних факторів середовища при його застосуванні у складі комплексного бактеріального препарату в агроєкосистемах.

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis*, фізико-хімічні фактори, дегідрогеназна активність.

Дегідрогеназний комплекс мікроорганізмів є одним з основних компонентів енергетичного метаболізму клітин та їх функціонування. До його складу входять піридинзалежні дегідрогенази, коферментами яких є НАД або НАДФ і флавінзалежні дегідрогенази з простетичними групами ФАД або ФМН [4].

Дегідрогеназний комплекс мікроорганізмів є досить чутливим до будь-яких змін в умовах оточуючого середовища. На показники його активності спричиняє помітний вплив концентрація джерел вуглецевого живлення і енергії, температура середовища, вміст різних хімічних речовин, які можуть інтенсифікувати або сповільнювати метаболічні процеси мікроорганізмів [8–12]. Тому дегідрогеназна активність вважається індикатором функціонального стану мікробних популяцій і їх окиснювальної активності [10–12].

Вплив цих факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* IMB B-7023, що є компонентом комплексного бактеріального препарату для рослинництва [2], не визначався, що не дозволяє прогнозувати можливі зміни



фізіолого-біохімічної активності цих бактерій в агроекосистемах за дії певних факторів середовища.

Зважаючи на це, метою роботи було дослідження впливу деяких фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 [6], що застосовується для виготовлення комплексного бактеріального препарату для рослинництва. Бактерії вирощували протягом 24 год при 28°C і перемішуванні (240 об/хв) в 750 мл колбах Ерленмейера, в які вносили по 100 мл рідкого живильного середовища Спізізена [13].

Отриману суспензію бактерій осаджували на центрифугі ОПН-8 при 6600 g протягом 15 хв за кімнатної температури. Клітини ресуспендували у буфері з певним значенням рН, оптичну густину (ОГ) доводили до 0,5 од, використовуючи фотоколориметр КФК-2МП, довжина оптичного шляху 5 мм і  $\lambda=540$  нм.

Визначення дегідрогеназної активності проводили, застосовуючи метод відновлення безбарвної солі 2,3,5-трифенілтетразолій хлориду (ТТХ) в червону сполуку трифенілформазан (ТФФ) в анаеробних умовах [1, 5] з наступною екстракцією ТФФ етиловим спиртом. Для визначення дегідрогеназної активності в пробірці Тунберга вносили 2 мл бактеріальної суспензії, по 1 мл 2% розчину глюкози, а в боковий відросток – 0,5 мл 1% розчину ТТХ. Після цього пробірки закривали, вакуумували, вміст бокового відростку переливали в їх головне відділення, суміші інкубували за відповідних температур протягом 1 год. Потім до вмісту пробірок Тунберга додавали 5 мл 96 % етанолу, енергійно струшували і залишали на 20 хв для екстракції формазану. Отриману суміш центрифугували 15 хв при 6600 g. У супернатанті визначали ОГ при  $\lambda=490$  нм, використовуючи кювети 10 мм. Кількість ТФФ визначали за калібрувальною кривою. Результати перераховували на суху біомасу бактерій (СБ), яку визначали ваговим методом та за стандартною кривою залежності біомаси від ОГ суспензії. Дегідрогеназну активність виражали у мг ТФФ/г<sup>-1</sup> СБ·год<sup>-1</sup>.

При визначенні впливу різних значень рН на дегідрогеназну активність суспензії бактерій готували у фосфатних буферних системах, що мали рН 5,0; 6,0; 7,0 і 8,0. На основі зазначених буферів готували розчини глюкози для реакційних сумішей. Дегідрогеназну активність визначали за вищеописаною методикою при температурі 28 °С.

Для визначення впливу на дегідрогеназну активність концентрації глюкози її вносили в реакційне середовище в концентраціях 1, 5, 10 і 20 г/л.

Вплив катіонів Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> визначали з використанням хлоридів даних солей. Усі розчини готували на основі тріс-НСІ буфера рН 7,1. Після культивування бактерії двічі відмивали у тріс-НСІ буфері, готували суспензію з заданою ОГ 0,8 од. Отриману суспензію додавали у пробірки по 2 мл, також додавали по 1 мл розчини солей певних концентрацій, 1 мл 2% розчину глюкози і визначали дегідрогеназну активність за описаною вище методикою. Всі досліди



проводили тричі у трьох і більше повторностях. Результати досліджень підлягали статистичній обробці, визначаючи довірчий інтервал середніх показників при вірогідності 95% [ 3 ].

### Результати та обговорення

Досліджено залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від температури інкубування бактерій. Встановлено, що за її підвищення від 18 до 28 °С дегідрогеназна активність зростала на 50% (рис. 1). Найвищих значень цей показник досягав за температури 37°С. При її підвищенні до 50 °С дегідрогеназна активність знижувалася на 24%. Таким чином, температурний оптимум для прояву дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 (37°С) не співпадає з оптимальними значеннями цього показника для росту даного штаму бактерій.

Значний вплив на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняло рН середовища. Максимальних значень вона досягала при рН 7,0. В середовищі, що мало рН 6,0 їх дегідрогеназна активність знижувалася на 41% (рис. 2), а при рН 5,0 спостерігалася майже повне пригнічення цієї активності. В лужному середовищі (при рН 8,0) також відбувалося зниження дегідрогеназної активності бацил, однак воно було менш помітним, ніж за рН 6,0. Таким чином, отримані результати свідчать про те, що оптимальні значення рН для прояву дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 співпадають з відповідними його значеннями для росту даних бактерій.

мг ТФФ·г<sup>-1</sup> СБ·год<sup>-1</sup>

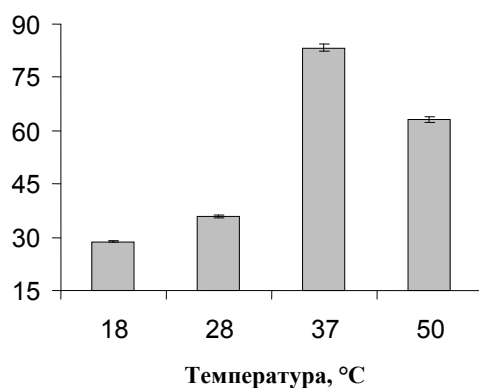
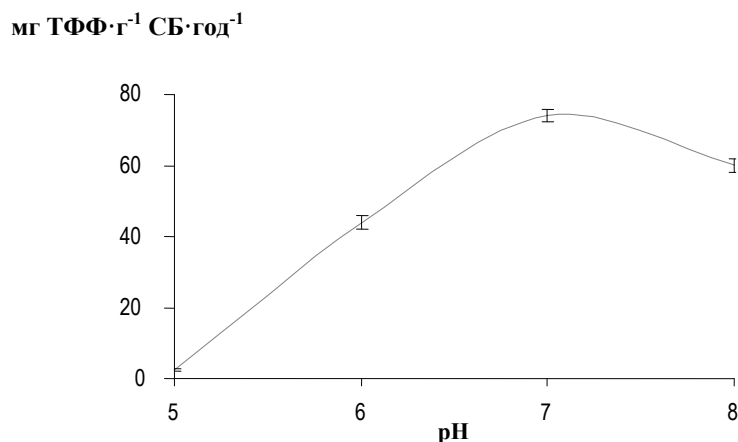


Рис. 1 Вплив температури на дегідрогеназну активність *B. subtilis*

Fig. 1. Influence of temperature on dehydrogenase activity of *B. subtilis*

Показано, що найбільш високих значень дегідрогеназна активність *B. subtilis* досягає при вмісті у реакційній суміші 10 г/л глюкози (табл. 1). За зменшення її концентрації до 5 та 1 г/л досліджуваній показник знижувався, відповідно, на 20,0% та 27,4%. Підвищення вмісту глюкози в середовищі до 20 г/л також супроводжувалося зниженням дегідрогеназної активності майже на 11%.

Рис. 2. Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* від рН середовищаFig. 2. Dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* on pH medium

Значний вплив на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняє вміст в середовищі деяких катіонів. Було встановлено, що внесення в середовище досліджених концентрацій  $Mg^{2+}$  у вигляді  $MgCl_2$  супроводжувалося стимулюванням дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023. Так, за внесення 0,25–1,0 мМ іонів магнію дегідрогеназна активність зростала по відношенню до контролю на 23 і 43%, відповідно. Найвищих значень цей показник досягав при вмісті в середовищі 10 мМ іонів магнію. Подальше збільшення концентрації магнію супроводжувалося зниженням його стимулювальної дії. Однак, навіть за вмісту в середовищі 30 мМ магнію дегідрогеназна активність бактерій була на 34% вищою від показників у контролі.

Таблиця 1

Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від концентрації глюкози в середовищі

Table 1

Dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* IMB B-7023 on glucose concentration in the medium

Штам	Дегідрогеназна активність (мг ТФФ/ г <sup>-1</sup> СБ· год <sup>-1</sup> ) за вмісту глюкози, г/л			
	1	5	10	20
<i>B. subtilis</i> IMB B-7023	52,6 ± 1,8	57,9 ± 1,2	72,5 ± 2,0	64,7 ± 1,9

Ще більш помітний стимулювальний вплив на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняли катіони кальцію. За вмісту в середовищі 0,25 мМ іону показник цієї ферментативної активності зростав на 29% (табл. 2).



Таблиця 2

Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від вмісту катіонів магнію та кальцію в середовищі

Table 2

dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* IMB B-7023 on magnesium and calcium content in the medium

Досліджуваний катіон	Дегідрогеназна активність (мг ТТФ/г <sup>-1</sup> СБ·год <sup>-1</sup> ) у залежності від вмісту катіонів, мМ					
	0-контроль	0,25	0,50	1,00	10,00	20,00
Mg <sup>2+</sup>	35,0±3,1	43,2±1,5	47,8±1,9	50,0±2,7	54,3±1,4	52,0±2,3
Ca <sup>2+</sup>	31,3±1,7	40,5±2,6	50,4±1,8	57,2±4,1	61,5±1,6	57,2±4,0

При подальшому підвищенні концентрації кальцію до 0,5 і 1,0 мМ дегідрогеназна активність зростала порівняно з контролем на 61 і 83%. Найвищі її значення були отримані за внесення в середовище 10 мМ іонів кальцію. Подальше підвищення його концентрації в середовищі супроводжувалося зниженням стимулювальної дії цього катіону на дегідрогеназну активність *B. subtilis* IMB B-7023 (табл. 2). Подібні закономірності впливу катіонів Mg<sup>2+</sup> та Ca<sup>2+</sup> на дегідрогеназну активність мікроорганізмів характерні й для інших видів мікроорганізмів [6, 7].

В той же час, внесення у середовище інкубування досліджуваного штаму бацил катіонів тривалентного заліза (у вигляді хлориду) супроводжувалося зниженням дегідрогеназної активності (рис. 3). За вмісту 0,125 мкМ Fe<sup>3+</sup> показник цієї активності знижувався на 37%.

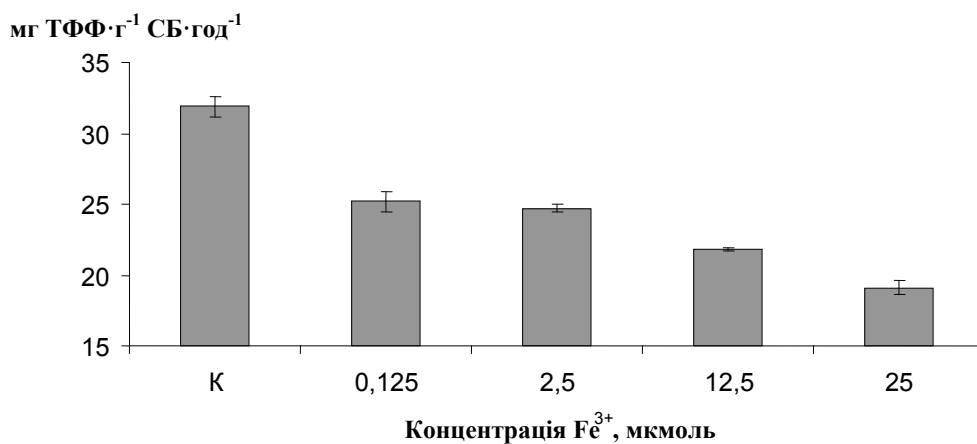


Рис. 3. Залежність дегідрогеназної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від вмісту в середовищі Fe<sup>3+</sup>

Fig. 3. Dehydrogenase activity dependence of *B. subtilis* IMB B-7023 on Fe<sup>3+</sup> content in the medium

Подальше підвищення концентрації даного катіону в середовищі супроводжувалося зниженням дегідрогеназної активності, значення якої при вмісті 25 мкМ  $Fe^{3+}$  складало, по відношенню до контролю, лише 24%.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було встановлено, що найвищих показників дегідрогеназна активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 досягає при температурі 37 °С та рН 7,0 за вмісту в інкубаційному середовищі 10 г/л глюкози. Внесення іонів  $Mg^{2+}$  і  $Ca^{2+}$  підвищує дегідрогеназну активність *B. subtilis* ІМВ В-7023, а іонів  $Fe^{3+}$  – навпаки, знижує її показники. Результати дослідження свідчать про високу чутливість дегідрогеназного комплексу *B. subtilis* ІМВ В-7023 до впливу ряду фізико-хімічних факторів середовища. Цей показник може використовуватися для прогнозування активності даного штаму в агроекосистемах за його застосування у складі комплексного бактеріального препарату в конкретних ґрунтово-кліматичних умовах.

### І.А. Герасименко, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, ул. Академіка  
Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03689, Україна,  
тел.: +38(044)526 90 11, e-mail: [Kurdish@serv.imv.kiev.ua](mailto:Kurdish@serv.imv.kiev.ua)

## ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7023

### Реферат

**Цель.** Исследование влияния некоторых физико-химических факторов на дегидрогеназную активность *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023. **Методы.** Бактерии выращивали в условиях периодического культивирования. Дегидрогеназную активность оценивали по восстановлению в анаэробных условиях 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида до трифенилфор-мазана, содержание которого определяли фотокolorиметрически. **Результаты.** Показано, что наивысших значений дегидрогеназная активность достигает у данного штамма при температуре 37 °С в среде, имеющей рН 7,0. Наиболее высокие показатели дегидрогеназной активности были получены при содержании в ней 10 г/л глюкозы. Установлено, что ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  стимулировали дегидрогеназную активность *Bacillus subtilis*, а ионы  $Fe^{3+}$ , напротив, угнетали ее. **Выводы.** Высокая чувствительность дегидрогеназного комплекса этих бактерий к физико-химическим факторам среды может использоваться для прогнозирования активности данного штамма при действии некоторых факторов среды в процессе его применения в составе комплексного бактериального препарата в агроэкосистемах.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, физико-химические факторы, дегидрогеназная активность.





**I.O. Herasymenko, I.K. Kurdish**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine,  
tel.:+38(044)526 90 11, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

## INFLUENCE OF PHYSICOCHEMICAL FACTORS ON DEHYDROGENASE ACTIVITY OF *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

### Summary

**Aim.** The investigation of the influence of some physicochemical factors on dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis* IMB B-7023. **Methods.** The bacteria were cultivated in the periodic process. Dehydrogenase activity was evaluated on reduction of 2,3,5-tetrazolium chloride to triphenylphormazane, the concentration of which was determined by photocolorymetrical methods. **Results.** It was defined that dehydrogenase activity reached the greatest significance in the given strain at the temperature of 37 °C in the media having pH 7.0. The highest indices of dehydrogenase activity have been obtained in the content of 10 g/l glucose in it. It was determined that ions of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  have stimulated dehydrogenase activity of *Bacillus subtilis*, and ions of  $Fe^{3+}$ , on the contrary, suppressed it. **Conclusion.** Actual presence of high sensitiveness of the dehydrogenase complex of these bacteria to physicochemical factors of the environment can be used for making up the prognoses of the given strain activity under certain factors of the environment in its use as a complex bacterial preparation in agroecosystems.

*Key words:* *Bacillus subtilis*, physicochemical factors, dehydrogenase activity.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Инишева Л.И., Ивлева С.Н., Щербакова Т.А. Руководство по определению ферментативной активности торфяных почв и торфов. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2002. – 119 с.
2. Курдиш И.К. Интродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми. – Київ: Наукова думка, 2010. – 253 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.
4. Ленинджер А. Биохимия. М.: – Мир, 1974. – 956 с.
5. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)/ Под ред. Прохоровой М.И. – Ленинград: изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.
6. Патент України № 54923 А. Штам *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. / Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
7. Практикум по агрохимии / Под ред. академика РАСХН В.Г. Минеева. – Москва: Изд-во МГУ, 2001. – 689 с.
8. Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Бабкина С.С., Кутырева М.П., Гатаулина А.Р. Металлы в живых организмах. – Казань: Казанский ун-т, 2012. – 102 с.
9. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. – 252 с.



10. *Camina F., Trasar-Cepeda C., Gil-Sotres F., Leiros C.* Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter// *Soil. Biol. Biochem.* –1998. – 30, N 8/9. – P. 1005–1011.

11. *Mathew M., Obbard J.P.* Optimization of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum// *Biotechnol. Lett.* – 2001. – 23. –P. 227–230.

12. *Nweke C.O., Alisi C.S., Okolo J.S., Nwanyanwu C.E.* Toxicity of zinc to heterotrophic bacteria from a tropical river sediment // *Appl. Ecol. and Environm. Res.* – 2008. – 5. № 1. – P. 123–132.

13. *Spizizen J.* Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1958. – 44. – P. 1072–1078.

Стаття надійшла до редакції 08.09.2014 р.



**С.В. Кузьмішина, С.О. Гнатуш, В.І. Баранов**

Львівський національний університет імені Івана Франка,  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: +38 (0322) 39 43 57, e-mail: kuzmishyna\_S\_@ukr.net

## **МІКРОБІОТА ПОРОДНОГО ВІДВАЛУ ЦЕНТРАЛЬНОЇ ЗБАГАЧУВАЛЬНОЇ ФАБРИКИ ЧЕРВОНОГРАДСЬКОГО ГІРНИЧОПРОМИСЛОВОГО РАЙОНУ ЗА ВНЕСЕННЯ ЗОЛИ**

**Мета.** Встановити вплив внесення золи із Добротвірської ТЕС до породи відвалу на чисельність окремих груп мікроорганізмів. **Методи.** Мікроскопічні гриби виявляли на сусло-агарі; целюлозоруйнівальні аеробні бактерії – на середовищі Гетченсона; олігонітрофільні бактерії – на середовищі Ешбі; сульфатвідновлювальні та сірководновлювальні бактерії – на середовищах Кравцова-Сорокіна із сульфатами та сіркою відповідно; безбарвні сіркоокиснювальні бактерії: нейтрофільні – на середовищі Бейеринка, ацидофільні – на середовищі Сільвермана-Людвигена 9К. рН проб порід відвалу визначали з використанням рН-150М [1]. **Результати.** Визначено чисельність окремих груп мікроорганізмів породного відвалу Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) Червоноградського гірничопромислового району та показано залежність їх кількості від внесення золи із Добротвірської ТЕС. **Висновки.** Внесення золи із Добротвірської ТЕС до породи відвалу ЦЗФ (250 г/м<sup>2</sup>) сприятливо впливає на чисельність мікроскопічних грибів, олігонітрофільних бактерій та безбарвних сіркоокиснювальних нейтрофільних бактерій, однак спричиняє зниження чисельності сірко- і сульфатвідновлювальних бактерій, целюлозоруйнівальних аеробних бактерій, а також безбарвних сіркоокиснювальних ацидофільних бактерій.

*Ключові слова:* мікробіота породних відвалів, мікроскопічні гриби, бактерії, сірководновлювальні бактерії, сульфатвідновлювальні бактерії.

Червоноградський гірничопромисловий район Львівсько-Волинського кам'яновугільного басейну несе велике екологічно небезпечне навантаження, оскільки 211 га відведено під відвали порід. Породний відвал Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) має площу 76 га і висоту 68 м [3]. Субстрати відвалу характеризуються незадовільними гідрологічними та агрохімічними показниками, низьким вмістом органічних речовин (1–2%) [4]. Вміст йонів важких металів у багато разів перевищує ГДК, водні стоки з відвалу мають високу кислотність (рН 2,7–3,5) за рахунок утворення сульфатної кислоти при окисненні піриту (1–4%) [2].

Кількісний та якісний склад мікроорганізмів вугільних відвалів змінюється залежно від хімічного складу, фізичних властивостей, реакції середовища



(рН), вмісту в ньому повітря, вологи та поживних речовин [11]. Кислотність ґрунтів визначає життєдіяльність мікроорганізмів, впливаючи на доступність поживних речовин [6]. Надмірна кислотність ґрунтів пригнічує діяльність мікроорганізмів, що беруть участь у розкладанні органічних решток [11]. Поліпшення властивостей ґрунтів і зниження ґрунтової кислотності досягаються їх вапнуванням. Як вапняний матеріал доцільно використовувати золу, що знижує кислотність та збагачує субстрат органічними речовинами та мікроелементами, які впливають на нейтралізацію рН і життєдіяльність мікроорганізмів [6, 8]. Однак у районах із вологим кліматом ґрунти поступово повторно закислюються.

Відомо про зниження гідролітичної кислотності ґрунту за внесення висококальцієвмісної золи та попелу, отриманих при спалюванні бурого вугілля [5], про збільшення кількості амілолітичних та целюлозолітичних мікроорганізмів [9]. Відзначається зростання біорізноманітності деструкторів клітковини за внесення високих доз золи. Автори припускають, що показник мінералізації органічної речовини ґрунту досягає максимального значення у варіанті внесення у ґрунт 1000 кг золи на гектар [9]. Встановлено позитивний вплив вугільної золи на чисельність метанотрофних бактерій, мікроскопічних грибів і актиноміцетів та підвищення активності інвертази і фосфатаз за внесення золи у ґрунт у низьких дозах, а також як додаткових складових органічних компостів [12-15].

Метою нашого дослідження було встановити вплив внесення золи із Добровірської ТЕС до породи відвалу ЦЗФ на чисельність окремих груп мікроорганізмів.

### Матеріали і методи

Проби породи із ділянок, локалізованих під насадженнями *Pinus sylvestris* L. і *Betula pendula* L. (2–5 дерев) на схилах відвалу ЦЗФ аналізували у квітні 2014 року. У дослідні ділянки 2 і 4 вносили золу «під корінь» у вересні 2013 року, змішуючи її із субстратом (250 г/м<sup>2</sup>), навколо стовбура під 5-річними саджанцями дерев. Контролем були ділянки 1 (під *P. sylvestris*) і 3 (під *B. pendula*), у які золу не вносили. Отримані проби поміщали у стерильні пакети. На поживні середовища висівали розведені розчини проб, узятих із відвалів. Інкубували у термостаті за температури +28 °С [10]. Мікроскопічні гриби виявляли на сусло-агарі; целюлозоруйнівальні аеробні бактерії – на середовищі Гетченсона; олігонітрофільні бактерії – на середовищі Ешбі; сульфатвідновлювальні та сірководновлювальні бактерії – на середовищах Кравцова-Сорокіна із сульфатами та сіркою відповідно; безбарвні сірководновлювальні бактерії: нейтрофільні – на середовищі Бейєринка, ацидофільні – на середовищі Сільвермана-Люднгрена 9К [7, 10]. Підрахунок кількості колонієутворювальних одиниць (КУО/г ґрунту) проводили, враховуючи розведення та вологість ґрунтових проб, яку визначали за загальноприйнятою методикою [10]. рН проб порід відвалу визначали використовуючи електронний рН-150М [1].

Дослідження кислотності субстрату проводили у п'ятикратній, а посів на середовища – у трикратній повторностях. Для кожної проби визначали основні



статистичні показники (середнє арифметичне –  $M$ , стандартне відхилення від середнього арифметичного –  $m$ ,  $M \pm m$ , рівні достовірності ознак –  $\sigma$ ). Отримані результати опрацьовували статистично, використовуючи програму “Microsoft Excel 2007”.

### Результати та їх обговорення

Беручи до уваги, що рН субстратів впливає на електричний заряд мікробних клітин, стан їх мембран, окисно-відновні реакції, а з іншого боку рН залежить від складу мікроелементів у субстраті, визначали актуальну та потенційну кислотність, яка за характером витіснення йонів включає обмінну і гідролітичну, як в контрольному варіанті, так і при внесенні золи із Добротвірської ТЕС. Актуальна кислотність ( $pH_{\text{вод}}$ ) – це рН ґрунтового розчину. Потенційна кислотність – це кислотність твердої фази ґрунту за впливу  $H^+$  і  $Al^{3+}$ . Обмінна кислотність ( $pH_{\text{сол}}$ ) виявляється при взаємодії твердої фази ґрунту з нейтральними солями (KCl). Гідролітична кислотність (Нг) визначається при обробці ґрунту  $CH_3COONa$  і показує максимально можливу кількість  $H^+$  і  $Al^{3+}$ , що знаходяться в обмінному стані у ґрунті. Отже, за дії KCl та  $CH_3COONa$  відбувається поступове витіснення із ґрунтового вбирного комплексу у ґрунтовий розчин обмінних йонів алюмінію та гідрогену, що надає розчину кислу реакцію. Тому у природних ґрунтах потенційна кислотність вища, ніж актуальна [1].

Субстрати під *P. sylvestris* (без внесення золи) мали більш кислу реакцію, порівняно із дослідними варіантами (із внесенням золи). Зміну кислотності за внесення золи спостерігали і у субстратах під *B. pendula* (табл. 1).

Таблиця 1

**Вплив золи Добротвірської ТЕС на кислотність субстрату під *Pinus sylvestris* L. та *Betula pendula* L. на породному відвалі ЦЗФ**

Table 1

**Impact of coal ash from Dobrotvir TPP on substrate acidity value under *Pinus sylvestris* L. and *Betula pendula* L. on CEP waste heap**

Варіант	Кислотність		
	$pH_{\text{вод}}$	$pH_{\text{сол}}$	Нг
<i>Pinus sylvestris</i> L. (контроль)	4,4 ± 0,33	3,24 ± 0,005	6,24 ± 0,06
<i>P. sylvestris</i> (зола)	5,13 ± 0,39*	3,55 ± 0,09***	6,43 ± 0,07**
<i>Betula pendula</i> L. (контроль)	3,8 ± 0,08	2,92 ± 0,02	6,2 ± 0,04
<i>B. pendula</i> (зола)	4,34 ± 0,39*	3,01 ± 0,17	6,2 ± 0,06
Зола	8,43 ± 0,27	-	-

Примітки: CEP – Central Enrichment Plant

«-» – не визначали

(\* –  $p \geq 0,95$ ,  $n=5$ ; \*\* –  $p \geq 0,99$ ,  $n=5$ ; \*\*\* –  $p \geq 0,999$ ,  $n=5$  – вірогідність зміни порівняно із контролем)



Зниження рН при визначенні обмінної кислотності очевидно спричиняється тим, що утворюється хлористий алюміній, який є гідролітично кислою сіллю, і з його розпадом утворюється нова кількість йонів гідрогену, які і підкислюють розчин [1]. У досліджених зразках породи гідролітична кислотність виявилася нижчою, ніж обмінна. Очевидно, що антропогенно трансформований субстрат відвалів містить компоненти, які, взаємодіючи із ацетатом натрію, зв'язують йони алюмінію, що зумовлює зниження гідролітичної кислотності.

Проведені мікробіологічні дослідження проб породного відвалу ЦЗФ Червоноградського гірничопромислового району під насадженнями *P. sylvestris* і *B. pendula*. Аналізували проби породи відвалу без внесення золи (контроль; проби 1, 3) і з внесенням золи (проби 2, 4).

Внесення золи до породи відвалу зумовило підвищення чисельності мікроскопічних грибів, у т.ч. дріжджів, (рис. 1, А), порівняно із контрольними пробами, у які золу не вносили. Чисельність цієї групи мікроорганізмів є найвищою у дослідній пробі під *P. sylvestris* і вдвічі знижується у пробі під *B. pendula*. У пробах без внесення золи цей показник зменшується у три рази порівняно із дослідними пробами.

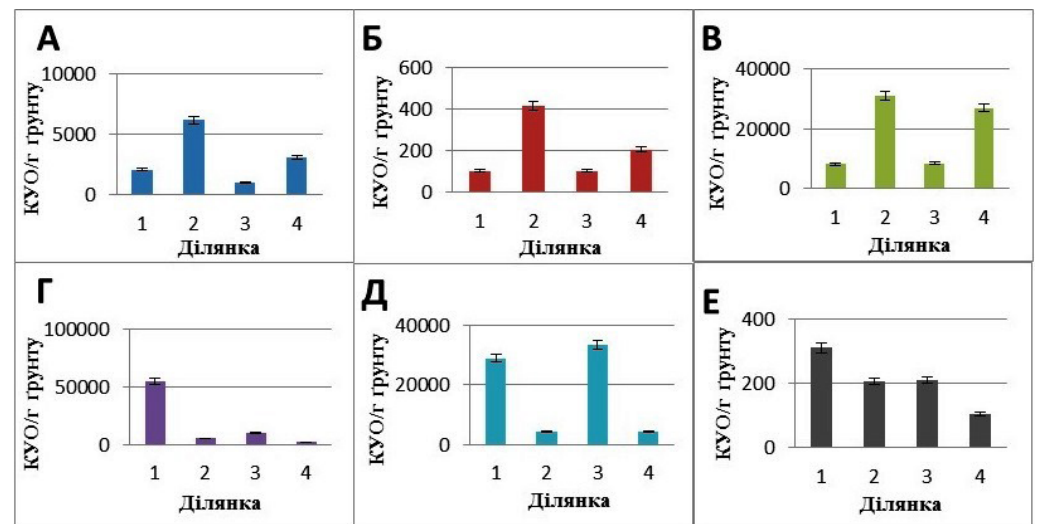


Рис. 1. Вплив золи на чисельність мікроорганізмів відвалу ЦЗФ

1 – *P. sylvestris* (контроль); 2 – *P. sylvestris* (внесення золи); 3 – *B. pendula* (контроль); 4 – *B. pendula* (внесення золи). А – мікроскопічні гриби, в т.ч. дріжджі; Б – безбарвні сіркоокиснювальні бактерії (нейтрофільні); В – олігонітрофільні бактерії; Г – сірковідновлювальні бактерії; Д – сульфатвідновлювальні бактерії; Е – безбарвні сіркоокиснювальні бактерії (ацидофільні)

Fig. 1. Impact of coal ash on microorganisms number of CEP waste heap

1 – the *P. sylvestris* (control); 2 – *P. sylvestris* (coal ash applying); 3 – *B. pendula* (control); 4 – *B. pendula* (coal ash applying). A – microscopic fungi (including yeasts); B – colorless sulfur oxidizing neutrophilic bacteria; C – oligonitrophilic bacteria; D – sulfur reducing bacteria; E – sulfate reducing bacteria; F – colorless sulfur oxidizing acidophilic bacteria





Кількість безбарвних сіркоокиснювальних нейтрофільних бактерій (рис. 1, Б) також була вищою у пробах із додаванням золи. У контрольних пробах без внесення золи чисельність цієї групи мікроорганізмів є нижчою: у 4 рази – у пробі під *P. sylvestris*, та у 2 рази – під *B. pendula*.

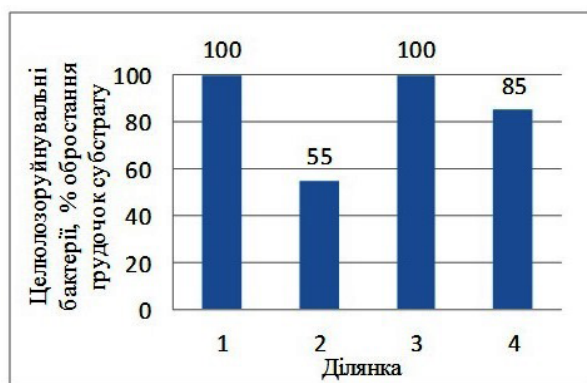
Для олігонітрофільних бактерій (рис. 1, В) відмітили чітко виражене їх домінування у дослідних пробах із внесенням золи. У контрольних пробах чисельність цих бактерій була втричі меншою, порівняно із дослідними пробами, і не перевищувала 9000 КУО/г ґрунту.

Для сірковідновлювальних бактерій (рис. 1, Г) встановили, що внесення золи спричиняє зниження їх чисельності порівняно із контрольними пробами: у 10,6 разів – під *P. sylvestris* та у 10 разів – під *B. pendula*. Окрім того, під *P. sylvestris* спостерігали збільшену у 5 разів чисельність сірковідновлювальних бактерій порівняно із кількістю цих мікроорганізмів під *B. pendula*.

Внесення золи спричинило негативний вплив і на чисельність сульфатвідновлювальних бактерій, знижуючи її приблизно у 6 разів (рис. 1, Д).

У пробах без внесення золи виявили близько 30000 КУО/г ґрунту, у той час як для дослідних проб кількість цих мікроорганізмів не перевищувала 5000 КУО/г ґрунту.

Кількість целюлозоруйнувальних аеробних бактерій аналізували методом обростання грудочок субстрату на середовищі Гетченсона. Загальну кількість грудочок приймали за 100% і вираховували у відсотках кількості грудочок, які обросли колоніями целюлозоруйнувальних бактерій. Встановлено, що внесення золи спричинило зменшення чисельності виявлених деструкторів целюлози: знижуючи даний показник до 85% – під *B. pendula* та 55 % – під *P. sylvestris*, порівняно з контролем (рис. 2).



**Рис. 2. Вплив золи на чисельність целюлозоруйнувальних аеробних бактерій відвалу ЦЗФ**

1 – *P. sylvestris* (контроль); 2 – *P. sylvestris* (внесення золи); 3 – *B. pendula* (контроль); 4 – *B. pendula* (внесення золи)

**Fig. 2. Impact of coal ash on cellulose decomposing aerobic bacteria number of CEP waste heap**

1 – *P. sylvestris* (control); 2 – *P. sylvestris* (coal ash applying); 3 – *B. pendula* (control); 4 – *B. pendula* (coal ash applying)

Таким чином встановлено, що внесення золи із Добротвірської ТЕС до породи відвалу ЦЗФ (250 г/м<sup>2</sup>) сприятливо впливає на чисельність мікроскопічних грибів, олігонітрофільних бактерій та безбарвних сіркоокиснювальних нейтрофільних бактерій, однак спричиняє зниження чисельності сірко- і сульфатвідновлювальних бактерій, целюлозоруйнівальних аеробних бактерій, а також безбарвних сіркоокиснювальних ацидофільних бактерій. Очевидно, що внаслідок зниження кислотності вихідного субстрату після внесення золи відбувається зміна едафічних умов.

**С.В. Кузьмишина, С.А. Гнатуш, В.І. Баранов**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,  
тел.: +38 (0322) 39 43 57, e-mail: kuzmishyna\_S\_@ukr.net,

## **МИКРОБИОТА ПОРОДНОГО ОТВАЛА ЦЕНТРАЛЬНОЙ ОБОГАТИТЕЛЬНОЙ ФАБРИКИ ЧЕРВОНОГРАДСКОГО ГОРНОПРОМЫШЛЕННОГО РАЙОНА ПРИ ВНЕСЕНИИ ЗОЛЫ**

### **Реферат**

**Цель.** Установить влияние внесения золы с Добротворской ТЭС к породе отвала на численность микроорганизмов различных групп. **Методы.** Микроскопические грибы учитывали на сусло-агаре; аэробные целлюлозоразрушающие бактерии – на среде Гетченсона; олигонитрофильные бактерии – на среде Эшби; сульфатвосстанавливающие и серовосстанавливающие бактерии – на средах Кравцова-Сорокина с сульфатами и серой соответственно; бесцветные сероокисляющие бактерии: нейтрофильные – на среде Бейеринка, ацидофильные – на среде Сильвермана-Людгрена 9К. рН проб пород отвала определяли с помощью рН-150М. **Результаты.** Определена численность различных групп микроорганизмов породного отвала Центральной обогатительной фабрики Червоноградского горнопромышленного района и показана зависимость их количества от внесения золы с Добротворской ТЭС. **Выводы.** Внесение золы с Добротворской ТЭС к породе отвала ЦОФ (250 г/м<sup>2</sup>) благоприятно влияет на численность микроскопических грибов, олигонитрофильных бактерий и бесцветных сероокисляющих нейтрофильных бактерий, однако приводит к снижению численности серо- и сульфатвосстанавливающих бактерий, аэробных целлюлозоразрушающих бактерий, а также бесцветных сероокисляющих ацидофильных бактерий.

**Ключевые слова:** микробиота породных отвалов, микроскопические грибы, аэробные целлюлозоразрушающие бактерии, олигонитрофилы, сероокисляющие бактерии, серовосстанавливающие бактерии, сульфатвосстанавливающие бактерии.



**S.V. Kuzmishyna, S.O. Hnatush, V.I. Baranov**

Ivan Franko National University of Lviv,  
4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine,  
tel.: +38 (0322) 39 43 57, e-mail: kuzmishyna\_S\_@ukr.net

## **MICROBIOTA OF THE CENTRAL ENRICHMENT PLANT WASTE HEAPS OF CHERVONOGRAD MINING REGION AFTER COAL ASH APPLYING**

### **Summary**

**Aim.** To determine the effect of coal ash from Dobrotvir thermal power plant to waste heaps gangue applying on the number of different groups of microorganisms. **Methods.** Microscopic fungi (including yeasts) were revealed on Mash-agar; cellulose decomposing aerobic bacteria – on Hetchenson medium; oligonitrophilic bacteria – on Ashby medium; sulfate and sulfur reducing bacteria – on Kravtsov-Sorokin media, with  $SO_4^{2-}$  and  $S^0$  respectively; colorless sulfur oxidizing bacteria: neutrophilic – on Beyerinck medium, acidophilic – on Silverman and Lundgren 9K medium. The pH of waste heaps gangue samples were determined by pH meter pH -150M. **Results.** Different groups of microorganisms from Central Enrichment Plant waste heap of Chervonograd mining region are enumerated and the dependence of their number on the coal ash applying is shown. **Conclusions.** Coal ash from Dobrotvir TPP to CEP waste heap gangue applying ( $250 \text{ g / m}^2$ ) makes a positive impact on the number of microscopic fungi, oligonitrophilic bacteria and on colorless sulfur oxidizing neutrophilic bacteria. Meanwhile coal ash applying causes decrease in the number of sulfur and sulphate reducing bacteria, cellulose decomposing aerobic bacteria and colorless sulfur oxidizing acidophilic bacteria.

*Key words:* waste heaps microbiota, microscopic fungi, cellulose decomposing aerobic bacteria, oligonitrophilic bacteria, sulfur oxidizing bacteria, sulfur reducing bacteria, sulfate reducing bacteria.

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ариунушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв. 2-е изд. – М.: МГУ, 1970. – 488 с.
2. Баранов В. І., Гузь, М. М., Гавриляк М. С., Ващук С. П. Вивчення вмісту важких металів у деревних рослин на декастованих ґрунтах породного відвалу вугільних шахт // Наук. вісн. НЛТУ України : зб. наук.-техн. пр. – Л., 2010. – 20, № 1. – С. 68–72.
3. Баранов В. І. Екологічний опис породного відвалу вугільних шахт ЦЗФ «ЗАТ Львівсистеменерго» як об'єкта для озеленення // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2008. – Вип. 46. – С. 172–178.
4. Баранов В. І., Книш І. Б. Хіміко-мінералогічний склад порід відвалу вугільних шахт ЦЗФ «Львівсистеменерго» та їх вплив на проростання насіння // Промислова ботаніка: стан та перспективи розвитку: матеріали V міжнар. наук. конф. – Донецьк, 2007. – С. 36–37.



5. Гібчинська М. А., Башуцька У. Б., Левандовська Л. В. Вплив золи бурого вугілля на фізичні властивості ґрунту // Науковий вісник НЛТУ України: зб. наук.-техн. пр. – Л., 2009. – 19, № 9. – С. 67–71.
6. Гордеева А. Зола в помощь [Електрон. ресурс] // Советская Белоруссия, 2012. – № 164. – Режим доступа к журналу: <http://www.sb.by/sad-i-ogorod/article/zola-v-pomoshch.html>.
7. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Яворська Г.В., Білінська І.С., Борсукевич Б.М. Практикум з мікробіології: підручник: [для студ. вищ. навч. закл.]. – Л: ЛНУ ім. І. Франка, 2014. – 436 с.
8. Зола вугільна [Електрон. ресурс] // Мала гірнича енциклопедія. В 3 т. / За ред. Білецького В. С. – Донецьк: Донбас, 2004. – 576 с. – Режим доступу: <http://www.experts.in.ua/baza/doc/download/gorZ.pdf>.
9. Коростелёва Л.А., Третьякова О.И., Доценко С.П., Исаева Т.А. Влияние отходов элеваторов и золы от их сжигания на микрофлору ризосферы, ризопланы и филлопланы озимой пшеницы [Электрон. ресурс] // Научный журнал КубГАУ, 2013. – 87, № 3. – Режим доступа к журналу: <http://ej.kubagro.ru/2013/03/pdf/40.pdf>.
10. Теплер Е. З., Шельникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. – 3-е изд. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239 с.
11. Ярошко М. Кислотність ґрунтів та її вплив на живлення рослин // Агроном. – 2013. – № 1. – С. 30–33.
12. Emmerling C., Liebner C., Haubold-Rosar M., Katur J. and Schröder D. // Plant and Soil. 220: 129-138, 2000.
13. Nayak AK., Raja R., Rao KS., Shukla AK. An others. Effect of fly ash application on soil microbial response and heavy metal accumulation in soil and rice plant// Ecotoxicol. Environ. Saf. May, 2014. ISSN 0147-6513.
14. Singh JS., Pandey VC. Fly ash application in nutrient poor agriculture soils: impact on methenotrophs population dynamics and paddy yields// Ecotoxicol. Environ. Saf. Mar., 2013; 89:43-51.
15. SurrIDGE AKJ., A. van der Merwe, Kruger R. Preliminary microbial studies on the impact of plants and South African fly ash on amelioration of crude oil polluted acid soils// World of coal Ash (WOCA) Conference. May, 4–7, 2009. – Lexington, KY, USA.

Стаття надійшла до редакції 20.10.2014 р.



**І.В. Драгоров<sup>1</sup>, Н.О. Леонова<sup>1</sup>, С.В. Лапа<sup>1</sup>, Л.А. Данкевич<sup>1</sup>,  
С.Ф. Падалко<sup>2</sup>, Л.В. Бобик<sup>2</sup>, Л.В. Авдєєва<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ МСП, 03680, Україна,  
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: igordragovoz@ukr.net

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, вул. Васильківська, 31/17,  
Київ, 03022, Україна

## **ФІТОСТИМУЛЮВАЛЬНА, АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ТА БІОЛОГІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ШТАМУ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7243**

**Мета.** Дослідити природу фітостимулювальної активності екзометаболітів штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7243, його антагоністичну активність та оцінити біологічну ефективність допосівної бактеризації сої в польових умовах. **Методи.** Фітогормональні сполуки визначали методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії, етилен – методом газової хроматографії, антагоністичну активність – методом радіальних штрихів проти збудників бактеріальних хвороб сої. **Результати.** Фітостимулювальна активність екзометаболітів *B. subtilis* ІМВ В-7243 зумовлена присутністю в їх складі фітогормонів-стимуляторів (ауксинів, цитокінінів). Показана здатність штаму проявляти середній та високий рівень антагонізму до збудників бактеріальних хвороб сої. **Висновки.** Наявність серед екзометаболітів фітогормонів-стимуляторів та певний рівень антагоністичної активності штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 щодо збудників бактеріальних хвороб сої позитивно впливає на біологічну ефективність в польових умовах.

*Ключові слова:* *Bacillus subtilis*, екзометаболіти, фітостимулювальна активність, фітогормони, антагоністична активність, соя.

Серед бактерій, що стимулюють ріст рослин (plant growth promoting rhizobacteria – PGPR-бактерії) на особливу увагу заслуговують аеробні споруотворювальні бактерії роду *Bacillus*, що характеризуються потужним біосинтетичним потенціалом в поєднанні з високою екологічною пластичністю (сапробіонти, епіфіти, ендofіти) [5, 7].

Відомо, що для PGPR-бактерій, зокрема, роду *Bacillus*, притаманним є позитивний (прямий і опосередкований) вплив на рослини. Вважається, що здатність до синтезу гормонів – одна з основних властивостей ризосферних, епіфітних, ендofітних і симбіотичних бактерій, що стимулюють ріст рослин [7, 9]. Тому дослідження фітостимулювальної та антагоністичної активностей бацил при створенні мікробних препаратів широкого спектру дії для рослинництва є досить актуальним.



У зв'язку з цим, метою роботи було дослідити природу фітостимулювальної активності екзометаболітів штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243, його антагоністичну активність та оцінити біологічну ефективність допосівної бактеризації сої в польових умовах.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *B. subtilis* ІМВ В-7243, що зберігається в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Штам виділений з ґрунту і є вільноіснуючим сапробіонтом. До його характерних особливостей слід віднести специфічну антагоністичну дію щодо фітопатогенних бактерій зернобобових культур. Як контроль використовували штам-еталон *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100, що є основою біопрепарату фітодоктор, дозволеного до використання в Україні, та застосовується для захисту зернобобових культур від хвороб.

Культивування *B. subtilis* ІМВ В-7243 проводили в колбах ємністю 750 мл при 200 об/хв за 37 °С впродовж 18–24 год на рідкому поживному синтетичному середовищі з рН до 6,5–7,0 такого складу (%): глюкоза – 2,00; натрію цитрат – 1,29; амонію фосфат двозаміщений – 4,75; калію фосфат однозаміщений – 9,60; натрію гідроксид – 0,18.

Середовище засівали 18-годинною культурою бацил в експоненційній фазі росту. Рідку культуру штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 з титром  $10^9$  КУО/мл центрифугували 30 хв при 15000g і температурі 4 °С. Надосадову рідину використовували для аналізу на загальну фітостимулювальну активність екзометаболітів, специфічного біотестування та якісного і кількісного визначення фітогормонів фізико-хімічними методами.

Для дослідження індукції ризогенезу використовували двотижневі живці квасолі сорту Лопата. Варіантами досліду були експериментально підібрані розведення 1:150, 1:200 культуральної рідини штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243. За контроль слугували відстояна водопровідна вода та препарат-еталон – індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) у концентрації  $10^{-5}$  М. Основними показниками фізіологічної активності досліджуваних розчинів слугували: кількість коренів, маса коренів та довжина ділянки, що утворювала корені.

Позаклітинні фітогормони виділяли з культуральної рідини штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 методом перерозподілу фітогормонів у двох фазах розчинників, що не змішуються між собою як описано в роботі [2]. Отримані екстракти (випарені та перерозчинені в етанолі) використовували для специфічного біотестування (ауксинова активність) і подальшого хроматографічного аналізу фітогормонів.

Для визначення ауксинової активності застосовували відрізки колеоптилів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський. Варіантами досліду були розведення екстрактів культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7243 1:200, 1:300, 1:400 та 1:500. За контроль слугували препарат-еталон – ІОК ( $10^{-5}$  М) та відстояна водогінна вода.





Отримані етанольні екстракти культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7243 використовували для проведення якісного і кількісного аналізу фітогормональних сполук методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [8]. Кількісне визначення ауксинів, цитокінінів та абсцизової кислоти (АБК) проводили за допомогою сканувального спектроденситометра «Сорбфіл» (Росія). Кількість синтезованих позаклітинних фітогормонів розраховували у мікрограмах на грам абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Етилен визначали методом газової хроматографії [13]. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі «Хром-5» (Чехія) з полум'яно-іонізаційним детектором (тверда фаза –  $\beta$ - $\beta'$  оксидопропіонітрил). Кількість етилену розраховували за калібрувальним графіком, побудованим згідно розведень етилену і виражали у молях за годину на грам АСБ продуцента. Експерименти проводили у 5-ти кратній повторності.

Антагоністичні властивості штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 та штаму *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 визначали методом радіальних штрихів [4]. Як тест-культури збудників бактеріальних хвороб сої використовували штами: *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (збудник пустульного бактеріозу або іржаво-бурої плямистості), *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (збудник кутастої плямистості), *Pseudomonas savastanoi* pv. *tabaci* (збудник дикого опіку), *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (збудник облямівчастої плямистості, поліфар) та *Pantoea agglomerans* (збудник смугастості стебла) у концентрації  $10^7$  КУО/мл. Зони затримки росту враховували через 24 год інкубації. Ступінь антагоністичної активності штамів визначали за розміром зон затримки росту культур фітопатогенних бактерій.

Польові досліді по визначенню ефективності дії штамів *Bacillus* проводили у дослідно-виробничому відділі ІФРГ НАН України, смт. Глеваха, Києво-Святошинський район. Насіння сої сорту Устя (сорт середньостійкий до бактеріальних хвороб) обробляли у вологий спосіб у день сівби суспензіями бактерій у концентрації  $1 \times 10^7$  КУО/мл штаму *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 та *B. subtilis* ІМВ В-7243. Насіння висівали на ділянках площею  $12,5 \text{ м}^2$  по 500 насінин на кожну. Повторність дослідів – 4-х кратна.

Динаміку захворювань та вплив біопрепаратів на врожайність сої аналізували відповідно до загальноприйнятих методик [6] у фазу сходів, цвітіння та наливу бобів. В польових умовах аналізували ураження рослин сої на кутасту плямистість, збудником якої є *P. savastanoi* pv. *glycinea*.

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



### Результати і обговорення

За попередніх досліджень загальної ростової активності екзометаболітів штаму *B. subtilis* IMB B-7243 на зернових культурах (озима пшениця, кукурудза, ячмінь) встановлено, що розведення культуральної рідини у 50–100 разів підвищували лабораторну схожість насіння та стимулювали нагромадження надземної маси та коренів у 7-денних проростків (неопубліковані дані).

Отримані результати показали позитивний вплив екзометаболітів штаму *B. subtilis* IMB B-7243 на ризогенез квасолі сорту Лопата (табл. 1). Препарат-еталон ІОК підвищував середню кількість та масу коренів на 9–13% відносно контролю. Аналогічна стимуляція ризогенезу спостерігалася при дослідженні розведення надосадової рідини 1:150. Відбувалося збільшення кількості коренів на 9% і приріст їх біомаси на 11%, відповідно. Обробка рослин розведенням 1:200 призводила до значного приросту (на 21%) кількості утворених коренів, середня маса їх при цьому зростала порівняно з контролем на 17%. Отримані дані свідчать про наявність фітостимулювальних речовин ауксинової природи серед екзометаболітів штаму *B. subtilis* IMB B-7243.

Специфічну ауксинову активність екзометаболітів штаму *B. subtilis* IMB B-7243 визначали за допомогою біотестування. Так, при дослідженні ауксинової активності показано приріст довжини колеоптилів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський з вираженою концентраційною залежністю (рис. 1), що свідчить про наявність у культуральній рідині штаму порівняно високої кількості ауксинів. Розведення екстракту у 200–500 разів призводило до стимуляції видовження колеоптилів на 8–22%, порівняно з контролем (вода). Максимальний прояв біологічної активності спостерігався за розведення екстракту у 400 разів, але він був дещо меншим за дії препарату-еталона ІОК (25%).

Таблиця 1

Вплив культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7243 на ризогенез живців квасолі сорту Лопата

Table 1

Influence of cultural liquid *B. subtilis* IMB B-7243 on bean cultivar Lopata rhizogenesis

Варіанти дослідів	Середня кількість коренів на рослину		Середня маса коренів на рослину	
	шт.	%	г	%
Контроль (обробка водою)	19,6±0,9	100	0,209±0,010	100
Індоліл-3-оцтова кислота, 10 <sup>-5</sup> М	22,1±1,3*	113	0,328±0,016*	109
Надосадова рідина <i>B. subtilis</i> IMB B-7243, розв. 1:150	21,4±1,2*	109	0,331±0,019*	111
Надосадова рідина <i>B. subtilis</i> IMB B-7243, розв. 1:200	23,8±1,7*	121	0,345±0,021*	117

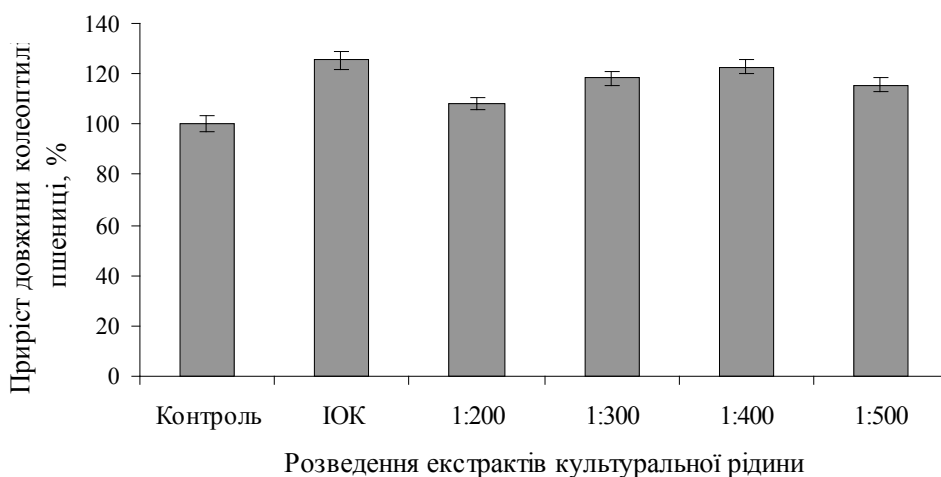
Примітка: \* – різниця достовірна відносно контролю при  $p < 0,05$ .

Note: \* – significant difference relative to control at  $p < 0,05$



Отже, отримані результати засвідчили присутність ауксинів серед екзо-метаболітів досліджуваного штаму, а прояв їх біологічної активності залежав від ступеня розведення екстракту.

Проведені дослідження показали, що штаму *B. subtilis* IMB B-7243 притаманний середній рівень синтезу ауксинів (121,6 мкг/г АСБ), серед яких фізіологічно активна ІОК складає лише 2,6% від загального пулу синтезованих сполук (рис. 2). Відомо, що здатність PGPR-бактерій синтезувати ауксини пов'язують зі стимуляцією росту коренів [15]. Для деяких видів рослин також показано, що низькі концентрації екзогенних ауксинів підвищують швидкість подовження коренів [14]. Ймовірно, досліджуваний нами сапробіонтний штам продукує ауксини за оптимальної для видовження коренів концентрації. На користь такого припущення свідчать результати, отримані при біотестуванні культуральної рідини.



**Рис. 1.** Приріст довжини відрізків колеоптилів озимої пшениці сорту Альбатрос одеський за дії екстрактів культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7243 за 24 год

**Fig. 1.** Growth of winter wheat coleoptels (cultivar Albatros odeskyi) under the extract influence of cultural liquid *B. subtilis* IMB B-7243 for 24 hours

Нами показано, що штам здатний до синтезу досить високого рівня цитокинінів (312,8 мкг/г АСБ), серед пулу яких більше 80% представлено транспортною формою – зеатин-рибозидом (рис. 2). Отримані дані свідчать про біологічні особливості досліджуваного штаму бацил, пов'язані, ймовірно, з формуванням ефективних взаємовідносин з рослиною через обмін екзометаболітами. Відомо, що при інокуляції рослин цитокинін-синтезувальними бактеріями стимулюється накопичення біомаси як пагонів, так і коренів рослин [1].

Штам *B. subtilis* IMB B-7243 також синтезує невелику кількість фітогормонів-інгібіторів: АБК та етилену (рис. 2). Фізіологічна доцільність синтезу штамом АБК, ймовірно, може бути пов'язана з важливою її функцією

для рослини у регуляції водного режиму. Саме в такий спосіб АБК здатна позитивно впливати на ріст рослинних клітин шляхом розтягнення [12]. Тому позаклітинна АБК, що синтезується штамом (5,8 мкг/г АСБ), через кореневу систему може потрапляти до рослини і включатися в метаболізм.

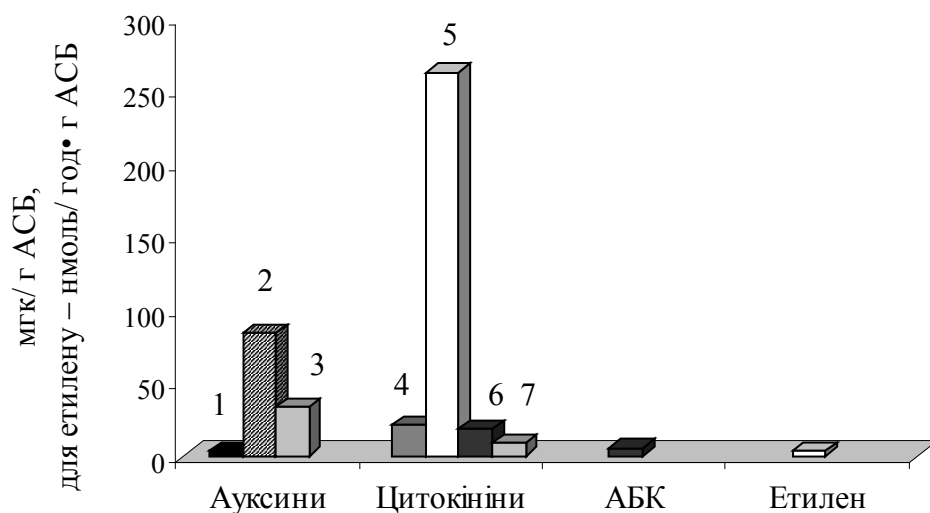


Рис. 2. Вміст позаклітинних фітогормонів-стимуляторів та інгібіторів у штаму *B. subtilis* IMB B-7243.

1 – ІОК; 2 – індол-карбінол; 3 – індоліл-3-оцтової кислоти гідразид; 4 – зеатин; 5 – зеатин-рибозид; 6 – ізопентеніладенін; 7 – ізопентеніладенозин.

Fig. 2. Extracellular phytohormones-stimulators and inhibitors content in *B. subtilis* IMB B-7243 strain.

1 – indole-3-acetic acid; 2 – indole-3-carbinol; 3 – indole-3-acetic hydrazide; 4 – zeatin; 5 – zeatin-riboside; 6 – isopentenyl adenine; 7 – isopentenyl adenosine.

Стосовно здатності штаму синтезувати екзогенний етилен (3,7 нмоль/год•г АСБ) слід зауважити, що доцільність його синтезу бацилами та вплив газоподібного гормону на рослину поки не зовсім зрозумілі. Зокрема відомо, що до синтезу етилену здатні певні види бактерій, а його низькі концентрації можуть стимулювати ріст рослин і перш за все – коренів [11]. З іншого боку, він відіграє важливу роль при формуванні системної стійкості до фітопатогенів, виконуючи роль сигнальних молекул [10]. Тому, яким чином екзогенний етилен в низьких концентраціях може впливати на рослину, особливо за дії стресових чинників – предмет подальших досліджень. Отже, штам *B. subtilis* IMB B-7243 в умовах *in vitro* здатний до синтезу трьох класів фітогормонів стимулювальної дії: ауксинів, цитокінінів та гіберелінів, що показано в попередніх дослідженнях [2]. Він продукує також екзогенні гормони-інгібітори: абсцизову кислоту та етилен. Щодо ролі окремих класів фітогормонів при формуванні асоціативних зв'язків, то вона різниться між собою. Тим не менше, результатом такої взаємодії

мікро- та макроорганізму є стимуляція росту і розвитку рослини, її захист від фітопатогенів та, як результат, стабілізація або підвищення продуктивності.

Раніше нами було досліджено антагоністичні властивості як еталонного штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100, так і досліджуваного *B. subtilis* IMB B-7243 щодо деяких колекційних штамів фітопатогенних бактерій і грибів – збудників бактеріальних та грибних хвороб зернобобових культур [3]. Враховуючи, що в структурі посівних площ зернобобових соя займає провідне місце і розглядається як одна із стратегічних та рентабельних культур, наступним етапом наших досліджень була перевірка в лабораторних та польових умовах ефективності використання штамів проти свіжевиділених збудників бактеріальних хвороб сої.

Встановлено, що штами *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100, який використовували для порівняння біологічної активності, та *B. subtilis* IMB B-7243 мають порівняно високі рівні антагоністичної активності до всіх збудників найбільш шкодочинних захворювань сої (табл. 2).

Таблиця 2

**Антагоністична активність бактерій роду *Bacillus*  
до збудників бактеріальних хвороб сої**

Table 2

**Antagonistic activity of genus *Bacillus* bacteria  
to the agents of soybean bacterial diseases**

Тест культури	Зони затримки росту тест-культур, мм	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> IMB B-7100	<i>B. subtilis</i> IMB B-7243
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> 8 штамів	25,0 ± 0,3	35,0 ± 0,5
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> , 4 штама	15,0 ± 0,4	15,0 ± 0,4
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>tabaci</i> , 2 штама	8,0 ± 0,1	12,0 ± 0,2
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , 2 штама	10,0 ± 0,5	13,0 ± 0,4
<i>P. agglomerans</i> 2 штама	15,0 ± 0,2	20,0 ± 0,1

Примітка: різниця достовірна при  $p < 0,05$  для всіх варіантів.

Note: the difference is significant at  $p < 0,05$  for all variants.

Зокрема, обидва штами є високоактивними по відношенню до збудників пустульного бактеріозу та бактеріальної смугастості стебла сої. Крім того, вони є середньо- та низькоактивними до збудників решти бактеріальних захворювань сої (кутаста плямистість, дикий опік, тощо). Також слід відмітити, що рівень антагоністичної активності штаму *B. subtilis* IMB B-7243 до всіх збудників бактеріальних хвороб сої є дещо вищим порівняно з аналогічними показниками штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100.



Отримані в лабораторних умовах результати підтвердилися при проведенні польових досліджень. Зокрема, передпосівна обробка насіння сої штамми *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 та *B. subtilis* IMB B-7243 пригнічувала розвиток та поширення кутастої плямистості (табл. 3).

Таблиця 3

**Вплив передпосівної обробки насіння сої штамми *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 та *B. subtilis* IMB B-7243 на ураження збудником кутастої плямистості сої та її продуктивність**

Table 3

**Pretreatment of soybean seeds influence by strains *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 and *B. subtilis* IMB B-7243 on soybean lesion by angular spot pathogen and its productivity**

Варіанти	Ураження рослин <i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>						Урожай, ц/га
	Поширення хвороби, %			Розвиток хвороби, %			
	фаза сходів	фаза цвітіння	фаза наливу бобів	фаза сходів	фаза цвітіння	фаза наливу бобів	
Контроль (обробка водою)	28,7±0,1	76,5±0,1	50,0±0,1	9,5±0,1	48,5±0,1	22,5±0,2	30,3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IMB B-7100	16,1±0,1	58,0±0,1	34,7±0,1	6,7±0,1	19,0±0,2	9,9±0,2	29,8
<i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7243	8,1±0,2	37,5±0,2	20,6±0,1	1,1±0,1	12,6±0,3	11,8±0,2	33,6
НІР <sub>05</sub>							1,9

Примітка: різниця достовірна відносно контролю при  $p < 0,05$  для штамів *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 і *B. subtilis* IMB B-7243; НІР<sub>05</sub> – найменша істотна різниця при 5% рівні значущості.

Note: significant difference relative to control at  $p < 0,05$  for *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 and *B. subtilis* IMB B-7243 strains; LSD05 – the least significant difference at the 5% significance level.

Слід також відмітити, що обробка штамом *B. subtilis* IMB B-7243 була більш ефективною порівняно з аналогічною обробкою штамом *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 практично на всіх фазах онтогенезу сої. Ефективна допосівна бактеризація насіння в подальшому також позитивно вплинула і на продуктивність. Так, протягом вегетаційного періоду спостерігалось суттєве зниження ураження рослин збудником кутастої плямистості, результатом чого стало підвищення продуктивності сої на 3,3 ц/га (більш, ніж 10%). Обробка штамом, що є основою біопрепарату Фітодоктор, майже не вплинула на показник продуктивності, в той же час мав місце фітопротекторний ефект.

Таким чином, наявність серед екзометаболітів фітогормонів-стимуляторів та певний рівень антагоністичної активності штаму *B. subtilis* IMB B-7243 щодо збудників бактеріальних хвороб сої позитивно вплинули на продуктивність культури в польових умовах.





**И.В. Драгоров<sup>1</sup>, Н.О. Леонова<sup>1</sup>, С.В. Лапа<sup>1</sup>, Л.А. Данкевич<sup>1</sup>,  
С.Ф. Падалко<sup>2</sup>, Л.В. Бобик<sup>2</sup>, Л.В. Авдеева<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: igordragovoz@ukr.net

<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

## **ФИТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ, АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7243**

### **Реферат**

**Цель.** Исследовать природу фитостимулирующей активности экзометаболитов штамма *Bacillus subtilis* IMB B-7243, его антагонистическую активность и оценить биологическую эффективность предпосевной бактеризации сои в полевых условиях. **Методы.** Фитогормональные соединения определяли методом спектроденситометрической тонкослойной хроматографии, этилен – методом газовой хроматографии, антагонистическую активность – методом радиальных штрихов против возбудителей бактериальных заболеваний сои. **Результаты.** Фитостимулирующая активность экзометаболитов *B. subtilis* IMB B-7243 обусловлена присутствием в их составе фитогормонов-стимуляторов (ауксинов, цитокининов). Показана способность штамма проявлять средний и высокий уровень антагонизма к возбудителям бактериальных болезней сои. **Выводы.** Присутствие среди экзометаболитов фитогормонов-стимуляторов и определенный уровень антагонистической активности штамма *B. subtilis* IMB B-7243 по отношению к возбудителям бактериальных болезней сои позитивно повлияют на биологическую эффективность в полевых условиях.

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, экзометаболиты, фитостимулирующая активность, фитогормоны, антагонистическая активность, соя.

**I.V. Dragovoz<sup>1</sup>, N.O. Leonova<sup>1</sup>, S.V. Lapa<sup>1</sup>, L.A. Dankevich<sup>1</sup>,  
S.F. Padalko<sup>2</sup>, L.V. Bobyk<sup>2</sup>, L.V. Avdeeva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny St., Kyiv, MSP 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: igordragovoz@ukr.net

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, NASU, 31/17, Vasylykivska St., Kyiv, Ukraine, 03022

## **PHYTOSTIMULATING, ANTAGONISTIC ACTIVITY AND BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF STRAIN *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7243**

### **Summary**

**Aim.** Research of the exometabolites phytostimulating activity nature of the strain *Bacillus subtilis* IMB B-7243 and its antagonistic activity and estimation of the biological effectiveness of pre-bacterization soybean in the field experiment. **Methods.** Phytohormones were determined by spectrodensitometric thin layer chromatography,



ethylene – by gas chromatography method, antagonistic activity – by radial strokes against pathogens of soybean bacterial diseases. **Results.** Phytostimulating activity of the exometabolites *B. subtilis* IMB B-7243 due to the presence in their composition phytohormones-stimulants (auxins, cytokinins). The ability of the strain to demonstrate middle and high level of antagonism to the agents of soybean bacterial diseases has been shown. **Conclusions.** Presence of phytohormones-stimulants from the exometabolites and a certain level of the antagonistic activity of the strain *B. subtilis* IMB B-7243 with respect to the agents of soybeans bacterial diseases had a positive impact on the biological effectiveness in the field.

*Key words:* *Bacillus subtilis*, exometabolites, phytostimulating activity, phytohormones, antagonistic activity, soybean.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Архипова Т.Н., Веселов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко Е.В., Кудоярова Г.Р. Сравнение действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 506–510.
2. Драговоз І.В., Леонова Н.О., Лапа С.В., Піскова О.В., Крючкова Л.О., Авдєєва Л.В. Синтез позаклітинних фітогормонів штамми *Bacillus*, виділеними з різних природних джерел // Мікробіол. журнал. – 2013. – 75, № 3. – С. 41–46.
3. Драговоз І.В., Пасічник Л.А., Жукова Д.А., Лапа С.В., Крючкова Л.О., Авдєєва Л.В. Антагоністична активність штамів *Bacillus amyloliquefaciens* – перспективних агентів біоконтролю зернових культур // Мікробіол. журнал. – 2014. – Т. 76, № 5. – С. 15–19.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Изво МГУ, 1994. – 512 с.
5. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев А.И. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Изв. Уфимского науч. центра РАН. – 2011, № 3–4. – С. 5–16.
6. Методики випробування і застосування пестицидів // С.О. Трибель, Д.Д. Сігарьова, М.П. Секун, О.Р. Іващенко та ін. За ред. проф. С.О. Трибеля. – К.: Світ. – 2001. – 448 с.
7. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Ростстимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 3. – С. 187–207.
8. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1987. – Т. 19, № 2. – С. 210–215.
9. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохим. микробиол. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.



10. *Çakmakçı R., Erat M., Erdoğan Ü., Dönmez M.F.* The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants // *J. Plant Nutr. Soil Sci.* – 2007. – 170, № 2. – P. 288–295.
11. *Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A.* Rhizobacterial mediation of plant hormone status // *Ann. Appl. Biol.* – 2010. – 157. – P. 361–379.
12. *Fricke W., Akhiyarova G., Veselov D., Kudoyarova G.* Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves // *J. Exper. Botan.* – 2004. – 55. – P. 1115–1123.
13. *Kurchii B.A.* Acetylcholine and ethylene: do they share similar receptors and biological action? // *Ukr. Bioorganica Acta.* – 2009. – № 1. – P. 36–44.
14. *Silva T., Davies P.J.* Elongation rates and endogenous indoleacetic acid levels in roots of pea mutants differing in internode length // *Physiol. Plantarum.* – 2007. – 129. – P. 804–812.
15. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R.* Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2007. – 31, № 4. – P. 425–448.

Стаття надійшла до редакції 08.09.2014 р.



## ПРОДУКЦІЯ СИДЕРОФОРІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS*

**Мета.** Вивчення рівня синтезу сидерофорів бактеріями роду *Pseudomonas* та впливу на нього іонів заліза (III). **Методи.** Здатність до утворення сидерофорів у штамів *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), *P. fluorescens* ONU 303 та *P. aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) вивчали з використанням CAS-азару. Інтенсивність росту та продукції півердинових біохелаторів досліджуваних культур у рідкому варіанті середовища Кінга визначали, відповідно, при довжинах хвиль 660 нм та 400 нм з використанням хром-азурола S. **Результати.** За інтенсивністю накопичення сидерофорів різні штами одного виду відрізнялися один від одного. Найбільш активна продукція сидерофорів спостерігалася у представників *P. aeruginosa* та *P. fluorescens*. Додаткове внесення іонів заліза (III) супроводжувалося змінами кількості клітин та інтенсивності накопичення ними сидерофорів. Додавання заліза у середовище культивування псевдомонад призвело до підвищення кількості клітин у суспензії. Проте, концентрація сидерофорів, що утворювались даними мікроорганізмами, за присутності 30 мкг/мл іонів заліза (III) зменшилась у 2–7 разів, а при 1000 мкг/мл – синтез досліджуваних сполук більшістю штамів псевдомонад практично повністю припинився. **Висновок.** Присутність у поживному середовищі іонів заліза (III) у концентрації 30 та 1000 мкг/мл гальмує накопичення сидерофорів бактеріями роду *Pseudomonas*.

*Ключові слова:* сидерофори, *Pseudomonas* spp., півердини,  $Fe^{3+}$ .

За присутності кисню у доквіллі доступність вільного заліза значно обмежена через низьку розчинність його гідроксидів. Але бактерії та гриби змогли створити специфічну систему, що дозволяє ефективно вилучати іони даного металу з навколишнього середовища и транспортувати їх усередину клітини. Основою даної системи є залізохелатуючі агенти – сидерофори. Це низькомолекулярні сполуки (як правило, менше 1 кДа), які діють як ентросорбенти з високим ступенем спорідненості до  $Fe(III)$ . Доведено, що за структурою та властивостями сидерофори є досить різноманітними речовинами. Єдиним для всіх подібних сполук є той факт, що індукція їхньої продукції мікроорганізмами відбувається при зменшенні внутрішньоклітинного вмісту заліза до  $10^{-6}$  М, яке використовується як кофактор ферментів [10, 13].

Бактерії роду *Pseudomonas*, які вже давно привертають увагу як продуценти широкого спектра біологічно активних речовин, синтезують понад 100 різних видів сидерофорів, серед яких є первинні флуоресцентні сидерофори, т.зв. півердинові похідні. Більшість з них представляють собою молекули, до складу



яких входить короткий пептид, зв'язаний одним кінцем з діоксіхіноліновим ядром – 2,3-діаміно-6,7-діоксіхоліном [12]. Вони є унікальними сполуками з надзвичайно високою хелатною іоноздатністю (константа зв'язування  $\text{Fe}^{3+}$  у цих комплексах досягає  $10^{25}$  при рН 7,0), що утворюються тільки даними мікроорганізмами [4].

Значну кількість випадків антагоністичних взаємовідносин, у яких беруть участь *Pseudomonas spp.*, визначає продукція саме піовердинових сидерофорів: за цим шляхом, наприклад, відбувається пригнічення ризосферними псевдомонадами ґрунтових фітопатогенів [3, 14]. На даний час розроблено технологію отримання деяких біопрепаратів, до складу яких входять сидерофори, що застосовуються у сільському господарстві [11].

Показано, що сидерофори бактерій роду *Pseudomonas* здатні утворювати комплекси з іонами одно- ( $\text{Hg}^+$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ), дво- ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ), трьох- ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ) та шестивалентних ( $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{W}^{6+}$ ) металів. Отже, існує можливість їх використання не тільки у агробіотехнологічному комплексі, а й для біоремедіації різних середовищ [7].

Метою даної роботи було вивчення рівня синтезу сидерофорів представниками роду *Pseudomonas* та впливу на нього іонів заліза (III).

### Матеріали та методи

У роботі використовували штами бактерій роду *Pseudomonas*: *Pseudomonas aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306), *P. fluorescens* ONU 303, ізольовані з ризосфери рослин, та *P. aeruginosa* (ONU 300 = ATCC 15692, ONU 301 = ATCC 27853, ONU 302 = ATCC 10145), отримані з музею культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Визначення сидерофорів проводили з використанням добових культур досліджуваних мікроорганізмів, які отримували згідно з [1]. Бактерії *P. aureofaciens* та *P. fluorescens* вирощували за температури 22 °С, *P. aeruginosa* – за 37 °С.

Якісне визначення сидерофорів здійснювали за допомогою хром-азурола S, на основі якого готували CAS-агар (chrome azurol S-blue agar) [6]. Бактерії, що виробляли сидерофори, змінювали колір CAS-агару.

Для визначення кількості сидерофорів, що утворюються досліджуваними бактеріями, вихідні суспензії клітин їх стандартизували до концентрації  $10^{11}$  кл/мл та 0,01 мл відповідної суспензії вносили у 0,99 мл середовища Кінга із різними вмістами іонів заліза, перемішували та культивували до початку стаціонарної фази росту бактерій у стерильних полістиролових планшетах. Після того осаджували центрифугуванням при 322 g впродовж 25 хв. Визначення концентрації сидерофорів проводили у супернатанті поживного середовища кожного з обраних штамів псевдомонад через 48 год культивування за [9]. Концентрацію клітин у суспензіях досліджуваних культур бактерій визначали спектрофотометрично («Spekol-10», Німеччина) [1].

Усі дослідження проводили у 6 повторах. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t-критерій Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику  $p \leq 0,05$ .



### Результати та їх обговорення

Використання у роботі CAS-агару – «блакитного агару», який змінює забарвлення через зв'язування хелатуючими агентами іонів заліза у його складі, дозволило визначити здатність різних досліджуваних псевдомонад утворювати сидерофори. Хром-азурол S є сполукою, що утворює специфічний комплекс блакитного кольору із залізом, яке входить до складу цього середовища. Мікроорганізми, продукуючи сидерофори (більш специфічні хелатори  $Fe^{3+}$ ), викликають перекомплексування та вивільнення хром-азуролу S, що супроводжується зміною забарвлення середовища з блакитного на жовто-гарячковий.

Найбільш інтенсивне пожовтіння середовища було зафіксовано для штамів, що належать до виду *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), та представників ризосферних мікроорганізмів *P. aureofaciens* ONU 304 та *P. fluorescens* ONU 303.

З даних літератури відомо, що найбільш інтенсивна продукція різних вторинних метаболітів, зокрема сидерофорів, відбувається у культурах, які переходять у стаціонарну фазу росту [1]. Отже, на наступному етапі досліджень було проведено спостереження за ростом культур у рідкому середовищі Кінга, аналог якого використовується для ідентифікації, культивування та визначення здатності до синтезу пігментів у представників родини *Pseudomonadaceae* [10] (рис. 1).

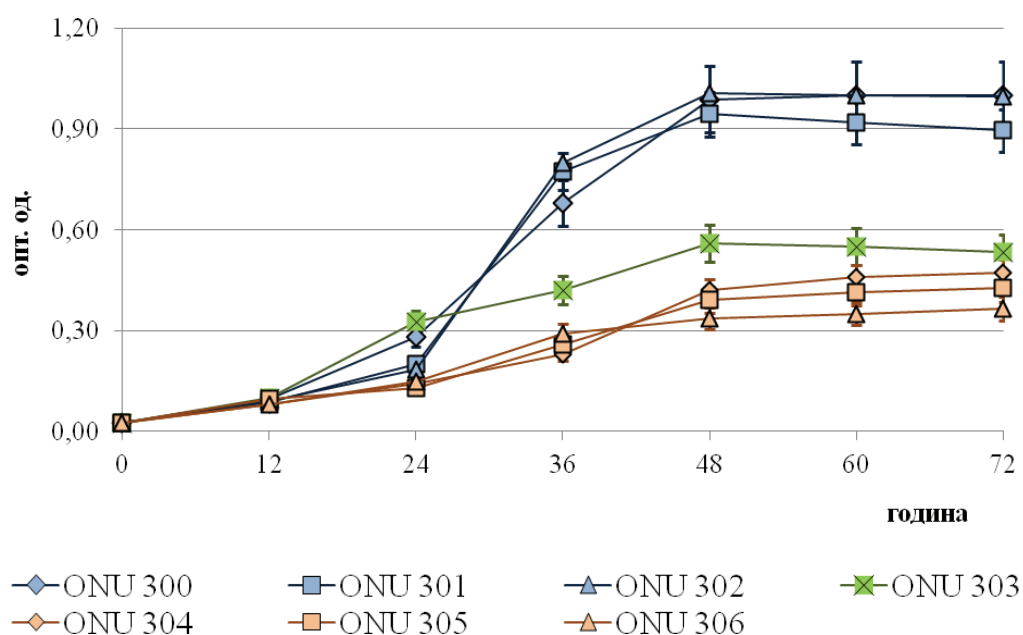


Рис. 1. Динаміка росту *Pseudomonas spp.* у рідкому поживному середовищі

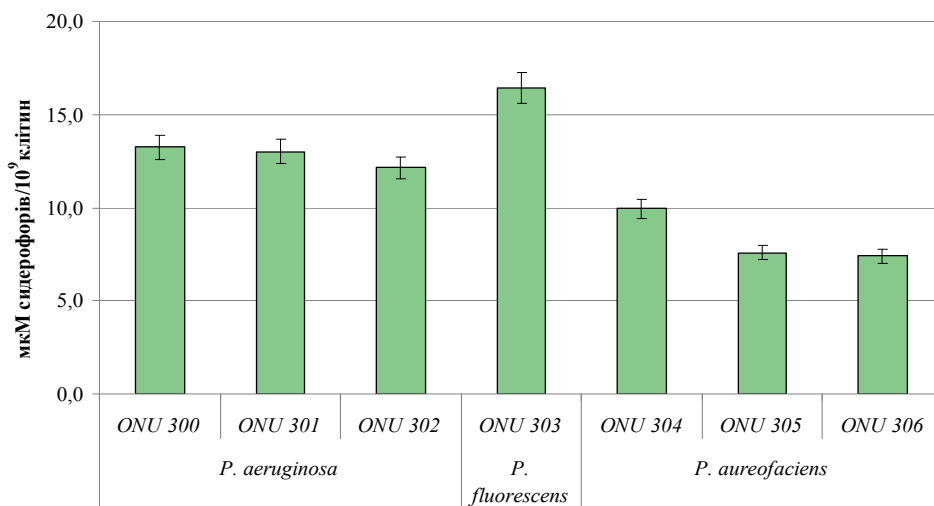
Fig. 1. Dynamics of *Pseudomonas spp.* growth in liquid nutrient medium





В роботі було зафіксовано, що між 48 та 60 годинами рівень оптичної щільності суспензій практично не змінювався, що свідчить про уповільнення процесу розмноження мікроорганізмів та настання стаціонарної фази росту цих культур у використаному середовищі.

Визначення вмісту сидерофорів, які утворюються бактеріями у стаціонарній фазі росту, у подальшому проводили через 48 годин культивування мікроорганізмів.



**Рис. 2. Вихідний рівень продукції сидерофорів досліджуваними штамми псевдомонад**

**Fig. 2. The basic siderophore production by the studied *Pseudomonas* strains**

Встановлено, що через 48 год. культивування найбільше первинних сидерофорів синтезує штам *P. fluorescens* ONU 303 – до 16,5 мкМ / 10<sup>9</sup> кл. Дещо менше (на 2,5–4,5 мкМ / 10<sup>9</sup> кл) досліджуваних сполук виявлено для представників виду *P. aeruginosa*. Серед *P. aureofaciens* найбільшу кількість сидерофорів продукував штам ONU 304 (10,0 мкМ / 10<sup>9</sup> кл), тоді як два інших – лише 7,4–7,6 мкМ / 10<sup>9</sup> кл у суспензії. Отже, за інтенсивністю накопичення первинних сидерофорів представники різних видів псевдомонад суттєво відрізнялись один від одного.

Створення біопрепаратів з використанням ризосферних мікроорганізмів починається з визначення їх синтетичного потенціалу, зокрема продукції сидерофорів, за різних умов культивування. Це дозволяє оцінити перспективність їх використання у ґрунтах різних типів та з різним вмістом заліза, тобто встановити «універсальність» майбутнього мікробіологічного препарату [8].

В роботі було проведено визначення впливу двох концентрацій Fe<sup>3+</sup> (30 мкг/мл, що відповідає вмісту заліза у чорноземі, та 1000 мкг/мл – гранично допустима концентрація сполук даного елемента [2]) на ріст досліджуваних культур та синтез ними сидерофорів (табл.).

## Синтез сидерофорів досліджуваними штамми псевдомонад за присутності іонів заліза (III)

Siderophore synthesis by the studied *Pseudomonas* strains in the iron ion (III) presence

Штам	Контроль без Fe(III)		30 мкг Fe(III)/мл		1000 мкг Fe(III)/мл	
	Концентрація клітин, $\cdot 10^9$ /мл	Сидерофори, мкМ / $10^9$ кл	Концентрація клітин, $\cdot 10^9$ /мл	Сидерофори, мкМ / $10^9$ кл	Концентрація клітин, $\cdot 10^9$ /мл	Сидерофори, мкМ / $10^9$ кл
<i>P. aeruginosa</i> ONU 300	4,5 $\pm$ 0,2	13,2 $\pm$ 0,4	5,9 $\pm$ 0,2*	8,2 $\pm$ 0,3**	12,6 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>	0,0 <sup>##</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ONU 301	4,3 $\pm$ 0,3	13,0 $\pm$ 0,4	7,7 $\pm$ 0,3*	4,3 $\pm$ 0,2**	12,0 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>	0,0 <sup>##</sup>
<i>P. aeruginosa</i> ONU 302	4,8 $\pm$ 0,2	12,1 $\pm$ 0,2	10,0 $\pm$ 0,3*	4,2 $\pm$ 0,1**	12,2 $\pm$ 0,3 <sup>#</sup>	0,1 $\pm$ 0,02 <sup>##</sup>
<i>P. fluorescens</i> ONU 303	2,6 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 0,3*	1,2 $\pm$ 0,1**	12,2 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>	0,1 $\pm$ 0,01 <sup>##</sup>
<i>P. aureofaciens</i> ONU 304	1,5 $\pm$ 0,1	9,9 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,1*	2,0 $\pm$ 0,2**	7,3 $\pm$ 0,1 <sup>#</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>##</sup>
<i>P. aureofaciens</i> ONU 305	1,8 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,2*	1,7 $\pm$ 0,1**	8,0 $\pm$ 0,2 <sup>#</sup>	0,2 $\pm$ 0,01 <sup>##</sup>
<i>P. aureofaciens</i> ONU 306	1,5 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,1*	2,1 $\pm$ 0,2**	7,7 $\pm$ 0,3 <sup>#</sup>	0,2 $\pm$ 0,01 <sup>##</sup>

Примітка: \* або \*\* – різниця вірогідна у порівнянні з відповідними значеннями, отриманими у поживному середовищі без внесення сполук заліза (при  $P < 0,05$ ); <sup>#</sup> або <sup>##</sup> – різниця вірогідна у порівнянні зі значеннями, отриманими у середовищі з 30 мкг/мл  $Fe^{3+}$  (при  $P < 0,05$ ).

Наявність іонів заліза (III) виявляли на зміни як кількості клітин, так й інтенсивності утворення ними сидерофорів.

Встановлено, що присутність в середовищі  $Fe^{3+}$  у 1,3–5,0 разів збільшує концентрацію досліджуваних бактерій. Найбільший стимулюючий вплив тривалентне заліза здійснювало у концентрації 1000 мкг/мл на штами *P. fluorescens* та *P. aureofaciens*. Очевидно, залізо, приймаючи участь у значній кількості внутрішньоклітинних процесів (наприклад, транспорті кисню, синтезі АТФ [5]) та входячи до складу такого ферменту, як рибонуклетид редуктаза, що є ключовим у синтезі ДНК, та цитохромів у системі переносу електронів, активізує ріст бактерій роду *Pseudomonas*.

Для продукції сидерофорів спостерігалась зворотна тенденція – додаткове внесення у поживне середовище  $Fe^{3+}$  викликало пригнічення продукції цих сполук. При цьому, за присутності 30 мкг/мл іонів заліза (III) концентрація сидерофорів, що утворювались даними мікроорганізмами, зменшилась у 2–7 разів. Найбільшу різницю (у більш ніж 10 разів, порівнюючи з вихідним рівнем продукції сидерофорів) було зафіксовано для штаму *P. fluorescens* ONU 303.



Порядок розміщення досліджуваних культур від найбільшого до найслабшого продуцента сидерофорів виявився наступним: *P. aeruginosa* ONU 300 > *P. aeruginosa* ONU 301 > *P. aeruginosa* ONU 302 > *P. aureofaciens* ONU 306 > *P. aureofaciens* ONU 304 > *P. aureofaciens* ONU 305 > *P. fluorescens* ONU 303.

При збільшенні вмісту заліза (III) у середовищі, де відбувалось культивування псевдомонад, до 1000 мкг/мл встановлено повне припинення синтезу сидерофорів. Для штамів *P. aeruginosa* ONU 300 та ONU 301 взагалі не було виявлено досліджуваних сполук. Найвища кількість сидерофорів за цієї концентрації  $Fe^{3+}$ , продукувалася штамми *P. aureofaciens*, дещо менша – культурою *P. fluorescens*.

Отже, значне зниження кількості досліджуваних сполук відбулось, очевидно, через підвищення вмісту заліза (III) у поживному середовищі, яке спричинило, очевидно, пригнічення синтезу сидерофорів у псевдомонад через зв'язування з Fur-протеїном, який репресує транскрипцію генів, що кодують специфічні  $\sigma$ -фактори синтезу піовердинів [8].

Таким чином, порівнюючи ріст бактеріальних культур та накопичення ними піовердинових сидерофорів, було визначено, що на тлі підвищення біомаси досліджуваних мікроорганізмів їхня здатність продукувати біохелатори, які забезпечують використання у метаболічних процесах клітин іонів заліза (III), суттєво пригнічується під час зростання його концентрації у навколишньому середовищі. Отже, при подальшому дослідженні продукції сидерофорів серед мікроорганізмів роду *Pseudomonas* необхідно враховувати специфічність даного процесу, що дозволить визначати можливість використання окремих штамів для створення біологічних препаратів.

**М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, В.В. Ивах,  
А.А. Титлянов**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

## **ПРОДУКЦІЯ СИДЕРОФОРІВ БАКТЕРІЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS***

### **Реферат**

**Цель.** Исследование уровня синтеза сидерофоров бактериями рода *Pseudomonas*.

**Методы.** Способность к образованию сидерофоров среди штаммов *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), *P. fluorescens* ONU 303 и *P. aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) изучали с использованием CAS-агара. Интенсивность роста и продукции пиовердиновых биохелаторов исследуемых культур в жидком варианте среды Кинга определяли соответственно при длинах волн 660 нм и 400 нм с использованием хром-азурола S. **Результаты.** По интенсивности накопления сидерофоров представители разных штаммов одного вида отличались один от другого. Наиболее активная продукция сидерофоров наблюдалась среди культур *P. aeruginosa* и *P. fluorescens*. Дополнительно внесенные ионы железа



(III) определили изменения количества клеток и интенсивности образования ими сидерофоров. Внесение железа в среду, в которой происходило культивирование псевдомонад, привело к повышению количества клеток в суспензии. Однако, концентрация сидерофоров, которые синтезируются данными микроорганизмами, в присутствии 30 мкг/мл ионов железа (III) уменьшилась в 2–7 раз, а при 1000 мкг/мл – синтез исследуемых соединений большинством штаммов псевдомонад практически полностью прекратился. **Выводы.** Присутствие в питательной среде ионов железа (III) в концентрации 30 и 1000 мкг/мл тормозит накопление сидерофоров бактериями рода *Pseudomonas*.

Ключевые слова: сидерофоры, *Pseudomonas spp.*, пиовердины,  $Fe^{3+}$ .

**M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, T.O. Filipova, V.V. Ivah, O.O. Titlianov**

I.I. Mechnykov Odesa National University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

## THE SIDEROPHORE PRODUCTION BY *PSEUDOMONAS* BACTERIA

### Summary

**Aim.** The study of the siderophore synthesis by *Pseudomonas* genus bacteria. **Methods.** The siderophore production ability of *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), *P. fluorescens* ONU 303 and *P. aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) strains was studied by using of CAS-agar. The intensity of growth and pyoverdin biochelator production of the studied cultures in liquid King medium variant was determined, respectively, at the wavelengths of 660 nm and 400 nm with using of chrome-azurols. **Results.** According to the intensity of siderophore accumulation by the representatives of different strains the same species distinguished from each other. The most active siderophore production was observed among *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* cultures. The iron ions (III) that were additionally added resulted the changes both the cell quantity and siderophore synthesis intensity. Adding iron to the medium in which *Pseudomonas* cultured, was resulting in increased cell number in suspension. However, concentration of siderophores, which are synthesized by these microorganisms, in the presence of 30  $\mu\text{g/ml}$  of iron (III) decreased by 2–7 fold, and at 1000  $\mu\text{g/ml}$  – synthesis of tested compounds by most *Pseudomonas* strains practically completely ceased. **Conclusions.** Presence of iron ions (III) in nutrient medium at concentration 30 and 1000  $\mu\text{g/ml}$  slowed down the accumulation of siderophores by bacteria of *Pseudomonas* genus.

Key words: siderophores, *Pseudomonas spp.*, pyoverdins,  $Fe^{3+}$ .

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Идентификация и характеристика пиовердина Pm – нового антирадикального соединения, синтезируемого бактериями *Pseudomonas putida* КМБУ4308 / Кулешова Ю.М., Максимова Н.П., Блажевич О.В., Семак И.В. // Труды Белорусского государственного университета. – 2006. – № 1. – С. 89–97.



2. *Методика* визначення розмірів шкоди, зумовленої забрудненням і засміченням земельних ресурсів через порушення природоохоронного законодавства (Із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства охорони навколишнього природного середовища N 149 (z0422-07) від 04.04.2007).

3. *Мошинець О.В., Косаківська І.В.* Фітосфера як екологічна ніша рослинно-мікробних взаємовідносин. Функціональна активність мікроорганізмів та їхній вплив на рослини // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2010. – № 3. – С. 6–22.

4. *Demange P.* *Pseudomonas* siderophores: Structure and physicochemical properties of pyoverdins and related peptides // Second Forum on Peptides. – 2009. – V. 174. – № 1. – P. 95–98.

5. *Microbial* iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm / Stintzi A., Carmen B., Jide X., Kenneth N.R. // J. Chem. – 2009. – V. 344, № 6. – P. 379–383.

6. *Neilands J.B.* Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 45. – P. 26723–26726.

7. *Siderophores* in environmental research: roles and applications / Ahmed E., Holmstrom S. J. M. // Microbial Biotechnology. – 2014. – V. 7. – P. 196–208.

8. *Siderophores* in Plant Iron Acquisition: Geochemical Aspects / Kraemer C., Crowley D., Kretzschmar R. // Advances in Agronomy. – 2006. – V. 91. – P. 1–46.

9. *Siderotyping* of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method / Meyer J.M., Gruffaz C., Raharinosy V., Bezverbnaya I., Schäfer M., Budzikiewicz H. // Biometals. – 2008. – V. 25. – P. 259–271.

10. *Structure*, properties and transport mechanism of iron(III) complex of mugineic acid, a possible phytosiderophore / Sugiura Y., Tanaka H., Mino Y., Ishida T., Ota N., Nomoto K., Yosioka H., Takemoto T. // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – V. 64. – P. 6979–6982.

11. *Utilisation* of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. / Raaijmakers J.M., Van der Sluis L., Koster M., Bakker P.M., Weisbeek P.J., Schippers B. // Can. J. Microbiol. – 2005. – V. 42. – P. 126–135.

12. *Varma A., Chincholkar S.* Microbial siderophores // J. Microbiol. – 2007. – V. 12. – P. 43–61.

13. *Visca P., Imperi F., Lamont I.L.* Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance // Trends Microbiol. – 2007. – V. 103. – P. 22–30.

14. *Weller D.M.* *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30years // Phytopathology. – 2007. – V. 97. – P. 250–256.

Стаття надійшла до редакції 08.09.2014 р.



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

**Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:**

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

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

До рукопису додається електронний варіант статті (збережений у документі Word 97-2003 (\*.doc) на дискеті (шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).





**При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:**

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- назва статті великими літерами;
- анотація із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

**Текст статті має включати такі складові:**

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; 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.

### ВРАЗКИ 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*. – 9<sup>th</sup> ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

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

#### На журнальні статті

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

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

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

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



### **На тези доповідей**

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

### **На депоновані наукові роботи**

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

### **На стандарти**

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

### **На автореферати дисертацій**

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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 26.12.2014 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 9,7. Тираж 100 пр.  
Зам. № 1060.

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