

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

№ 3(27)
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

Ю.І. Шевченко, В.К. Позур, М. Скурник УЧАСТЬ WAAL ЛІГАЗ БАКТЕРІЙ <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> O:3 ТА O:8 В ФОРМУВАННІ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО СИРОВАТКИ КРОВІ.....	6
О.А. Савенко, Л.М. Буценко, Л.А. Пасічник, В.П. Патица RAPD-АНАЛІЗ <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> , ВИДІЛЕНИХ З БУР'ЯНІВ В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ	15
О.М. Василюк, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>PLANTARUM</i> , ІЗОЛЬОВАНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ	23
Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>	31
Н.І. Адамчук-Чала, Л.В. Титова, Г.О. Іутинська МІКРОБНІ ПЕЙЗАЖИ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ІНТРОДУКЦІЇ РІЗНИХ ІНОКУЛЯНТІВ.....	40
В.М. Мокросноп, О.В. Поліщук, О.К. Золотарьова ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА ДИХАННЯ І ФОТОСИНТЕЗ <i>EUGLENA GRACILIS</i>	49
Х.А. Берегова, Т.П. Пирог ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН <i>NOCARDIA VACCINII</i> ІМВ В-7405 НА АДГЕЗІЮ БАКТЕРІЙ ТА ДРІЖДЖІВ ДО ПОВЕРХОНЬ СИЛІКОНОВИХ КАТЕТЕРІВ	57
О.В. Федотов, Т.С. Волошко ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ДЕЯКИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ	65
О.І. Сідашенко, Т.М. Шевченко, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, А.І. Вінніков ВПЛИВ ФТОРХІНОЛОНІВ НА БІОПЛІВКИ <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>EPIDERMIDIS</i>	77
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	86

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

J.I. Shevchenko, V.K. Pozur, M. Skurnik ROLE OF WAAL LIGASES IN SERUM RESISTANCE OF <i>YERSINIA</i> <i>ENTEROCOLITICA</i> SEROTYPES O:3 AND O:8.....	6
O.A. Савенко, Л.М. Буценко, Л.А. Пасічник, В.П. Патика RAPD-ANALYSIS OF <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE</i> , ISOLATED FROM WEEDS IN AGROPHYTOCENOSIS OF WHEAT.....	15
O.M. Vasulyk, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko PROBIOTIC PROPERTIES OF STRAINS OF <i>LACTOBACILLUS</i> <i>PLANTARUM</i> ISOLATED FROM FERMENTED PRODUCTS	23
T.V. Gudzenko, N.V. Korotaeva, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva, O.G. Gorshkova, V.O. Ivanytsia FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF BACTERIA OF THE GENUS <i>PSEUDOMONAS</i> , OXIDIZING PETROLEUM PRODUCTS	31
N.I. Adamchuk-Chala, L.V. Tytova, G.O. Iutynska MICROBIAL SCENERY OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER DIFFERENT INOCULANTS INTRODUCTION	40
V.M. Mokrosnop, O.V. Polishchuk, O.K. Zolotareva EFFECT OF ETHANOL ON RESPIRATION AND PHOTOSYNTHESIS OF <i>EUGLENA GRACILIS</i>	49
Kh.A. Beregova, T.P. Pirog EFFECT OF <i>NOCARDIA VACCINII</i> IMB B-7405 SURFACTANT ON ADHESION OF BACTERIA AND YEAST TO SILICONE CATHETERS	57
O.V. Fedotov, T.E. Voloshko PRODUCTION AND ANALYSIS OF ENZYME PREPARATIONS OF OXIDOREDUCTASES OF SOME BASIDIOMYCETES	65
O.I. Sidashenko, T.M. Shevchenko, O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha, A.I. Vinnikov FLUOROQUINOLONE INFLUENCE UPON <i>STAPHYLOCOCCUS</i> <i>EPIDERMIDIS</i> BIOFILM	77
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	103

UDC 579.234

J.I. Shevchenko^{1,2}, V.K. Pozur¹, M. Skurnik²

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2, Akad. Hlushkov str. Kiev-022, 03022, Ukraine

²Haartman Institute, University of Helsinki, Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland
tel.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: julia.i.shevchenko@gmail.com

ROLE OF WAAL LIGASES IN SERUM RESISTANCE OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* SEROTYPES O:3 AND O:8

The **aim** of current study was to estimate WaaL ligase contribution in lipopolysaccharide (LPS) phenotype profile formation of *Y. enterocolitica* serotype O:3 (YeO3) and O:8 (YeO8) bacteria and its participation in serum killing protection. In lipopolysaccharide (LPS) biosynthesis of Gram-negative bacteria the waaL-encoded ligase joins O-polysaccharide (O-Ag) and outer core (OC) onto lipid A-core oligosaccharide. Three waaL genes named as waaL_{OS}, waaL_{PS} and waaL_{XS} were identified from *Yersinia enterocolitica* genome. **Methods.** The waaL-knock-out mutants were created by allelic exchange strategy. The LPS phenotypes of created mutants were visualized by silver-stained DOC-PAGE and immunoblotting with specific outer core (core oligosaccharide, hexasaccharide, OC) and O-polysaccharide (OPS or O-Ag) monoclonal antibodies. To study the contribution of WaaL_{OS} and WaaL_{PS} to the survival of *Yersinia* bacteria in non-immune human serum, we constructed the series of single and double ligase mutants. Survival of bacteria was analyzed in normal serum (with functional classical, lectin, and alternative complement activation pathways) and EGTA-Mg-treated serum (only alternative pathway functional). **Results.** Our results demonstrated that WaaL ligases participate in the synthesis of proper LPS structure and play an important role in protection against serum killing. **Conclusions.** The LPS ligases of YeO3 exhibit relaxed donor substrate specificity. Under given conditions the effect of WaaL_{OS} ligase is more significant for OC and OPS ligation onto lipid A than WaaL_{PS} one.

Key words: WaaL ligase, lipopolysaccharide, *Yersinia enterocolitica*, serum resistance.

Among humans, *Y. enterocolitica* causes intestinal disease, such as enterocolitis, with inflammatory diarrhea, ileitis, mesenteric appendicitis and gastroenteritis. The pathogen crosses the epithelial barrier through the M cells of Peyer's patches and infects the underlying tissues. Survival in deeper tissues and serum resistance depends on *Yersinia* virulence factors encoded by genes located on the chromosome (Ail and lipopolysaccharide O-Ag and OC and on the 70-kb virulence plasmid (YadA and Yop proteins) [2].

© J.I. Shevchenko, V.K. Pozur, M. Skurnik, 2014



Activation of complement starts with activation of C3, then cleavage product of C3, C3b, deposits on microbial surface and bind complement component C5. C5b, the cleavage product of C5, subsequently initiates the cascade of interactions that lead to insertion of the membrane attack complex (MAC) (C5b-9), into the bacterial membrane. This event results in bacterial lysis and cell death. Many microbes, however, evolved mechanisms to evade this attack (thick peptidoglycan layer, long O-side chains, bacterial capsules, etc.) The C3b is the key protein of complement activation, which binds more strongly to YadA-negative bacteria grown at 37 °C. Only *Y. enterocolitica* bacteria grown at 37°C are resistant to killing by alternative pathway (AP), classical pathway (CP), or both (CP/AP) [2].

Y. enterocolitica genome contains the genes *waaL_{OS}* and *waaL_{PS}* encoding WaaL-ligases responsible for substituting lipidA with oligo- and polysaccharide moieties [2]. In this report, we analyzed serum resistance of *Y. enterocolitica* O:3 and *Y. enterocolitica* O:8 using single and double *waaL* mutants. The strains were analyzed for serum resistance in a killing assay in normal and EGTA [ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid]-Mg serum.

Current investigations are important for evaluation of biological role and participation of WaaL ligases of *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:8 in virulence realization. To this end we attempted serum-killing assay as a conventional system for estimating *waaL*-mutants pathogenicity. The obtained data indicated that the mutants with disrupted *waaL* genes were less resistant to serum killing.

Further investigations of WaaL ligases will concern importance of the ligases to the *Y. enterocolitica* pathogenesis. Knowledge of this pathway will enable the development of effective inhibitors and create new approaches to yersiniosis treatment.

Materials and Methods

Bacterial strains and culture conditions. Bacterial strains are listed in Table 1. For bactericidal assay, bacteria were grown to stationary phase overnight in 5 ml of Luria Broth (LB) media at 22–25 °C (RT) for *Yersinia* and at 37 °C for *E. coli* strains. To study serum resistance of *Yersinia* strains and their *waaL* mutants bacteria were grown at 37 °C. LB supplemented with 1.5% Bacto Agar was used for all solid cultures. As a selective medium CIN agar supplemented with appropriate antibiotics was used. When appropriate, antibiotics were added to the media at the following concentrations: kanamycin (Km), 100 μ g/ml in agar plates and 20 μ g/ml in broth; chloramphenicol (CIm), 20 μ g/ml.

General DNA techniques. Isolation of plasmids and genomic DNA were done with kits. All enzymes were used according to the supplier's specifications. Small-scale plasmid DNA preparations were carried out using plasmid mini prep kits. Plasmid DNA was moved by electroporation into *Y. enterocolitica* or heat shock transformation. Recombinant plasmids were mobilized from *E. coli* strains to *Y. enterocolitica* by conjugation.



Mutant construction. The *waaL_{OS}* and *waaL_{PS}* genes were amplified by PCR with primer pairs O3ligYE1727F5 & O3ligYE1727R5 and O3ligYE532F2 & O3ligYE532R2 using the Dynazyme II DNA-polymerases (Thermo Scientific) and genomic DNA of *Y. enterocolitica* O:3 as template. Amplified DNA was purified with Kit method and digested with NsiI (Mph 1103I) for *waaL_{OS}* gene and PstI for *waaL_{PS}*. Digested and purified fragments were cloned into PstI digested suicide vector pSW23T and the constructed plasmids were named as pSW23T-*waaL_{OS}* and pSW23T-*waaL_{PS}* respectively. The constructions were mobilized from *E. coli* ω 7249 into *Y. enterocolitica* O:3 (YeO3) and O:8 (YeO8) strains by conjugation as described earlier [1]. For elimination suicide vector and the wild-type genes was used optimized cycloserine enrichment method [1]. For large-scale screening of knock-out mutants among Clm^s colonies we used Colony hybridization kit method (Roche). Isolated genomic DNA from negative colonies were diluted and used as a template for PCR with different primer pairs. DNA of wild-type strain YeO3 or YeO8 were used as a control.

Immunoblotting. To detect YadA expression in mutants, bacteria were grown overnight at 37 °C in 5 ml of LB with an appropriate antibiotics. Wholecell lysates were prepared from 1 ml of bacterial cultures (OD₆₀₀ adjusted to 0.2). The cultures were centrifuged for 15 min (1,500 x g), and pellets were resuspended in 100 μ l of Laemmli sample buffer. The mixtures were heated at 95–99 °C for 10 min before being loaded onto polyacrylamide gels. The separated samples were transferred to nitrocellulose membranes and nonspecific binding sites were blocked by immersing the membranes in a 5% skimmed milk–PBS solution (for 1h at RT). The membranes were incubated overnight at 4 °C with monoclonal antibody (mAb) specific for YadA (mAb 3G12), diluted 1:10. After four washes with PBS (each for 10 min), the membranes were incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (P0260; dilution 1:2,000) for 1h at RT. Antibody binding was detected by chemiluminescence using the ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions [2].

Serum-killing assay. Normal human serum (NHS) was obtained from healthy human donors who were devoid of anti-*Yersinia* antibodies. Blood was allowed to clot for 15 min at room temperature and for 60 min at 4 °C. Following centrifugation (4 °C, 2,500 x g, 30 min), the sera were collected, pooled, and stored at –70 °C in aliquots of 0.5 ml. Prior to use, the serum was allowed to thaw on ice. One-third of it was heat inactivated by incubation at 56 °C for 30 min (HIS). To block the CP activity, EGTA and MgCl₂ were added to another third to final concentrations of 10 and 5 mM, respectively. The last third represented the normal human serum [2]. Bacterial cultures were diluted appropriately to obtain 1.000–1300 bacteria in 10 μ l. Triplicates of 10 μ l of bacterial suspensions were incubated with 20 μ l of NHS (final NHS concentration of 66.7%), 20 μ l of HIS, or 20 μ l of EGTA-Mg serum at 37 °C for 30 min. Before plating on LB plates with appropriate antibiotics, 70 μ l of brain heart infusion broth (BHI) was added to each mixture to stop the complement function, and tubes were kept on ice. The serum bactericidal effect was calculated as



the survival percentage taking the bacterial counts obtained with bacteria incubated in HIS as 100%. The killing experiment was repeated three times for each strain.

Results and Discussion

The main goal was to characterize whether the absence of the WaaL ligase activity would influence the inherent serum resistance of pathogenic *Y. enterocolitica* serotype O:3 and O:8 bacteria. For this purpose we have constructed single and double *waaL*-knock-out mutants of YeO3 and YeO8 pathogenic strains.

Construction of *Y. enterocolitica* ligase mutants. Fully virulent *Y. enterocolitica* O:3 and O:8 strains were used for construction of *waaL* mutants. With help of allelic exchange strategy we managed to inactivate the *waaL_{OS}* and *waaL_{PS}* encoding regions. Obtained mutants were confirmed by colony hybridization, which was used for specific detection of the deletion in the *waaL* gene of Clm sensitive bacteria (Clm^S). Further verification of deletion was performed by PCR.

Presence of virulence plasmid and expressing of YadA protein was checked to be immunoblotting with mAb anti-Yad A (Fig. 1).

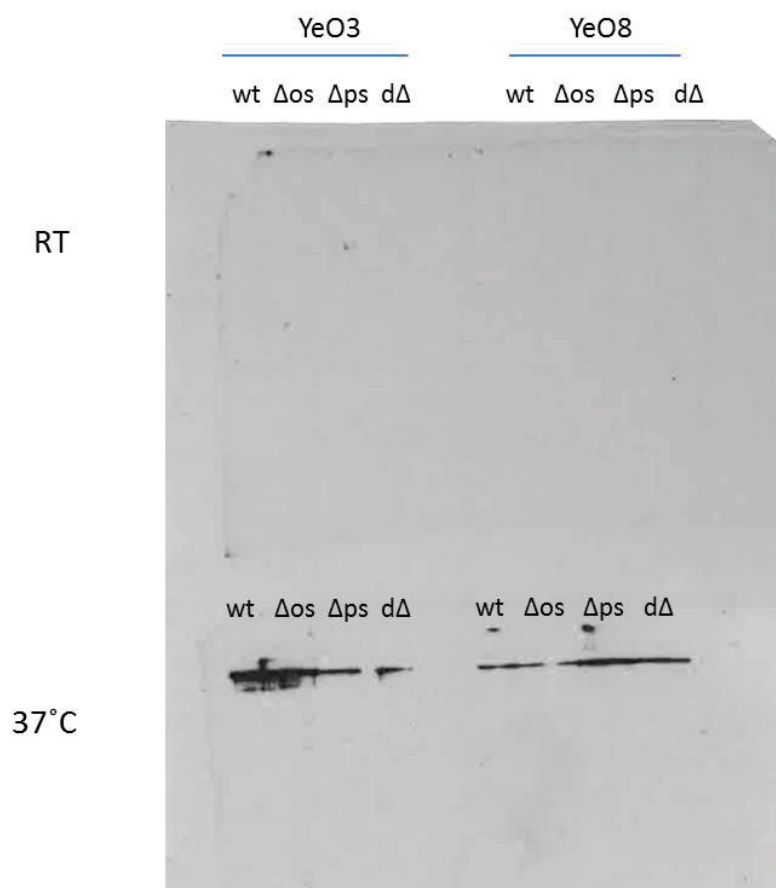


Fig. 1. Immunoblot analysis with mAb specific for YadA (wt-wild type, Δos & Δps – *waaL_{OS}* & *waaL_{PS}* single mutants, $d\Delta$ – double mutants)

CP/AP- and AP-mediated killing. According to the obtained results, we can see a clear difference between surviving of wild type bacteria and *waaL*-knock-out mutants of YeO3 and YeO8 in 30 min exposition with human serum. The single deletion of *waaL_{OS}* and *waaL_{PS}* genes reduced resistance of bacteria to NHS 2.5–5 times, respectively, compared to wild type YeO3. Double ligase mutants of YeO3 under NHS treatment didn't survive at all (Fig. 2A). AP-mediated killing with the same samples was in 2.4 (YeO3_{os}) and 1.3 (YeO3_{ps} & YeO3_{os_{ps}}) times more efficient than wild type ones (Fig. 2B).

Furthermore, single and double ligase mutants of YeO8 showed similar decreasing of resistance to NHS as YeO3 ones (Fig. 2C). In AP-mediated killing experiment with YeO8 mutants, however, we didn't follow the same trend. The single ligase mutants survived as well as wild type bacteria and double mutants in two times better than others (Fig. 2D).

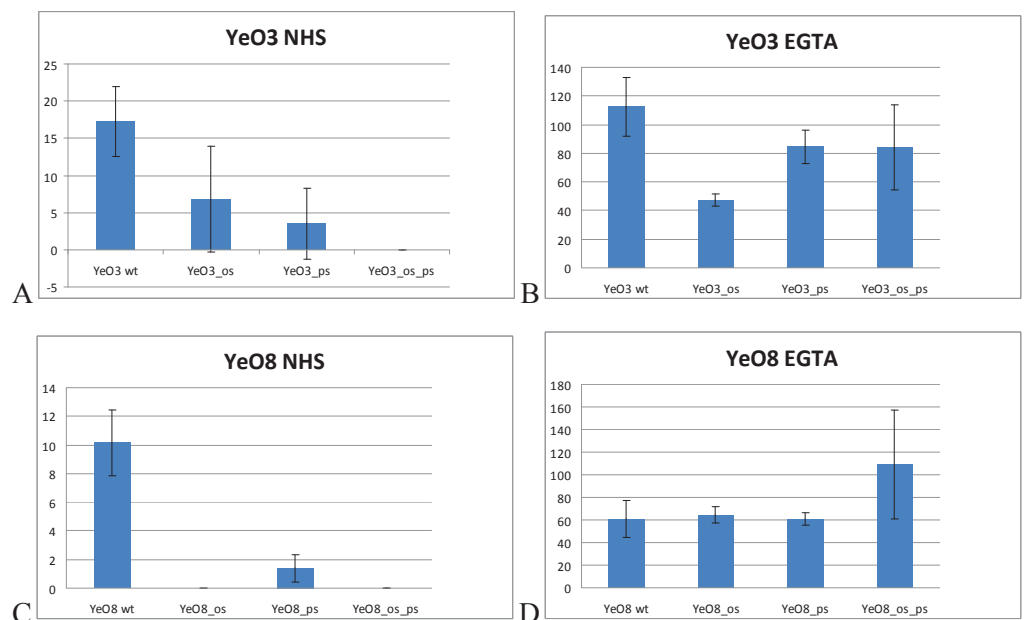


Fig. 2. Survival percentage of YeO3 ligase mutants in NHS (A) & EGTA-treated serum (B) and YeO8 (C, D)

These findings show that LPS' ligase deletion contributes to human serum resistance of *Yersinia enterocolitica* O:3 and O:8 bacteria. In general, bacterial exposition with normal serum caused total killing of double ligase mutants and provided much less surviving of single ones compared to wild type. It was some difference between serotypes but common tendency was the same.

Comparing two virulent serotypes, we have noticed some difference in surviving. It can be explained by LPS structure distinctions between YeO3 & YeO8 and the complement proteins deposition potential. It was observed that O-Ag, as a single



factor, could prevent deposition of covalently bound C3b on YeO3 bacteria after exposing bacteria to EGTA-Mg-treated serum in the beginning of incubation [2]. Indeed, we can follow sharp decreasing of surviving among *waaL_{os}* ligase mutants of YeO3 after exposing bacteria in EGTA-Mg-treated serum. On the other hand, we didn't observe the same tendency with YeO8 *waaL_{os}* ligase mutants and with double mutants of both serotypes. In the same way, survival rate of *waaL*-knock-out mutants of *Edwardsiella tarda* declined dramatically compared to parent strain [3].

It was considered that O-Ag played an important role in inhibition of the early phase of alternative pathway activation [4]. As for OC, previous studies do not indicate any direct involvement of OC in serum resistance [5]. It was shown that OC-positive, YadA- and Ail-negative strains were efficiently killed by complement. In the absence of YadA, however, OC seemed to potentiate Ail-mediated resistance [2].

Conclusions

In this work we have characterized the biological role of WaaL ligases in serum killing system. The results of normal serum killing showed clear reduction of serum resistance among single and double ligase mutants for both serotypes. YeO8 ligase mutants, however, showed full resistance to AP-mediated killing. Further work will be needed to clarify the role of WaaL LPS' ligases of *Y. enterocolitica* for virulence *in vivo*.

Table 1.

Bacterial strains

	Strain	Genotype	Reference
Yersinia enterocolitica	6471/76	YeO3 wild type strain, patient isolate	[6]
	6471/76-c	YeO3-c virulence plasmid cured derivative of 6471/76	[6]
	YeO3_Δ _{os}	<i>waaL_{os}::pSW23Tlig1727su</i>	This work
	YeO3_Δ _{ps}	<i>waaL_{ps}::pSW29-lig532del, KmR</i>	This work
	YeO3_Δ _{os} _Δ _{ps}	<i>waaL_{os}::pSW23T-lig1727su waaL_{ps}::pSW29-lig-532del, KmR</i>	This work
	8081	YeO8 wild type strain, patient isolate	[7]
	8081-L2	R ^{M+} derivative of wild-type strain 8081; serotype O:8; pYV+	[8]
	YeO8_Δ _{os}	<i>waaL_{os}::pSW23T-lig1727su, pYV+, ClmR</i>	This work
	YeO8_Δ _{ps}	<i>waaL_{ps}::pSW29-lig532del, KmR</i>	This work
	YeO8_Δ _{os} _Δ _{ps}	<i>waaL_{os}::pSW23T-lig1727su waaL_{ps}::pSW29-lig532del, KmR</i>	This work
Escherichia coli	ω7249	B2163Δ _{nic35} , <i>E. coli</i> strain for suicide vector delivery, requirement for diaminopimelic acid 0.3mM, KmR	[9]
	S17-1λ pir	A-pir lysogen of S17-1, <i>E. coli</i> strain for suicide vector delivery	[10]
	DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(<i>ara, leu</i>)7697 galU galK λ- rpsL nupG tonA	Life Technologies



Acknowledgments

This work was supported by the grants from Center for International Mobility (CIMO), Finland.

Ю.І. Шевченко^{1,2}, В.К. Позур¹, М. Скурник²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка вул. Академіка Глушкова, 2, Київ-022, Україна, 03022

² Haartman Institute, University of Helsinki, Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland, тел.: +38 (044) 521 32 31/+380954292532, e-mail: julia.i.shevchenko@gmail.com

УЧАСТЬ WAAI ЛІГАЗ БАКТЕРІЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:3 ТА O:8 В ФОРМУВАННІ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ДО СИРОВАТКИ КРОВІ

Реферат

Метою даної роботи було дослідження участі WaaI лігаз в біосинтезі ліпополісахариду (ЛПС) бактерій *Yersinia enterocolitica* серотипів O:3 та O:8; їх ролі в формуванні фенотипу ЛПС та резистентності *waaL*-мутантів до сироватки крові. WaaI лігази каталізують приєднання O-антигену (O-Ag) та зовнішнього полісахаридного кору (OC) до ліпиду А в процесі біосинтезу ліпополісахариду грамнегативних бактерій. В геномі бактерій *Y. enterocolitica* було ідентифіковано три гени лігаз, які були названі *waaL_{OS}*, *waaL_{PS}* та *waaL_{XS}*. **Методи.** Нокаутні мутанти по генам лігаз *waaL* були створені шляхом обміну алелями. Візуалізація фенотипів ЛПС створених мутантів відбувалась шляхом забарвлення сріблом гелю DOC-PAGE та імуноблоту з специфічними моноклональними антитілами до кору та O-полісахариду. Оцінювали виживання бактерій в нормальній сироватці крові (присутні класичний, лектиновий та альтернативний шлях активації комплементу) та обробленій EGTA (тільки альтернативний шлях). **Результати.** Отримані результати підтверджують участь WaaI лігаз в синтезі належної молекули ЛПС та відіграють важливу роль в формуванні резистентності до бактерицидної дії сироватки крові. **Висновки.** Лігази ЛПС бактерій демонструють низьку субстрату специфічність. За даних умов участь WaaL_{OS} лігази в лігуванні OC та OPC на ліпід А є істотною ніж WaaL_{PS}.

Ключові слова: WaaI лігаза, ліпополісахарид, *Yersinia enterocolitica*, резистентність сироватки.



Ю.И. Шевченко^{1,2}, В.К. Позур¹, М. Скурник²

¹ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, ул. Академика Глушкова, 2, Киев-022, Украина, 03022

² Haartman Institute, University of Helsinki, Haartmaninkatu 3 (P.O. Box 21), FIN-00014, Finland, тел.: +38 (044) 521 32 31/+380954292532, e-mail: julia.i.shevchenko@gmail.com

УЧАСТИЕ WAAI ЛИГАЗ БАКТЕРИЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA* O:3 И O:8 В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Реферат

Целью работы было исследование участия WaaL лигаз в биосинтезе липополисахарида (ЛПС) бактерий *Yersinia enterocolitica* серотипов O:3 и O:8; их роли в формировании фенотипа ЛПС и устойчивости *waaL*-мутантов к сыворотке крови. WaaL лигазы катализируют присоединение O-антигена (O-Ag) и внешнего полисахаридного кора (OC) к липиду A в процессе биосинтеза ЛПС грамотрицательных бактерий. В геноме бактерий *Y. enterocolitica* было идентифицировано три гена лигаз, которые были названы *waaL_{OS}*, *waaL_{PS}* и *waaL_{XS}*. **Методы.** Нокаутные мутанты по генам лигаз *waaL* были созданы путем обмена аллелями. Визуализация фенотипов ЛПС созданных мутантов происходила путем окраски серебром гелей DOC-PAGE и иммуноблота со специфическими моноклональными антителами к кору и O-полисахариду. Оценивали выживание бактерий в нормальной сыворотке крови (присутствуют классический, лектиновый и альтернативный путь активации комплемента) и обработанной EGTA (только альтернативный путь). **Результаты.** Полученные результаты подтверждают участие WaaL лигаз в синтезе надлежащей молекулы ЛПС и играют важную роль в формировании резистентности к бактерицидному действию сыворотки крови. **Выводы.** Лигаза ЛПС бактерий демонстрируют низкую субстратную специфичность. При данных условиях участие WaaL_{OS} лигазы в лигировании OC и OПС на липид A является более значимым чем WaaL_{PS}.

Ключові слова: WaaL лигаза, липополисахарид, *Yersinia enterocolitica*, резистентность сыворотки.

REFERENCES

1. Pinta, E., et al., Identification of three oligo-/polysaccharide-specific ligases in *Yersinia enterocolitica*. Mol. Microbiol., 2012. **83**(1): P. 125–36.
2. Biedzka-Sarek M., R. Venho and M. Skurnik, Role of YadA, Ail, and Lipopolysaccharide in Serum Resistance of *Yersinia enterocolitica* Serotype O:3. Infect Immun, 2005. **73**(4): P. 2232–44.
3. Xu L. et al., Characterization of *Edwardsiella tarda* *waaL*: roles in lipopolysaccharide biosynthesis, stress adaptation, and virulence toward fish. Arch. Microbiol., 2010. **192**(12): P. 1039–47.



4. Wachter E., and V. Brade. Influence of surface modulations by enzymes and monoclonal antibodies on alternative complement pathway activation by *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 1989. **57**: P. 1984–1989.
5. Skurnik M., R. Venho, J.-A. Bengoechea and I. Moriyono. The lipopolysaccharide outer core of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is required for virulence and plays a role in outer membrane integrity. Mol. Microbiol., 1999. **31**: P. 1443–1462.
6. Skurnik M. Lack of correlation between the presence of plasmids and fimbriae in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Appl. Bacteriol., 1984. **56**: P. 355–363.
7. Portnoy D.A., Moseley S.L. and Falkow S. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. Infect. Immun, 1981. **31**: P. 775–782.
8. Zhang L., Radziejewska-Lebrecht J., Krajewska-Pietrasik D., Toivanen P. and Skurnik M. Molecular and chemical characterization of the lipopolysaccharide O-antigen and its role in the virulence of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. Mol. Microbiol, 1997. **23**: P. 63–75.
9. Babic A., Guerout A.M. and Mazel D. Construction of an improved RP4 (RK2)-based conjugative system. Res Microbiol, 2008. **159**: P. 545–549.
10. Wilson K.J., Sessitsch A., Corbo J.C., Giller K.E., Akkermans A.D. and Jefferson R.A. beta-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. Microbiology, 1995. **141** (Part 7): P. 1691–1705.

Стаття надійшла до редакції 04.06.2014 р.



О.А. Савенко, Л.М. Буценко, Л.А. Пасічник, В.П. Патица

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03608, Україна,
тел.: + 38 (044) 526 55 78, e-mail: s.helen@ukr.net

RAPD-АНАЛІЗ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ВИДІЛЕНИХ З БУР'ЯНИВ В АГРОФІТОЦЕНОЗІ ПШЕНИЦІ

Мета роботи. Дослідження генетичної різноманітності штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з різних видів бур'янів: хвощу польового, березки польової, плоскоухи звичайної, осоту польового, підмаренника чіпкого, редьки дикої та лободи білої, що мали ознаки бактеріального ураження. **Методи.** RAPD–ПЛР аналіз. **Результати.** Проаналізовано штами *Pseudomonas syringae*, ізольовані з різних видів бур'янів в агрофітоценозі пшениці. Встановлено спорідненість ізольованих нами штамів з неопатотиповим штамом *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394 і типовим штамом *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. Більшість виділених штамів мали високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що є найпоширенішим на зернових культурах. Менш поширеним на пшениці є збудник бактеріального опіку *P. syringae* pv. *syringae* і лише три штами бактерій, виділених з бур'янів, мали з ним спільні продукти реакції. **Висновки.** Штами *P. syringae*, виділені з різних видів бур'янів, і штами *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, збудники бактеріальних хвороб пшениці, є генетично однорідною групою. Це підтверджує гіпотезу про те, що бур'яни є однією з екологічних ніш збереження і виживання збудників бактеріозів та за сприятливих умов можуть бути джерелом інфекції.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae*, генетична різноманітність, RAPD-ПЛР аналіз.

В останні роки велика увага приділяється вивченню бактеріальних хвороб цінних зернових культур [4]. Для того щоб отримати найбільш повну інформацію, необхідну для розуміння джерел інфекції та можливих шляхів її розповсюдження потрібно досліджувати всі компоненти агрофітоценозу, у тому числі і бур'яни. Твердження про те, що бур'яни можуть бути однією з екологічних ніш виживання збудників бактеріозів неодноразово висувалося науковцями [3]. Та для остаточних висновків необхідне вивчення генетичної спорідненості між фітопатогенами виділеними із зернових культур та бур'янів.

Зважаючи на схожість патоварів *Pseudomonas syringae* за фізіологічними і біохімічними властивостями, науковці намагаються отримати додаткову інформацію шляхом вивчення геному. Для цього досить успішно застосовується рестрикційний аналіз ДНК [16], аналіз повторюваних елементів ДНК, що отримані в результаті ампліфікації з REP-, ERIC-, BOX- праймерами (rep-ПЛР) [1,



9, 10]. Але результати отримані при дослідженні спорідненості мікроорганізмів за допомогою REP-, ERIC-, та BOX- ПЛР можуть бути менш інформативними для близько споріднених штамів [9]. В таких випадках AP-PCR/RAPD аналіз є більш ефективним, так як дає точніші оцінки між близькими популяціями, хоча і потребує оптимізації для кожної конкретної мети [10, 13].

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – довільно ампліфікована поліморфна ДНК – продукт ПЛР з довільними праймерами, метод запропонований [15]. Праймери, що використовують для RAPD-ПЛР, мають відносно невеликі розміри (8–12 нуклеотидів), довільну нуклеотидну послідовність і [G+C] – склад не нижче 50% [15]. RAPD-ПЛР аналіз успішно використовується для генетично-популяційного аналізу широкого кола мікроорганізмів. Переваги RAPD-ПЛР аналізу полягають і у тому, що він дозволяє встановити генетичну варіабельність цілого геному, порівняно з методами гібридизації рибосомальної РНК [7].

Враховуючи те, що нам не відома нуклеотидна послідовність ДНК аналізованих штамів, застосування техніки RAPD-ПЛР є найбільш оптимальним для досягнення поставлених завдань.

Метою роботи було дослідження генетичної різноманітності штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з уражених бур'янів.

Матеріали і методи

Досліджували 10 штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з уражених рослин бур'янів, відібраних в посівах пшениці в період 2012–2013 рр. в Київській, Чернігівській та Полтавській областях (штами *P. syringae*: 515в і 516а – хвощ польовий, 560а і 562 – березка польова, 650в і 650б – плоскуха звичайна, 662г – осот польовий, 684б – підмаренник чіпкий, 536а – редька дика, 566б – лобода біла) та типовий штам *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 (УКМ В-1027) і неопатотиповий штам *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* PDDCC 4394 (УКМ В-1011) із колекції культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Аналіз поліморфізму ДНК фітопатогенних штамів *P. syringae* проводили, використовуючи метод RAPD ПЛР [15].

Для виділення ДНК використовували 18–20-годинну культуру фітопатогенних бактерій, вирощену на МПБ при 28 °С в умовах гойдання (160 об/хв). Після культивування клітини осаджували центрифугуванням при 800g 10 хв, ресуспендували у фізіологічному розчині і знову центрифугували в тому самому режимі. ДНК виділяли, використовуючи набір реактивів «ДНК-сорб Б» («AmpliSens», Росія) за інструкцією виробника. Виділену ДНК зберігали в морозильній камері при температурі -20 °С.

Здійснення класичної RAPD-ампліфікації вимагає наявності в реакційній суміші одного короткого (до 10 нуклеотидів) праймеру, але для отримання достовірних результатів необхідно поєднувати декілька праймерів (від чотирьох до 10 і більше) [13]. Тому для отримання найбільш точних результатів щодо



спорідненості штамів *P. syringae* використали чотири праймери. Два з них, ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3') і ОРД-13 (5'-GGGGTGACGA-3') добре зарекомендували себе в роботі з бактеріями роду *Pseudomonas* [14].

Інші два праймери С 4 (5'-CCGCATCTAC-3') та С 13 (5'-AAGCCTCGTC-3') було вибрано доволіно враховуючи лише те, що послідовність праймера має містити більш, ніж 60% [G+C] і мати довжину близько десяти нуклеотидів [6].

Для ампліфікації з RAPD-праймерами готували суміш (25 мкл), що містила: 200 нг геномної ДНК; 25 пмоль праймеру; 2,5 Units SynTaq полімерази; 0,2 mM кожного дезоксинуклеотиду трифосфату; 2,5 мкл 10-кратного ПЛР буферу. Кожна реакційна суміш була ампліфікована на термоциклері MasterCycle Personal (Eppendorf, Німеччина) за таким режимом: початкова денатурація 95 °C 5 хв, 45 циклів: 94 °C – 1 хв, 38 °C – 1 хв, 74 °C – 1 хв [14].

Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,5% агарозному гелі з додаванням етідиуму броміду (0,5 мкг/мл); в ТВЕ буфері 40 хв за напруги 90 В. Як маркер використано 2000 bp DNA Ladder (O'RangeRuller, Standart, Fermentas).

Результати та їх обговорення

Всі досліджені штами бактерій *Pseudomonas syringae* при штучному зараженні були патогенними для рослини-хазяїна, інших видів бур'янів, а також викликали симптоми ураження на зернових культурах (пшениця, ячмінь, жито). Бактерії не відрізнялися за морфологічними і фізіолого-біохімічними властивостями, але належали до різних серогруп і різнилися за агресивністю до рослини-хазяїна. Більшість штамів були високо агресивними [5].

В результаті RAPD-ПЛР продукти ампліфікації утворювалися за використання всіх чотирьох праймерів (ОРА-13, ОРД-13, С 4, С 13). Лише за використання праймеру ОРА-13 (5'-CAGCACCCAC-3') вдалося отримати ДНК-фрагменти за результатами аналізу яких, штами *Pseudomonas syringae*, виділені з бур'янів, розподілилися на дві групи.

Штами *P. syringae* 515в, 536а, 560а, 562, 566б, 650в, 684б мали високий ступінь спорідненості з неопатотиповим штамом *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394, що є збудником базального бактеріозу пшениці. У цієї групи був спільний панівний фрагмент 900 т.п.н. і фрагмент 1500 т.п.н. (рис. 1). У раніше досліджених штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольованих з уражених рослин пшениці в Україні, також виявлено високий ступінь спорідненості із неопатотиповим штамом *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394 і переважальні фрагменти такого ж розміру [2].

Штами *P. syringae* 516а, 622г, 650б виявилися високо спорідненими з типовим штамом *P. syringae* pv. *syringae* 281, збудником бактеріальної плямистості, та мали спільні фрагменти довжиною 400 т.п.н., 800 т.п.н. та 1031 т.п.н.

У більшості досліджень генетичного поліморфізму фітопатогенних бактерій, ізольованих з різних рослин, штами об'єднувалися у групи зі спільною рослиною хазяїном [7, 12].



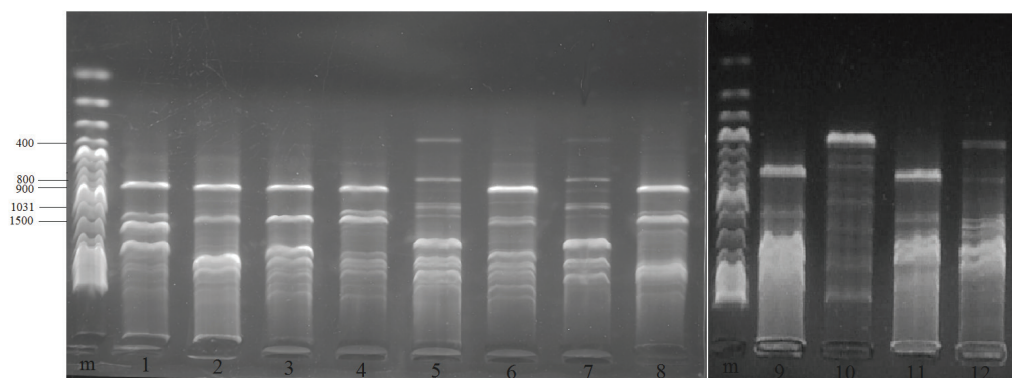


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР з використанням праймеру ОРА-13 у 1,5% агарозному гелі

m – маркери довжини фрагментів; 1. – *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394; 2. – *P. syringae* pv. *syringae* 281; 3. – *P. syringae* 515в; 4. – *P. syringae* 516а; 5 – *P. syringae* 536а; 6. – *P. syringae* 560а; 7. – *P. syringae* 562; 8. – *P. syringae* 566б; 9. – *P. syringae* 684б; 10. – *P. syringae* 662г; 11. – *P. syringae* 650в, 12. – *P. syringae* 650б.

Fig. 1. Distribution of PCR products amplified with ORA- 13 primer on 1.5% agarose gel after electrophoresis

m – DNA length marker; 1. – *P. syringae* pv. *atrofaciens* 4394; 2. – *P. syringae* pv. *syringae* 281; 3. – *P. syringae* 515в; 4. – *P. syringae* 516а; 5 – *P. syringae* 536а; 6. – *P. syringae* 560а; 7. – *P. syringae* 562; 8. – *P. syringae* 566б; 9. – *P. syringae* 684б; 10. – *P. syringae* 662г; 11. – *P. syringae* 650в, 12. – *P. syringae* 650б.

Дослідженням штамів *Xylella fastidiosa* встановлено, що відсоток генетичної різноманітності за рахунок географічного походження є меншим, ніж відсоток відмінностей, пов'язаний з різними рослинами, з яких виділений збудник [11]. У ході наших досліджень подібності між штамми *P. syringae*, що мають спільну рослину-хазяїна не виявлено. Але вдалося встановити спорідненість між штамми *P. syringae*, виділеними з бур'янів в посівах пшениці, та збудниками бактеріозів зернових культур. Більшість штамів мали високий ступінь спорідненості зі збудником базального бактеріозу пшениці *P. syringae* pv. *atrofaciens*, що є найпоширенішим на зернових культурах. Менш поширеним на пшениці є збудник бактеріального опіку *P. syringae* pv. *syringae* і лише три штами бактерій із бур'янів мали з ним спільні продукти реакції (рис. 2).

Проте, дослідниками [1] встановлено високий ступінь генетичної варіабельності штамів роду *Pseudomonas*, ізольованих з уражених тканин зернових культур з симптомами базального бактеріозу.

Отримані нами результати дозволяють зробити висновок, що штами *P. syringae*, виділені з різних видів бур'янів, і штами *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 та *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, збудники бактеріальних хвороб пшениці є генетично однорідною групою. Генетично

однорідною групою за даними RAPD-аналізу з використанням праймера OPA-13 є штами *P. syringae* pv. *atropaciens* ізольовані з пшениці [2]. Це підтверджує гіпотезу про те, що бур'яни можуть бути резервуарами збудників бактеріозів і, за сприятливих умов, являтися джерелом бактеріальної інфекції для сільськогосподарських рослин. В той же час, науковцям, які досліджували генетичну мінливість штамів *P. syringae* pv. *syringae*, ізольованих з бур'янів у фруктових садах, за допомогою RFLP- і ERIC – ПЛР аналізу не вдалося підтвердити припущення, що бур'яни забезпечують перезимівлю штамів *P. syringae* і слугують джерелом поширення інфекції [8].

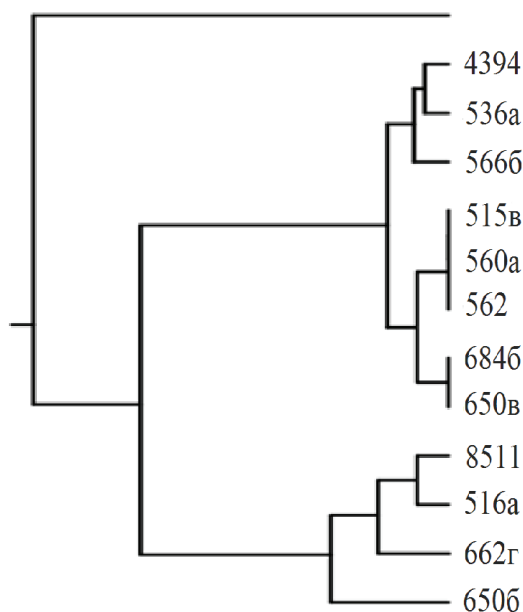


Рис. 2. Дендрограма спорідненості патогенних для бур'янів штамів бактерій роду *Pseudomonas*, побудована за результатами RAPD-профілювання з праймером OPA-13

Fig. 2. Dendrogram of relationship between weed-pathogenic strains of *Pseudomonas* species compiled on the results of RAPD-profiling with OPA-13 primer

Результати наших досліджень мають важливе значення для розуміння генетичної структури та динаміки популяції патогена *P. syringae* в агрофітоценозі пшениці і ґрунтах для розробки практичної стратегії профілактики та управління захворюваннями рослин сільськогосподарських культур [10].

О.А. Савенко, Л.М. Буценко, Л.А. Пасичник, В.Ф. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 164, Киев ГСП, Д 03680, Украина

RAPD-АНАЛИЗ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СОРНЯКОВ В АГРОФИТОЦЕНОЗЕ ПШЕНИЦЫ

Реферат

Цель. Исследование генетического разнообразия штаммов *Pseudomonas syringae*, выделенных из различных видов сорняков: хвоща полевого, вьюнка полевого, ежовника обыкновенного, осота полевого, подмаренника цепкого, редьки дикой и мари белой, с признаками бактериального поражения. **Методы.** RAPD-ПЦР анализ. **Результаты.** Проанализированы штаммы *Pseudomonas syringae*, изолированные из разных видов сорняков в агрофитоценозе пшеницы. Установлено родство исследованных штаммов с неопатотиповым штаммом *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, и типовым штаммом *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. Большинство выделенных штаммов имели высокую степень родства с возбудителем базального бактериоза пшеницы *P. syringae* pv. *atrofaciens*, который является самым распространенным на зерновых культурах. Менее распространенным на пшенице является возбудитель бактериального ожога *P. syringae* pv. *syringae* и только три штамма бактерий, выделенных из сорняков, имели с ним общие продукты реакции. **Выводы.** Штаммы *P. syringae*, выделенные из различных видов сорняков, и штаммы *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281 и *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, возбудители бактериальных болезней пшеницы являются генетически однородной группой. Это подтверждает гипотезу о том, что сорняки – это одна из экологических ниш сохранения и выживания возбудителей бактериозов и при благоприятных условиях они могут быть источником инфекции.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, генетическое разнообразие, RAPD-ПЦР анализ.

O.A. Savenko, L.M. Butsenko, L.A. Pasichnyk, V.P. Patyka

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU,
154, Zabolotny Str., Kyiv, D 03680, Ukraine

RAPD-ANALYSIS OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ISOLATED FROM WEEDS IN AGROPHYTOCENOSIS OF WHEAT

Summary

Aim. Investigation of the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* strains, isolated from various weeds: horsetail, field bindweed, barnyard grass, sow-thistle,



bedstraw, wild radish, orache white which had the signs of bacterial affection. **Methods.** RAPD-PGR analysis. **Results.** *Pseudomonas syringae* strains, isolated from various species of weeds in wheat agrophytocenosis, were analyzed. We have established the relationship of studied strains with neopatotype strain *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC 4394, and the type strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB 281. Most isolated strains had a high level of affinity with basal bacteriosis pathogen of wheat *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* which is the most common among the crops. Bacterial blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is less widespread and only three bacteria stains isolated from weeds had common reaction. **Conclusion.** *P. syringae* strains isolated from different types of weeds and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* NCPPB and *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* PDDCC4394 strains, pathogens of bacterial diseases of wheat are genetically homogeneous group. Our data support the hypothesis that weeds are one of the ecological niches of conservation and survival of bacterial pathogens and under favorable conditions can be a source of infection.

Key words: *Pseudomonas syringae*, genetic diversity, RAPD-PGR analysis.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Боброва В.К., Милютин И.А., Троицкий А.В. Генетическое разнообразие псевдомонад, ассоциированных с зерновыми культурами, пораженными базальным бактериозом // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 4. – С. 537–544.
2. Буценко Л.Н., Пасичник Л.А., Коломиец Ю.В. RAPD-анализ популяции *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* в Украине // Материалы VII Межд. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии” (Минск, 31 мая – 4 июня 2010 г.) – Минск, Беларусь, 2010. – С. 12–13.
3. Гвоздяк Р.И., Яковлева Л.М., Пасичник Л.А., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е. Бактерии рода *Pseudomonas* на сорняках // Микробиол. журн. – 2005. 67, № 2. – С. 63–69.
4. Пасичник Л.А., Патыка В.Ф., Ходос С.Ф., Винничук Т.С. Базальный бактериоз пшеницы и влияние агротехнических приемов на его распространение // Микробиол. журн. – 2012. – 74, № 4. – Р. 37–44.
5. Пасичник Л.А., Савенко Е.А., Буценко Л.Н., Щербина Т.Н., Патыка В.Ф. *Pseudomonas syringae* – возбудитель бактериальных болезней сорняков // Микробиол. журн. – 2013. – т. 75, № 4. – С. 41–46.
6. Clerc A., Manceau C., Nesme X. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, N 4. – P. 1180–1187.
7. Khoodoo M.H.R., Jaufeerally-Fakim Y. RAPD-PCR fingerprinting and southern analysis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains isolated from different aroid hosts and locations // Plant Dis. – 2004. – Vol. 88, N 9. – P. 980–988.



8. Little E. L., Bostock R. M., Kirkpatrick B. C. Genetic Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Strains from Stone Fruits in California // *App. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64, N 10. – P. 3818–3823.
9. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60, N 7. – P. 2286–2295.
10. Louws F.J., Rademaker I.L.W., de Bruijn F.J. The three DS of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection and diseases diagnosis // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 81–125.
11. Montero-Astúa M., Hartung J. S., Aguilar E., Chacón C., Li W., Albertazzi F. J., Rivera C. Genetic diversity of *Xylella fastidiosa* strains from Costa Rica, São Paulo, Brazil, and United States // *Phytopathology.* – 2007. – Vol. 97, N 10. – P. 1338–1347.
12. Momol M.T., Momol E.A., Lamboy W.F., Norelli J.L., Beer S.V., Aldwinekle H.S. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs) // *J. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol. 82, N 3. – P. 389–398.
13. Osborn M., Smith C. (eds). *Molecular microbial ecology* Published/Created: New York, NY: Taylor & Francis, c 2005. ISBN: 1859962831
14. Sazakli E., Leotsinidis M., Vantarakis A., Papapetropoulou M. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 1191–1203.
15. Williams J.G., Kubelik A.R., Livar K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // *Nucl. Acids. Res.* – 1990. – 18, N 22. – P. 6531–6535.

Стаття надійшла до редакції 23.07.2014 р.



O.M. Vasulyk, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko

Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Acad. Zabolotny St.,
Kyiv, MSP, D03680, Ukraine, e-mail: olyav345@gmail.com

PROBIOTIC PROPERTIES OF STRAINS OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLATED FROM FERMENTED PRODUCTS

Aim. To study probiotic properties of the strains *Lactobacillus plantarum*, isolated from the national fermented foods of plant and animal origin of different regions of Ukraine. **Methods.** The ability of strains *L. plantarum* to adhere was studied on the cells of human buccal epithelium. The ability to filmformation of strains *L. plantarum* was studied in plastic plates. We investigated the survival of *L. plantarum* in the conditions of the gastrointestinal tract: resistance to lysozyme, gastric juices and bile salts. **Result.** Probiotic properties of 24 strains *L. plantarum* has been studied. These strains have a wide range of antagonistic action on opportunistic microorganisms used and proved to be sensitive to the clinically important antibiotics. Index adhesion of the lactobacilli ranged from 3.63 ± 0.38 to 30.11 ± 1.47 and didn't depend on the source of strains isolation. Most of the studied strains (79%) had the average ability to form biofilms. Gastric juice was one of the most aggressive factors of the gastrointestinal tract, in its action, growth had 42% of the studied strains. *L. plantarum* resistant to lysozyme and to 0.3% bile salts have been determined. **Conclusions.** The probiotic properties of 24 strains of *L. plantarum* were investigated and analyzed. Selected two strains of *L. plantarum* 1047s and *L. plantarum* 691ch, which may be promising for use in oral probiotic preparations.

Key words: probiotic properties, *Lactobacillus plantarum*, fermented foods.

Lactic acid bacteria (LAB) of genus *Lactobacillus* is a helpful component of human biological community norm. These bacteria have a high biological activity, which contributes to their widespread use in modern probiotic preparations and foodstuffs [5]. Probiotic bacteria are defined by FAO/WHO as “live microorganisms which when administered in adequate amount confer a health benefit”. Probiotic effect of lactobacilli on the human body caused by the inhibition of growth of pathogenic and opportunistic microorganisms. This inhibition could be due to the inhibitory compounds such as organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins, synthesis of the vitamins and enzymes [11]. In addition, they also reduce the risk of gastro-intestinal disorders and prevent diarrhea [9]. To make a probiotic effect, the strain must survive passing through different parts of the gastrointestinal tract (GIT) and have the ability to adhere to intestinal surfaces. Probiotic strains of lactobacilli also have to be sensitive to clinically important antibiotics, including ampicillin, gentamicin, kanamycin, streptomycin and chloramphenicol to assess the safety of their use as food additives [14].

© O.M. Vasulyk, I.L. Garmasheva, N.K. Kovalenko, 2014



It is known that fermented foods has a positive effect on the host. This effect is provided by autochthonous strains LAB, therefore fermented foods are increasingly seen as a source of probiotic strains LAB in recent years. The use of fermented vegetables as a source of probiotic strains of Lactobacilli, paid much less attention compared to dairy products and this issue is very important for Ukraine. Therefore, the study of probiotic properties of strains of *Lactobacillus plantarum*, isolated from fermented vegetables and their comparison with strains isolated from dairy products is important in terms of the biology of these organisms and is of fundamental and practical importance.

The aim of the present work was to study the probiotic properties of strains of *L. plantarum*, isolated from the national fermented foods of plant and animal origin derived from different regions of Ukraine in the comparative aspect.

Materials and Methods

The 24 strains of *L. plantarum* were the main objects of the present research. These strains were isolated from the national fermented foods of plant (sauerkraut, pickled cucumbers) and animal origin (sour milk, cream, cheese) [3]. Stock cultures were stored in 30% glycerol at -50 °C. Before the experiment the microorganisms were subcultured three times on medium MRS [8].

Adhesion of *L. plantarum* strains to human buccal epithelium cells was studied using method of Brilis and Brilene [1]. Code adhesion of microorganisms was determined – the average number of bacteria in one epithelial cells which is involved in the adhesion.

Monitoring biofilms formation of all LAB was performed as described Rode et al. [15].

Bile tolerance (0.3%) strains of *L. plantarum* was determined according to the protocol proposed by Christiaens and Leer [7].

To determine the stability of *L. plantarum* to the gastric juices there were used overnight culture of each strain, 1 ml of gastric juice (pH 2.0) (CJSC “Biopharma”, Ukraine) and incubated at 37 °C for 2 h [12].

Resistance of *L. plantarum* to the action of lysozyme studied by the method of Vizoso Pinto et al. [17].

The statistical analysis of data was performed using the program «STATISTICA 7.0». To assess the reliability of quantitative indicators of differences in different strains there were used Post-hoc-test using the criterion of LSD. The difference was considered significant of $P \leq 0,05$.

Results and discussion

It was studied the biological activity of the 109 strains of *L. plantarum*. It was found that only 24 strains inhibited all the pathogenic bacteria tested such *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Candida albicans* and were sensitive to clinically



important antibiotics [2, 4]. These strains were selected for further studies on their probiotic properties.

According to FAO / WHO [10] to probiotic strains LAB put forward a number of requirements, including – adhesion to epithelial cells and resistance to gastrointestinal conditions. The ability to adhere to epithelial cells provides colonization resistance of the host. It was shown, that all the investigated strains of *L. plantarum* are able to adhere to the human buccal epithelium. Low index adhesion had 50% of the lactobacilli (from 3.63 ± 0.20 to 9.95 ± 0.61), 37% – average (from 10.20 ± 0.46 to 14.58 ± 1.13). 12.5% of the strains of *L. plantarum* (1047s, 1092s, 743s) showed the high adhesive activity, these strains were isolated from sauerkraut. From this source were isolated as strains that had low index adhesion (4.31 ± 0.28) (Fig. 1).

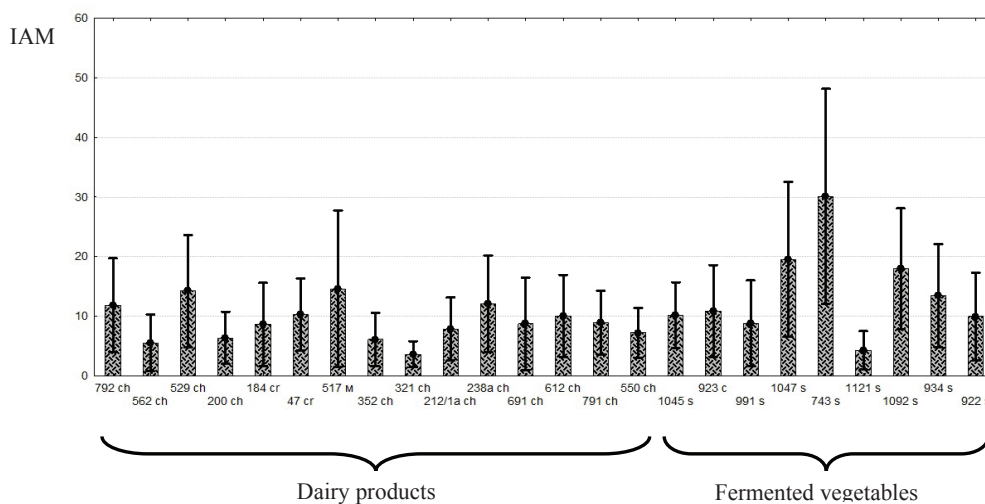


Fig. 1. Index adhesion strains of *Lactobacillus plantarum* to human buccal epithelium

Note: source of isolation of the strain: "ch" – cheese, "cr" – cream, "m" – sour milk, "s" – sauerkraut, "c" – pickled cucumbers; IAM – index adhesion of the strains.

The obtain results show that the adhesive activity depends on the strain and does not depend upon the source selection. The similar results were highlighted in another study, which shows that the adhesive activity depends on the strain of the microorganism [16].

LAB form biofilm, which ensures their survival in adverse conditions gastrointestinal microorganism of host [13]. Therefore, we have investigated the ability of *L. plantarum* strains to form biofilms (Fig. 2). Four strains of *L. plantarum* (529ch, 1045s, 352ch, 612ch) showed high ability to form biofilms. Many of the investigated strains (79%) had an average rate of biofilm formation, one strain of *L. plantarum* 517m practically did not show this ability. There was no established relationship between the source of isolation of the strain and its ability to form biofilms, but it should be noted that the two strains isolated from cheese had the highest rate of the formation of biofilm.

All investigated strains of *L. plantarum* proved resistant to 0.3% bile salts in the medium.

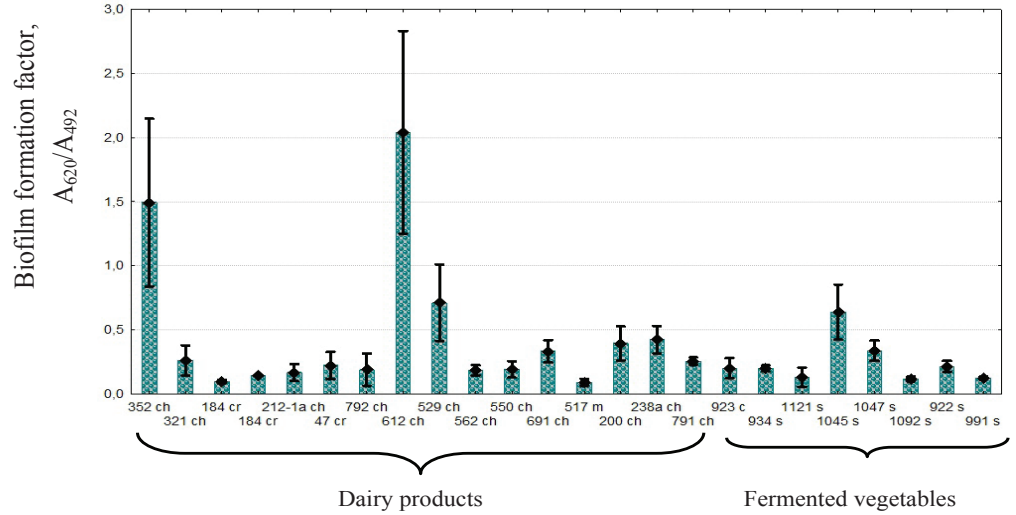


Fig. 2. Biofilm-forming ability of the strains of *Lactobacillus plantarum*

Note: source of isolation of the strain: "ch" – cheese, "cr" – cream, "m" – sour milk, "s" – sauerkraut, "c" – pickled cucumbers.

Gastric juice was the most aggressive factor in the gastrointestinal tract. It was found that 58% of strains of *L. plantarum* were inhibited by the action of the gastric juice for 2 hours. The other strains had different degrees of survival (Fig. 3). According to the literature, acceptable level of survival of LAB in conditions of the gastrointestinal tract is at least 1×10^4 CFU/ml [18]. Among the strains, only two answered the following criteria. They were isolated from a variety of sources: *L. plantarum* 1047s – with sauerkraut, *L. plantarum* 691c – cheese (Fig. 3).

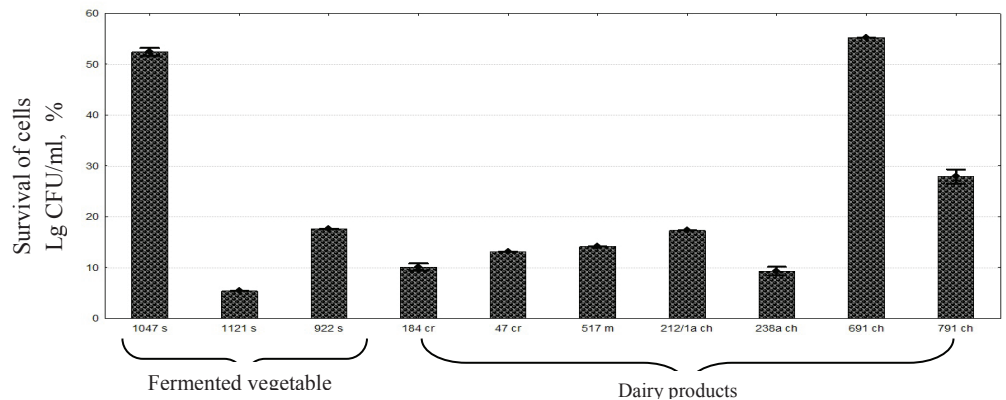


Fig. 3. Tolerance of *Lactobacillus plantarum* strains to intestinal juice

Note: source of isolation of the strain: "ch" – cheese, "cr" – cream, "m" – sour milk, "s" – sauerkraut.



There was no any relationship between the source of isolation of the strains and their sensitivity to the action of gastric juice.

We also investigated sensitivity of lactobacilli to the action of enzyme –lysozyme (Table).

Table

Stability of *Lactobacillus plantarum* strains to the action of lysozyme

Strains	Control, CFU/ml×10 ⁹	Experiment, CFU/ml×10 ⁹
352 ch	1,79±0,06*	1,57±0,23
791 ch	1,10±0,01*	0,50±0,02*
934 s	0,89±0,04*	0,82±0,07
562 ch	0,86±0,06*	0,50±0,02*
321 ch	1,78±0,02*	1,72±0,29
1121 s	5,70±0,16	0,37±0,04
1047 s	1,79±0,16	1,55±0,04*
550 ch	1,64±0,29	0,59±0,02*
184 cr	2,47±0,03*	1,79±0,01*
212/1a ch	1,28±0,09*	1,10±0,01*
691 ch	1,85±0,29*	1,35±0,03*

Note: * – significant difference ($p \leq 0,05$),

source of isolation of the strain: «ch» – cheese, «s» – sauerkraut, “cr” – cream.

It was established that this enzyme had no any significant effect on the growth of the most of lactobacilli. However, the concentration of CFU/ml of *L. plantarum* strains as 791ch, 1121 s, 550 ch, 184 cr halved decreased in comparison to controls.

So, as a result of being explored and analyzed the probiotic properties of 24 strains of *L. plantarum*. Most of the studied strains had high biological activity, but proved susceptible to the action of gastric juice, so they can be promising for the development of probiotics for oral cavity [6]. Thus, based primarily from the ability of lactobacilli to withstand harsh conditions of the gastrointestinal tract, we have selected two strains of *L. plantarum* 1047s and *L. plantarum* 691ch, which may be promising for use in oral probiotic preparations.

УДК 579.6:579.264

О.Н. Василюк, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина
e-mail: olyav345@gmail.com

ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ФЕРМЕНТИРОВАННЫХ ПРОДУКТОВ

Реферат

Цель. Изучить пробиотические свойства штаммов *L. plantarum*, изолированных из национальных ферментированных продуктов животного и растительного происхождения. **Методы.** Способность *L. plantarum* к адгезии изучали на клетках буккального эпителия человека. На пластиковых планшетах исследовали способность лактобацилл к пленкообразованию. Изучали выживание *L. plantarum* в условиях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ): устойчивость к лизоциму, желудочному соку и солям жёлчных кислот. **Результаты.** Штаммы *L. plantarum* имели широкий спектр антагонистической активности к использованным условно-патогенным микроорганизмам (УПМ), а также были чувствительны к клинически важным антибиотикам. Индекс адгезивности колебался от $3,63 \pm 0,38$ до $30,11 \pm 1,47$, и не зависел от источника выделения лактобацилл. У большинства штаммов (79%) обнаружили среднюю способность к формированию биопленки. Желудочный сок оказался одним из агрессивных факторов желудочно-кишечного тракта, при его действии выживало 42% штаммов. Установлено, что *L. plantarum* устойчивы к действию лизоцима и 0,3% солей жёлчных кислот. **Выводы.** Исследованы и проанализированы пробиотические свойства 24-х штаммов *L. plantarum*. Отобрано два штамма *L. plantarum* 1047к и *L. plantarum* 691m, которые могут быть перспективными для использования в составе пероральных пробиотических препаратов.

Ключевые слова: пробиотические свойства, *Lactobacillus plantarum*, ферментированные продукты.



УДК 579.6:579.264

О.М. Василюк, І.Л. Гармашева, Н.К. Коваленко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна
e-mail: olyav345@gmail.com

ПРОБІОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ШТАМІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ІЗОЛЬОВАНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ ПРОДУКТІВ

Мета. Вивчити пробіотичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих з національних ферментованих продуктів рослинного та тваринного походження, відібраних з різних регіонів України. **Методи.** Здатність штамів *L. plantarum* до адгезії вивчали на клітинах букального епітелію людини. На пластикових пласкиетах досліджували здатність лактобацил до плівкоутворення. Досліджували виживання *L. plantarum* в умовах шлунково-кишкового тракту: стійкість до лізоциму, шлункового соку та солей жовчних кислот. **Результати.** Штами *L. plantarum* мали широкий спектр антагоністичної дії щодо використаних умовно патогенних мікроорганізмів та виявились чутливими до клінічно важливих антибіотиків. Індекс адгезивності лактобацил коливався в межах від $3,63 \pm 0,38$ до $30,11 \pm 1,47$ та не залежав від джерела виділення. Більшість досліджуваних штамів (79%) мали середню здатність до формування біоплівки. Шлунковий сік виявився одним з найагресивніших чинників шлунково-кишкового тракту, при його дії ріст мали 42% штамів. Встановлено, що *L. plantarum* стійкій до лізоциму та 0,3% солей жовчних кислот. **Висновки.** Досліджено та проаналізовано пробіотичні властивості 24 штамів *L. plantarum*. Відібрано два штами *L. plantarum* 1047к та *L. plantarum* 691т, які можуть бути перспективними для використання у складі пероральних пробіотичних препаратів.

Ключові слова: Пробіотичні властивості, *Lactobacillus plantarum*, ферментовані продукти.

LITERATURE

1. Брилис В.К., Брилене Т.А., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
2. Василюк О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіол. журн. – 2014 – 76, № 3 – С. 24–30.
3. Василюк О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л., Олещенко Л.Т. Виділення та ідентифікація бактерій роду *Lactobacillus* з ферментованих продуктів різних регіонів України // Мікробіол. журн. – 2014 – 76, № 3 – С. 2–10.
4. Василюк О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л. Фізіолого-біохімічні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіол. журн. – 2014 – 76, № 5 – С. 2–8.



5. Доронин А.Ф., Шендеров Б.А. Функциональное питание. – М.: Грантъ, 2002. – 296 с.
6. Червинець В.М., Червинець Ю.В., Самоукина Е.С., Гаврилова О.А. Формирование биопленок антагонистическими штаммами лактобацилл полости рта // Стоматология. – 2012. – 91, № 1. – С. 16–19.
7. Christiaens H., Leer R.J., Pouwels P.H., Verstraete W. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – 58, № 12. – P. 3792–3798.
8. De Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. Medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – 23, № 1. – P. 130–135.
9. Dunne C. Adaptation of bacteria to the intestinal niche: Probiotics and gut disorder // Inflamm. Bowel Dis. – 2001. – 7, № 1. – P. 136–145.
10. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics In Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
11. Guarner F., Perdigon G., Corthier G., Salminen S., Koletzko B., Morelli L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? // Brit. J. Nutr. – 2005. – 93, № 6. – P. 783–786.
12. Kos B., Suskovic J., Goreta J., Matosic S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions // Food Technol. Biotechnol. – 2000. – 38, № 2. – P. 121–127.
13. Kubota H., Senda S., Nomura N., Tokuda H., Uchiyama H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress // J. Biosci. Bioeng. – 2008. – 106, № 4. – P. 381–386.
14. Parvez S., Malik K.M., Ah Kang S., Kim H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health // J. Appl. Microbiol. – 2006. – 100, № 6. – P. 1171–1185.
15. Rode T.M., Langsrud S., Holck A., Moretro T. Different Patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions // Int. J. Food Microbiol. – 2007. – 116, № 3. – P. 372–383.
16. Tallan R., Arias S., Bressollier P. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds // J. Appl. Microbiol. – 2007. – 102, № 2. – P. 442–451.
17. Vizoso Pinto M.G., Franz C.M., Schillinger U., Holzappel W.H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products // Int. J. Food Microbiol. – 2006. – 109, № 3. – P. 205–214.
18. Zhihui Y., Xue Z., Shengye L., Changying L., Da L., Zhennai Y. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – 29, № 3. – P. 489–498.

Стаття надійшла до редакції 08.08.2014 р.



**Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,
Т.О. Беляєва, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082,
Україна, e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Мета. Визначення складу жирних кислот ліпідів та ідентифікація штамів бактерій роду *Pseudomonas*, що окиснюють нафту та нафтопродукти, за їх жирно-кислотним складом. **Методи.** Аналіз жирних кислот штамів *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329* проводили методом газової хроматографії з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Результати.** Аналіз результатів хроматографічних досліджень показав, що домінуючими в жирно-кислотному профілі штамів *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329* були довголанцюгові ненасичені та насичені жирні кислоти, а також їх розгалужені структурні ізомери. В профілях обох штамів виявлено гексадеканову ($C_{16}:0$) та гексадеценову ($C_{16}:1w7c/C_{16}:1w6c$) жирні кислоти. На сумарну частку коротколанцюгових насичених гідроксикислот у штамі *Pseudomonas sp. ONU328* припадало 12,6%, а у штамі *Pseudomonas sp. ONU329* до 7% від загальної суми площ піків на хроматограмах складали розгалужені ізомери коротколанцюгових насичених гідроксикислот. Вперше встановлено, що штами близькосторідних видів псевдомонад чітко розмежовуються за наявністю циклогептадеканової у *Pseudomonas sp. ONU328* та 13-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ iso) і 12-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ anteiso) жирних кислот у *Pseudomonas sp. ONU329*. Ознакою цих штамів також слугує показник ненасиченості жирних кислот. **Висновок.** За складом жирних кислот досліджувані штами *Pseudomonas sp. ONU329* та *Pseudomonas sp. ONU328* ідентифіковані, відповідно як *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas fluorescens* ONU328. Відмічені особливості жирно-кислотного профілю досліджуваних мікроорганізмів систематизовані та можуть бути використані як допоміжний ключ для розмежування бактерій цих видів.

Ключові слова: склад жирних кислот, ідентифікація, *Pseudomonas*.

Поширеним класичним методом ідентифікації мікроорганізмів є аналіз їх жирно-кислотного профілю в клітині. Жирні кислоти входять до складу фосфоліпідів, які є основними структурними складовими мембран. Часто їх якісний та кількісний склад є специфічною ознакою та використовується як хемотаксономічний маркер.

На сьогодні, при жирнокислотному аналізі широко застосовується система ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа.



Очевидними перевагами такої системи є наявність автоматичної ідентифікації досліджуваних мікроорганізмів з використанням бібліотек жирно-кислотних профілів. [6, 7, 10]. Такі дослідження можуть бути важливими не лише при вивченні нових та малодосліджених мікроорганізмів, а також бути необхідними для періодичної перевірки культур на чистоту у процесі виготовлення нафто-окиснювального біопрепарату для біоремедіації довкілля [12].

У попередніх дослідженнях показано, що два штами бактерій, виділені з морського середовища та попередньо ідентифіковані класичними методами за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками як *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329*, за десять діб експозиції активно утилізують до 70% вуглеводнів сирової нафти з вихідною концентрацією 500 мг/дм³ [1], здатні до сорбції важких металів [4] та деструкції біорезистентних органічних поверхнево-активних сполук [2].

Метою роботи було визначення складу жирних кислот клітинних ліпідів та ідентифікація штамів бактерій роду *Pseudomonas sp.*, що окиснюють нафту та нафтопродукти, за їх жирно-кислотним складом.

Матеріали і методи

Як об'єкти дослідження використовували два штами бактерій *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329*, що зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Бактерії вирощували на середовищі Tryptic soy agar (Merck, Germany). Культивували при 28±1 °С впродовж 24 годин. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. Одну повну петлю вологої біомаси поміщали в скляні віали для подальшого руйнування клітин та омилення ліпідів мікроорганізмів. Омилення проводили додаванням суміші метанолу та луку, проби витримували впродовж 30 хв при температурі 95–100 °С. Метилювання жирних кислот проводили прогріванням реакційної суміші при 80 °С впродовж 10 хв після додавання розчину кислого метанолу. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [9].

Хроматографічне розділення проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм), детектор полум'яно-іонізаційний. Пробу, об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкова температура 170 °С з наступним градієнтом 5 °С/хв до 270 °С. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до загальної суми площ піків. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2.

Результати досліджень

Аналіз хроматограми, представленої на рис. 1, показав, що домінантними в жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Pseudomonas sp. ONU329*



були розгалужені ізомери насичених жирних кислот (42,0%), із яких 32,0% припадало на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso). Частка 12-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ anteiso) від загальної площі піків складала 17,4%. Нерозгалужені насичені жирні кислоти склали 7,5%, що в 5,6 разів менше, ніж розгалужених ізомерів.

Частка жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі: тетрадеканової кислоти ($C_{14}:0$) та гексадеканової кислоти ($C_{16}:0$) склали відповідно 2,6% і 4,9%. Ізомерів гексадеценаної кислоти виявлено 17,7%, з яких 13,5% припадає на 9-гексадеценанову та 10-гексадеценанову кислоти ($C_{16}:1$ w7c/ $C_{16}:1$ w6c) і 4,2% – на 15-метил-7-гексадеценанову кислоту ($C_{17}:1$ iso w9c). Дещо в менших кількостях виявлені коротколанцюгові насичені гідроксикислоти $C_{12}:0$ 3ОН (2,8%) та розгалужені структурні ізомери насичених гідроксикислот $C_{11}:0$ iso 3ОН (1,7%), $C_{13}:0$ iso 3ОН (2,1%).

За жирнокислотним складом, який розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.21 програми MIDI Sherlock, досліджуваний штам *Pseudomonas sp. ONU329* ідентифіковано як *Pseudomonas maltophilia* з високим індексом схожості – 0,719 (табл. 1).

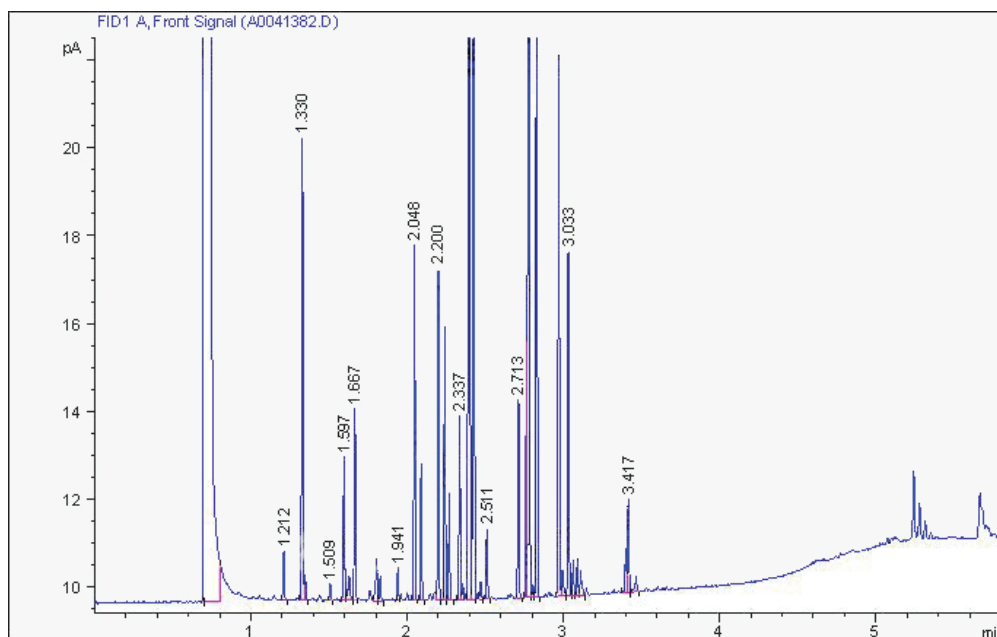


Рис. 1. Хроматограма жирних кислот загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU329*

Fig. 1. Chromatogram of fatty acids total lipids of strain *Pseudomonas sp. ONU329*

Особливістю другого досліджуваного штаму *Pseudomonas sp. ONU328* є наявність у його жирнокислотному профілі циклогептадеканової кислоти ($C_{17}:0$ cyclo) – 2,2% та відсутність міристинової кислоти ($C_{14}:0$). Виявлено додеканову кислоту ($C_{12}:0$) в кількості 4,1% від загальної суми площ піків (рис. 2).

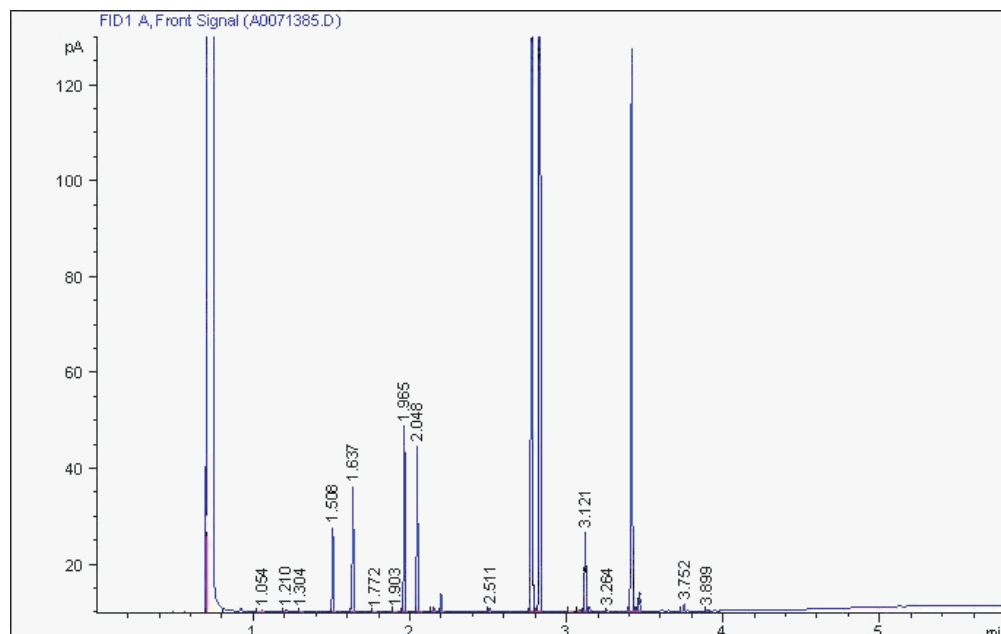


Рис. 2. Хроматограма жирних кислот загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328*

Fig. 2. Chromatogram of fatty acids total lipids of strain *Pseudomonas sp. ONU328*

Частка пальмітинової кислоти ($C_{16}:0$) складала 4,9% для штаму *Pseudomonas sp. ONU329*, а для штаму *Pseudomonas sp. ONU328* – 28,0%, при загальному вмісті насичених жирних кислот з парним числом атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі 7,5 і 32,0%, відповідно. В жирнокислотному профілі загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328* порівняно зі штамом *Pseudomonas sp. ONU329* в 5,7 рази переважали довголанцюгові насичені, та не реєструвались розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, на їх частку у складі штаму *Pseudomonas sp. ONU329* припадало близько 42,0%, з яких 32,0% – на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso).

Встановлено більший вміст ізомерів гексадеценової жирної кислоти ($C_{16}:1$ w7c/ $C_{16}:1$ w6c), майже в 2,7 рази, в складі загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328* (36,2%) порівняно зі штамом *Pseudomonas sp. ONU329*, та виявлено 11-октадеценову кислоту з ω ($C_{18}:1$ w7c) – 15,2%. При сумарному вмісті ненасичених жирних кислот – 51,4% у складі клітин штаму *Pseudomonas sp. ONU328* їх перебільшення щодо до насичених жирних кислот (32,0%) є більш помітним (табл. 1).

Порівняно з часткою насичених і ненасичених жирних кислот, як і в штамі *Pseudomonas sp. ONU329*, у малих кількостях виявлено коротколанцюгові насичені гідроксикислоти $C_{10}:0$ 3ОН (2,7%), $C_{12}:0$ 2ОН (5,3%), $C_{12}:0$ 3ОН (4,6%) (табл. 2).

Таблиця 1

Основні жирні кислоти (%) *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 1

The main fatty acids (%) of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

Жирна кислота	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. fluorescens</i> ONU328
C ₁₁ :0 iso	4,7	-
C ₁₂ :0	-	4,1
C ₁₄ :0	2,6	-
C ₁₅ :0 anteiso	17,4	-
C ₁₅ :0 iso	32,0	-
C ₁₆ :0	4,9	28,0
C ₁₆ :0 iso	1,5	-
C ₁₆ :1 w7c/ C ₁₆ :1 w6c	13,5	36,2
C ₁₆ :1 w9c	1,8	-
C ₁₇ :1 iso w9c	4,2	-
C ₁₇ :0 cyclo	-	2,2
C ₁₈ :1 w7c	0,4	15,2

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined

Другий досліджуваний штам *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковано як *Pseudomonas fluorescens* з індексом схожості 0,780.

Таблиця 2

Гідроксикислоти (%) *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 2

The hydroxy fatty acids (%) of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

ОН-кислота	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. fluorescens</i> ONU328
C ₁₀ :0 3OH	-	2,7
C ₁₁ :0 iso3OH	1,7	-
C ₁₂ :0 2OH	-	5,3
C ₁₂ :0 iso3OH	2,8	-
C ₁₂ :0 3OH	-	4,6
C ₁₃ :0 2OH	0,8	-
C ₁₃ :0 iso3OH	2,1	-

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined



З викладеного вище можна констатувати, що близькоспоріднені види чітко розмежовуються за характерними ознаками: наявністю в жирнокислотному складі загальних жирних кислот у *P. fluorescens* ONU328 циклогептадеканової кислоти, а у *P. maltophilia* ONU329 – 13-метилтетрадеканової кислоти (C₁₅:0 iso), 12-метилтетрадеканової кислоти (C₁₅:0 anteiso) та інших жирних кислот, що представлені в табл. 1. Іншим показником їх відмінності може слугувати показник ненасиченості (K_{ненасич}), що розраховується за співвідношенням загальних кількостей ненасичених і насичених жирних кислот, або за відсотками вміст пальмітинової (C₁₆:0) та пальмітолеїнової (C₁₆:1 w7c/C₁₆:1 w6c) кислот. Так, для штаму *P. maltophilia* ONU329 показник ненасиченості з урахуванням насиченої розгалуженої жирної кислоти C₁₅:0 anteiso дорівнює 0,22 (15,4/71,1), а для штаму *P. fluorescens* ONU328 з урахуванням кислоти C₁₇:0 cyclo – 1,50 (51,4/34,3). Частка C₁₆:0 і C₁₆:1 w7c/C₁₆:1 w6c при переході від штаму *P. maltophilia* ONU329 до штаму *P. fluorescens* ONU328 підвищується з 4,9 до 28,0% і від 13,5 до 36,2%.

У таблиці 3 наведено особливості жирнокислотного профілю досліджуваних мікроорганізмів, які можуть бути використані як допоміжний ключ для диференціації на видовому рівні (за результатами дослідження складу жирних кислот) бактерій роду *Pseudomonas*.

Таблиця 3

Особливості складу жирних кислот досліджуваних штамів
P. maltophilia ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 3

Characteristics of fatty acid composition of the investigated strains
P. maltophilia ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

Штам	K _{ненасич}	Наявність ЖК			
		C ₁₇ :0 cyclo	C ₁₅ :0 anteiso та C ₁₅ :0 iso	C ₁₇ :1 iso w9c	C ₁₂ :0
<i>P. maltophilia</i> ONU329	0,22	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> ONU328	1,50	+	-	-	+

Таким чином, при аналізі жирнокислотного складу з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock, досліджувані штами *Pseudomonas* sp. ONU329 та *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковані як *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas fluorescens* ONU328, відповідно.



Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач, Т.А. Беляева,
О.Г. Горшкова, В.А. Иваныця

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

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ОКИСЛЯЮЩИХ НЕФТЕПРОДУКТЫ

Реферат

Цель. Определение состава жирных кислот клеточных липидов и идентификация штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, которые окисляют нефть и нефтепродукты. **Методы.** Жирно-кислотный анализ штаммов *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 проводили методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Результаты.** Анализ результатов хроматографических исследований показал, что доминантными в жирно-кислотном профиле штаммов *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 являлись длинноцепочечные ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, а также их разветвленные структурные изомеры. В профилях обоих штаммов были обнаружены гексадекановая ($C_{16}:0$) и гексадеценовая ($C_{16}:1\ w7c/C_{16}:1\ w6c$) жирные кислоты. На суммарную долю короткоцепочечных насыщенных гидроксикислот у штамма *Pseudomonas sp.* ONU328 приходилось 12,6%, а у штамма *Pseudomonas sp.* ONU329 до 7% от общей суммы площадей пиков на хроматограммах составляли разветвленные изомеры короткоцепочечных насыщенных гидроксикислот. Впервые установлено, что штаммы близкородственных видов псевдомонад четко разграничиваются по наличию циклогептадекановой у *Pseudomonas sp.* ONU328, а также 3-метилтетрадекановой ($C_{15}:0\ iso$) и 12-метилтетрадекановой ($C_{15}:0\ anteiso$) жирных кислот у *Pseudomonas sp.* Отличительным признаком этих штаммов является показатель ненасыщенности жирных кислот. **Вывод.** По составу жирных кислот исследуемые штаммы *Pseudomonas sp.* ONU329 и *Pseudomonas sp.* ONU328 идентифицированы соответственно как *Pseudomonas maltophilia* ONU329 и *Pseudomonas fluorescens* ONU328. Отмеченные особенности жирно-кислотного профиля исследуемых микроорганизмов систематизированы и могут быть использованы в качестве вспомогательного ключа для разграничения бактерий этих видов.

Ключевые слова: состав жирных кислот, идентификация, *Pseudomonas*



**T.V. Gudzenko, N.V. Korotaeva, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva,
O.G. Gorshkova, V.O. Ivanytsia**

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*, OXIDIZING PETROLEUM PRODUCTS

Summary

Aim. Determination of fatty acid composition of lipids and identification of strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*, which oxidize crude oil and petroleum products. **Methods.** The fatty acid analysis of strains of *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 were carried out by gas chromatography using identification of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Results.** The analysis of the results of gas chromatography showed that long-chain unsaturated and saturated fatty acids and branched structural isomers dominated in profile of fatty acid of the strains of *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329. In the profiles of fatty acid of both strains there were detected hexadecanoic acid (C₁₆:0) and hexadecanoic acid (C₁₆:1 w7c/C₁₆:1 w6c). This short-chain saturated hydroxy acids of the strain of *Pseudomonas sp.* ONU328 accounted for 12.6%, and the branched structural isomers of short-chain saturated hydroxy acids of the strain of *Pseudomonas sp.* ONU329 – up to 7% of the total peak areas. For the first time there were established that the closely related species of *Pseudomonas* were distinguished by the presence of cycloheptadecanoic acid of *P. fluorescens* ONU328 and 13-methyltetradecane acid (C₁₅:0 iso), 12-methyltetradecane acid (C₁₅:0 anteiso) of *P. maltophilia* ONU329. A distinctive indicator of their separation is a measure of unsaturations. **Conclusion.** The fatty acid composition of the investigated strains of *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 identified as *Pseudomonas maltophilia* ONU329 and *Pseudomonas fluorescens* ONU328. The peculiarities of fatty acid profile of the studied microorganisms were systematized and can be used as an auxiliary key for differentiation at the species level (according to a study in cellular fatty acid composition of bacteria in these species).

Key words: fatty acid composition, identification, *Pseudomonas*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Пузирьова І.В., Лісютін Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4 (24). – С. 72–80.
2. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Горшкова О.Г., Пузирьова І.В., Іваниця В.О. Видалення броміду гексадецилпіридинію із водних розчинів з



бактеріями роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітозаном // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 1 (25). – С. 72–78.

3. Жданов Р.И., Керн Д., Лоренц В., Ибрагимова М.Я. Жирнокислотный состав ДНК-связанных липидов *Pseudomonas aurantiaca* по данным масс-спектрометрии // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 6. – С. 437–438.

4. Іваниця В.А., Бухтияров А.Е., Лисютин Г.В., Захарія А.Н., Гудзенко Т.В. Аккумуляция тяжелых металлов бактериями рода *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4 (20). – С. 76–83.

5. Кейтс М. Техника липидологии. – М. : Мир, 1975. – 324 с.

6. Шмырина А.С. Жирнокислотный профиль и структурное моделирование ДНК-связанных липидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. – 21 с.

7. Carla C.C.R., de Carvalho, Maria-Jose Caramujo. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds // Molecules. – 2014. – V. 19. – P. 5570–5598; doi: 10.3390/molecules 19055570. – www.mdpi.com/journal/molecules.

8. Kunitsky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock microbial identification system. In Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods; Miller M.I., Ed.; Davis Healthcare International Publishing, LLC: Baltimore, MD, USA. – 2005. – Vol. III. – P. 1–17.

9. MIS Operating Manual. www.midi-inc.com, September 2012.

10. Mukund Chandra Thakur, Arif Khan, Hiren Doshi. Isolation and Screening of Dye Degrading Microorganisms from the Effluents of Dye and Textile Industries at Surat // American Journal of Environmental Engineering. – 2012. – № 2 (6). – P. 152–159. doi: 10.5923/j.ajee.20120206.02 e-ISSN: 2166-465X.

11. Piotrowska-Seget Z., Mrozek A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms // Polish Journal of Environmental Studies. – 2003. – Vol. 12, № 6. – P. 669–675.

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

Стаття надійшла до редакції 08.08.2014 р.



УДК 579.262

Н.И. Адамчук-Чалая, Л.В. Титова, Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, 03143, Киев, Украина,
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: m_nv@mail.ru

МИКРОБНЫЕ ПЕЙЗАЖИ РИЗОСФЕРЫ СОИ ПРИ ИНТРОДУКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ИНОКУЛЯНТОВ

Цель. Изучить пространственно-функциональную структуру микробиоценоза ризосферы сои при интродукции клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий в составе различных инокулянтов с использованием структурного анализа пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания. **Методы.** В работе применен новый подход, позволяющий определить морфологическое разнообразие бактериального сообщества в ненарушенных бобово-ризобияльных системах, базирующийся на использовании полимерных пленок с последующим анализом образовавшихся на них микробных ценозов при помощи сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии. **Результаты.** Структурный анализ пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания в щадящем режиме показал, что в варианте с инокуляцией семян сои монокультурой *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 или совместно с *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 возрастает количество ризосферных бактерий и их морфометрические показатели. **Выводы.** Инокуляция семян сои моно- и комплексными препаратами брадиризобий способствовала увеличению количественно-морфологических характеристик популяций бактерий в ризосфере. Наибольшие показатели получены при совместной инокуляции исследуемых бактерий.

Ключевые слова: ризосферный микробиоценоз, соя, инокулянты, биоплёнка обрастания.

Исследование микробно-растительных взаимоотношений – одна из наиболее актуальных проблем в почвенной и сельскохозяйственной микробиологии, важным аспектом которой является колонизация поверхности корня и ризосферы почвенными микроорганизмами [3, 4]. Мониторинг микроорганизмов в естественной среде обитания необходим для лучшего понимания стратегий их выживания, что важно для повышения эффективности интродуцированных хозяйственно-полезных микроорганизмов – биоагентов микробных препаратов. С теоретической и практической точек зрения представляет интерес изучение колонизации микроорганизмами ризосферы под влиянием различных агрономических приёмов, в частности, инокуляции семян биопрепаратами. Для эффективного управления микробными популяциями необходимо также знать особенности их пространственно-функциональной организации, которая составляет архитектонику микробных ценозов.

© Н.И. Адамчук-Чалая, Л.В. Титова, Г.А. Иутинская, 2014



Однако возможности мониторинга микробиоты имеют ряд принципиальных ограничений, поскольку микроорганизмы, которые могут быть изолированы из естественных сред обитания на отдельных питательных средах, составляют лишь малую часть микробного сообщества почв [1, 4, 5]. Микробные ценозы гетерогенны и состоят из популяций с разнообразными метаболическими способностями. Методические подходы к изучению микробных сообществ в их естественной ненарушенной уникальной структуре немногочисленны. Известны классические методы с использованием стекол обрастания Холодного, капилляров Перфильева и Габбе. Перспективна новая модификация аппликационных методов, основанная на анализе микробного пейзажа ризосферы с использованием полиэтилентерефталатных пленок (ПЭТ-пленок) обрастания из биосовместимого гидрофобного прозрачного полимера, позволяющих исследовать ценоз в его нативной архитектуре [1].

Целью работы было изучение архитектоники микробиоценоза ризосферы сои при интродукции штаммов клубеньковых и фосфатмобилизирующих бактерий в составе различных инокулянтов с использованием структурного анализа пейзажных панорамных снимков биопленок обрастания.

Материалы и методы

В работе изучали ризосферные микробиоценозы сои сорта Алиса. Опыты проводили в полевых условиях на серой лесной почве (Киевская обл., Украина). Исследовали варианты с моноинокуляцией семян *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018, с бинарной инокуляцией семян брадиризовиями совместно с фосфатмобилизирующими бациллами *Bacillus megaterium* УКМ В-5724, а также без инокуляции (контрольный вариант, обработка семян водой).

Для получения инокулянтов культуру *B. japonicum* УКМ В-6018 выращивали в периодических условиях на качалке (140 об/мин) в течение 4 суток при 28 °С на маннитно-дрожжевой среде. *B. megaterium* УКМ В-5724 культивировали в аналогичных условиях в течение 2 суток. При бинарной инокуляции культуры микроорганизмов смешивали в сочетании 3:1. Бактериальная нагрузка при моно- и бинарной инокуляции составляла 10^7 клеток на семя. Семена инокулировали в день посева.

Для изучения морфологии клеток исследуемых микроорганизмов в жидкой среде обитания суспензионные культуры бактерий наносили на формваровую подложку сеточек для микроскопирования, фиксировали в парах 25% глютаральдегида и обрабатывали 2%-ной фосфорновольфрамовой кислотой, рН 7,2, методом негативного контрастирования. Локализацию брадиризовий в среде определяли по реакции связывания галактозоспецифических лектинов сои с соответствующими углеводами, входящими в состав клеточной стенки клубеньковых бактерий, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (JEOL JEM-1400, Япония). При этом препараты клеток *B. japonicum* УКМ В-6018 на сеточках обрабатывали соевым лектином, полученным из Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), в разведении (1:32).



Наличие глобул поли-β-оксибутирата или поли-окси-масляной кислоты (ПОМ) в клетках *B. japonicum* и *B. megaterium* подтверждали световой микроскопией (NU-2 и МТ 5300Н, Япония), нанося бактериальной петлей 7%-ый водный раствор нигрозина на бактериальную суспензию на покровном стекле. Для выявления локализации гранул волютина (ГВ) в бактериальных клетках использовали краситель по методике Раскиной [2].

Для исследования морфологии клеток *B. japonicum* и *B. megaterium* при их обитании в почве в стерилизованную текучим паром почву вносили суспензии бактерий до концентрации 10^8 кл/г, а также ПЭТ-пленки размером 1x5 см. Предварительно пленки стерилизовали этанолом. Экспозицию проводили в течение 10 суток.

С целью изучения пространственной структуры ризосферного микробного ценоза сои в фазе развития 2–3 настоящих листьев возле поверхности главного корня помещали стерилизованные этанолом ПЭТ-пленки. Экспозицию пленок проводили в течение 10 суток.

После извлечения ПЭТ-пленок из почвы сохранялась целостность сформированной в биопленке обрастания микробной ассоциации, которую анализировали по методике [1] с помощью сканирующей (Jeol JSM 35С, Япония) и трансмиссионной (JEOL JEM-1400, Япония) электронной микроскопии. Исследовали по 10 полей зрения на пяти участках биопленки на расстоянии 1 мм друг от друга для каждого варианта. Подсчитывали количество бактериальных клеток на 100 мкм² пленки и определяли их морфометрические параметры. Варьирование размеров бактерий исчисляли по десяти электронограммам по 50 клеток в поле зрения.

Результаты экспериментов обрабатывали статистически по программе STAT.

Результаты и их обсуждение

Изучение морфологии клеток *B. japonicum* УКМ В-6018, входящих в состав инокулянтов, показало, что большую часть популяции (67,1%) в культуральной жидкости составляли палочковидные бактерии средней величины: 0,3-0,8x1,5-2,0 мкм (табл. 1).

Таблица 1

Соотношение бактерий *B. japonicum* УКМ В-6018 по размерам в разных условиях обитания

Table 1

Ratio of *B. japonicum* UCM В-6018 bacteria size in different conditions

Среда	Относительное содержание клеток в популяции по размерам, % от общего количества		
	Мелкие ширина до 0,3 мкм длина до 1,5 мкм	Средние ширина 0,3-0,8 мкм длина 1,5- 2,0 мкм	Большие ширина более 0,8 мкм длина более 2,0 мкм
Жидкая питательная среда	13,5	67,1	19,4
Стерильная почва	7,1	37,7	55,2



В стерильной почве в популяции *B. japonicum* УКМ В-6018 преобладали крупные клетки размером более 0,8x2,0 мкм (55,2%).

На электронограммах (рис. 1а) клетки суспензионной культуры *B. japonicum* имели тонкую клеточную стенку (КС) 50–70 нм, окруженную толстой полисахаридной капсулой (ПК) (рис. 1а). Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) отделяла клеточную стенку от мелкозернистой цитоплазмы, содержащей ПОМ и гранулы волютина. Клетки суспензионной культуры *B. megaterium* УКМ В-5724 были немного толще клеток брадиризобий и аккумулировали липидные капли (ЛК) вокруг гранул волютина (рис. 1б).

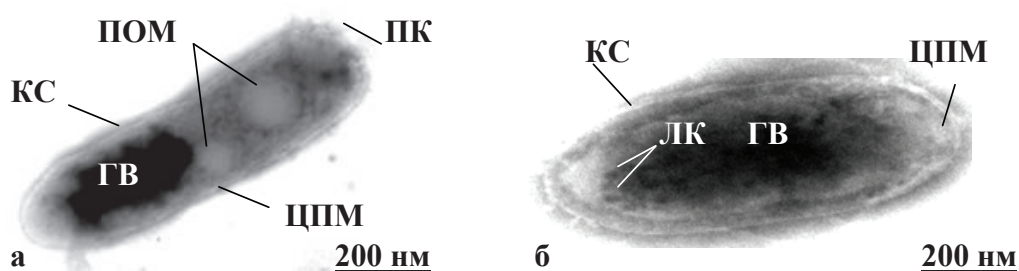


Рис. 1. Электронограммы клеток суспензионных культур (а – *B. japonicum* УКМ В-6018, б – *B. megaterium* УКМ В-5724)

Электронная трансмиссионная микроскопия (JEOL JEM-1400, Япония). Обозначения: ПОМ – полиоксимасляная кислота (поли-β-оксибутират), КС – клеточная стенка, ПК – полисахаридная капсула, ГВ – гранулы волютина, ЛК – липидные капли, ЦПМ – цитоплазматическая мембрана.

Fig. 1. Electron micrographs of cells in the suspension culture (a – *B. japonicum* UCM В-6018, б – *B. megaterium* UCM В-5724).

Electron transmission microscope (JEOL JEM-1400, Japan). Designations: ПОМ – poly-β-oxobutyrate, КС – cell wall, ПК – polysaccharide capsule, ГВ – volutine granules, ЛК – lipidic drops, ЦПМ – cytoplasmic membrane.

В стерильной почве клетки *B. japonicum* имели удлиненную эллиптическую форму (рис. 2а).

Поверхность клеток *B. japonicum* УКМ В-6018 характеризовалась специфической реакцией связывания галактозоспецифических лектинов с соответствующим углеводом, входящим в состав клеточной стенки (рис. 2б, центры связывания указаны стрелками). Насчитывалось 43–60 единиц меченых лектинов на 1 мкм² клеточной поверхности. В популяции клеток *B. megaterium* УКМ В-5724 в стерильной почве такая реакция не наблюдалась (рис. 2в). По различиям реакции связывания лектинов между ризобиями и бациллами можно было выявить их локализацию при совместной интродукции в почву. У обоих инокулянтов в цитозоле средней электронной плотности располагались осмиофильные гранулы диаметром 70–150 нм, которые у палочковидных бактерий представлены жировыми включениями и гранулами волютина. В со-

став волютиновых или метахроматических гранул также входят полифосфаты, макроэргические связи которых выступают энергетическими депо, способствующими выживанию бактерий в почве [2]. В отличие от клеток в суспензии, ризобии в стерильной почве утрачивали жгутик, содержали меньше клеточных включений.

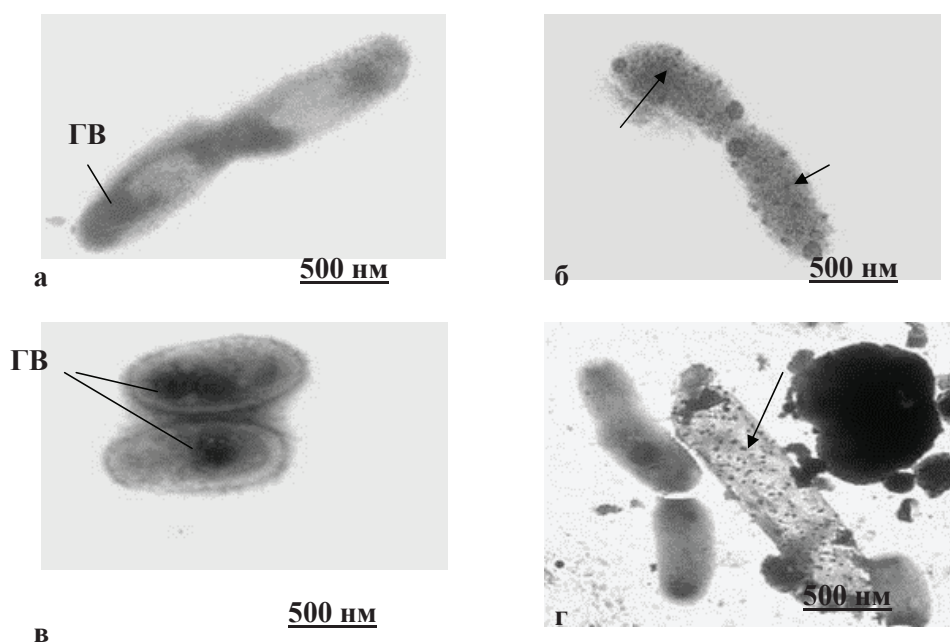


Рис. 2. Электронограммы бактериальных культур в стерильной почве

(а – *B. japonicum* УKM В-6018, без обработки лектинами, б – *B. japonicum* УKM В-6018, обработка лектинами, в – *B. megaterium* УKM В-5724, обработка лектинами, г – ассоциация *B. japonicum* УKM В-6018 и *B. megaterium* УKM В-5724, обработка лектинами). Электронная трансмиссионная микроскопия (JEOL JEM-1400, Япония). Стрелками указаны метки лектинов.

Fig. 2. Electron micrographs of bacterial cultures in the sterilized soil

(а – *B. japonicum* UKM B-6018, without lectin treatment, б – *B. japonicum* UKM B-6018, with lectin treatment, в – *B. megaterium* UKM B-5724, with lectin treatment, г – association of *B. japonicum* UKM B-6018 and *B. megaterium* UKM B-5724, with lectin treatment). Electron transmission microscope (JEOL JEM-1400, Japan). Lectin labels pointed.

В нестерильных условиях полевых опытов поверхность ПЭТ-пленки обрастала биопленкой, сформированной ризосферными микроорганизмами, представленными палочками различной величины, располагающимися на корешках и прилегающих к ним частицам почвы. При исследовании микробиоценоза ризосферы сои с помощью электронной трансмиссионной микроскопии в варианте моноинокуляции (рис. 3а) и бинарной инокуляции (рис. 3б) обнаружены микроорганизмы длиной более 2 мкм с высокой плотностью лектиновой метки на поверхности капсул, очевидно, принадлежащие к роду *Bradyrhizobium*.

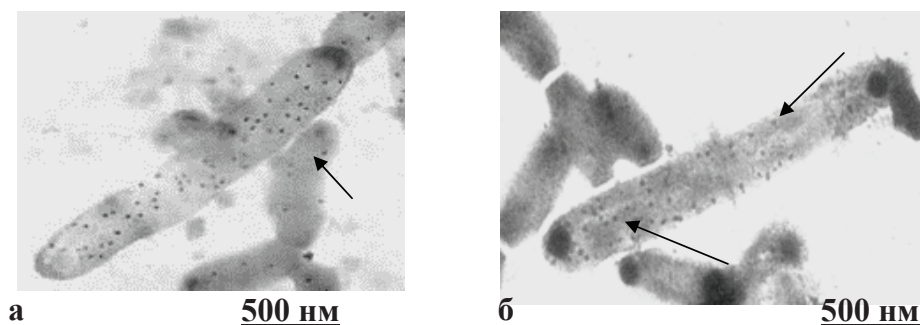


Рис. 3. Электронограммы микробного ценоза ризосферной почвы сои в полевом эксперименте

(а – моноинокуляция, б – бинарная инокуляция). Электронная трансмиссионная микроскопия (JEOL JEM-1400, Япония). Стрелками указаны метки лектинов.

Fig. 3. Electron micrographs of microbial cenosis of soybean rhizosphere soil in the field experiment

(а – mono-inoculation, б – binary inoculation). Electron transmission microscope (JEOL JEM-1400, Japan). Lectin labels pointed.

Проведение исследований с применением электронной сканирующей микроскопии позволило составить пейзажные панорамы микробного ценоза ризосферы сои (рис. 4а).

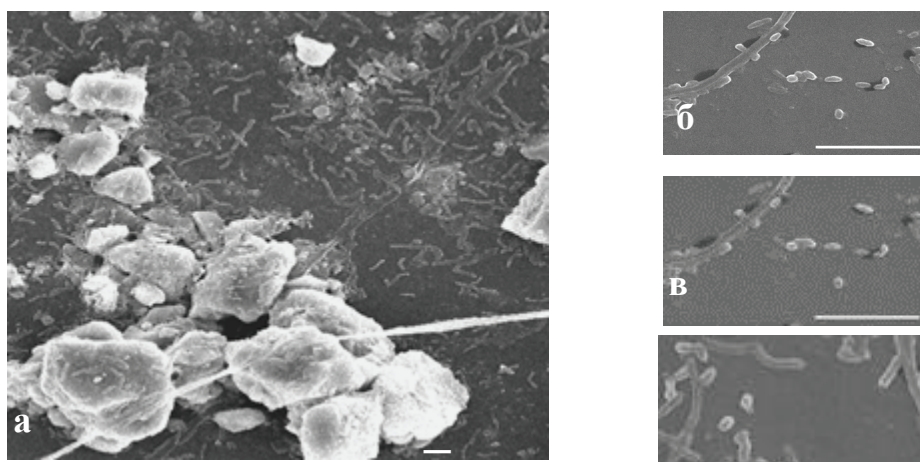


Рис. 4. Микробный пейзаж ризосферы сои, инокулированной ризобиями (а) и фрагменты пейзажа ризосферы сои в полевых опытах (б – контроль без инокуляции, в – моноинокуляция, г – бинарная инокуляция), длина масштабной метки: 5 мкм.

Сканирующая электронная микроскопия (Jeol JSM 35С, Япония).

Fig. 4. Microbial scenery of soybean rhizosphere under rhizobium inoculation (а) and scenery fragments of soybean rhizosphere in the field experiments (б – control without inoculation, в – mono-inoculation, г – binary inoculation), bar: 5 µm.

Scan electron microscopy (Jeol JSM 35С, Japane).

Установлено, что на панорамном пейзаже пленок обрастания вокруг корневых волосков и на поверхности почвенных частиц развивались микроорганизмы, которые располагались дисперсно или в виде контактных групп из 2–4 бактерий. Определены количественно-морфологические характеристики популяций бактерий в ризосфере растений разных вариантов. Бактерии контрольного варианта были представлены укороченными палочками эллиптической или кокковидной формы, которые располагались на поверхности корневых волосков растения или скапливались небольшими группами в виде цепочек на расстоянии 2–5 мкм от поверхности корешков (рис. 4б). В ризосфере сои в варианте с моноинокуляцией, кроме вышеописанных, наблюдали вытянутые палочки изогнутой формы, длина которых превышала 2 мкм (рис. 4в). В условиях бинарной инокуляции такие бактерии составляли большую часть микробного ценоза ризосферной зоны сои, что было подтверждено данными микроскопических наблюдений (рис. 4г).

В контрольном варианте преобладали мелкие клетки, средние размеры которых составляли 0,4x1,5 мкм (табл. 2). В варианте с моноинокуляцией ризобиями средняя ширина почвенных бактерий возрастала в 1,2 раза по сравнению с контролем, а длина – в 1,5 раза, в варианте с двойной инокуляцией – в 1,5 и 1,3 раза, соответственно.

Таблица 2

Численность и морфологические характеристики бактерий пленок обрастания в ризосфере сои

Table 2

Quantity and morphological characteristics of bacteria in the soybean rhizosphere overgrown blade

Вариант	Размеры клеток, мкм		Количество клеток на 100 мкм ² пленки обрастания
	длина	ширина	
Контроль	1,52±0,11	0,42±0,01	17,83±1,22
Инокуляция <i>B. japonicum</i> УКМ В-6018	2,24±0,13	0,52±0,02	19,71±2,03
Инокуляция <i>B. japonicum</i> УКМ В-6018 совместно с <i>B. megaterium</i> УКМ В-5724	1,98±0,11	0,62±0,03	25,54±2,26

Наибольшее количество клеток на 100 мкм² пленки обрастания наблюдали в ризосфере сои с бинарной инокуляцией, в остальных вариантах эта величина была в 1,3–1,4 раза меньше.

Таким образом, использован новый подход, позволяющий определить морфологическое разнообразие бактериального сообщества в суспензионной культуре, в стерильной почве и в ненарушенных бобово-ризобияльных системах, базирующийся на использовании ПЭТ-пленок с последующим их



анализом с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии. Инокуляция семян сои монокультурой *B. japonicum* УКМ В-6018 или совместно с *B. megaterium* УКМ В-5724 приводила к увеличению количественно-морфологических характеристик популяций бактерий в ризосфере. Наибольшие показатели плотности микробиоценоза получены при бинарной инокуляции. Отличия в микробных пейзажах ризосферы сои при применении исследованных инокулянтов могут быть связаны с изменением спектров доминантных форм и активизацией развития эндемных и интродуцированных микроорганизмов в корневой зоне.

УДК 579.262

Н.І. Адамчук-Чала, Л.В. Титова, Г.О. Іутинська

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: m_nv@mail.ru

МИКРОБНИ ПЕЙЗАЖИ РИЗОСФЕРИ СОЇ ЗА ІНТРОДУКЦІЇ РІЗНИХ ІНОКУЛЯНТІВ

Реферат

Мета. Вивчити просторово-функціональну структуру мікробіоценозу ризосфери сої за інтродукції бульбочкових та фосфатмобілізувальних бактерій у складі інокулянтів з використанням структурного аналізу пейзажних панорамних знімків біоплівки обростання. **Метод.** В роботі застосовано новий підхід, що дозволяє визначити морфологічну різноманітність бактеріальної спільноти в непорушених бобово-ризобіальних системах, що базується на використанні полімерних плівок з подальшим аналізом утворених на них мікробних ценозів за допомогою скануючої та трансмісійної електронної мікроскопії. **Результати.** Структурний аналіз пейзажних панорамних знімків біоплівки обростання в зберігаючому режимі показав, що за інокуляції насіння сої монокультурою *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 або спільно з *Bacillus megaterium* УКМ В-5724 зростає кількість ризосферних бактерій та їх морфометричні показники. **Висновки.** Інокуляція насіння сої моно- та комплексним препаратами брадиризобій сприяла збільшенню кількісно-морфологічних характеристик популяцій бактерій в ризосфері. Найбільші показники щільності мікробіоценозу отримані за сумісної інокуляції досліджуваних бактерій.

Ключові слова: ризосферний мікробіоценоз, соя, інокулянти, біоплівка обростання.



UDC 579.262

N.I. Adamchuk-Chala, L.V. Tytova, G.O. Iutynska

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, 154, Zabolotny Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: m_nv@mail.ru

MICROBIAL SCENERY OF SOYBEAN RHIZOSPHERE UNDER DIFFERENT INOCULANTS INTRODUCTION

Summary

Aim. Investigation of space-functional structure of soybean rhizosphere microbiocenosis under introduction of nodule and phosphate-mobilizing bacteria in the inoculate composition with using of structural analysis of scenery panoramic biofilms. **Methods.** The new method for investigation of bacteria communities morphological diversity of the not destroy soybean-legume systems was employed. This method is based on using of polymer overgrowth blade with next scan and transmission electron microscope analysis. **Results.** Structure analysis of microbe scenery panoramic biofilm in sparing regime showed that soybean seeds inoculation by monoculture *Bradyrhizobium japonicum* UCM B-6018 or both with *Bacillus megaterium* UCM B-5724 promoted increasing of rhizospheric bacteria quantity on the square of view and their morphometric parameters. **Conclusions.** Inoculation of soybean seeds promoted increasing of quantities and morphological characteristics of bacteria populations in the soybean rhizosphere. The greatest effect was obtained in the variant with binary inoculation.

Key words: rhizosphere microbiocenosis, soybean, inoculants, scenery biofilms.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кордюм В.А., Мошинец Е.В., Цапенко М.В., Адамчук-Чала Н.И., Иродов Д.М., Андриенко В.И. Микроорганизмы ризосферы – полный мониторинг // Грунтознавство. – 2008. – Т. 9, № 1–2. – С. 53–63.
2. Сергійчук М.Г. Будова бактеріальної клітини та методи її дослідження / М.Г. Сергійчук. – К.: Фітоцентр, 2001. – 323 с.
3. Gregory P.J. Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? // European Journal of Soil Science. – 2006. – 57. – P. 2–12.
4. Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S.S. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment // Science. – 2002. – 296. – P. 1127–1129.
5. Torre J. R., Brett M., Goebel E., Friedmann I., Pace N. R. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – 69. – P. 3858–3867.

Стаття надійшла до редакції 09.04.2014 р.



В.М. Мокросноп, О.В. Поліщук, О.К. Золотарьова

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

ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА ДИХАННЯ І ФОТОСИНТЕЗ *EUGLENA GRACILIS*

Метою роботи є вивчення впливу етанолу на швидкість фотосинтезу, дихання і ріст *Euglena gracilis*. **Методи.** Швидкість росту культури визначали за концентрацією клітин. Інтенсивність фотосинтезу розраховували за кількістю світлозалежного утворення O_2 , а інтенсивність дихання – за поглинанням розчинного кисню. Зміни концентрації O_2 визначали за допомогою закритого платинового електроду Кларка. Ефективність фотосинтетичної трансформації енергії оцінювали за величиною ефективного квантового виходу фотосистеми 2, вимірюючи інтенсивність модульованої флуоресценції хлорофілу на флуориметрі ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). **Результати.** Ріст культури *E. gracilis* при освітленні значно стимулювався після додавання 100 мМ етанолу, при цьому втричі зростала швидкість темного дихання, а інтенсивність фотосинтезу збільшувалася вдвічі. Метанол не викликав суттєвих змін. **Висновки.** Етиловий спирт ефективно асимілюється *E. gracilis*, яка культивується на світлі, що супроводжується активацією фотосинтезу та прискорює накопичення біомаси культури.

Ключові слова: *Euglena gracilis*, фотосинтез, дихання, етанол, варіабельна флуоресценція хлорофілу.

Еукаріотична джгутикова мікроводорість *Euglena gracilis* добре росте в широкому діапазоні значень рН і температури, а також пристосована до виживання в анаеробних умовах. Цей організм продукує у значних кількостях біологічно активні сполуки і тому має перспективу для використання в біотехнології. Клітини *E. gracilis* накопичують протеїни, поліненасичені жирні кислоти, парамілон – поліцукрид з імуностимулювальними і імунопротекторними властивостями, попередники тетратерпеноїдів, каротиноїдів, вітамінів А, С і Е [3, 4, 14].

E. gracilis може рости автотрофно за рахунок фотосинтезу, з використанням CO_2 як єдиного джерела вуглецю. В темряві стимуляція росту мікроводорості забезпечується використанням різноманітних органічних речовин, зокрема етанолу, який нею швидко утилізується. Здатність цієї мікроводорості інтенсивно рости у присутності етанолу відрізняє її від інших фотосинтезуювальних мікроорганізмів [2]. Основними метаболічними ефектами етанолу є підвищення рівня дихання, інгібування гліколітичного розщеплення глюкози, стимуляція глюконеогенезу та синтез парамілону [5, 8, 12]. Вже за декілька



хвилин після внесення етанолу у адаптовану до темряви культуру *E. gracilis* швидкість мітохондріального дихання її клітин значно зростає [5]. За біохімічними показниками мітохондріон *E. gracilis* займає проміжне положення між аеробними та анаеробними мітохондріями, завдяки чому види *Euglena* адаптуються до широкого діапазону концентрацій кисню і здатні існувати за анаеробних умов [7, 9].

Метаболізм етанолу в мітохондріоні і цитозолі *E. gracilis* відбувається за участі унікальних НАД⁺ – алкогольдегідрогеназ, та високоактивних альдегіддегідрогеназ [13, 15]. Було показано, що додавання етанолу до суспензії клітин *E. gracilis*, фотосинтетичний апарат яких сформований у присутності світла, призводить до стимуляції росту культури і накопичення біологічно активних речовин [3, 4]. За наявності в культуральному середовищі, адаптованої до темряви *E. gracilis*, екзогенних джерел вуглецю, таких як етанол, глюкоза, сукцинат та ін., світлозалежний розвиток хлоропластів, синтез хлорофілу і ліпідів гальмується [8, 10]. Це явище відоме як катаболітна репресія біогенезу фотосинтетичного апарату [1, 11]. Чи викликає додавання етанолу до автотрофної культури пригнічення фотосинтезу і активацію дихання, до теперішнього часу не визначено. Тому метою даної роботи було вивчення впливу екзогенного етанолу на інтенсивність темного дихання і фотосинтезу автотрофної культури *E. gracilis*.

Матеріали і методи

Культуру мікроводорості *E. gracilis* var. *bacillaris* вирощували автотрофно протягом шести діб у сольовому поживному середовищі (Cramer and Myers, 1952) без перемішування та аерації за інтенсивності світла $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ та температури 20°C до концентрації $\sim 10^6$ клітин/мл. Швидкість росту культури оцінювали за концентрацією клітин методом підрахунку в камері Горяєва. На цьому добу аліквоти суспензій розділяли на 3 варіанти: автотрофний контроль (варіант «Контроль»), варіанти з 100 мМ метанолом (варіант «+Мет») та 100 мМ етанолом (варіант «+Ет») та інкубували протягом доби. Темнове поглинання та світлозалежне виділення кисню вимірювали за допомогою сконструйованого нами комп'ютеризованого полярографа, оснащеного електродом Кларка та термостатованим водяним кожухом. Зразок освітлювали 5 Вт світлодіодною лампою білого світла (світлова температура 4100 К). Для дослідження інтенсивності фотосинтезу визначали швидкість виділення кисню за насичуючої інтенсивності світла ($500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) з поправкою на темнове дихання. Паралельно, для оцінки змін інтенсивності фотосинтетичного електронного транспорту використовували флуориметр ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). В основі методу лежить прямий зв'язок між рівнем флуоресценції хлорофілу в складі фотосистеми 2 (ФС 2) і відновленістю первинного хінонового акцептора ФС 2 – Q_A , і, відповідно, зворотній зв'язок із здатністю ФС 2 до електронного транспорту. Клітини адаптуються до кількісного і якісного складу діючого світла (мінімальна насичуюча інтенсивність світла) протягом 15 хв, при



цьому активність механізмів фотохімічного перетворення та нефотохімічної дисипації світлової енергії стабілізується і флуоресценція хлорофілу виходить на стаціонарний рівень, F_s . Потім вмикається насичуючий спалах світла, під час дії якого практично всі центри ФС 2 відновлюються і флуоресценція зростає до максимального рівня в адаптованому до світла стані – F'_m . В цій точці ефективність фотохімічних перетворень, тобто електронного транспорту, наближається до нуля. Відносне положення рівнів F_s і F'_m характеризує ефективний квантовий вихід ФС 2, $\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$ [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Після інкубації зразків культури протягом доби без перемішування концентрація кисню в суспензії клітин *E. gracilis* встановлювалася на рівні, який визначався співвідношенням інтенсивностей фотосинтетичного виділення кисню і його поглинання в процесі клітинного дихання (рис. 1). За автотрофного культивування концентрація кисню встановлювалася на рівні 290 мкМ. У присутності етанолу рівноважна концентрація кисню знижувалася вдвічі, що може свідчити як про пригнічення фотосинтезу, так і про значну стимуляцію дихання. Для порівняння було досліджено вплив метанолу, як спирту, що за літературними даними не є ефективним субстратом дихання. У присутності метанолу рівноважна концентрація кисню не змінювалася.

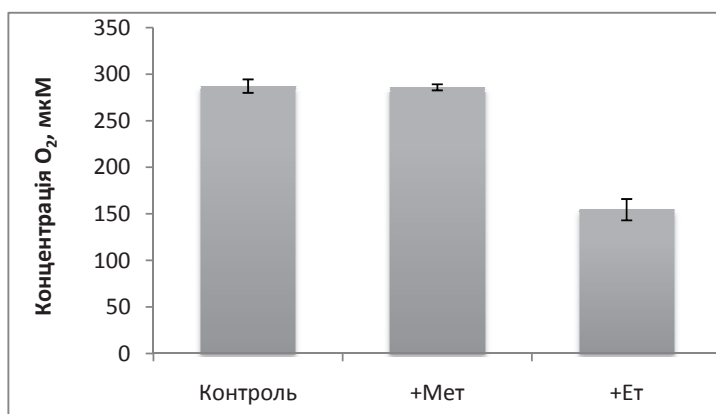


Рис. 1. Рівноважна концентрація кисню в суспензії *E. gracilis*, інкубованих протягом доби у присутності метилового та етилового спиртів

Fig. 1. Equilibrium oxygen concentrations in *E. gracilis* cell suspension incubated for one day in the presence of methyl and ethyl alcohols

Таким чином, при додаванні досліджуваних джерел вуглецю інтенсивності дихання та фотосинтезу змінювалися порівняно з контрольним, автотрофним варіантом. Обидва процеси достовірно стимулювалися етанолом. Найбільша стимуляція дихання, майже в 3 рази порівняно з контролем, спостерігалася у клітин, інкубованих з етанолом (рис. 2). Метанол суттєво не стимулював дихання клітин *E. gracilis*, порівняно з контролем.

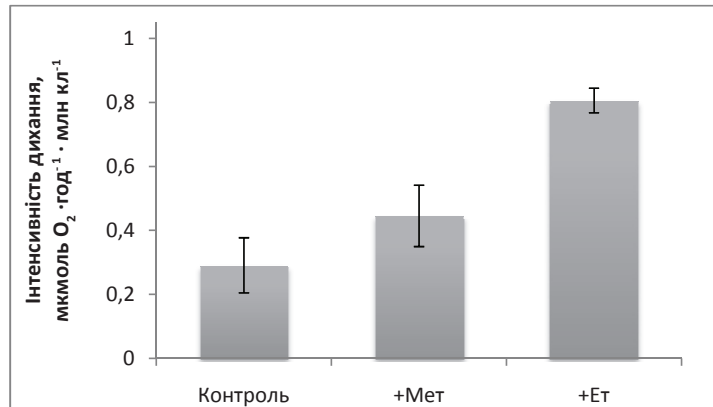


Рис. 2. Інтенсивність дихання *E. gracilis* у присутності метилового та етилового спиртів

Fig. 2. Respiration rate of *E. gracilis* in the presence of methyl and ethyl alcohols

Інтенсивність світлозалежного виділення кисню, з поправкою на рівень темного дихання, змінювалася у вузких межах, ніж інтенсивність дихання (рис. 3, А).

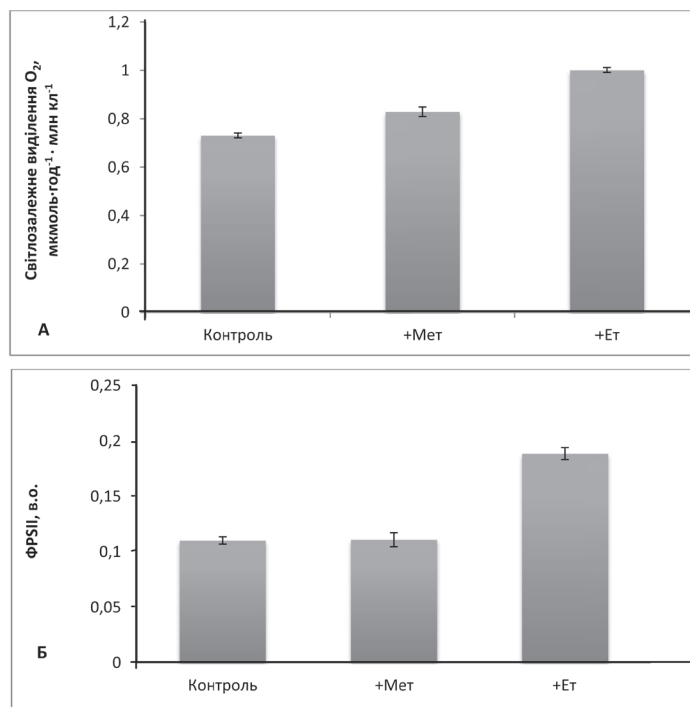


Рис. 3. Інтенсивність світлозалежного виділення кисню (А) та ефективний квантовий вихід ФС 2 (Φ_{PSII}) (Б) у культурі клітин *E. gracilis* в присутності метилового та етилового спиртів

Fig. 3. Light-dependent oxygen evolution activity and effective PSII quantum yield (Φ_{PSII}) in *E. gracilis* cell culture in the presence of methyl and ethyl alcohols

Обидва джерела вуглецю стимулювали фотосинтетичне виділення кисню, причому найбільш вираженим цей ефект був у варіанті з додаванням етилового спирту. Такий ефект може бути зумовлений накопиченням в клітинах головного субстрату фотосинтезу – CO_2 .

Специфічнішим показником функціонування фотосинтетичного електрон-транспортного ланцюга, ніж світлозалежне виділення кисню, є ефективний квантовий вихід ФС 2, який в наших дослідках достовірно збільшувався у 2 рази в присутності етанолу (рис. 3, Б). Метанол не впливав на цей показник. Менш виражений вплив етанолу на швидкість виділення кисню на світлі, порівняно з Φ_{PSII} , може бути зумовлений одночасним поглинанням кисню в інших процесах, серед яких найбільш значимим є фотодихання.

Культивування *E. gracilis* на світлі у присутності етанолу суттєво стимулює її ріст порівняно з автотрофною культурою (рис. 4.). По досягненню середини експоненційної фази росту, концентрація клітин міксотрофної культури вже перевищувала значення контрольної в 5 разів.

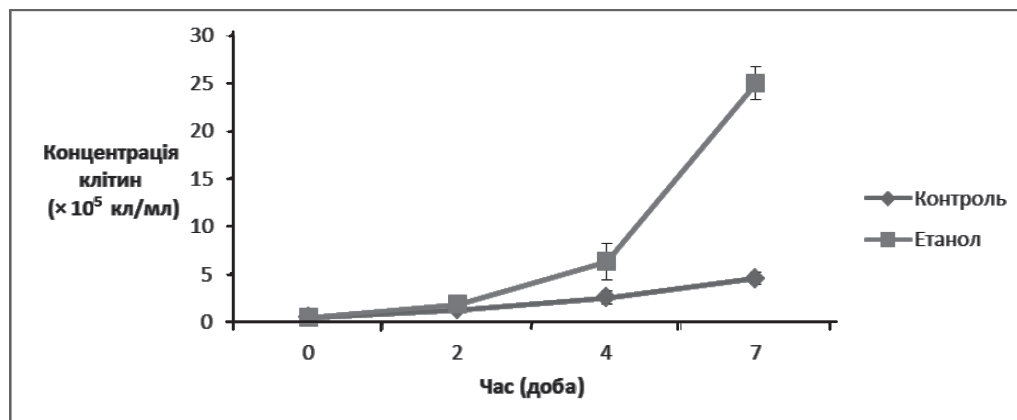


Рис. 4. Ефект етанолу на ріст культури *E. gracilis* у порівнянні з контролем

Fig. 4. Effect of ethanol on growth of *E. gracilis* culture compared with control

Таким чином, *E. gracilis*, яка культивується на світлі, ефективно використовує етиловий спирт як джерело вуглецю та енергії, що супроводжується активацією фотосинтезу та прискорює накопичення біомаси культури.

Додавання етанолу до автотрофної культури *E. gracilis* значно стимулює її ріст. Добова інкубація у присутності 100 мМ етилового спирту на світлі призводить до підвищення інтенсивності темного дихання в 3 рази та двократної активації фотосинтезу. При цьому вміст кисню суттєво знижується і згодом досягає мінімального значення, що зумовлює перехід культури до анаеробного існування. Активація фотосинтезу у *E. gracilis* за присутності етанолу може бути викликана підвищеною внутрішньоклітинною концентрацією CO_2 внаслідок значної інтенсифікації дихання.

V.M. Mokrosnop, O.V. Polishchuk, O.K. Zolotareva

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

**EFFECT OF ETHANOL ON RESPIRATION AND PHOTOSYNTHESIS
OF *EUGLENA GRACILIS***

Summary

The aim of the present work was to study the effect of ethanol on the rates of photosynthesis and respiration, and productivity of *Euglena gracilis*. **Methods.** The growth rate of culture was determined by cell concentration. Dark respiration and net photosynthesis were measured by O₂ concentration changes with a Clark-type electrode. Photosynthesis efficiency was also determined as effective quantum yield of PSII with Xe-PAM fluorometer (Walz, Germany). **Results.** Addition of 100 mM ethanol significantly stimulated the growth of light-adapted *E. gracilis*. At the same time, respiration rate tripled and light-dependent oxygen evolution rate doubled. Methanol caused no significant changes. **Conclusions.** Cultivated on the light *E. gracilis* effectively assimilated ethyl alcohol, that was accompanied by photosynthesis activation and culture biomass accumulation.

Key words : *Euglena gracilis*, photosynthesis, respiration, ethanol, variable chlorophyll fluorescence.

В.М. Мокросноп, А.В. Полищук, О.К. Золотарева

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

**ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ДЫХАНИЕ И ФОТОСИНТЕЗ
*EUGLENA GRACILIS***

Реферат

Целью работы является изучение влияния этанола на скорость фотосинтеза, дыхания и рост микроводоросли *Euglena gracilis*. **Методы.** Скорость роста культуры определяли по концентрации клеток. Интенсивность фотосинтеза рассчитывали по выделению O₂ при освещении клеток, а интенсивность дыхания – по поглощению растворимого кислорода в темноте. Изменения концентрации O₂ определяли с помощью закрытого платинового электрода Кларка. Эффективность фотосинтетической трансформации энергии оценивали по величине эффективного квантового выхода фотосистемы 2, измеряя интенсивность модулированной флуоресценции хлорофилла на флуориметре XE-PAM (Walz, Германия). **Результаты.** Рост культуры *E. gracilis* на свету значительно стимулировался после добавления 100 Мм этанола, при этом втрое возрастала



интенсивность темнового дыхания, а интенсивность фотосинтеза увеличивалась вдвое. Метанол не вызывал существенных изменений. **Выводы.** Этиловый спирт эффективно ассимилируется *E. gracilis*, которая культивируется на свету, что сопровождается активацией фотосинтеза и ускоряет накопление биомассы культурой.

Ключевые слова: *Euglena gracilis*, фотосинтез, дыхание, этанол, варибельная флуоресценция хлорофилла.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф., Золотарьова О.К. Цукри як ключова ланка в регуляції метаболізму фотосинтезуючих клітин // Укр. бот. журн. – 2001. – 58, № 1. – С. 121–127.
2. Степанов С.С., Золотарева Е.К. Фотосинтез, дихання і ріст мікробіодорослі *Chlamydomonas reinhardtii* в присутстві етанолу // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 62–71.
3. Afukwa C., Ogbonna J. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis*// Afr. J. Biotech. – 2007. – 6, № 22. – P. 2612–2615.
4. Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J., Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture // Appl. Microbiol. and Biotechnol. – 2008. – 79, № 3. – P. 371–378.
5. Garlaschi F., Garlaschi A., Lombardi A., Glorgio F. Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis* // Plant. Sci. Lett. – 1974. – 2. – P. 29–39.
6. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 990. – P. 87–92.
7. Hoffmeister M., van der Klei A., Rotte C., van Grinsven K.W.A., van Hellemond J.J., Henze K., Tielens A.G.M., Martin W. *Euglena gracilis* Rhodoquinone:Ubiquinone Ratio and Mitochondrial Proteome Differ under Aerobic and Anaerobic Conditions // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, № 21. – P. 22422–22429.
8. Horrum M., Schwartzbach S. Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena* // Plant Physiol. – 1980. – 65. – P. 382–386.
9. Matsuda F., Hayashi M., Kondo A. Comparative profiling analysis of central metabolites in *Euglena gracilis* under various cultivation conditions // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2011. – 75, № 11. – P. 2253–2256.
10. Monroy A.F., Schwartzbach S.D. Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1984. – 81, № 9. – P. 2786–2790.
11. Ogbonna J., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 58. – P. 532–538.

12. Ono K., Kawanaka Y., Inui H., Miyatake K., Kitaoka S., Nakano Y. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis*// J. Biochem. – 1995. – 117. – P. 1178–1182.
13. Rodriguez-Zavala J., Ortiz-Cruz M., Moreno-Sanchez R. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*// J. Eukaryot. Microbiol. – 2006. – 53, № 1. – P. 36–42.
14. Rodriguez-Zavala J., Ortiz-Cruz M., Mendoza-Hernandez G., Moreno-Sanchez R. Increased synthesis of α -tocopherol by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production // J. Appl. Microbiol. – 2010. – 109. – P. 2160–2172.
15. Yoval-Sánchez B., Jasso-Chávez R., Lira-Silva E., Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Zavala J. Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis* // J. Bioenerg. Biomembr. – 2011. – 43, № 1. – P. 519–530.

Стаття надійшла до редакції 20.03.2014 р.



Х.А. Берегова, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38(044) 287 92 18, e-mail: khrystya91@ukr.net

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *NOCARDIA VACCINII* ІМВ В-7405 НА АДГЕЗІЮ БАКТЕРІЙ ТА ДРІЖДЖІВ ДО ПОВЕРХОНЬ СИЛІКОНОВИХ КАТЕТЕРІВ

Мета. Дослідження впливу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 на адгезію деяких бактерій та дріжджів до фрагментів силіконових урогенітальних катетерів. **Методи.** Ступінь адгезії мікроорганізмів визначали як відношення кількості клітин на оброблених ПАР фрагментах катетерів до кількості клітин на контрольних (без обробки ПАР) зразках і виражали у відсотках. Концентрацію клітин визначали за методом Коха на м'ясо-пептонному та глюкозо-картопляному агарі. **Результати.** Встановлено, що адгезія клітин деяких бактерій (*Escherichia coli* ІЕМ-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12) і дріжджів *Candida albicans* Д-6 на фрагментах урогенітальних силіконових катетерів, оброблених ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежала від концентрації і ступеня очищення ПАР, а також типу тест-культур. Обробка катетерів розчинами ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (0,05–0,08 мг/мл) супроводжувалася зниженням адгезії бактерій та дріжджів на 21–95% та 57–94% відповідно. **Висновки.** ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 можуть бути використані для створення ефективних препаратів, що знижують адгезію мікроорганізмів на поверхні матеріалів медичного призначення.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, адгезія, поверхня силіконових катетерів.

Відомо, що у 40% випадків причинами шпитальних інфекцій сечостатевої системи є урогенітальні катетери хворих, які перебувають у відділеннях інтенсивної терапії. Найчастіше у пацієнтів з шпитальними сечостатевими інфекціями виявляються грамнегативні бактерії *Escherichia coli* (25–31%) та *Enterococcus* sp. (15–16%) [1].

Показано [2, 11, 12], що з представників мікробіоти шкіри людини катетери найчастіше колонізують *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., а з рук медичного персоналу при порушенні асептики можуть потрапляти також *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp., *Staphylococcus maltophilia*, *Candida albicans*. Особлива небезпека інфекцій, спричинених катетер-асоційованими мікроорганізмами, зумовлена утво-



ренням на поверхні або в середині катетера біоплівки. Відомо, що мікроорганізми у складі біоплівок набувають резистентності до антибіотиків та є набагато стійкішими до дії дезінфектантів. Одним з механізмів формування біоплівки дріжджів роду *Candida* є їх здатність до зв'язування з білками (фібрoneктинами) шкіри та слизових оболонок. На ефективність адгезії мікроорганізмів впливає також природа матеріалу катетерів. Показано, що краще прикріплюються мікроорганізми до поліетилену та полівінілхлориду, гірше – силікону, тефлону та поліуретану [2].

Актуальним нині є пошук засобів, які б перешкождали адгезії мікроорганізмів на поверхнях різних матеріалів медичного призначення, в тому числі на катетерах. Відомо [3–6, 10], що такими засобами можуть бути мікробні поверхнево-активні речовини (ПАР), які попереджають прикріплення мікроорганізмів до поверхонь, руйнують архітектуру біоплівок, а також не викликають стійкості мікроорганізмів до антибіотиків [10]. Літературні дані свідчать, що механізм антиадгезивної дії ПАР може бути зумовлений підвищенням проникності клітинної мембрани, а також зміною поверхневого заряду клітин, і як наслідок, порушенням їх біологічної функції [3, 6].

Раніше із забруднених нафтою зразків ґрунту виділено бактерії, ідентифіковані як *Nocardia vaccinii* К-8 (ІМВ В-7405), встановлено їх здатність синтезувати метаболіти з поверхнево-активними та емульгуювальними властивостями [7, 8], які можуть бути використані в природоохоронних технологіях, а також як антимікробні агенти [7, 8, 14].

Мета роботи – дослідити вплив ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на адгезію деяких бактерій та дріжджів до силіконових катетерів.

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були поверхнево-активні речовини, синтезовані штамом *N. vaccinii* ІМВ В-7405, який зареєстрований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ. Як тест-культури для визначення антиадгезивних властивостей використовували штами бактерій *Escherichia coli* ІЕМ-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2 і *Proteus vulgaris* ПА-12, а також дріжджі *Candida albicans* Д-6 з колекції мікроорганізмів кафедри біотехнології і мікробіології Національного університету харчових технологій.

N. vaccinii ІМВ В-7405 вирощували в рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; KH_2PO_4 – 0,1; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, дріжджовий автолізат – 0,5% (об'ємна частка). Як джерело вуглецю використовували гліцерин у концентрації 1,5% (об'ємна частка).

Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного складу з 0,5% гліцерину. Кількість інокуляту – 10% від об'єму середовища. Культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 30 °С упродовж 120 год.



У дослідженнях використовували поверхнево-активні речовини у вигляді супернатанту культуральної рідини і розчину ПАР, екстрагованих з супернатанту сумішшю Фолча (хлороформ і метанол, 2:1) [7, 8, 14], а також водну фазу, що залишилася після екстракції ПАР. Супернатант, розчин ПАР і водну фазу стерилізували 30 хв при 112 °С.

Для одержання супернатанту постферментаційну культуральну рідину центрифугували упродовж 45 хв при 700 г. Концентрацію позаклітинних ПАР (г/л) визначали ваговим методом [7, 8, 14].

Визначення антиадгезивних властивостей здійснювали, як описано у роботі [6]. Для цього фрагменти (2 см) силіконових урогенітальних катетерів витримували 20 хв у 75% -ому розчині етилового спирту, потім поміщали у досліджувані розчини (супернатант культуральної рідини, розчин ПАР, водна фаза) і висушували упродовж 24 год в термостаті при 30 °С. Однодобові тест-культури бактерій та дріжджів вирощували на м'ясо-пептонному (МПА) і глюкозо-картопляному агарі (ГКА), відповідно, суспендували в 100 мл стерильної водогінної води, у суспензію поміщали попередньо оброблені досліджуваними розчинами і необроблені (контрольні) фрагменти катетерів, витримували 2 год в термостаті при 30 °С, ополіскували 10 мл стерильної водопровідної води, щоб змити неадгезовані клітини. Потім фрагменти катетерів поміщали у ємність із 20 мл стерильної водопровідної води і скляними кульками діаметром 3 мм, струшували 5 хв для змиву адгезованих клітин. Кількість клітин в отриманій суспензії визначали за методом Коха на МПА і ГКА. Ступінь адгезії мікроорганізмів визначали як відношення кількості клітин на оброблених супернатантом, розчином ПАР та водною фазою силіконових фрагментах до кількості клітин на контрольних зразках і виражали у відсотках.

Всі досліді проводили у трьох повторностях. Статистичне опрацювання експериментальних даних проводили за Лакінім [13]. Різницю середніх показників вважали достовірною при рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Дані, наведені в табл.1, показують, що адгезія грамнегативних бактерій до фрагментів силіконових урогенітальних катетерів залежала від концентрації ПАР.

Дослідження показали, що розчин ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 виявився ефективнішим антиадгезивним агентом порівняно з супернатантом культуральної рідини: після обробки ним фрагментів катетерів адгезія більшості досліджуваних бактерій була в середньому на 40–50% нижчою, ніж після обробки супернатантом.

Відомо [10], що препарат псевдофактин II *Pseudomonas fluorescens* BD5 у концентрації 0,05 мг/мл знижував ступінь адгезії *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter hirae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio ordalii*, *Vibrio harveyi* та дріжджів *Candida albicans* на 80–90%. Отже, ефект препаратів ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 порівняний з описаними в літературі даними.



Таблиця 1

Вплив ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на прикріплення грамнегативних бактерій до поверхонь силіконових катетерів

Table 1

Effect of *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactant on attachment of gram-negative bacteria to silicone catheters

Досліджувані розчини	Концентрація ПАР, мг/мл	Кількість прикріплених клітин, %				
		<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>P. vulgaris</i> ПА-12	<i>Erwinia</i> sp. ТБ-4	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>E. cloacae</i> АС-22
Супернатант КР	0,08	79±4,0	56±2,8	72±3,6	68±3,4	32±1,6
	0,05	86±4,3	65±3,2	89±4,4	91±4,5	76±3,8
Розчин ПАР	0,08	20±1,0	5±0,3	28±1,4	21±1,0	24±1,2
	0,05	25±1,2	11±0,6	48±2,8	42±2,0	45±2,3

Примітка: КР – культуральна рідина, кількість клітин у контрольних зразках приймали за 100%.

Note: CF – culture fluid, cells number in control samples taken as 100%.

Результати, наведені в табл. 2, свідчать, що за обробки катетерів розчином ПАР (0,05 мг/мл) ступінь адгезії дріжджів *C. albicans* Д-6 знижувався на 88%, у той час як після обробки супернатантом культуральної рідини – лише на 59%.

Таблиця 2

Вплив ПАР штаму ІМВ В-7405 на адгезію клітин *Candida albicans* Д-6 до поверхонь силіконових катетерів

Table 2

Effect of strain ІМВ В-7405 surfactant on adhesion of *Candida albicans* Д-6 to silicone catheters

Досліджувані розчини	Концентрація ПАР, мг/мл	Кількість прикріплених клітин, %
Супернатант КР	0,08	Н.в.
	0,05	41±2,1
Розчин ПАР	0,08	43±2,2
	0,05	12±0,6

Примітка: КР – культуральна рідина, Н.в. – не визначали; кількість клітин у контрольних зразках приймали за 100 %.

Note: CF – culture fluid, N.d. – Not determined, cells number in control samples taken as 100%.



Зазначимо, що зі зниженням концентрації ПАР кількість прикріплених клітин *C. albicans* Д-6 зменшувалася.

Подальші експерименти показали, що у разі використання водної фази, що не містить ПАР, також спостерігали зменшення кількості прикріплених до фрагментів катетерів клітин досліджуваних бактерій та дріжджів (табл.3).

Таблиця 3

Адгезія бактерій та дріжджів на катетерах, оброблених водною фазою після екстракції ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Table 3

Adhesion bacteria and yeast on catheters treated with an aqueous phase after extraction of surfactant *N. vaccinii* ІМВ В-7405

Розведення водної фази	Кількість прикріплених клітин, %					
	<i>Pseudomonas</i> sp. МІ-2	<i>P.vulgaris</i> ПА-12	<i>Erwinia</i> sp. ТБ-4	<i>E. coli</i> ІЕМ-1	<i>E. cloaceae</i> АС-22	<i>C. albicans</i> Д-6
1:19	64±3,2	105±5,2	113±5,6	124±6,2	57±2,3	98 ± 4,9
1:29	85±4,3	135±6,7	124±6,2	138±6,9	70±3,5	33 ± 1,7

Припустимо, що це може бути зумовлене наявністю у водній фазі відмінних від ПАР метаболітів, яким притаманна антимікробна дія. Раніше [14] було встановлено, що водна фаза, яка залишилася після екстракції ПАР з супернатанту культуральної рідини штаму ІМВ В-7405, спричиняла антимікробну дію на фітопатогенні бактерії родів *Pseudomonas*, *Xanthomonas* та *Pectobacterium*. Зазначимо, що у літературі є відомості про синтез антибіотиків представниками роду *Nocardia* [3, 5].

Отже, у результаті проведеної роботи встановлено, що поверхнево-активним речовинам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (як у вигляді супернатанту культуральної рідини, так і розчину ПАР) притаманна антиадгезивна дія, завдяки чому вони можуть бути використані для створення антиадгезивних препаратів медичного призначення.

К.А. Береговая, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина, тел.: +38(044) 287 92 18,
e-mail: khrysty91@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ К ПОВЕРХНОСТЯМ СИЛИКОНОВЫХ КАТЕТЕРОВ

Реферат

Цель. Исследование влияния поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на адгезию некоторых бактерий и дрожжей к фрагментам силиконовых урогенитальных катетеров. **Методы.** Степень адгезии микроорганизмов определяли как отношение количества клеток на обработанных ПАВ фрагментах катетеров к количеству клеток на контрольных (без обработки ПАВ) образцах и выражали в процентах. Концентрацию клеток определяли по методу Коха на мясо-пептонном и глюкозо-картофельном агаре. **Результаты.** Установлено, что адгезия клеток некоторых бактерий (*Escherichia coli* ИЕМ-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12) и дрожжей *Candida albicans* Д-6 на фрагментах урогенитальных силиконовых катетеров, обработанных ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 зависела от концентрации и степени очистки ПАВ, а также типа тест-культур. Обработка катетеров растворами ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 (0,05–0,08 мг/мл) сопровождалась снижением адгезии бактерий и дрожжей на 21–95% и 57–94% соответственно. **Выводы.** Таким образом, ПАВ *N. vaccinii* IMB B-7405 могут быть использованы для создания эффективных препаратов, снижающих адгезию микроорганизмов на поверхности материалов медицинского назначения.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, *Nocardia vaccinii* IMB B-7405, адгезия, поверхности силиконовых катетеров.

Kh.A. Beregova, T.P. Pirog

National University of Food Technologies,
68, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,
tel.: +38(044) 287 92 18, e-mail: khrysty91@ukr.net

EFFECT OF *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 SURFACTANT ON ADHESION OF BACTERIA AND YEAST TO SILICONE CATHETERS

Summary

Aim. To investigate the effect of *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 surface-active substances (surfactants) on adhesion of some bacteria and yeasts to fragments



urogenital silicone catheters. **Methods.** The degree of adhesion of microorganisms was determined as the ratio of the cells amount on treated by surfactants catheters fragments to the amount of cells in the control (without surfactant treatment) samples and expressed in percent. Cell concentration was determined by the method of Koch meat-peptone agar and glucose-potato agar. **Results.** It was shown that the attachment bacteria (*Escherichia coli* IEM-1, *Erwinia* sp. ТБ-4, *Enterobacter cloacae* АС-22, *Pseudomonas* sp. МІ-2, *Proteus vulgaris* ПА-12) and yeast *Candida albicans* Д-6 to the fragments of urogenital silicone catheters treated with *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactants depended on the concentration and purification of surfactants, and the type of test cultures. Treatment catheters of *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactant (0.05–0.08 mg/ml) was accompanied by decrease adhesion of bacteria and yeast by 21–95% and 57–94%, respectively. **Conclusions.** Thus, *N. vaccinii* ІМВ В-7405 surfactant can be used for development of effective preparations decreasing the adhesion of microorganisms on the surface of medical application.

Key words: surfactants, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405, adhesion, silicone catheters.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Dusane D.H., Matkar P.K., Venugopalan V.P.* Cross-species induction of antimicrobial compounds, bio-surfactants and quorum-sensing inhibitors in tropical marine epibiotic bacteria by pathogens and biofouling microorganisms // *Curr. Microbiol.* – 2011. – Vol. 62, № 3. – P. 974–980.
2. *Finkel J.S., Mitchell A.P.* Genetic control of *Candida albicans* biofilm development // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – Vol. 9, № 2. – P. 109–118.
3. *Imai T., Yazawa K., Tanaka Y., Mikami Y., Kudo T., Suzuki K.* Productivity of antimicrobial substances in pathogenic actinomycetes *Nocardia brasiliensis* // *Microbiol. Cult. Coll.* – 1997. – Vol. 13, № 2– P. 103–108.
4. *Kalyani R.K., Bishwambar M.N., Suneetha V.L.* Recent potential usage of surfactant microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // *J. Res. Pharm.* – 2011. – Vol. 2, № 8. – P. 11–15.
5. *Kavitha A., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Y.Venkateswarlu* Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL 113 // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 49, № 4. – P. 484–490.
6. *Monteiro A.S., Miranda T.T., Lula I., Denadai A.M., Sinisterra R.D., Santoro M.M., Santos V.L.* Inhibition of *Candida albicans* CC biofilms formation in polystyrene plate surfaces by biosurfactant produced by *Trichosporon montevidense* CLOA72 // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2011. – Vol. 84, № 2. – P. 467–476.
7. *Pirog T., Shulyakova M., Sofilkanych A., Shevchuk. T., Maschenko O.* Biosurfactant synthesis by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241, *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 on byproduct of biodiesel product // *Food Bioprod. Proces.* – 2013. – DOI 10.1016/j.fbp.2013.09.003.
8. *Pirog T., Sofilkanych A., Konon A., Shevchuk T., Ivanov S.* Intensification of surfactants' synthesis by *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter*



calcoaceticus IMV B-7241 and *Nocardia vaccinii* K-8 on fried oil and glycerol containing medium // Food Bioprod. Proces. – 2013. – Vol. 91, № 2. – P. 149–157.

9. Tawakoli P.N., Al-Ahmad A., Hoth-Hannig W., Hannig M., Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm // Clin. Oral. Investig. – 2013. – Vol. 17, № 3. – P. 841–850.

10. Tomasz J., Lukaszewicz M., Krasowska A. Antiadhesive activity of the bio-surfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5 // BMC Microbiology. – 2012. – DOI: 10.1186/1471-2180-12-24.

11. Wang H.H., Schaffner D.W. Antibiotic resistance: how much do we know and where do we go from here? // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 20. – P. 7093–7095.

12. Warren J.W. Catheter-associated urinary tract infections. // Infect. Dis. Clin. – 2001. – Vol. 3, № 4. – P. 823–854.

13. Лакин Г.Ф. Биометрия – М.: Высшая школа –1990. – 352 с.

14. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинская Г.А. Действие поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ В7405 на фитопатогенные бактерии // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – № 49, № 4. – С. 364–371.

Стаття надійшла до редакції 02.07.2014 р.



О.В. Федотов, Т.Є. Волошко

Донецький національний університет,
вул. 600-річчя, 21, Вінниця, 21001, Україна,
тел.: +38 (062) 302 06 00, e-mail: bio.graff@ukr.net

ОТРИМАННЯ ТА АНАЛІЗ ФЕРМЕНТНИХ ПРЕПАРАТІВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ДЕЯКИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

*Метою роботи було отримання та аналіз ферментних препаратів оксидоредуктаз деяких видів базидіоміцетів. Методи. Як продуценти оксидоредуктаз використовували штами *Agrosybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208. Обрані штами базидіоміцетів культивували на модифікованому для кожного штаму глюкозо-пептонному середовищі. Фракціонування ферментів з культурального фільтрату та водних екстрактів міцелію проводили шляхом висолювання сульфатом амонію. Отримані розчини фракцій білків піддавали подальшому очищенню шляхом діалізу та гель-фільтрації на гранулах Молселекту G-50 і G-75. Результати. Отримано ферментні препарати внутрішньо- і позаклітинних оксидоредуктаз – пероксидаз, каталаз та супероксиддисмутаз з культур базидіоміцетів. Встановлено індивідуальні характеристики ферментів: ферментативну активність, рН- та термостабільність. Дослідженні штами базидіоміцетів мають більший високий рівень активності позаклітинних оксидоредуктаз порівняно з внутрішньоклітинними. Найвища пероксидазна активність ферментного препарату штаму *A. cylindracea* 167 становила $6,2 \pm 0,2$ Е/ мг, каталаза штаму *P. ostreatus* P-208 – 9181 ± 293 мкат/ мг та супероксиддисмутази штаму *F. hepatica* Fh-08 – $101,6 \pm 3,5$ Е/ мг. Всі ферменти стабільні в діапазоні рН 5–10, та температурі – від 20 до 40 °С. Висновок. Отримано нові антиоксидантні ензими базидіоміцетів *Agrosybe cylindracea*, *Fistulina hepatica* і *Pleurotus ostreatus* та встановлені їх ферментативна активність, рН- і термостабільність. За цими ознаками виділені ензими не поступаються використовуваним в промисловості та є перспективними для практичного застосування.*

Ключові слова: базидіоміцети, оксидоредуктаза, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза.

Вивчення біологічної різноманітності, метаболічних шляхів та розробка способів культивування показали перспективність використання ксилотрофних базидіоміцетів у біотехнології. Це ґрунтується на їх здатності рости на дешевих живильних середовищах [12], плодоносити, утворювати значну біомасу з певними корисними властивостями та синтезувати численні біологічно активні речовини (БАР) [6, 15]. Особливе місце серед грибних БАР займають ензими різного спектру дії. Доведено, що за субстратною специфічністю, температурними і рН оптимумами дії та низкою інших властивостей вони більш повно відповідають певним вимогам практичного використання [12, 15].

© О.В. Федотов, Т.Є. Волошко, 2014



Науковий та комерційний інтерес мають оксидоредуктази, зокрема пероксидази [8, 14], каталази [5] та супероксиддисмутази [1, 5]. Основними джерелами промислових ензимів є рослини (пероксидаза), тварини (каталаза) та мікроорганізми (СОД). Проте отримання цих ферментів пов'язане з низкою труднощів: дефіцитом сировини, вартістю методів виділення та очищення ферментних препаратів [12].

Проведені скринінгові дослідження дозволили виділити штами базидіоміцетів *Agrocybe cylindracea* 167, *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208 – активних продуцентів пероксидаз, супероксиддисмутаза та каталаз відповідно [5]. Для обґрунтування їх подальшого використання після удосконалення складу глюкозо-пептонного середовища та умов культивування [3] метою роботи було отримання та аналіз ферментних препаратів оксидоредуктаз цих базидіоміцетів.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами *A. cylindracea* 167, *F. hepatica* Fh-08 та *P. ostreatus* P-208, які зберігаються у Колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету та депоновані у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (ІВК) [11].

Процес отримання ферментних препаратів (ФП) внутрішньо- та позаклітинних каталаз, пероксидаз та супероксиддисмутаза штамів *A. cylindracea* 167, *F. hepatica* Fh-08, *P. ostreatus* P-208 включав етапи, наведені на рис. 1.

Штами культивували поверхнево на модифікованому для кожного штаму глюкозо-пептонному середовищі (ГПСм) 15 діб при $27 \pm 1^\circ\text{C}$ [3]. Модифіковане ГПС для культивування штамів *A. cylindracea* 167 і *F. hepatica* Fh-08 містило (г/л): глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 0,6; K_2HPO_4 – 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,05; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; казеїн – 0,5 та вітамін С – 0,05, який вносили на початку культивування першого штаму або за 1 добу до експерименту – другого та дистильовану воду. Модифіковане ГПС для культивування штаму *P. ostreatus* P-208 у порівнянні із попереднім не містило вітаміну С, а замість казеїну включало валін – 0,3 та MnSO_4 – 1,45 г/л, які вносили на початку культивування [2]. Згідно попередніх досліджень збільшення активності оксидоредуктаз [4], штам *A. cylindracea* 167 за 1 добу до експерименту піддавали дії електромагнітного поля з частотою $27 \pm 0,16$ Гц та потужністю 70 ± 21 Вт на апараті УВЧ-66 протягом години, а штами *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 – з частотою 0,8–2,4 ГГц та потужністю 1 мВт протягом всього терміну культивування. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури на сусло-агарі, об'ємом 5–7% від об'єму ГПСм.

Для отримання ферментних препаратів використовували міцелій та культуральний фільтрат (КФ) 15 добових культур. Міцелій та КФ розділяли шляхом фільтрування культуральної рідини. Клітини міцелію піддавали механічній деградації та екстрагували дистильованою водою 1:10. Фракціонування біл-



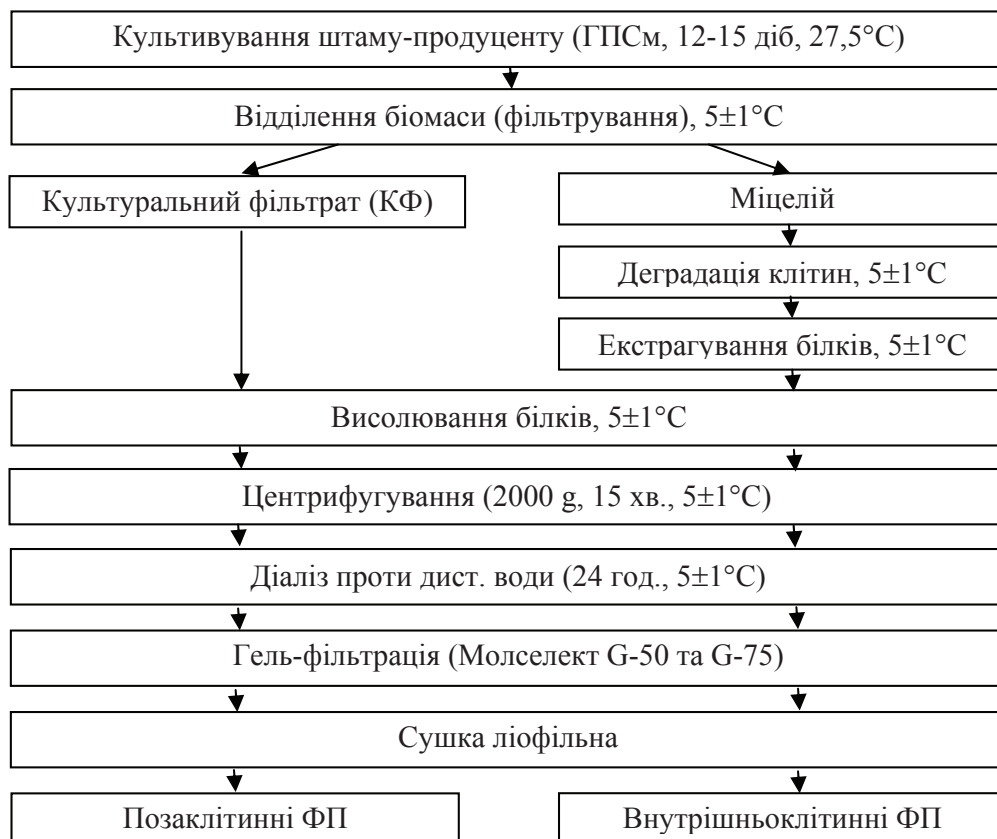


Рис. 1. Схема отримання ферментних препаратів оксидоредуктаз

Fig. 1. Scheme of obtaining oxidoreductases enzymes preparation (EP)

ків проводили шляхом розчинення сульфату амонію до 40–70% насичення для висолювання пероксидаз та 80% – каталаз та супероксиддисмутаз. Фракцію білка, яка утворила осад, відділяли центрифугуванням при 2000 g та $5\pm 0,5$ °C.

Первинну очистку білкової фракції проводили діалізом проти охолодженої до $5\pm 0,5$ °C дистильованої води. Для прискорення дифузії, розчинник декілька разів замінювали до повного очищення розчину білків від сульфату амонію. Отримані фракції білків піддавали подальшому очищенню шляхом гель-фільтрації на гранулах Молселекту G-50 та G-75.

Розчини білків ліофільно висушували, одержуючи таким чином внутрішньо- та позаклітинні ферментні препарати (ФП_в та ФП_п), які мали вигляд порошку від світло-сірого до світло-кремового забарвлення.

Активність оксидоредуктаз міцелію, КФ та ФП визначали спектрофотометричними методами: пероксидазну активність (РОХ activity) – за інтенсивністю забарвлення продукту окиснення о-діанізидину H_2O_2 та виражали в умовних одиницях кількості ферменту, яка каталізує окиснення одного мкмо-

ля о-діанізидину за 1 хвилину [8]; каталазну активність (CAT activity) – за забарвленням продукту реакції H_2O_2 з молібдатом амонію та виражали у мкат [5]; супероксиддисмугазну активність (SOD activity) – за здатністю цього ферменту інгібувати реакцію аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі, та виражали в умовних одиницях, що відповідає 1% пригнічення швидкості аутоокиснення адреналіну під дією СОД [5].

Концентрацію білка визначали за методом Лоурі-Фоліна [13]. На основі отриманих результатів розраховували питому пероксидазну, каталазну та супероксиддисмугазну активності за формулою:

$$A_{\text{пт}} = A / C_{\text{б}},$$

де: $A_{\text{пт}}$ – питома активність відповідного ферменту, A – активність відповідного ферменту, $C_{\text{б}}$ – концентрація білка.

Стабільність ферментів за різних значень рН визначали за рівнем залишкової активності їх розчинів після 60 хв експозиції при 25 °С в калій-фосфатному буфері з рН від 2,0 до 12,0; а термостабільність – після 60 хв експозиції при 10, 20...90 °С з рН 7,0.

Експерименти проводили у 6-кратній повторності. Отримані експериментальні дані піддавали статистичній обробці згідно керівництву [7]. Для оцінки статистичної значущості відмінностей використовували рівень достовірності $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати аналізу ферментних препаратів показали (табл.), що пероксидазна активність ФП_п штаму *A. cylindracea* 167 є найвищою і в 31 раз перевищує таку штаму *P. ostreatus* P-208 та в 3,4 разу – штаму *F. hepatica* Fh-08. Щодо ФП_в, штаму *A. cylindracea* 167, то його РОХ activity в 10,5 разу вища за цей показник штаму *F. hepatica* Fh-08 та в 5,3 разу – штаму *P. ostreatus* P-208. Вихід ферментних препаратів пероксидаз штаму *A. cylindracea* 167 становив $0,16 \pm 0,02$ г на кг сирої маси міцелію та $0,15 \pm 0,03$ г на літр КФ. Отже, штам *A. cylindracea* 167 показав найвищу РОХ activity як КФ та міцелію при скрипінгових дослідженнях [5], так і виділених ФП.

Найвищу CAT activity встановлено для ФП_п штаму *P. ostreatus* P-208 [5]. Каталазна активність ФП_п цього штаму перевищує такий показник штаму *A. cylindracea* 167 в 2,3 разу, а штаму *F. hepatica* Fh-08 – в 2,2 рази. CAT activity ФП_в штаму *P. ostreatus* P-208 незначно перевищувала цей показник ФП_в штаму *A. cylindracea* 167 та була нижчою майже в 2 рази ніж у штаму *F. hepatica* Fh-08. Вихід ферментних препаратів каталаз штаму *P. ostreatus* P-208 становив $0,18 \pm 0,02$ г на кг сирої маси міцелію та $0,19 \pm 0,03$ г на літр КФ.

Як продуцент ФП супероксиддисмугази обрано штам *F. hepatica* Fh-08 [5]. SOD activity ФП цього штаму найвища серед досліджуваних і перевищує таку активність ФП_п штаму *P. ostreatus* P-208 в 3,5 разу, штаму *A. cylindracea* 167 – в 2,2 разу та ФП_в обох штамів – в 5,7 разу. Позаклітинні ФП СОД штаму



F. hepatica Fh-08 в 3,8 разу активніші за внутрішньоклітинні. Вихід ферментних препаратів супероксиддисмутаза штаму *F. hepatica* Fh-08 становив $0,12 \pm 0,02$ г на кг сирової маси міцелію та $0,18 \pm 0,03$ г на літр КФ.

Таблиця

Активність оксидоредуктаз ферментних препаратів штамів базидіоміцетів

Table

Activity of oxidoreductases of enzyme preparations of strains Basidiomycetes

Штам	POX activity, Е/ мг		CAT activity, мкат / мг		SOD-activity, Е/ мг	
	ФП _п	ФП _в	ФП _п	ФП _в	ФП _п	ФП _в
<i>A. cylindracea</i> 167	6,2 $\pm 0,2$	2,1 $\pm 0,1$	4081 ± 104	942 ± 40	45,3 $\pm 0,2$	4,7 $\pm 0,1$
<i>F. hepatica</i> Fh-08	1,8 $\pm 0,1$	0,2 $\pm 0,0$	4266 ± 29	2010 ± 35	101,6 $\pm 3,5$	26,6 $\pm 0,7$
<i>P. ostreatus</i> P-208	0,2 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,1$	9181 ± 293	1010 ± 10	29,1 $\pm 0,9$	4,69 $\pm 0,1$

Слід зазначити, що всі дослідженні штами базидіоміцетів мають більш високий рівень активності позаклітинних оксидоредуктаз порівняно з внутрішньоклітинними. Скоріш за все, це пов'язано з приналежністю їх до групи грибів білої гнилі – лігнотрофів. Особливості живлення останніх зумовлюють найвищу активність комплексу саме позаклітинних оксидоредуктаз [12].

Наступним етапом дослідження було визначення деяких фізико-хімічних властивостей отриманих ФП. Так, 0,1% водні розчини ФП пероксидаз мають рН від 4,8 (штам *F. hepatica* Fh-08) до 5,8 (штам *P. ostreatus* P-208); каталази – від 5,3 (штам *P. ostreatus* P-208) до 6,2 (штам *A. cylindracea* 167); супероксиддисмутаза – від 6,5 (штам *F. hepatica* Fh-08) до 7,5 (штам *A. cylindracea* 167).

Як видно з рис. 2–4, всі отримані ферментні препарати пероксидаз мають профіль рН-стабільності ферментів в межах рН 5,0–7,0 для штаму *A. cylindracea* 167, рН 4,0–6,0 – для штаму *F. hepatica* Fh-08 та рН 7,0–8,0 – для штаму *P. ostreatus* P-208. За вкрай низьких та високих значень рН (2,0 та 12,0) пероксидазна активність втрачається майже повністю. Це пояснюється тим, що переважна більшість їх, за винятком деяких ядерних білків, є кислими та негативно зарядженими.

Профіль рН-стабільності ФП внутрішньоклітинних пероксидаз порівняно з ФП позаклітинних пероксидаз для штаму *A. cylindracea* 167 лежить в інтервалі рН 6,0–8,0; для штаму *F. hepatica* Fh-08 – 4,0–6,0; для штаму *P. ostreatus* P-208 – 5,0–8,0. При рН 2,0 та 12,0 пероксидазна активність штаму *F. hepatica* Fh-08 та штаму *P. ostreatus* P-208 втрачається майже повністю, а штаму *A. cylindracea* 167 пригнічується на 76% при рН 2,0 та на 90% при рН 12,0.



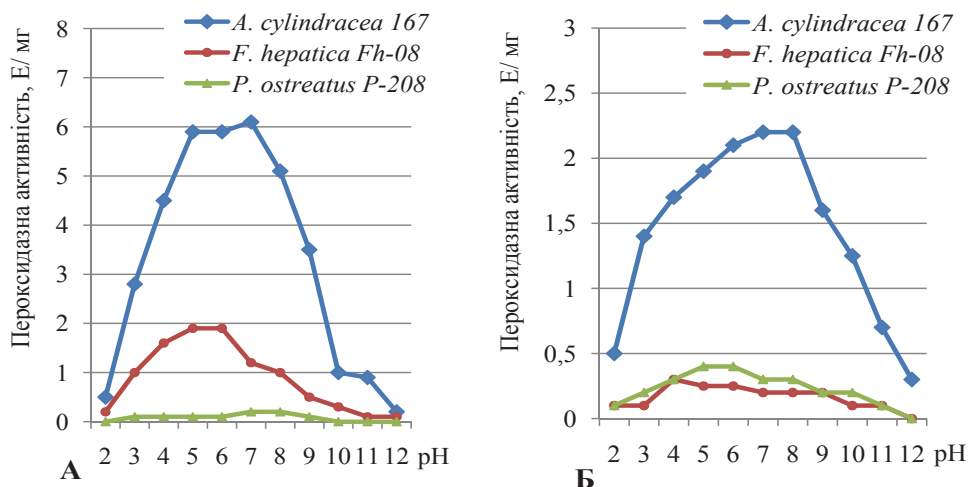


Рис. 2. Стабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП пероксидаз штамів базидіоміцетів за різних рН

Fig. 2. Stability of extracellular (A) and intracellular (B) EP of basidiomycetes strains peroxidase at different pH

Вивчення рН-стабільності позаклітинних каталаз показало, що профіль цього показника штаму *P. ostreatus* P-208 лежить в межах рН 5,0–7,0; штаму *A. cylindracea* 167 – рН 4,0–7,0; штаму *F. hepatica* Fh-08 – рН 7,0–8,0. При рН 2,0 каталазна активність найбільше знижується – на 97% від максимуму для штаму *F. hepatica* Fh-08, а найменше – на 75% для штаму *A. cylindracea* 167. При рН 12,0 каталазна активність знижується на 92–97%.

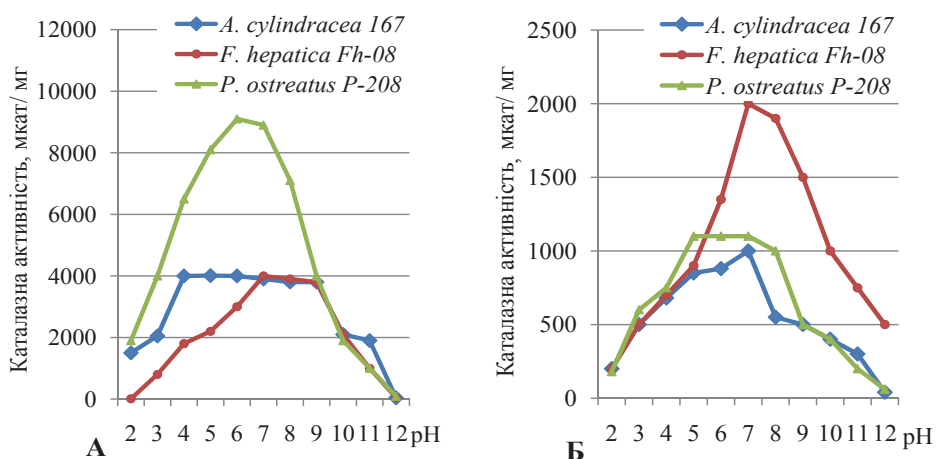


Рис. 3. Стабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП каталаз штамів базидіоміцетів за різних рН

Fig. 3. Stability of extracellular (A) and intracellular (B) EP of basidiomycetes strains catalases at different pH



При дослідженні рН-стабільності внутрішньоклітинних каталаз встановлено ті ж закономірності, що і для позаклітинних каталаз.

Профіль рН-стабільності позаклітинних супероксиддисмутаз, на відміну від пероксидаз, у більшості випадків зсунутий в бік слабколужних значень. Так, межі рН-стабільності цих ферментів штаму *F. hepatica* Fh-08 зафіксовано за рН 6,0–11,0; штаму *A. cylindracea* 167 – за рН 5,0–8,0; штаму *P. ostreatus* P-208 – за рН 6,0–9,0. Слід відзначити, що супероксиддисмутази штаму *F. hepatica* Fh-08 є стабільними у лужному середовищі: за рН 12,0 їх активність знижується лише на 25%.

Дослідження рН-стабільності внутрішньоклітинних супероксиддисмутаз показало, що межі цього показника штаму *F. hepatica* Fh-08 лежать за рН 7,0–10,0; штаму *A. cylindracea* 167 – за рН 5,0–8,0; штаму *P. ostreatus* P-208 – за рН 5,0–9,0. ФП як внутрішньоклітинної, так і позаклітинної СОД штаму *F. hepatica* Fh-08 стабільніші при слабколужному рН 7,0–10,0 та втрачають свою активність при рН 12,0 на 44% порівняно з максимальною.

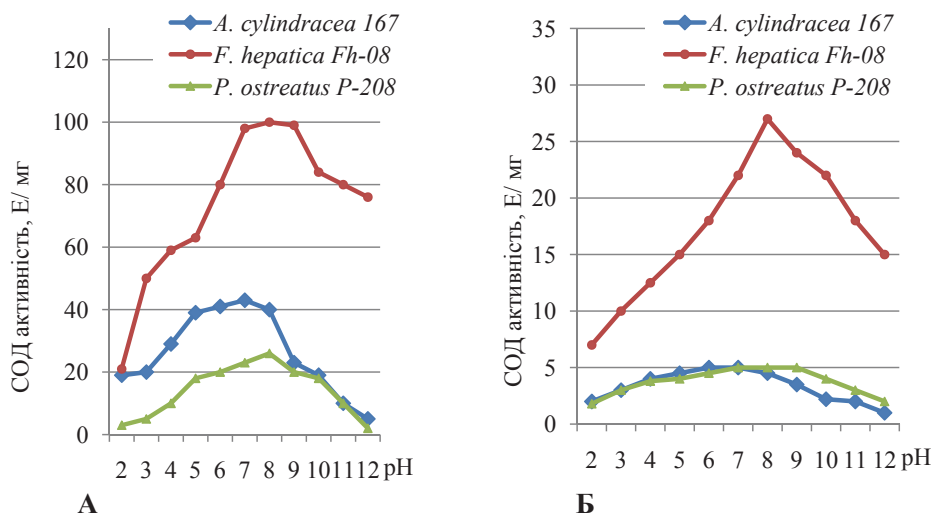


Рис. 4. Стабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП супероксиддисмутаз штамів базидіоміцетів за різних рН

Fig. 4. Stability of extracellular (A) and intracellular (B) EP of basidiomycetes strains superoxide dismutase at different pH

Отже, проведені дослідження з рН-стабільності отриманих ферментів показали, що всі вони стабільні в діапазоні рН 5–10. За вкрай низьких та високих значень рН активність всіх досліджених ферментів значно знижується, за виключенням супероксиддисмутази штаму *F. hepatica* Fh-08, яка є відносно стабільною у лужному середовищі.

Встановлено (рис. 5), що досліджені ферментні препарати позаклітинних пероксидаз є стабільними у діапазоні температур 20–30°C і за температури, що

є вищою відбувається їх часткова інактивація. Інкубація протягом 60 хв при 70–90 °С призводить до їх повної інактивації.

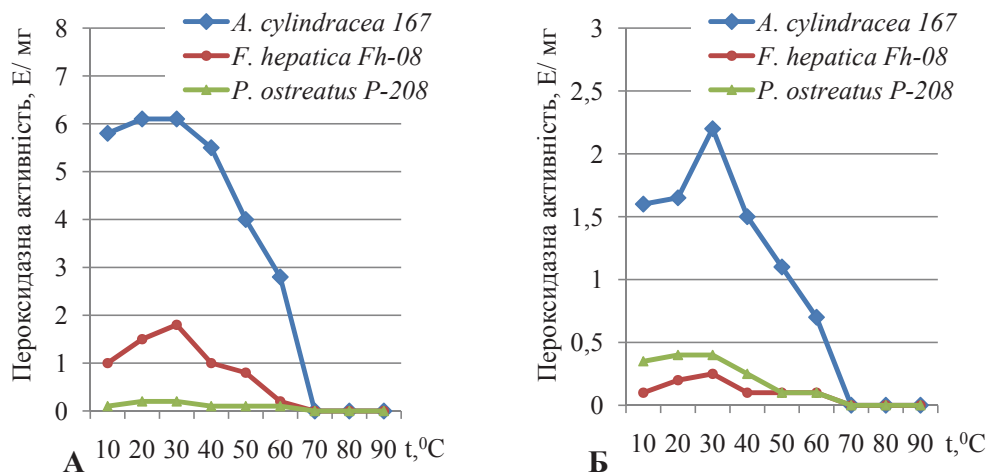


Рис. 5. Термостабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП пероксидаз

Fig. 5. Thermostability of extracellular (A) and intracellular (B) peroxidase EP

Дослідження термостабільності внутрішньоклітинних пероксидаз базидіоміцетів показало таку ж тенденцію, як і для позаклітинних. Вивчені ферменти є стабільними при 20–30 °С для штамів *F. hepatica* Fh-08 і *P. ostreatus* P-208 та при 30 °С для штаму *A. cylindracea* 167. При 70–90 °С відбувається повна інактивація досліджених ензимів.

Аналіз даних термостабільності внутрішньо- та позаклітинних каталаз показав (рис. 6), що діапазон цього показника всіх отриманих ферментних препаратів лежить в межах 20–40 °С. При зниженні температури до 10 °С втрачається від 40% (штам *A. cylindracea* 167) до 63% (штам *P. ostreatus* P-208) каталазної активності. При підвищенні температури до 80 °С зафіксована незначна залишкова каталазна активність ФП, а при 90 °С вона втрачається повністю.

Діапазон термостабільності супероксиддисмутаза (рис. 7) є дещо вищим за цей показник для пероксидаз та каталаз та відповідає знаходиться в межах 30–40 °С. При зниженні температури до 10 °С втрачається від 37% (штам *P. ostreatus* P-208) до 70% (штам *F. hepatica* Fh-08) супероксиддисмутазної активності ФП. При підвищенні до 80 °С виявлена їх незначна залишкова активність та повна інактивація при 90 °С.

Отже, всі отримані ферментні препарати є стабільними при рН, що лежить в інтервалі від 5 до 10 та температурі – від 20 до 40 °С. За цими ознаками та ферментативною активністю виділені ензими не поступаються використовуваним у промисловості [5].

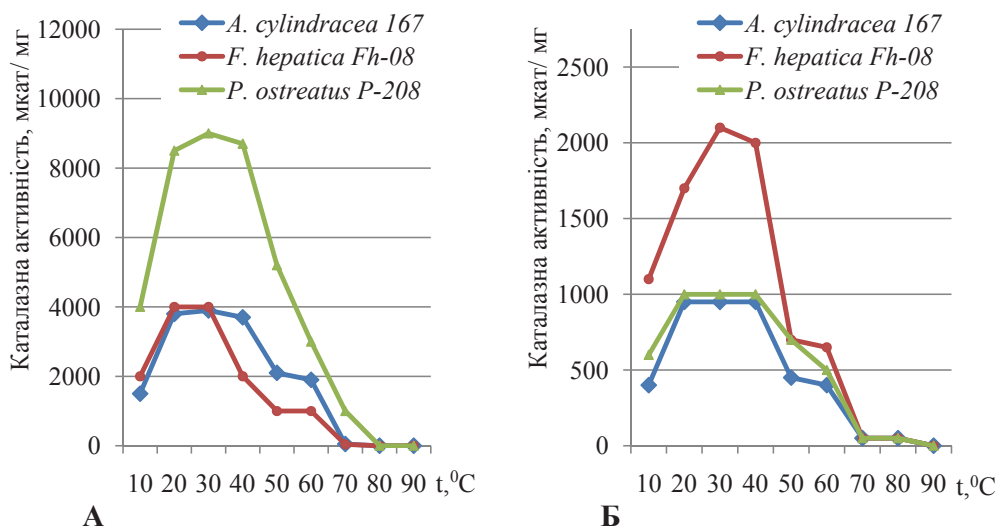


Рис. 6. Термостабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) каталаз EP
 Fig. 6. Thermostability of extracellular (A) and intracellular (B) catalases EP

Встановлені фізико-хімічні характеристики досліджених ферментів, ймовірно, зумовлені особливостями живлення досліджених ксилотрофних базидіоміцетів та наявністю різних ізоформ серед позаклітинних ензимів. Зокрема, для лігнотрофів є характерним переважання серед позаклітинних пероксидаз – лігнінпероксидаз [12, 14].

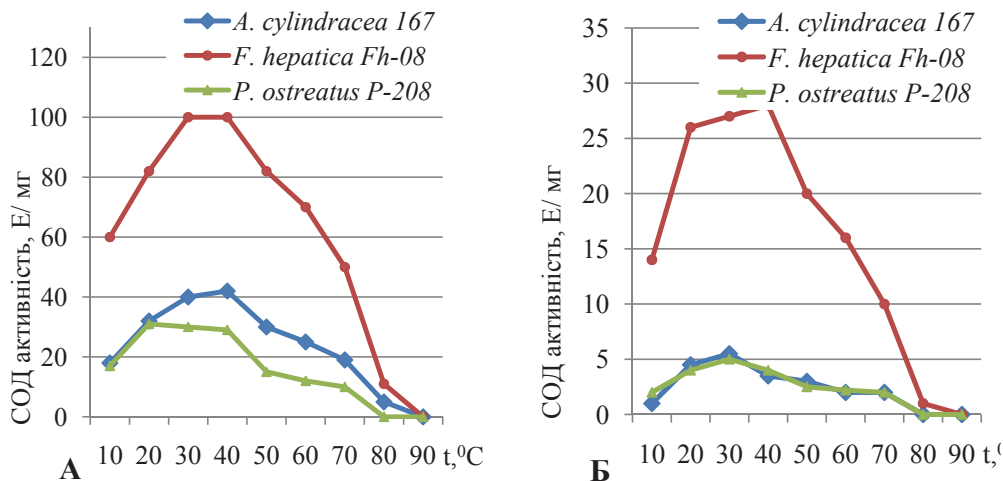


Рис. 7. Термостабільність позаклітинних (А) та внутрішньоклітинних (Б) ФП супероксиддисмутаза

Fig. 7. Thermostability of extracellular (A) and intracellular (B) superoxide dismutase EP

Таким чином, вперше отримано та проведено вивчення ферментних препаратів пероксидаз, каталаз та супероксиддисмутаз внутрішньо- та позаклітинного походження штамів базидіальних грибів *Agrocybe cylindracea* 167, *Fistulina hepatica* Fh-08, *Pleurotus ostreatus* P-208. Встановлено індивідуальні характеристики – ферментативну активність ФП, їх рН- і термостабільність. Показано, що штам *A. cylindracea* 167 є активним продуцентом позаклітинної пероксидази, штам *P. ostreatus* P-208 – позаклітинної каталази, а штам *F. hepatica* Fh-08 – позаклітинної супероксиддисмутази. Результати скринінгу високоактивних продуцентів оксидоредуктаз серед представників відділу *Basidiomycota*, вивчення закономірностей їх культивування та біосинтезу, апробації способів отримання ферментних препаратів пероксидаз, каталаз та супероксиддисмутаз внутрішньо- та позаклітинного походження дозволяють отримати нові антиоксидантні ензими, які мають широкі перспективи використання у різних галузях промисловості, медицині та екології.

О.В. Федотов, Т.Е. Волошко

Донецкий национальный университет,
ул. 600-летия, 21, Винница, 21001, Украина,
тел.: +38 (062) 302 06 00, e-mail: bio.graff@ukr.net

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ОКСИДОРЕДУКТАЗ НЕКОТОРЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

*Целью работы было получение и анализ ферментных препаратов оксидоредуктаз некоторых видов базидиомицетов. Методы. В качестве продуцентов оксидоредуктаз использовали штаммы *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08 и *Pleurotus ostreatus* P-208. Отобранные штаммы базидиомицетов культивировали на модифицированной для каждого штамма глюкозопептонной среде. Фракционирование ферментов из культурального фильтрата и водных экстрактов мицелия проводили путем высаливания сульфатом аммония. Полученные растворы фракций белков подвергали дальнейшей очистке путем диализа и гель-фильтрации на гранулах Молселекта G-50 и G-75. Результаты. Получены ферментные препараты вне- и внутриклеточных оксидоредуктаз – пероксидаз, каталаз и супероксиддисмутаз из культур базидиомицетов. Установлены индивидуальные характеристики ферментов: ферментативная активность, рН- и термостабильность. Исследованные штаммы базидиомицетов имеют более высокий уровень активности внеклеточных оксидоредуктаз по сравнению с внутриклеточными. Максимальная пероксидазная активность ферментного препарата штамма *A. cylindracea* 167 составляла $6,2 \pm 0,2$ Е/мг, каталаза штамма *P. ostreatus* P-208 – 9181 ± 293 мкат/мг и супероксиддисмутаза штамма *F. hepatica* Fh-08 – $101,6 \pm 3,5$ Е/мг. Все ферменты стабильны в диапазоне рН 5–10 и температуре – от 20 до 40 °С. Вывод. Получены новые антиоксидантные энзимы базидиомицетов*



Agrocybe cylindracea; Fistulina hepatica, Pleurotus ostreatus и установленны их индивидуальные свойства: ферментативная активность, pH и термостабильность. По установленным признакам выделенные энзимы не уступают используемым в промышленности и являются перспективными для практического применения.

Ключевые слова: базидиомицеты, оксидоредуктазы, каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза.

O.V. Fedotov, T.E. Voloshko

Donetsk National University,
21, 600th anniversary str., Vinnitsa, 21001, Ukraine,
tel.: +38 (062) 302 06 00, e-mail: bio.graff@ukr.net

PRODUCTION AND ANALYSIS OF ENZYME PREPARATIONS OF OXIDOREDUCTASES OF SOME BASIDIOMYCETES

Summary

Aim. To obtain and analyze the oxidoreductase enzyme preparations of some species of Basidiomycetes. **Methods.** The strains *Agrocybe cylindracea* 167; *Fistulina hepatica* Fh-08 and *Pleurotus ostreatus* P-208 were used as the producers of oxidoreductases. The selected strains of Basidiomycetes were cultured on modified for each strain glucose-peptone medium. Fractionation of the enzyme from the culture filtrate and mycelium aqueous extracts was carried out by salting out with ammonium sulfate. The obtained solutions of protein fractions were further purified by dialysis and gel filtration on Molselekt pellet G-50 and G-75. **Results.** The enzyme preparations of extracellular and intracellular oxidoreductases such as peroxidase, catalase and superoxide dismutase were obtained from the cultures of Basidiomycetes. Basidiomycetes strains which were tested had individual characteristics of enzymes and enzymatic activity, pH and thermal stability. These strains of Basidiomycetes have a higher level of activity of extracellular oxidoreductases compared with intracellular. Maximum peroxidase activity of the enzyme preparation of *A. cylindracea* strain 167 was marked at 6.2 ± 0.2 U/mg, catalase of strain *P. ostreatus* P-208 was marked at 9181 ± 293 MAb/mg and superoxide dismutase of strain *F. hepatica* Fh-08 was marked at 101.6 ± 3.5 U/mg. All enzymes are stable in the pH range of 5–10 and at temperature from 20 to 40 °C. **Conclusion.** New antioxidant enzymes Basidiomycetes *Agrocybe cylindracea*, *Fistulina hepatica*, *Pleurotus ostreatus* were obtained. Their individual properties: enzyme activity, pH and temperature stability were established. According to the established properties are not inferior to the selected enzymes used in industry and they are promising for practical application.

Key words: basidiomycetes, oxidoreductase, catalase, peroxidase, superoxide dismutase.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – С. 465–474.
2. Волошко Т.Є. Вплив деяких мікроелементів на активність оксидоредуктаз базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікроб. і біотехнол., 2013. – № 1(21). – С. 63–80.
3. Волошко Т.Є. Вплив джерел азотного живлення на активність оксидоредуктаз деяких штамів базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Актуальні проблеми ботаніки та екології. – Ужгород, 2012. – С. 197–198.
4. Волошко Т.Є. Вплив електромагнітних полів на активність оксидоредуктаз деяких видів базидіоміцетів / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Біологічний вісник МДПУ ім. Богдана Хмельницького, 2013. № 2 (8). – С. 45–56.
5. Волошко Т.Є. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікроб. і біотехнол., 2011. – № 4(16). – С. 69–81.
6. Дудка И.А. Культивирование съедобных грибов. / И.А. Дудка, Н.А. Бисько, В.П. Билай. – К.: Урожай, 1992. – 160 с.
7. Приседський Ю.Г. Пакет програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. – Донецьк: ДонНУ, 2005. – 75 с.
8. Рогожин В.В. Физиолого-биохимические механизмы прорастания зерновок пшеницы / В.В. Рогожин, Т.В. Рогожина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 8 (82). – С. 17–21.
9. Федотов О.В. Амінокислотний склад ферментних препаратів пероксидаз істівних лікарських грибів *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes* і *Pleurotus ostreatus* / О.В. Федотов // Вісник Донецького університету. – 2006. – Вип. 2. – С. 270–274.
10. Федотов О.В. Зв'язані амінокислоти і білок ферментних препаратів монокозидальної дії у афілофорових грибів / О.В. Федотов, М.І. Бойко, С.Ф. Негруцький // Укр. ботан. журн. – 2002, – Т. 59, № 1. – С. 45–48.
11. Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів – основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету. – 2012. – Вип. 1. – С. 209–213.
12. Fedotov O.V. Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov // Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications – Tbilisi: Myza, 2007. – P. 125–131.
13. Lowry O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // Biol. Chem., 1951. – P. 265–275.
14. Ngo T.T. Peroxidase in chemical and biochemical analysis / T.T. Ngo // Analytical letters. – 2010. – Vol. 43, № 10. – P. 1572–1587.
15. Wasser S.P. Medicinal mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved problems / S.P. Wasser // International Journal Medical Mushrooms, 2010. – 12 (1). – P. 1–16.

Стаття надійшла до редакції 05.10.2013 р.



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

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

ВПЛИВ ФТОРХІНОЛОНІВ НА БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Мета. Вивчити вплив офлоксацину та левофлоксацину на сформовані біоплівки бактерій клінічних штамів *Staphylococcus epidermidis*. **Методи.** Стійкість до антибіотиків визначали методом дисків з фторхінолонами різних поколінь: налідиксова кислота, піпемідінова кислота, цiproфлорксацин, офлоксацин, норфлорксацин, левофлоксацин, спарфлорксацин. Формування біоплівки стафілококами моделювали мінімальні пригнічувальні концентрації (МПК) антибіотиків для планктонної культури, які визначали методом серійних розведень. Формування біоплівки стафілококами моделювали у імунологічних лункових планшетах. **Результати.** Показано, що офлоксацин у концентрації, що у 100 разів перевищує МПК для формування біоплівки, зменшує сумарну кількість бактерій 24-годинної біоплівки більше ніж у 40000 разів, а 48-годинної – у 31000 разів, при застосуванні такої ж концентрації левофлоксацину при внесенні до 24-годинної біоплівки – у 9100 разів, до 48-годинної біоплівки – у 7400 разів. **Висновок.** Офлоксацин у концентрації, яка перевищує у 100 разів МПК для формування біоплівки у 4,5 та 4,2 рази більш ефективний відносно 24-годинної та 48-годинної біоплівки відповідно порівняно з аналогічною концентрацією левофлоксацину.

Ключові слова: *Staphylococcus epidermidis*, біоплівка, офлоксацин, левофлоксацин, пригнічувальна концентрація.

Останнім часом відмічається збільшення кількості випадків, коли антибактеріальні препарати та їх комплекси стають неефективними у лікуванні інфекційних процесів. Значну роль у цьому відіграє біоплівкова структурна організація бактерій. У складі біоплівки умовно-патогенні бактерії набувають ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та інших чинників довкілля. Бактерії, що формують біоплівку, викликають близько 65–80% усіх інфекційних захворювань [14, 15]. Одними з найбільш відомих бактерій, що формують біоплівку є стафілококи [2, 3, 12]. Вони часто викликають позалікарняні нозокоміальні інфекції [7], а також біоплівкові інфекції верхніх дихальних шляхів, шкіри та м'яких тканин, ендокардити, ураження сечовидільної системи тощо [2].

Біоплівка суттєво підвищує стійкість мікроорганізмів до імунної системи хазяїна, антимікробних препаратів [12, 13] і впливу негативних факторів навколишнього середовища [4, 9]. Стійкість бактерій у біоплівці може виража-



тися у високій резистентності до чинників, які їх пригнічують за умов перебування у планктонній культурі [1].

Вочевидь, що проникнення антибіотиків у біоплівки пов'язане з перенесенням крізь ліпіди поверхневих оболонок матриксу, які є однаковими за якісним складом з ліпідами бактеріальних мембран. У зв'язку з цим, вважають, що більш ефективно діяти на бактеріальні біоплівки будуть антибіотики, що здатні проникати через клітинну стінку бактерії. До таких препаратів відносять фторхінолони [9].

Метою роботи було вивчити вплив офлоксацину та левофлоксацину на сформовані біоплівки бактерій клінічних штамів *Staphylococcus epidermidis*.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 20 біоплівкоутворювальних штамів *Staphylococcus epidermidis* з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету імені О. Гончара.

Стійкість до фторхінолонів визначали відповідно до критеріїв рівнів стійкості/чутливості бактерій до антибіотиків [5]. Для цього використовували диски з фторхінолонами різних поколінь: налідиксова кислота, піпемідинова кислота, ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин (ТОВ «Аспект», РФ).

МПК фторхінолонів для планктонної культури визначали методом серійних розведень.

МПК фторхінолонів, що впливають на утворення біоплівки, визначали в імунологічному планшеті. Для отримання біоплівок стафілококу в лунки 96-лункового імунологічного планшета вносили по 0,2 мл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ). Із основного розчину антибіотика (1 г у 10 мл 0,5% NaCl) відбирали по 0,05 мл і вносили в першу лунку планшета, після чого робили серійні розведення антибіотика. Потім у кожен лунку вносили по 0,05 мл бактеріальної суспензії, яка містила $3,3 \times 10^6$ кл/мл та інкубували при 37 °С. Остання лунка планшета, в якій не відбувалося формування біоплівки протягом 72 год, відповідала МПК антибіотика. Для визначення МПК для планктонної культури антибіотика брали у кінцевих концентраціях від 0,05–0,3 мкг/мл, а для МПК, що пригнічує формування біоплівки у 96-лунковому планшеті – 0,1–3,0 мкг/мл.

Вивчення впливу підвищених концентрацій фторхінолонів на сформовану біоплівку *S. epidermidis* проводили за допомогою модифікованої методики [11] у 6-лункових планшетах. Для цього у кожен лунку вносили по 0,4 мл бактеріальної суспензії *S. epidermidis* та поміщали планшет до термостату при 37 °С на 3 год, потім додавали по 1,6 мл МПБ. Фторхінолони додавали до лунок планшета під час засіву бактеріальної суспензії, потім до сформованих впродовж 24 та 48 год біоплівок. Антибіотики вносили у концентраціях, що перевищували МПК формування біоплівки у 10, 50 та 100 разів. Облік результатів проводили через 24 год після внесення антибіотика. Для цього з лунок планше-



ту відбирали залишки поживного середовища, а біоплівку, яка залишалася на дні лунок промивали ізотонічним розчином 0,5% NaCl та переносили у скляний гомогенізатор для гомогенізації та вивільнення клітин. З отриманої суспензії робили розведення та проводили висів на м'ясо-пептонний агар (МПА) для підрахунку кількості колоніє-утворювальних одиниць (КУО).

Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми MS Excel.

Результати та їх обговорення

Вивчення стійкості до фторхінолонів другого та третього покоління (рис. 1) офлоксацину та левофлоксацину, показало, що вони пригнічують усі 20 штамів *S. epidermidis* у планктонній культурі.

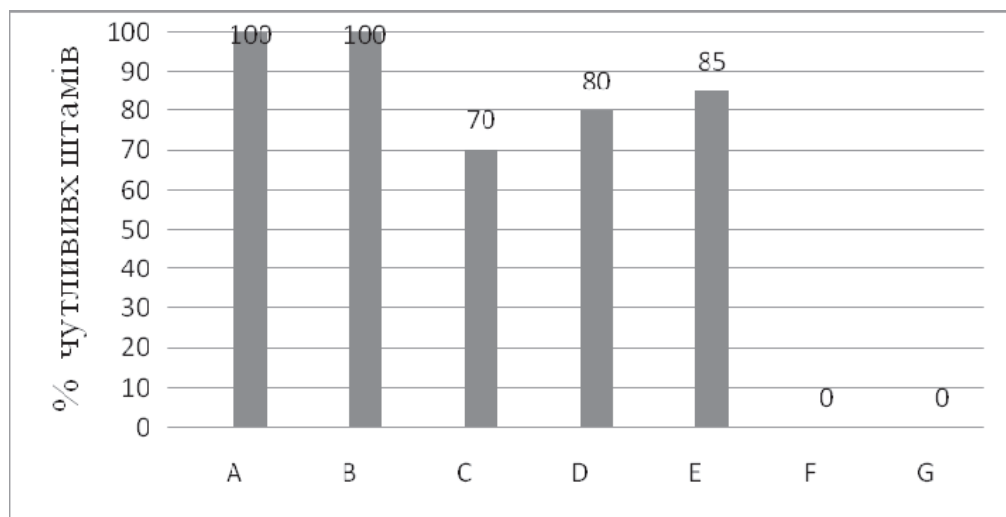


Рис. 1. Частота виявлення чутливих до фторхінолонів штамів *S. epidermidis*

Примітка: А – офлоксацин, В – левофлоксацин, С – ципрофлоксацин, D – норфлоксацин, E – спарфлоксацин, F – налідиксова кислота, G – піпемідинова кислота

Fig. 1. Incidence of antibiotic-sensitive film-forming strain of *S. epidermidis* for fluoroquinolones medicines

Note: A – ofloxacin, B – levofloxacin, C – ciprofloxacin, D – norfloxacin, E – sparfloxacin, F – nalidixic acid, G – piperimidic acid

До ципрофлоксацину виявили чутливість 14 штамів (70%), до норфлоксацину – 16 (80%), до спарфлоксацину – 17 (85%). Помірночутливих та стійких серед досліджених штамів стафілококів не виявлено. Всі досліджувані штами виявили стійкість до фторхінолонів першого покоління – налідиксової та піпемідинової кислот.

На основі отриманих результатів у подальших дослідженнях вивчали вплив офлоксацину та левофлоксацину на формування бактеріями біоплівки та сформовану біоплівку.

За результатами, які були отримані раніше, відомо, що МПК офлоксацину та левофлоксацину для планктонних культур були у середньому в 2 рази нижчі за МПК, які гальмували формування біоплівки.

Відомо, що бактерії у складі біоплівки характеризуються підвищеною стійкістю до антибіотиків та негативних чинників навколишнього середовища [2, 3]. В зв'язку з цим визначені для планктонної культури МПК антибіотиків не впливають на бактерії вже сформованої біоплівки. Тому в подальшому вивчали вплив на сформовані протягом 24 та 48 годин біоплівки офлоксацину та левофлоксацину у концентраціях, що перевищують МПК для біоплівкових культур у 10, 50 та 100 разів.

Встановлено, що за таких концентрацій офлоксацину та левофлоксацину, внесених разом з бактеріальною суспензією стафілококів, формування біоплівки не спостерігали.

Після додавання офлоксацину у концентрації, що перевищує МПК біоплівкоутворення у 10 разів (табл. 1) до середовища зі сформованою 24 годинною біоплівкою, було встановлено, що кількість бактерій у біоплівці на наступну добу після внесення антибіотику зменшилася у 455 разів порівняно з контролем, а у 48 годинній біоплівці – у 250 разів.

Так як бактерії 24 та 48 годинні біоплівки, до яких вносили антибіотик, продовжували культивування у поживному середовищі та їх вік збільшувався на 24 години, тому контролем виступали 48 та 72 годинні біоплівки.

Таблиця 1

Сумарна кількість бактерій (КУО) *S. epidermidis* у сформованій біоплівці за дії офлоксацину

Table 1

The total bacteria number of biofilm *S. epidermidis*, formed under the influence of ofloxacin (CFU)

Вік біоплівки (годин)	Концентрація офлоксацину			
	Контроль	10 МПК	50 МПК	100 МПК
24	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^6$	$(6,8 \pm 1,3) \times 10^3$	$(7,4 \pm 2,3) \times 10^2$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^2$
48	$(2,9 \pm 0,4) \times 10^9$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^7$	$(8,7 \pm 2,4) \times 10^5$	$(9,0 \pm 2,1) \times 10^4$

Примітка: облік результатів проводили через 24 години після внесення офлоксацину
 Note: the record of the results was performed the next day after adding of ofloxacin

При внесенні до 24 годинної біоплівки офлоксацину у концентрації, що перевищує МПК для формування біоплівки у 50 разів, встановлено зменшення сумарної кількості бактерій у складі біоплівки на наступну добу після внесення антибіотику у 4150 раз, при додаванні тієї ж концентрації офлоксаци-



ну до 48 годинної біоплівки кількість бактерій у біоплівці знижувалася у 3200 разів порівняно з біоплівками, що формувалися у середовищі без антибіотиків. Після додавання антибіотика у концентрації 100 МПК до 24 годинної біоплівки виявлено сумарне зменшення кількості бактерій у біоплівці на наступну добу у 41400 рази, а до 48 годинної біоплівки – у 31000 разів.

Після додавання левофлоксацину у концентрації, що у 10 разів перевищувала МПК для формування біоплівки до рідкого поживного середовища, в якому знаходились сформовані протягом 24 та 48 годин біоплівки, було визначено, що сумарна кількість бактерій у біоплівках на наступну добу досліджень знижувалася, як і при використанні офлоксацину, на два порядки.

При внесенні до 24 годинної біоплівки дослідних штамів левофлоксацину (табл. 2) у концентрації, що у 10 разів перевищувала МПК біоплівкоутворення, сумарна кількість бактерій біоплівки на наступну добу після внесення антибіотика знижувалася у 195 разів, до 48 годинної – у 100 раз порівняно з біоплівкою, що формувалася без антибіотика.

Таблиця 2

Сумарна кількість бактерій (КУО) *S. epidermidis* у сформованій біоплівці за дії левофлоксацину

Table 2

The total bacteria number of the biofilm *S. epidermidis*, formed under the influence of levofloxacin (CFU)

Вік біоплівки	Концентрація левофлоксацину			
	Контроль	10 МПК	50 МПК	100 МПК
24	$(4,8 \pm 1,2) \times 10^6$	$(2,4 \pm 0,9) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^3$	$(5,2 \pm 1,5) \times 10^2$
48	$(3,6 \pm 0,8) \times 10^9$	$(3,6 \pm 1,0) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,7) \times 10^5$

Примітка: облік результатів проводили через 24 години після внесення левофлоксацину
Note: the record of the results was performed after adding of levofloxacin in 24 hours

При внесенні до 24 годинної біоплівки препарату у концентрації, що у 50 разів перевищувала МПК біоплівкоутворення, відмічали зменшення кількості бактерій у біоплівках дослідних штамів на наступну добу після внесення антибіотика у 3150 раз, при додаванні тієї ж концентрації левофлоксацину до 48 годинної біоплівки сумарна кількість бактерій у складі біоплівки знижувалася у 2450 раз, порівняно з контрольними біоплівками.

Після внесення до 24 годинної біоплівки левофлоксацину у концентрації, що у 100 разів перевищує МПК біоплівкоутворення, спостерігали зменшення кількості бактерій у біоплівці на наступну добу досліджень у 9100 раз, при додаванні вказаної концентрації левофлоксацину до 48 годинної біоплівки кіль-



кість бактерій у біоплівці знижувалася у 7400 рази порівняно з біоплівкою, що формувалася без антибіотика.

Таким чином, можна заключити, що більш ефективно антибіотики у концентраціях 10, 50 та 100 МПК впливали на 24 годинну біоплівку, порівняно з 48 годинною. Серед антибіотиків більш ефективним виявився офлоксацин з концентрацією у 100 разів вищою за МПК для біоплівкової культури, так як відбувалося зниження кількості бактерій у біоплівці понад 40000 раз.

При дослідженні впливу фторхінолонів на різні грамозитивні та грамнегативні бактерії показано [9, 10], що під час засіву бактеріальної суспензії для формування біоплівки їх додавання у кількостях, що відповідали 50 або 100 МПК, у всіх досліджуваних штамів відбувалося значне зниження кількості бактерій у біоплівках. Біоплівки різних штамів одного й того ж виду, наприклад стафілококів, псевдомонад та ентерококів, по різному реагували на однакові концентрації того ж антибіотика. Так, для більшості штамів стафілококів відбувалося зниження кількості бактерій біоплівки у 10^3 – 10^4 разів, а для штамів псевдомонад лише у 10–15 разів.

Додавання фторхінолонів у кількостях, що відповідають 50–200 МПК до 24 годинної біоплівки різних видів стафілококів, ентеробактерій, кишкової та синьогнійної палички, призводило до зменшення числа бактерій у 10–100 разів [9].

В ході наших досліджень встановлено, що внесення фторхінолонів під час засіву бактеріальної суспензії призводило до повного пригнічення формування біоплівки та росту культури. Внесення до добової біоплівки фторхінолонів у концентраціях, що відповідають 50–100 МПК відбувалося зниження кількості бактерій у 10^2 – 10^4 разів порівняно з біоплівками, що розвивалися у середовищах без антибіотиків. Тому, можна заключити, що активність антибактеріальних препаратів залежить не тільки від виду бактерій, але й від того в якій формі існування перебувають бактерії – планктоні чи у складі біоплівки.

При аналізі отриманих нами результатів порівняно з даними літератури [8, 9, 10] можна відмітити, що фторхінолони здійснювали значний вплив на формування та добову біоплівку. Але у нашому випадку внесення досліджуваних препаратів під час засіву бактеріальної суспензії призводило до повного пригнічення формування біоплівки.

У ході наших досліджень встановлено, що внесення антибіотиків у кількостях, відповідних 50 та 100 МПК, призводило до зниження кількості бактерій у 10^2 – 10^4 разів, тоді як за даними інших авторів [9, 10] внесення антибіотиків у кількостях 50–200 МПК до добової біоплівки призводило до зменшення числа КУО у 10–100 разів. Отже, проблема стійкості бактерій біоплівки має принципове значення під час добору оптимальних антибіотиків, визначенні МПК та вивченні їх впливу на мікроорганізми. Такі дослідження є теоретичною основою розробки схем раціонального застосування антибіотиків у лікуванні інфекцій, що ускладнені формуванням біоплівок.



УДК 579.61:616-078

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

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

ВЛИЯНИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Реферат

Цель работы. Изучить влияние офлоксацина и левофлоксацина на сформированные биопленки бактерий клинических штаммов *Staphylococcus epidermidis*. **Методы.** Устойчивость к антибиотикам определяли методом дисков с фторхинолонами разных поколений: налидиксовая кислота, пипемидиновая кислота, ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин. Формирование биопленки стафилококками моделировали минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков для планктонной культуры, определяли методом серийных разведений. Формирование биопленки стафилококками моделировали в иммунологических луночных планшетах. **Результаты.** Показано, что офлоксацин в концентрации, что в 100 раз превышает МПК для формирования биопленки приводит к снижению суммарного количества бактерий 24-часовой биопленки более чем в 40000 раз, а 48-часовой – в 31000 раз, при применении такой же концентрации левофлоксацина при внесении к 24-часовой биопленки – в 9100 раз, 48-часовой биопленки – в 7400 раз. **Выводы.** Офлоксацин в концентрации, превышающей в 100 раз МПК для формирования биопленки в 4,5 и 4,2 раза более эффективен в отношении 24-часовой и 48-часовой биопленки соответственно по сравнению с аналогичными концентрациями левофлоксацина.

Ключевые слова: *Staphylococcus epidermidis*, биопленка, офлоксацин, левофлоксацин, подавляющая концентрация.

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

Dnipropetrovsk National University named after Oles Gonchar,
72, Ave. Gagarin, Dnipropetrovsk, Ukraine,
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru

FLUOROQUINOLONE INFLUENCE UPON *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* BIOFILM

Summary

Aim. To study the effect of ofloxacin and levofloxacin on biofilm of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains. **Methods.** Resistance to antibiotics was



determined by the method of discs with fluoroquinolones of different generations: nalidixic acid, piperimidin acid, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin. The formation of biofilm by staphylococci modeled minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics for planktonic culture, it was determined by the method of serial dilutions. The formation of biofilm by staphylococci was modeled in immunological well plates. **Results.** It is shown that ofloxacin in concentrations 100 times higher than the MIC for biofilm formation reduces the bacteria on 24 hours biofilm more than 40000 times, on 48 hour – 31000 times, the application of the same concentration of levofloxacin to 24 hours biofilm – in 9100 times, to 48 hours biofilm – in 7400 times. **Conclusions.** Ofloxacin in the concentration exceeding 100 times the MIC for biofilm formation by 4.5 and 4.2 times more effective against 24 hour and 48 hour biofilm, respectively, compared with the same concentration of levofloxacin.

Key words: *Staphylococcus epidermidis*, biofilm, ofloxacin, levofloxacin, inhibitory concentration.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Афиногенова А. Г., Даровская Е. Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. – 2011. – Т. 61, № 3. – С. 119–125.
2. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4–15.
3. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С. 101–108.
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 149–163.
5. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – К: МОЗ України, 2007. – 63 с.
6. Сідашенко О.І., Воронкова О.С., Сірокваша О.А., Вінніков А.І. Чутливість до антибіотиків планктонних та біоплівкових культур *Staphylococcus epidermidis* // Мікробіологія та біотехнологія. – 2014. – Т. 25, № 1. – С. 63–71.
7. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбеян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 435–446.
8. Тец В.В. Бактериальные сообщества. Клеточные сообщества. СПб.: Изд-во СПб ГМУ. – 1998. – С. 73.
9. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб.: КЛЕ-Т. – 2006. – С. 128.



10. Тец Г.В., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Тец В.В. Особенности совместного действия левофлоксацина и ДНКазы на биопленки возбудителей урогенитальных инфекций // Урология. – 2012. – № 1. – С. 21–24.

11. Тец В.В., Кнорринг Г.Ю., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., К.Л. Артеменко Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – № 12 – С. 9–13.

12. Чеботарь И.В. Таланин Е.А., Кончакова Е.Д. Новый метод количества учета кокков в надклеточных образованиях – кластерах и биопленке // Стоματοлогия, травматология, микробиология. – 2010. – № 3 – С. 14–17.

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

14. Cirioni O. RNAIII-inhibiting peptide significantly reduces bacterial load and enhances the effect of antibiotics in the treatment of central venous catheter-associated *Staphylococcus aureus* infections // J. of Inf. Dis. – 2006. – № 193. – P. 180–186.

15. Pace J.L., Rupp M.E., Finch R.G. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy // Boca Raton: Taylor & Francis Group. – 2006. – P. 495.

Стаття надійшла до редакції 14.04.2014 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 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. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

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

На журнальні статті

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

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

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

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



На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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 08.10.2014 р. Формат 70x100/16.

Ум.-друк. арк. 8,7. Тираж 100 пр.

Зам. № 1024.

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