

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(39)
2017

Одеса
ОНУ
2017

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

А. Анадон (Мадрид, Іспанія), 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), Т. Ертле (Нант, Франція), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), І.П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), В.П. Патица (Київ, Україна), Петров С.А. (Одеса, Україна), В.С. Підгорський (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), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія), С.В. Чеботар (Одеса, 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

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

Реферативна база даних Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.urau.ua), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Reseach Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

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, 2017

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

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), S.V. Chebotar (Odesa, Ukraine), V.O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B.M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland), P.I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G.O. Iuynska (Kyiv, Ukraine), L.V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N.K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I.K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B.P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I.P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S.A. (Odesa, Ukraine), V.S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), V.P. Polishuk (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)

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

**Bibliographic Database «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List,
Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals,
Scientific Periodicals of Ukrain (journal.urau.ua), Ukrainian Scientific journals (usj.
org.ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google
Scholar, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Scientific Periodicals of
Ukrain (journal.urau.ua), Reseach Bib, e-LIBRARY, IBI Factor**

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

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

© Odesa National Mechnykov
University, 2017

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ПРАЦІ

І.А. Блайда, Т.В. Васильєва БАКТЕРІАЛЬНА ДЕСУЛЬФУРИЗАЦІЯ ВУГІЛЛЯ.....	6
---	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Ю.В. Коломієць, А.Ф. Ліханов, І.П. Григорюк ПРОСТОРОВА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ І СПЕЦИФІЧНІСТЬ ІНДУКОВАНИХ БАКТЕРІОЗІВ У КАЛІОСНИХ ТКАНИНАХ <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM MILL. IN VITRO</i>	24
--	----

А.С. Семенець, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова ВПЛИВ АНТИБІОТИКІВ НА БІОПЛІВКИ ШТАМІВ <i>PSEUDOMONAS</i> <i>AERUGINOSA</i> З РІЗНИМ РІВНЕМ ВМІСТУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ	33
--	----

А.Г. Мерліч, І.Д. Жунько, Н.В. Ліманська, В.О. Іваниця АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ БАКТЕРІЙ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ТА <i>ENTEROCOCCUS ITALICUS</i> ЗА СУМІСНОЇ ДІЇ ПРОТИ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ	45
--	----

О.М. Волощук, Ю.В. Короткий, О.А. Смертенко, С.Л. Рибалко, Ю.І. Порва, В.П. Широбоков АНТИВІРУСНА ДІЯ ПОХІДНИХ АМІНОПРОПАНОЛУ-2 НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С	55
---	----

О.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Бєляєва, І.П. Конуп ВИЛУЧЕННЯ CU (II) З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ІММОБІЛІЗОВАНИМИ КЛІТИНАМИ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>	66
---	----

Л.О. Максименко, О.І. Балко, О.Б. Балко НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ КАРОТОВОРИЦИНИ <i>PESTOBACTERIUM</i> <i>CAROTOVORUM</i> SUBSP. <i>CAROTOVORUM</i>	75
--	----

І.П. Конуп, Т.В. Гудзенко, Л.А. Конуп, О.В. Волювач ДЕТЕКТУВАННЯ БІОСУРФАКТАНТІВ НА ПОВЕРХНІ НАНОПОРИСТОГО КРЕМНІЮ	84
---	----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	93
---	----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

I.A. Blayda, T.V. Vasyleva BACTERIAL DESULPHURIZATION OF COALS	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

Y.V. Kolomiets, A.F. Likhanov, I.P. Grigoryuk SPATIAL HETEROGENICITY AND SPECIFICITY OF INDUCED BACTERIOSIS IN CALLUS TISSUES <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> <i>MILL. IN VITRO</i>	24
--	----

A.S. Semenets, M.B. Galkin, B.M. Galkin, T.O. Filipova INFLUENCE OF ANTIBIOTICS ON BIOFILMS OF <i>PSEUDOMONAS</i> <i>AERUGINOSA</i> STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF CYCLIC DIGUANOSINE MONOPHOSPHATE	33
--	----

A.G. Merlich, I.D. Zhunko, N.V. Limanska, V.O. Ivanytsia ANTAGONISTIC ACTIVITY OF METABOLIC PRODUCTS OF BACTERIA <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> AND <i>ENTEROCOCCUS ITALICUS</i> WITH JOINT ACTION AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA	45
---	----

O.M. Voloshchuk, Yu.V. Korotkiy, O.A. Smertenko, S.L. Rybalko, Yu.I. Porva, V.P. Shyrobokov ANTIVIRAL ACTION OF AMINOPROPANOL-2 DERIVATIVES ON THE EXPERIMENTAL MODELS OF HEPATITIS C VIRUS	55
--	----

O.G. Gorshkova, T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva, I.P. Konup ISOLATION OF CU (II) FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY IMMOBILIZED BACTERIAL CELLS OF THE GENUS <i>PSEUDOMONAS</i>	66
--	----

L.O. Maksimenko, O.I. Balko, O.B. Balko <i>PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM</i> SUBSP. <i>CAROTOVORUM</i> LOW-MOLECULAR-WEIGHT CAROTOVORICINS	75
--	----

I.P. Konup, T.V. Gudzenko, L.O. Konup, O.V. Voliuvach DETECTION OF BIOSURFACTANTS ON THE SURFACE OF NANOPOROUS SILICON	84
---	----

INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	93
------------------------------------	----

И.А. Блайда, Т.В. Васильева

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел. (048) 746 61 02
e-mail: iblayda@ukr.inet

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ДЕСУЛЬФУРИЗАЦИЯ УГЛЕЙ

*В обзоре приведены литературные данные о содержании различных форм серы в углях, ее влиянии на качественные характеристики углей. Указаны технологические и экологические проблемы, возникающие в результате сжигания высокосернистых углей. Рассмотрены вопросы обогащения углей и представлен обзор современных методов их обессеривания. Особое внимание уделено биотехнологическим методам с использованием микроорганизмов различных таксономических групп. Приведены данные о снижении содержания в углях серы, в основном пиритной, представителями мезофильных и умеренно термофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий. Дан сравнительный анализ способности гетеротрофных бактерий родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium* и др. разрушать серосодержащий гетероатом, входящий в структурную матрицу угля. Приведены данные о роли гетеротрофных бактерий в окислении органической серы.*

Ключевые слова: уголь, пиритная сера, органическая сера, десульфуризация, ацидофильные хемолитотрофные бактерии, гетеротрофные бактерии.

Угольная промышленность, обеспечивающая добычу и первичную переработку каменного и бурого углей, является одной из основных отраслей энергетической промышленности Украины. В недрах Украины сосредоточено около 300 млрд. т угля, которого, по прогнозам экспертов, должно хватить на 250–300 лет [12]. Это позволяет рассматривать современную угольную энергетику как приоритетную, а уголь – как основной энергетический ресурс Украины.

Наиболее важной характеристикой угля, влияющей на его качество, тепловые характеристики и, соответственно, стоимость, является содержание в нем серы. В силу геохимических особенностей образования угольных месторождений сера общая ($S_{\text{общ}}$) в углях присутствует в виде неорганической или пиритной ($S_{\text{пир.}}$), органической ($S_{\text{орг.}}$), сульфатной ($S_{\text{сул.}}$) и элементарной (S_0). На долю элементарной серы, которая распределяется в виде тонкодисперсных вкраплений в пласты угля, приходится около 0,15%. Пиритная (колчеданная) сера в основном входит в состав пирита и представлена в виде FeS_2 ; сульфатная представлена в общем виде как $-\text{O}-\text{SO}_3$; органическая сера ковалентно связана с углеродом в виде $-\text{C}-\text{S}-\text{S}-\text{C}-$ и $-\text{C}-\text{S}-\text{C}-$, в частности, в гетероциклических соединениях, и равномерно распределена по всему пласту.

© И.А. Блайда, Т.В. Васильева



Содержание сульфатов в угле очень незначительно (до 0,1%), является результатом окисления пирита и имеет второстепенное значение. На долю органической серы приходится до 50,0%, на долю пиритной – до 60,0% от общего количества серы в угле в зависимости от месторождения [7, 3].

В процессе сжигания угля на ТЭС большая часть серы превращается в оксиды, которые попадают в атмосферу и оказывают крайне негативное влияние на экологическую обстановку и здоровье человека. Кроме того, повышенное содержание серы в угле снижает его тепловые характеристики и, соответственно, стоимость, поскольку при использовании значительно увеличиваются расходы топлива, а при коксовании – ухудшается качество кокса и увеличивается потребность в нем при выплавке чугуна. Поэтому удаление как можно большего количества серы из угля на стадии его обогащения, при этом в первую очередь наиболее доступной пиритной и только потом – более трудно доступной органической серы, – важная задача.

Добываемый уголь в большинстве случаев не отвечает требованиям потребителей по основным качественным показателям: содержанию серы, зольности, влажности, теплотворной способности и спекающим свойствам. Улучшение качества угольного сырья до высококачественных коксующихся и энергетических углей, востребованных на рынке, достигается путем обогащения различными методами: гравитационным, магнитной сепарацией, электрическим разделением, флотацией, масляной агломерацией, обработкой химическими реагентами и растворителями [2, 3, 6-9]. С развитием биотехнологий все большее внимание уделяется экологически безопасным и ресурсосберегающим микробиологическим методам обессеривания угля бактериями и грибами – биодесульфурзации [5, 25, 30, 31, 44]. При этом помимо снижения содержания серы из углей возможно извлекать ценные и токсичные металлы, что делает разработку и внедрение микробных методов обессеривания углей актуальной и перспективной.

Удаление пиритной серы

Пиритная сера ($S_{\text{пир.}}$) химически не связана с угольной матрицей и может быть удалена обычными методами – гравитационным разделением, флотацией, магнитной сепарацией. Наиболее эффективным абиотическим методом обогащения углей является флотация, эффективность которой можно повысить за счет использования реагентов-модификаторов (щелочных металлов, неорганических серосодержащих солей, отходов нефтехимии и полупродуктов нефтепереработки). По самым оптимистичным прогнозам флотация может обеспечить удаление до 90,0 % всей пиритной серы, что в пересчете на общую серу соответствует показателю до 65,0 % [2, 6, 10].

Что касается биодесульфурзации, имеющиеся данные литературы свидетельствуют о способности широкого спектра микроорганизмов различных таксономических групп снижать содержание серы в углях в результате своей жизнедеятельности. Доминируют в процессах удаления неорганической серы мезофильные и умеренно термофильные ацидофильные хемолитотрофные бактерии (АХБ) и археи [5, 25, 33], в частности, мезофильные представители рода *Acidithiobacillus* – *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*,



которые нашли широкое применение при выщелачивании металлов из природных сульфидных руд с высоким содержанием ценных компонентов [1, 5, 43].

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что для обессеривания в основном используются чистые культуры *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans* – типовые и коллекционные, а также изолированные из специфических источников – различных образцов углей, дренажных кислых шахтных вод. Основными общими технологическими параметрами процесса микробной десульфуризации с участием АХБ являются плотность пульпы, состав раствора для обессеривания, значения рН и температур, перемешивание. В большинстве разработок эти параметры отличаются незначительно. Так, плотность пульпы варьирует от 2,0 до 10,0% (мас.), диапазон рН=1,5–2,5, температур 28,0–35,0 °С, процесс обычно проводят при перемешивании пульпы со скоростью 150,0–180,0 об./мин. В качестве раствора для бактериального обессеривания используют минеральный фон стандартной среды Сильвермана-Лундгрена 9К, иногда с добавлением в качестве источника энергии соединений двухвалентного железа и серы. Следует отметить, что эффективность процесса биодесульфуризации значительно зависит от содержания различных форм и количества серы и общего железа в исходных углях, которые отличаются не только по регионам добычи, но и в частицах разного размера одного образца угля.

В таблице 1 приведены данные по обессериванию углей Китая, Южной Кореи и Индонезии мезофильными штаммами *Acidithiobacillus ferrooxidans*, выделенными из различных экологических ниш.

Таблица 1

**Результаты по обессериванию углей мезофильными штаммами
*Acidithiobacillus ferrooxidans***

Table 1

**Results on desulfurization of coals by mesophilic strains
*Acidithiobacillus ferrooxidans***

Месторождение угля	Содержание серы, %				Степень обессеривания, %		Ссылка
	исходное		после обработки		по S _{общ.}	по S _{пр.}	
	S _{общ.}	S _{пр.}	S _{общ.}	S _{пр.}			
Китай, рудник Чунцине	2,49	1,46	1,23	0,44	49,39	30,14	[21]
Китай, область Нейменджу, лигнит	0,23	0,20	0,013	-	94,00	-	[47]
Китай, провинция Гуйчжоу	3,20	2,80	0,80	0,38	75,00	86,60	[18]
Южная Корея, область Хвасун, антрацит	0,26	0,20	-	0,012	-	94,00	[47]
Индонезия, о. Суматра, лигнит	0,45	0,23	-	0,005	-	97,70	[47]



В исследованиях применяли лабораторный штамм *Acidithiobacillus ferrooxidans* [21], штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus ferrooxidans* YU2, изолированные из кислых дренажных вод рудника Чунцине (юго-запад Китая) и шахты Далсунг (Южная Корея) [18, 47]. В качестве раствора для микробной десульфуризации авторы использовали минеральный фон среды 9К [18, 21, 47]; в качестве источников энергии – $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 44,6 г/дм³ или 25,0 г/дм³ элементарной серы [21]; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 9,0 г/дм³ или 25,0 г/дм³ элементарной серы [18]; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 44,2 г/дм³ или элементарной серы – 10,0 г/дм³ или 128,0 г/дм³ пирита [47]. Максимальное удаление общей и пиритной серы из представленных углей, независимо от его качества (антрацит или лигнит), было достигнуто при добавлении к минеральной среде 9К в качестве единственного источника энергии – соединения двухвалентного железа $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Эффективность десульфуризации при добавлении к минеральному фону среды 9К элементарной серы в качестве источника энергии не превышала 27,0% для антрацита и 48,0% для лигнита [47]. Окисление пиритного железа, присутствующего в угле, происходило только при использовании минерального фона среды 9К без дополнительных источников энергии [47].

Для обессеривания углей юго-западной области Колумбии использовали мезофильные штаммы *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*, выделенные из кислых шахтных вод и предварительно адаптированные в течение шести месяцев. В исследованиях использовали два образца угля с различным содержанием серы: высокосернистый ($S_{\text{общ.}} - 5,53\%$, $S_{\text{пир.}} - 3,41\%$) и низкосернистый (2,61% и 1,27% соответственно). В результате процесса биодесульфуризации достигнуто снижение $S_{\text{общ.}}$ на 35,0–50,0 % и $S_{\text{пир.}}$ на 85,0–96,0% в обоих образцах. При этом окисление пирита в низкосернистом и высокосернистом образцах происходило на 64,9–85,0% и 80,0–95,0% соответственно. Авторы отмечают, что количество органической серы в угле не зависело от содержания пиритной серы и общего железа [29].

В таблице 2 приведены результаты по обессериванию углей из шахт Польши с использованием аборигенного штамма *Acidithiobacillus sp.*, изолированного из исследуемых образцов углей [14], штамма *Thiobacillus ferrooxidans*, полученного из кислых шахтных вод [15] и коллекционного штамма *Thiobacillus ferrooxidans* из чешско-словацкой коллекции микроорганизмов в Брно [39].

Согласно данным, наиболее высокие концентрации общей и пиритной серы были в угле шахты «Сирза», все остальные угли отличались незначительно. Десульфуризацию проводили в сходных условиях, отличительной чертой было отсутствие источника энергии ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) в экспериментах по обессериванию углей рудников Янковице, Марсель, Сташич и шахты «Янина» [14, 39]. Другие авторы, напротив, проводили десульфуризацию в присутствии разных концентраций $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – от 3,0 до 15,0 г/дм³ [15]. При этом максимальное удаление общей (на 62,0%) и пиритной (на 41,0%) серы из угля шахты «Сирза» достигалось при использовании $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ с концентрацией 15,0 г/дм³. В течение 28 дней из углей рудников Янковице, Марсель, Сташич и шахты «Янина» было удалено от 46,21 до 71,79% общей серы и



51,15–81,82% пиритной серы (табл. 2). Несмотря на достаточно эффективное удаление органической серы (45,45–64,52%), авторы считают более результативным для общего обессеривания использование других ацидофильных бактерий, например *Sulfolobulus acidocaldarius* [39].

Таблица 2

Результаты по обессериванию углей из шахт Польши

Table 2

Results on desulfurization of Polish coals

Содержание серы*, %	Места отбора проб углей				
	рудник Янковиче [39]	рудник Марсель [39]	рудник Сташич [39]	шахта «Янина»[14]	шахта «Сирза» [15]
S _{общ.}	1,71/0,51	1,56/0,44	1,45/0,78	2,17/0,8	6,8/2,6
S _{пир.}	0,52/0,16	0,52/0,21	0,33/0,06	0,79/-	4,3/2,6
S _{орг.}	0,33/0,18	0,49/0,20	0,62/0,22	1,38/-	2,0/-
S _{суд.}	0,86/0,17	0,55/0,39	0,50/0,50	-	-

* Примечание: содержание серы исходное/после обработки

* Note: initial sulfur amount/after treatment

Помимо углей из польских шахт была проведена обработка углей шахт «Дарков» и «Дукла» (Республика Чехия). Актуальность этой проблемы в Чехии связана с тем, что основной источник энергии в этой стране – твердое топливо. Для обессеривания была использована коллекционная культура *Thiobacillus ferrooxidans* из чешско-словацкой коллекции микроорганизмов в Брно. Содержание общей и пиритной серы в исследуемых образцах отличались незначительно и составляли 1,12 и 0,55%; 1,45 и 0,48% в углях шахт «Дарков» и «Дукла», соответственно. Процесс десульфуризации проводили с применением среды 9К без железа. В результате проведенных исследований снижение общей и пиритной серы соответственно составляло 57,14 и 74,55% (шахта «Дарков»), 77,08% и 37,93% (шахта «Дукла») [39].

Кроме углей из шахт Польши провели десульфуризацию углей из северо-восточных бассейнов Ассам, Тинсукин (Турция) и углей месторождений Раджастан (Индия) с использованием аборигенных штаммов *Acidithiobacillus* sp., изолированных из микробиоты исследуемых образцов. При этом особое внимание было уделено распределению различных форм серы в зависимости от размера частиц угля (таблица 3) [14].

Как следует из данных, большая часть серы в образцах углей этих месторождений является органической. Распределение серы по фракциям углей носит случайный характер и не имеет какой-либо закономерности. Однако максимальное удаление серы за счет окисления пирита происходило из наиболее мелкой фракции с частицами размером 45,0 мкм и достигало для углей Индии 91,87 и 99,8% соответственно по сере и пириту. Из углей Турции эти показатели были низкими (9,44 и 18,8% соответственно), что, по мнению авторов, связано с образованием ярозитов в процессе микробиологической обработки.



Таблица 3

Содержание серы и железа в частицах различного размера углей месторождений Турции и Индии [14]

Table 3

The amount of sulfur and iron in the particles of different sizes of coal from Turkey and India [14]

Содержание серы и железа, %	Размер частиц угля, мкм							
	180,0		112,5		60,0		45,0	
	Турция	Индия	Турция	Индия	Турция	Индия	Турция	Индия
S _{общ.}	5,50	2,42	6,12	2,04	5,21	2,15	3,92	2,17
S _{пир.}	1,46	0,47	1,29	0,56	1,36	0,77	1,96	0,79
S _{орг.}	4,04	1,95	4,83	1,48	3,85	1,38	1,96	1,38
Fe _{общ.}	1,28	0,22	1,13	0,26	1,19	0,36	0,91	0,37

Об использовании в процессах обессеривания углей других представителей АХБ, кроме *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*, известно мало. Так, авторы работы [40] сообщают о применении для этих целей представителя рода *Acidithiobacillus* – штамма *Acidithiobacillus ferrivorans*, имеющего наряду с общими для типичных представителей *Acidithiobacillus* свойствами отличительную способность – расти на триптоне и соевом бульоне. Выделенный из кислых дренажных вод месторождения Балыкесир (Турция), штамм, идентифицированный в результате молекулярно-генетического анализа с использованием 16S rRNA как *Acidithiobacillus ferrivorans*, оказался способным окислять серу и железо [26]. Этот штамм был использован для обессеривания турецкого угля с содержанием S_{общ.} – 3,42%; S_{пир.} – 2,37%; S_{сул.} – 0,33%; S_{орг.} – 0,72%. Оптимальные параметры процесса не отличались от условий с использованием *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Acidithiobacillus thiooxidans*. В результате содержание общей серы в угле снизилось до 2,29% в основном за счет удаления пиритной серы (до 1,42%) и в меньшей степени органической серы (до 0,65%) с суммарной эффективностью обессеривания 33,0%. Авторы отмечают, что полученные результаты являются первыми по применению *Acidithiobacillus ferrivorans* и выражают надежду, что этот штамм может быть использован для десульфуризации в более крупных масштабах [40].

Таким образом, анализ имеющейся литературы показал, что в большинстве работ приводятся данные об использовании для десульфуризации углей чистых культур АХБ. О применении для этой цели смешанных культур, ассоциаций и консорциумов собственной микробиоты угольных субстратов данных практически нет, хотя они широко используются и хорошо зарекомендовали себя для биовыщелачивания металлов из сульфидных руд и техногенных отходов [1, 5, 33].

Из аборигенного консорциума угля марки ГЖ Воргашорского месторождения (Печерский район, Россия) был выделен мезофильный хемолитотрофный ацидофильный анаэробно-аэробный консорциум микроорганизмов [11]. После длительной адаптации консорциум использовали для

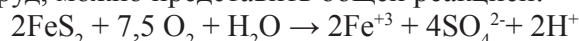


десульфуризации угля с содержанием $S_{\text{общ.}} - 1,0\%$, $Fe_{\text{общ.}} - 14,7\%$, зольностью – $21,1\%$. В обработанном угле зольность снижалась на $22,0-28,0\%$, $S_{\text{общ.}}$ на $22,0-50,0\%$, $Fe_{\text{общ.}}$ на $38,0\%$. Авторы обращают внимание на попутное удаление в процессе микробиологической обработки угля токсичных металлов (стронция, никеля, свинца, хрома, бериллия) на $20,0\%$, а также извлечение ценных металлов и токсичных элементов (марганца, цинка, молибдена, меди, кобальта, индия, галлия, сурьмы, бария) – до $90,0\%$. Полученные результаты подтверждают возможность использования аборигенного консорциума микроорганизмов после адаптации к субстрату для комплексного решения вопросов повышения качества угля и извлечения из него ценных металлов.

Авторы других исследований [28, 44] выделили смешанную культуру умеренно термофильных бактерий из кислых дренажных вод Южной Кореи и использовали ее для обессеривания Иллинойского угля (США). В выделенном консорциуме, согласно данным анализа 16S rRNA, доминировали *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и *Acidithiobacillus caldus*. Для обессеривания отбирали частицы угля с размером ≤ 100 мкм, $100-200$ мкм и ≥ 200 мкм с содержанием соответственно $S_{\text{общ.}} - 5,55$; $6,34$ и $5,25\%$. Процесс проводили в биореакторах с использованием минерального фона стандартной среды 9К без железа. Максимального обессеривания в $75,6\%$ достигали для частиц угля размером $100-200$ мкм. Для частиц угля размерами ≤ 100 мкм и ≥ 200 мкм показатели были несколько меньше и составляли $66,5\%$ и $59,0\%$ соответственно.

Таким образом, приведенные литературные данные свидетельствуют о том, что обессеривание угля по общей сере может быть достаточно эффективно достигнуто за счет удаления серы пиритной при использовании чистых или смешанных культур мезофильных и умеренно термофильных бактерий – *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Наилучшие результаты достигаются при добавлении в среду 9К двухвалентного железа.

Механизм удаления серы, так же как извлечение металлов из сульфидных руд, можно представить общей реакцией:



Процесс сопровождается образованием кислоты, что обеспечивает поддержание низких значений pH, благоприятных для жизнедеятельности и окислительной активности АХБ [5, 25, 39].

Удаление органической серы

Как следует из вышеприведенной реакции, механизм удаления серы, характерный для АХБ, не позволяет этой группе бактерий эффективно удалять серу органическую, входящую в структурную матрицу угля и связанную с углеродом. Хотя имеются отдельные сведения о снижении с помощью *Thiobacillus ferrooxidans* органической серы в польских углях на $45,45\%$ – $64,52\%$ [39].

Органическая сера находится в пластах угля в виде серосодержащих соединений, в том числе гетероциклических – тиола, тиофена, дибензотиофена [33, 36]. Удаление органической серы из углей возможно только в результате разрыва ковалентных связей -C-S-S-C- и -C-S-C-, устойчивых к действию



АХБ, но, можливо, способних розрушитися под действием гетеротрофних мікроорганізмів, для яких характерно вплив на органічні субстрати. Відомо розщеплення зв'язі С-S тільки обмеженим числом прокариот: *Sulfolobus acidocaldarius*, *Brevibacterium sp.*, деякими штаммами роду *Pseudomonas*, в тому числі мутантним штаммом *Pseudomonas sp.* СВ1 [32, 33, 46].

Дослідження по видаленню органічної сери з природних субстратів – нафти і вугілей проведені на прикладі модельного зв'язу дибензотіофена (ДБТ). В ряду робіт показана здатність чистої культури *Brevibacterium DO* використовувати ДБТ як єдиний джерело вуглецю, сери і енергії [25, 46]. Розрушення ДБТ *Brevibacterium sp.* відбувається в результаті окислювальних реакцій, каталізуємих мікробними сульфоксидазами, в результаті чого утворюються ДБТ-5-оксид, ДБТ-5-діоксид і ДБТ-сульфон. Цей процес супроводжується звільненням стехіометричного кількості сульфату, який окислюється до сульфату; в результаті цих реакцій утворюється бензоат. Авторів цих досліджень вважають, що метаболічний шлях окислення ДБТ *Brevibacterium sp.*, який призводить до його розрушення, може бути загальним для окислення гетероциклічних серосодержачих зв'язу в природних вугілях [25, 46]. Шляхи окислення дибензотіофена різними мікроорганізмами відрізняються. Так, наприклад, *Pseudomonas alkaligenes*, *Pseudomonas stutzeri* і *Pseudomonas putida* окислюють тільки периферичне ароматичне кільце дибензотіофена, утворюючи водорозчинні продукти. *Pseudomonas abiconensis*, *Pseudomonas jianii*, *Rizobium sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas putida*, окислюють серосодержачий гетероатом без його абстрагування від вуглецю. При цьому відомо про втрату активності штамму *Pseudomonas* і здатності до розрушення ДБТ [38, 41].

Вивчена здатність двох штаммів, ідентифікованих як *Nocardia globerula* UM9 і *Rhodococcus globerulus* UM3, використовувати ДБТ або ДБТ-сульфон як єдиний джерело сери [35, 42]. Було встановлено, що обидва штамми призводили до зниження концентрації ДБТ-сульфону, але продукти кільцевого розщеплення виявлені не були.

Авторів роботи [22] встановили, що *Sulfolobus acidocaldarius* може рости і обесеривати ДБТ в присутності в середі культивування триптона. Однак при заміні триптона на сахарозу росту і окислення ДБТ штаммом *Sulfolobus acidocaldarius* не спостерігалося. Крім того, автори відзначають токсичність ДБТ для бактерій в концентрації більше 500,0 мг/дм³.

Встановлено, що розрив С-S зв'язу під впливом гетеротрофних мікроорганізмів може проходити не тільки в аеробних, але і в анаеробних умовах [4]. Зв'яз С-S в тіофеновому кільці більш лабільний порівняно з С-С зв'язом. Приєднання атома кисню до атома сери робить зв'яз С-S ще менш міцним і доступним для анаеробних мікроорганізмів. Типичною сульфатовідновлювальною бактерією *Desulfovibrio desulfuricans* М6 з високою дегідрогеназною активністю в анаеробних умовах показала високу ступінь десульфурізації бензотіофена і дибензотіофена. В електрохімічній камері *Desulfovibrio desulfuricans* М6 знижував вміст сери в кувейтській нафті на 21,0%, на основі чого автори припускають, що цей штамм



имеет специализированные ферменты, способные расщеплять связь C-S [45].

В литературе описаны также неудачные попытки десульфуризации ДБТ при использовании различных штаммов сульфатредуцирующих бактерий. Так, деградации ДБТ *Desulfotomaculum orientis*, *Desulfovibrio desulfuricans* и *Thermodesulfobacterium commune* при культивировании на лактате и цитрате не наблюдалось [27].

Логично предположить, что бактерии, способные окислять дибензотиофен, могут приводить к снижению содержания труднодоступной органической серы в углях. При этом общими необходимыми параметрами десульфуризации углей гетеротрофными бактериями должны быть перемешивание и аэрация; значения pH 6,8–7,2 и температуры 28,0–35,0 °C, состав раствора для обессеривания выбирается в зависимости от используемой группы бактерий.

Так, различные штаммы рода *Pseudomonas*, выделенные из угля, нефти, дренажных вод, оказались способными удалять из углей 20,0–47,0% органической серы уже через 6–12 часов [13, 20]. Способность к десульфуризации углей выявлена у *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa*. Из лигнитов Техаса штамм *Pseudomonas putida* удалял 75,0% пиритной серы и 37,4% органической за 5–7 дней. Штамм *Pseudomonas aeruginosa* был менее эффективен и снижал на 26,0–32,5% содержание только пиритной серы [17].

О снижении количества исключительно пиритной серы гетеротрофными бактериями *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* сообщают авторы работы [19]. Штаммы *Bacillus subtilis* и *Paenibacillus polymyxa* были изолированы из дренажных вод рудника Эль-Магхара (Египет) и использовались для обессеривания углей с исходным содержанием общей серы 3,3% до конечных показателей 0,92% и 1,12% соответственно. Авторы связывают большую эффективность десульфуризации штаммом *Bacillus subtilis* из-за его более высокого сродства к поверхности угля.

В работе [31] приведены данные о способности штамма *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 использовать серосодержащие соединения – тиосульфат, сульфат, сульфид, ДБТ, а также уголь в качестве единственного источника энергии для роста и жизнедеятельности. Приведены данные об удалении этим штаммом до 91,0% органической серы из угля. Механизм процесса авторам не известен, они предполагают, что удаление такого количества органической серы может отрицательно сказаться на топливной ценности угля.

Имеются неоднозначные публикации об участии *Sulfolobus acidocaldarius* в снижении содержания серы и окислении пирита в углях. С одной стороны авторы работы [22] утверждают, что *Sulfolobus acidocaldarius* способен снижать содержание органической серы в углях до 44,0% и десульфировать ДБТ. С другой стороны этим же авторам не удалось воспроизвести ранее полученные результаты [23]. Авторами работы [37] также не выявлено действие *Sulfolobus acidocaldarius* и *Sulfolobus solforubicus* на удаление пиритной и органической серы из углей, а установленное окисление пирита в углях на 80,0–83,0% рассматривается как результат воздействия высоких температур (70,0 °C) и низких значений pH. Авторы работы [32] установили способность одного и того же штамма *Sulfolobus brierleyi* окислять преимущественно либо органическую, либо неорганическую серу из углей различного



происхождения, но примерно одинакового состава. При этом авторы не могут объяснить, с чем связана способность штамма *Sulfolobus brierleyi* переходить с одного типа метаболизма на другой.

Описана смешанная культура гетеротрофных термофильных бактерий, изолированная из термальных вод Йеллоустонского парка и способная снижать содержание серы в углях северной Дакоты. Ассоциация и выделенные из нее изоляты за 14–42 дня снижали содержание органической и неорганической серы на 33,0% и до 90,0% соответственно при различных плотностях пульпы. Причем, пиритная и сульфатная сера окислялись бактериями за 14 дней, а органическая – за 30, что свидетельствует об ее устойчивости вообще и к бактериальному окислению, в частности [34].

Приведенный анализ имеющихся литературных данных свидетельствует о незначительном успехе в направлении удаления органической серы из углей гетеротрофными бактериями. Это в первую очередь связано с нестабильностью их свойств, невозможностью воспроизвести результаты в последующих экспериментах, а также способностью ряда гетеротрофных бактерий переходить с одного типа метаболизма на другой. В ряде случаев снижение содержания органической серы может быть следствием абиотических процессов окисления при высоких температурах и низких значениях pH. Кроме того, на удаление органической серы гетеротрофными бактериями может оказывать влияние и ряд других факторов, в частности, присутствие тяжелых металлов и сульфатов, ингибирующих процесс. По мнению ряда авторов, одним из основных препятствий развития бактериального удаления органической серы является отсутствие методов прямого контроля этого показателя в угле [16, 24, 34].

В Одесском национальном университете имени И.И. Мечникова на базе Биотехнологического научно-учебного центра проводятся работы по обессериванию украинских углей шахт Львовско-Волинского угольного бассейна с попутным извлечением ценных металлов, в частности, германия. Так, из исходного угля с содержанием пиритной и органической серы 2,42% и 0,97% соответственно консорциумом собственной микробиоты путем ряда последовательных операций за счет активизации деятельности сообществ ацидофильных хемолитотрофных и гетеротрофных бактерий снижается содержание пиритной и органической серы в угле на 95,0% и 30,0% соответственно. Это сопровождается выщелачиванием германия из угля на 78,0%. Проводимые исследования направлены на комплексное решение ресурсоэкологической проблемы топливно-энергетического комплекса Украины, которая связана с добычей высокосернистых низкокалорийных ископаемых углей и, как следствие, нагрузкой на окружающую среду, а также необходимостью вывода на отечественный рынок важного стратегического металла – германия.



І.А. Блайда, Т.В. Васильєва

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38(048) 746 51 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

БАКТЕРІАЛЬНА ДЕСУЛЬФУРИЗАЦІЯ ВУГІЛЛЯ

Реферат

*В огляді наведено літературні дані про вміст різних форм сірки у вугіллі, її вплив на якісні характеристики вугілля. Вказані технологічні та екологічні проблеми, що виникають в результаті спалювання високосірчастого вугілля. Розглянуто питання збагачення вугілля і представлено огляд сучасних методів його знесірчення. Особливу увагу приділено біотехнологічним методам з використанням мікроорганізмів різних таксономічних груп. Наведено дані про зниження вмісту сірки у вугіллі, в основному піритної, представниками мезофільних і помірно термофільних ацидофільних хемолітотрофних бактерій. Дано порівняльний аналіз спроможності бактерій родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium* і ін. руйнувати сірковмісний гетероатом, що входить до структурної матриці вугілля. Наведено дані про роль гетеротрофних бактерій в окисненні органічної сірки.*

Ключові слова: вугілля, піритна сірка, органічна сірка, десульфуризація, ацидофільні хемолітотрофні бактерії, гетеротрофні бактерії.

I.A. Blayda, T.V. Vasyleva

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (048) 746 51 02, e-mail: iblayda@ukr.net

BACTERIAL DESULPHURIZATION OF COALS

Summary

*The review contains literature data about the amount of various forms of sulfur in coals and its impact on the qualitative characteristics of coal. The technological and environmental problems resulting from the combustion of high-sulfur coals are shown. The problems of coal enrichment are considered and an overview of modern methods for their desulfurization are presented. Particular attention is paid to the biotechnological methods with using microorganisms of various taxonomic groups. Data about the reduction of sulphur content in the coals, mainly pyrite, under the action by representatives of mesophilic and moderately thermophilic acidophilic chemolithotrophic bacteria are given. A comparative analysis of the ability of the bacteria of the genera *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium* and others to destroy the sulfur-containing heteroatom included in the structural matrix of coal are else given. The data on the role of heterotrophic bacteria in the oxidation of organic sulfur are shown.*

Key words: coal, pyrite sulfur, organic sulfur, desulfurization, acidophilic chemolithotrophic bacteria, heterotrophic bacteria.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Блайда І. А., Васильєва Т.В., Баранов В.И., Семенов К.И., Слюсаренко Л.И., Барба И.Н.* Свойства новых штаммов хемолитотрофных бактерий, выделенных из техногенных субстратов / Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – Vol.8 (6). – P. 56–62. doi: 10.15407/biotech8.06.056.
2. *Гришин И.А., Князбаев Ж.С.* Основные направления совершенствования реагентных режимов флотации углей // *Науки о Земле. Успехи современного естествознания*. – 2015, № 12. – С. 87–90.
3. *Долгий В. Я., Кривченко А. А., Шамало М.Д.* Содержание общей серы в угольных пластах на шахтах Украины // *Уголь Украины*. – 2000. – № 1. – С. 10–12.
4. *Захарянц А.А., Мурыгина В.П., Калюжный С.В.* Биодесульфуризация дибензотиофена и его производных // *Успехи современной биологии*. – 2005. – Т. 125, № 1. – С. 104–114.
5. *Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф.* Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // *Микробиология*. – 2006, № 5. – С. 593–629.
6. *Мин Р. С., Бессараб Н. А., Басарыгин В. И., Иванов Г. В.* Флотационная активность нефтяных реагентов для обогащения угольных шламов // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 2001, № 4. – С. 575–580.
7. *Миронов К.В.* Справочник геолога-угольщика /под ред. К.В. Миронов. – М.: Недра, 1991. – 363 с.
8. *Младецкий И.К., Дацун С.Н.* Магнитная десульфурация углей // *Збагачення корисних копалин*. – 2012. – Вип. 50(91). – С. 41–47.
9. *Назимко Е.И.* Исследования по проблеме удаления серы, содержащейся в углях // *Вісті Донецького гірничного інституту*. – 2014, № 2. – С. 60–65.
10. *Чупрова Л.В., Муллина Э.Р., Мишурина О.А.* Влияние неорганических и органических соединений на флотацию углей низкой стадии метаморфизма // *Современные проблемы науки и образования*. – 2013, № 4. – С. 24. URL: <http://www.science-education.ru/110-9663>.
11. *Шумков С.И., Терехова С.Е.* Влияние биообработки на содержание элементов в углях печорского бассейна // *Горный информационно-аналитический бюллетень. Семинар № 24*. – 2007, № 3. – С. 393–397.
12. *Энергетика*. История, настоящее, будущее. Книга 1. Раздел 7. Уголь. Электронный ресурс: <http://energetika.ua/ru/books/book-1>
13. *Abdul Sattar Jatoi, Shaheen Aziz, Suhail Ahmed Soomrob.* Biological Removal of Sulfur from Coal through Use of Microorganism. A Review // *4th International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development*. – 2016. [http://eesd.muett.edu.pk/proceedings\(EESD_2016_320\)](http://eesd.muett.edu.pk/proceedings(EESD_2016_320))
14. *Acharya C., Kar R.N., Sukla L.B.* Microbial desulfurization of different coals // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 118(1-3). – P. 47-63.
15. *Anna Juszczak, Florian Domka, Miectyslaw Kotlowski, Helena Wachowska.* Microbial desulfurization of coal with *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria // *Fuel*. – 1995. – Vol. 74, № 5. – P. 725–728.



16. *Bos, P., Kuenen J.G.* Microbial treatment of coal. In: *Microbial Mineral Recovery*, (H. Ehrlich and C. Brierley, Eds.), McGraw, New York, NY. – 1990. – P. 425–428.
17. *Charanjit Rai, Jon P. Reyniers.* Microbial Desulfurization of Coals by Organisms of the Genus *Pseudomonas* // *Biotechnology Progress*. – 1988. – Vol. 4, №. 4. – P. 225–230.
18. *Dong-Jin Kim, Chandra Sekhar Gahan, Chandrika Akilan, Seo-Yun Choi, Byoung-Gon Kim.* Microbial desulfurization of three different coals from Indonesia, China and Korea in varying growth medium // *Korean J. Chem. Eng.* – 2013. – Vol. 30(3). – P. 680-687. DOI: 10.1007/s11814-012-0168-z.
19. *El-Midany A., Abdel-Khalek M.A.* Reducing sulfur and ash from coal using *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa* // *Fuel*. -2014. – Vol. 115. – P. 589–595.
20. *El-Midany A.A., Abdel-Khalek M.A.* Influence of bacteria–coal electrostatic interaction on coal cleaning // *International Journal of Mineral Processing*. – 2014. – Vol. 126. – P. 30–34.
21. *Fen-Fen Hong, Huan He, Jin-Yan Liu, Xiu-Xiang Tao, Lei Zheng, Yi-Dong Zhao.* Comparison Analysis of Coal Biodesulfurization and Coal's Pyrite Bioleaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans* // *The Scientific World Journal*. – 2013 –P. 111–120.
22. *Fikret Kargi, James M. Robinson.* Microbial Oxidation of Dibenzothiophene by the Thermophilic Organism *Sulfolobus acidocaldarius* // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1984. – Vol. XXVI. – P. 687–690.
23. *Fikret Kargi, James M. Robinson.* Biological removal of pyritic sulfur from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius* // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1985. – Vol. 27(1). – P. 41–49.
24. *Friedman, S.* Sulfur analysis of coal – A critical evaluation. In: *Proc. 1st Int. Symp. Biol. Process Coal*, EPRI, GS-6970. – 1990. – P. 1.1–1.
25. *Giovanni Rossi.* The Microbial Desulfurization of Coal // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 142. – P. 147–67. doi: 10.1007/10_2013_178.
26. *Hallberg K.B., Gonzalez-Toril E, Johnson D.B.* *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments // *Extremophiles*. – 2010. – Vol. 14(1). – P. 9-19. doi: 10.1007/s00792-009-0282-y.
27. *Hector M. Lizama, LaDonna A. Wilkins, and Timothy C. Scott.* Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria // *Biotechnology Letters*. – 1995. – Vol. 17, N.1 – P. 113–116.
28. *Huan He, Fen-Fen Hong, Xiu-Xiang Tao, Lei Li, Chen-Yan Ma, Yi-Dong Zhao.* Biodesulfurization of coal with *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the interfacial interaction between cells and pyrite // *Fuel Processing Technology*. – 2012. – Vol. 101. – P. 73–77.
29. *Isabel Cristina Cardona, Marco Antonio Marquez.* Biodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms // *Fuel Processing Technology*. – 2009. – Vol. 90. – P. 1100–1106.



30. *Ivan P. Ivanov et al.* Influence of Aerobic bioprocessing on Composition and Sorption Properties of Berezovsky Brown Coal // Journal of Siberian Federal University. Chemistry 1. – 2016, № 9. – P. 49–59. <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/20286?show=yes>

31. *John J. Kilbane, Kathleen Jackowski.* Biodesulfurization of Water-Soluble Coal-Derived Material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 // Biotechnology and Bioengineering – 1992. – Vol. 40. – P. 1107–1114.

32. *John J. Kilbane.* Desulfurization of coal: the microbial solution // Elsevier Science Publishers Ltd (UK). – 1989. – Vol. 7. – P. 97–101.

33. *Karavaiko GI, Lobyreva LB.* An overview of the bacteria and archaea involved in removal of inorganic and organic sulfur compounds from coal // Fuel Process Technol. – 1994. – Vol. 40. – P. 167–182.

34. *Kenneth Runnion, Joan D. Combie.* Organic sulfur removal from coal by microorganisms from extreme environments // FEMS Microbiology Reviews. – 1993. – Vol. 11. – P. 139–144.

35. *Kodama K., Umehara K., Shimizu K., Nakatani S., Minoda Y., Yamada K.* Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway // Agric. Biol. Chem. – 1973. – Vol. 37. – P. 45–50.

36. *Levine D.G., Schlosberg R.H., Silbernagel B.G.* Understanding the chemistry and physics of coal structure (A Review) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – Vol. 79. – P. 3365–3370.

37. *Masako Tobita, Mayumi Yokozeki, Nobuyuki Nishikawa, Yasushi Kawakami.* Pyrite Oxidation by *Sulfolobus acidocaldarius* // Biosci. Biotech. Biochem. – 1994. – Vol. 58 (4). – P. 771–772.

38. *Monticello D.J., Bakker D., Finnerty W.R.* Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. – Vol. 49. – P. 756–760.

39. *Peter Fecko, Iva Pectova, Vladimir Cablik, Silvie Riedlova, Pavla Ovcari, Barbara Tora.* Bacterial desulphurization of coal // Gyrnietwoi Geoinynieria. – 2006. – Vol. 30, № 3/1. – P. 47–65.

40. *Pinar Aytar Catherine M. Kay, Mehmet Burzin Mutlu, Ahmet Zabuk.* Coal Desulfurization with *Acidithiobacillus ferrivorans* from Balya Acidic Mine Drainage // Energy Fuels. – 2013, № 27 (6). – P. 3090–3098.

41. *Rai C., Reyniers J.P.* Microbial desulfurization of coal by organisms of the genus *Pseudomonas* // Biotechnol. Progress. – 1988. – Vol. 4. – P. 225–230.

42. *Ralph F. Purdy, Joe E. Lepo, Bailey Ward.* Biodesulfurization of Organic-Sulfur Compounds // Current microbiology. – 1993. – Vol. 27. – P. 219–222.

43. *Rawlings D.E.* Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates // Microbial Cell Factories. – 2005. – Vol. 4, № 13. – P. 4–13.

44. *Sradhanjali Singh, Haragobinda Srichandan, Ashish Pathak, Chandra Sekhar Gahan, Sujeong Lee, Dong-Jin Kim, Byoung-Gon Kim.* Studies on the effect of coal particle size on biodepyritization of high sulfur coal in batch bioreactor // Polish Journal of Chemical Technology. – 2015. – Vol. 17, № 1. – P. 97–102.



45. *Tae Sung Kim, Hae Yeong Kim, Byung Hong Kim*. Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 US // *Biotechnology Letters*. – 1990. – Vol. 12. – P. 757–760.
46. *Van Afferden M, Schacht S, Klein J, Trper H.G.* Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium sp.* DO // *Arch. Microbiol.* – 1990. – Vol. 13(4). – P. 324–328.
47. *Xinping Yang, Shimei Wang, Yujiao Liu, Yuanyuan Zhang*. Identification and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* YY2 and its application in the biodesulfurization of coal // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2015, №. 61(1). – P. 65–71.

Reference

1. *Blayda IA, Vasileva TV, Baranov VI, Semenov KI, Slyusarenko LI, Barba IN*. Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates // *Biotechnologia Acta*. – 2015. – Vip. 8, № 6. – P. 56-62. doi: 10.15407/biotech8.06.056.
2. *Grishin I A, Knyazbaev ZH S*. The basic directions of perfection of reagent regimes of flotation of coals // *Nauki o Zemle. Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. – 2015, № 12. – P. 87-90.
3. *Dolgiy V Ya, Krivchenko A A, Shamalo MD*. The content of total sulfur in coal seams at mines in Ukraine // *Ugol Ukrainyi*. – 2000, № 1. – P. 10-12.
4. *Zaharyants A A, Muryigina V P, Kalyuzhnyi S V*. Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives // *Uspehi sovremennoy biologii*. – 2005. – V. 125, № 1. – P. 104-114.
5. *Karavayko GI, Dubinina GA, Kondrateva TF*. Lithotrophic microorganisms of oxidation cycles of sulfur and iron // *Mikrobiologiya*. – 2006, № 5. – P. 593-629.
6. *Min R S, Bessarab N A, Basaryigin V I, Ivanov G V*. Flotation activity of oil reagents for enrichment of coal slimes // *Himiya v interesah ustoychivogo razvitiya*. – 2001, № 4. – P. 575-580.
7. *Mironov K V*. Guide geologist-coal /pod red. K. V. Mironov. – M.: Nedra, 1991. – 363 p.
8. *Mladetskiy I K, Datsun S N*. Magnetic desulfurization of coals // *Zbagachennya korisnih kopalyn*. – 2012. – Vip. 50, № 91. – P. 41-47.
9. *Nazimko E I*. Studies on the problem of removing sulfur contained in coals // *Visti Donetskogo gornichnogo Institutu*. – 2014, № 2. – P. 60-65. Rezhim dostupu: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Vdgi_2014_1-2_12; <http://ru-ecology.info/page/00238103802099101180002000037932/>
10. *Chuprova L V, Mullina E R, Mishurina O A*. The influence of inorganic and organic compounds on the flotation of coals of the low stage of metamorphism // *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. – 2013, № 4. – P. 24. URL: <http://www.science-education.ru/110-9663>.
11. *Shumkov SI, Terehova SE*. The effect of bioprocessing on the content of elements in the coals of the Pechora basin // *Gorniy informatsionno-analiticheskiy byulleten. Seminar N. 24*. – 2007, № 3. – P. 393-397.
12. Power engineering. History, present, future. Kniga 1. Razdel 7. Ugol – elektronnyy resurs <http://energetika.ua/ru/books/book-1>



13. *Abdul Sattar Jatoi, Shaheen Aziz, Suhail Ahmed Soomrob.* Biological Removal of Sulfur from Coal through Use of Microorganism. A Review // 4th International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development. - 2016. <http://eesd.muett.edu.pk/proceedings> (EESD_2016_320)
14. *Acharya C, Kar R N, Sukla L B.* Microbial desulfurization of different coals // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2004. - Vol. 118(1-3). – P. 47-63.
15. *Anna Juszczak, Florian Domka, Miectyslaw Kotlowski, Helena Wachowska.* Microbial desulfurization of coal with *Thiobacillus ferrooxidans* bacteria // *Fuel.* – 1995. – Vol. 74, № 5. – P. 725-728.
16. *Bos, P, Kuenen, J G.* Microbial treatment of coal. In: *Microbial Mineral Recovery*, (H. Ehrlich and C. Brierley, Eds.), McGraw, New York, NY. - 1990.
17. *Charanjit Rai, Jon P Reyniers.* Microbial Desulfurization of Coals by Organisms of the Genus *Pseudomonas* // *Biotechnology Progress.* – 1988. – Vol. 4, №. 4. – P. 225-230.
18. *Dong-Jin Kim, Chandra Sekhar Gahan, Chandrika Akilan, Seo-Yun Choi, Byoung-Gon Kim.* Microbial desulfurization of three different coals from Indonesia, China and Korea in varying growth medium // *Korean J. Chem. Eng.* – 2013. – Vol. 30(3). – P. 680-687. DOI: 10.1007/s11814-012-0168-z.
19. *El-Midany A, Abdel-Khalek M A.* Reducing sulfur and ash from coal using *Bacillus subtilis* and *Paeni bacillus polymyxa* // *Fuel.* -2014. - Vol. 115. – P. 589–595.
20. *El-Midany AA, Abdel-Khalek MA.* Influence of bacteria–coal electrostatic interaction on coal cleaning // *International Journal of Mineral Processing.*- 2014. –Vol. 126. - P.30-34.
21. *Fen-Fen Hong, Huan He, Jin-Yan Liu, Xiu-Xiang Tao, Lei Zheng, Yi-Dong Zhao.* Comparison Analysis of Coal Biodesulfurization and Coal's Pyrite Bioleaching with *Acidithiobacillus ferrooxidans* // *The Scientific World Journal.*-2013. – P. 111–120.
22. *Fikret Kargi, James M. Robinson.* Microbial Oxidation of Dibenzothiophene by the Thermophilic Organism *Sulfolobus acidocaldarius* // *Biotechnology and Bioengineering.* – 1984. - Vol. XXVI. - P. 687-690.
23. *Fikret Kargi, James M. Robinson.* Biological removal of pyritic sulfur from coal by the thermophilic organism *Sulfolobus acidocaldarius* // *Biotechnology and Bioengineering.* – 1985. – Vol. 27(1). – P. 41-49.
24. *Friedman, S.* Sulfur analysis of coal - A critical evaluation. In: *Proc. 1st Int. Syrup. Biol. Process Coal*, EPRI, GS-6970. - 1990. – P. 1.1-1.
25. *Giovanni Rossi.* The Microbial Desulfurization of Coal // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2014. – Vol.142. - P. 147-67. doi: 10.1007/10_2013_178.
26. *Hallberg K B, Gonzalez-Toril E, Johnson D B.* *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments // *Extremophiles.* – 2010. –Vol. 14(1). - P. 9-19. doi: 10.1007/s00792-009-0282-y.
27. *Hector M Lizama, LaDonna A Wilkins, and Timothy C Scott.* Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria // *Biotechnology Letters.* – 1995. – Vol.17, No.1 – P. 113-116.



28. Huan He, Fen-Fen Hong, Xiu-Xiang Tao Lei Li, Chen-Yan Ma, Yi-Dong Zhao. Biodesulfurization of coal with *Acidithiobacillus caldus* and analysis of the interfacial interaction between cells and pyrite // Fuel Processing Technology.- 2012.- Vol. 101.- P. 73–77.
29. Isabel Cristina Cardona, Marco Antonio Marquez. Biodesulfurization of two Colombian coals with native microorganisms // Fuel Processing Technology. - 2009. - 90. - P.1100-1106.
30. Ivan P Ivanov et al. Influence of Aerobic bioprocessing on Composition and Sorption Properties of Berezovsky Brown Coal // Journal of Siberian Federal University. Chemistry 1. - 2016.- № 9. - P.49-59. <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/20286?show=yes>
31. John J Kilbane, Kathleen Jackowski. Biodesulfurization of Water-Soluble Coal-Derived Material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 // Biotechnology and Bioengineering – 1992. - Vol. 40, - P. 1107-1114.
32. John J Kilbane. Desulfurization of coal: the microbial solution // Elsevier Science Publishers Ltd (UK). - 1989. - Vol. 7. - P. 97-101.
33. Karavaiko G I, Lobyreva L B. An overview of the bacteria and archaea involved in removal of inorganic and organic sulfur compounds from coal // Fuel Process Technol. - 1994. – Vol. 40. – P. 167–182.
34. Kenneth Runnion, Joan D. Combie. Organic sulfur removal from coal by microorganisms from extreme environments // FEMS Microbiology Reviews. – 1993. – Vol. 11. – P. 139-144.
35. Kodama K, Umehara K, Shimizu K, Nakatani S, Minoda Y, Yamada K. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway // AgricBiol. Chem. – 1973. - Vol. 37. – P. 45-50.
36. Levine D G, Schlosberg R H, Silbernagel B G. Understanding the chemistry and physics of coal structure (A Review) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – Vol. 79. -P. 3365–3370.
37. Masako Tobita, Mayumi Yokozeki, Nobuyuki Nishikawa, Yasushi Kawakami. Pyrite Oxidation by *Sulfolobus acidocaldarius* // Biosci. Biotech. Biochem. – 1994. - Vol. 58 (4). – P. 771 – 772.
38. Monticello D J, Bakker D, Finnerty W R. Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species // Appl. Environ. Microbiol. – 1985. - Vol. 49. – P.756-760.
39. Peter Fecko, Iva Pectova, Vladimir Cablik, Silvie Riedlova, Pavla Ovcari, Barbara Tora. Bacterial desulphurization of coal // Gyrnictwoi Geoiniynieria. – 2006. – Vol. 30, № 3/1. – P. 47-65.
40. Pinar Aytar, Catherine M Kay, Mehmet Burzin Mutlu, Ahmet Zabuk. Coal Desulfurization with *Acidithiobacillus ferrivorans* from Balya Acidic Mine Drainage // Energy Fuels.– 2013, №. 27 (6). - P. 3090–3098.
41. Rai C, Reyniers J P. Microbial desulfurization of coal by organisms of the genus *Pseudomonas* // Biotechnol. Progress. – 1988. - Vol. 4. – P. 225–230.
42. Ralph F Purdy, Joe E Lepo, Bailey Ward. Biodesulfurization of Organic-Sulfur Compounds // Current microbiology. – 1993. -Vol. 27. – P. 219-222.



43. *Rawlings D E.* Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates // *Microbial Cell Factories.* - 2005. - Vol. 4, № 13. – P. 4-13.

44. *Sradhanjali Singh, Haragobinda Srichandan, Ashish Pathak, Chandra Sekhar Gahan, Sujeong Lee, Dong-Jin Kim, Byoung-Gon Kim.* Studies on the effect of coal particle size on biodepyritization of high sulfur coal in batch bioreactor // *Polish Journal of Chemical Technology.* - 2015. – Vol. 17, № 1. – P. 97-102.

45. *Tae Sung Kim, HaeYeong Kim, Byung Hong Kim.* Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 US // *Biotechnology Letters.* – 1990. - Vol. 12. - P. 757-760.

46. *Van Afferden M, Schacht S, Klein J, Trper H G.* Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO // *Arch Microbiol.* – 1990. – Vol. 13(4). – P.324–328.

47. *Xinping Yang, Shimei Wang, Yujiao Liu, Yuanyuan Zhang.* Identification and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* YY2 and its application in the biodesulfurization of coal // *Canadian Journal of Microbiology.* – 2015. – Vol. 61(1). – P. 65-71.

Стаття надійшла до редакції 05.05.2017 р.



Ю.В. Коломієць¹, А.Ф. Ліханов², І.П. Григорюк¹

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 13, Київ, 03041, e-mail: julyja@i.ua

²Інститут еволюційної екології НАН України,
вул. Академіка Лебедева, 37, Київ, 03143, e-mail: likhanov.bio@gmail.com

ПРОСТОРОВА ГЕТЕРОГЕННІСТЬ І
СПЕЦИФІЧНІСТЬ ІНДУКОВАНИХ БАКТЕРІОЗІВ
У КАЛЮСНИХ ТКАНИНАХ *LYCOPERSICON*
ESCULENTUM MILL. *IN VITRO*

Мета. Дослідити специфічні реакції індукованого імунітету калюсних тканин томатів за умов інокуляції збудниками бактеріальних хвороб *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, *S. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Методи. Гістохімічні дослідження калюсних структур томатів і специфіки патогенезу проводили на постійних препаратах. **Результати.** Показано, що у морфогенних калюсах створюються неоднорідні умови для проникнення бактерій у глибокі шари тканин. Підтверджено, що напрямки і швидкість поширення збудників у калюсах залежать від гетерогенності структур і типу сформованих тканин. З'ясовано, що провідні пучки, які в калюсах складені системою трахеїдоподібних елементів і знаходяться в осередку інфекції не сприяють її системному поширенню, а є центрами активної протидії патогенам. **Висновки.** Високий рівень стійкості проти *X. vesicatoria* виявили аксіальні структури ризогенного типу, що пов'язано з функціональними особливостями їх покривних тканин. Визначено, що бактерії не долають створених калюсами тканинних бар'єрів. У окремих груп клітин калюсів томатів *in vitro* виявлено ефект їх стійкості проти *P. syringae* pv. *tomato* за відсутності типових ознак індукованого імунітету, що розкриває нові аспекти в системі взаємодії патоген-хазяїн.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., збудники бактеріальних хвороб, калюс.

Фітопатогенні бактерії відзначаються багатовекторністю впливу на рослини, зокрема за участю гідролітичних ферментів, токсинів, фітогормонів, екзо- та ліпополісахаридів [1]. Інгібітори ферментів рослин і мембраноактивні речовини, які виявляються серед токсинів бактерій індукують некроз рослинних тканин, впливають на трансмембранне перенесення йонів й відкривають породици та зумовлюють в'янення рослин [2].

Бактерії роду *Clavibacter* зумовлюють в'янення рослин в результаті закупорювання судин. Вони продукують складні гетеро- або екзополісахариди (ЕПС), які оточують бактеріальні клітини, захищають їх від швидкого



зневоднення і зумовлюють концентрування в клітині поживних речовин й внутрішньоклітинних ферментів [7]. У бактерій роду *Xanthomonas* виявлено два різних біополімери, зокрема позаклітинний ЛПС, що вирізняється за своєю будовою і біологічними властивостями від ЛПС зовнішньої мембрани, та вуглеводовмісний біополімер, що представляє собою фітотоксичний полісахаридліпідний комплекс, який викликає утворення гелієвих структур у рослинних тканинах [4]. Патовари *Pseudomonas syringae* продукують широкий спектр фітотоксинів, зокрема коронатин, що за структурою нагадує жасмонову кислоту і спричиняє зниження рівня хлорофілу [9].

Метою даної роботи було дослідити специфіку впливу збудників бактеріальних хвороб на калюсні тканини томатів *in vitro*.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували калюсні тканини сортів томатів, які відрізнялися за стійкістю до збудників бактеріальних хвороб, зокрема Чайка (більш стійкий), Оберіг (середньо стійкий), Малиновий дзвін (не стійкий). В дослідженнях використовували фітопатогенні бактерії *X. vesicatoria* (Doidge 1920) Vauterin et al. 1995 штам 9098 з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Штами *S. michiganensis subsp. michiganensis* (Smith 1910) Davis et al. 1984 штам P115 і *P. syringae* pv. *tomato* (Okabe 1933) Young et al. 1978 штам

Pst-2, було отримано з Інституту пестицидів та захисту рослин, Сербія.

З метою прискореного одержання рихлого калюсу живильне середовище Мурашіге і Скуга доповнювали 8,0 мг/л 6-БАП й 4,0 мг/л ІОК. Інокуляцію калюсів культурою збудників проводили за допомогою стерильних шприців на 14 добу після пересаджування. Гістохімічні дослідження калюсних структур і специфіку бактеріозів проводили на постійних препаратах. Анатомічні зрізи, залитих у парафін зразків калюсів, робили на санному мікроскопі (7 – 8 мкм). Після депарафінізації тканини забарвлювали ацетофуксином. Якісне визначення поліцукридів, білків, суберину, лігніну в тканинах виконували за стандартними прописами [8]. Локалізацію бактерій *P. syringae* pv. *tomato* в калюсних тканинах визначали методом непрямого імунофлуоресцентного аналізу за використання прямих кролячих антитіл і вторинних поліклональних FITC мічених проти кролячих антитіл (Anti-RabbitIgG-FITC antibody, Sigma-Aldrich) відповідно протоколів [5]. Для уникнення неспецифічного зв'язування антитіл зріз попередньо обробляли 3% розчином БСА. ДНК у клітинах визначали флуоресцентним барвником DAPI. Рослинні тканини досліджували на люмінесцентному мікроскопі AxioScope A-1 CarlZeiss. Для отримання диференціального зображення флуоресценції тканин використовували люмінесцентні фільтри (для DAPI – EXG 365, BSFT 395, EMBP 445/50нм; для FITC – EXBP 475/40, BSFT500, EMBP 530/50 нм). Фотодокументацію і обробку отриманих даних виконували в спеціалізованій програмі для аналізу цифрових зображень – Image-ProPremier 9.0.

Результати та їх обговорення

Швидкість і специфіка розвитку бактеріозів в калюсних тканинах



томатів залежить від багатьох внутрішніх і зовнішніх чинників. Калюс томатів представлений складним комплексом компактно і рихло складених паренхімних клітин, меристемоїдних і аксіальних структур. Рихла паренхіма з вираженими міжклітинниками, як правило, зосереджена на периферії. Структурні особливості первинного неморфогенного калюсу зумовлені несинхронізованим поділом клітин і просторовою неорганізованістю транспорту поживних речовин. На рис. 1 представлені результати взаємодій калюсних тканин з бактеріями *X. vesicatoria* 9098.

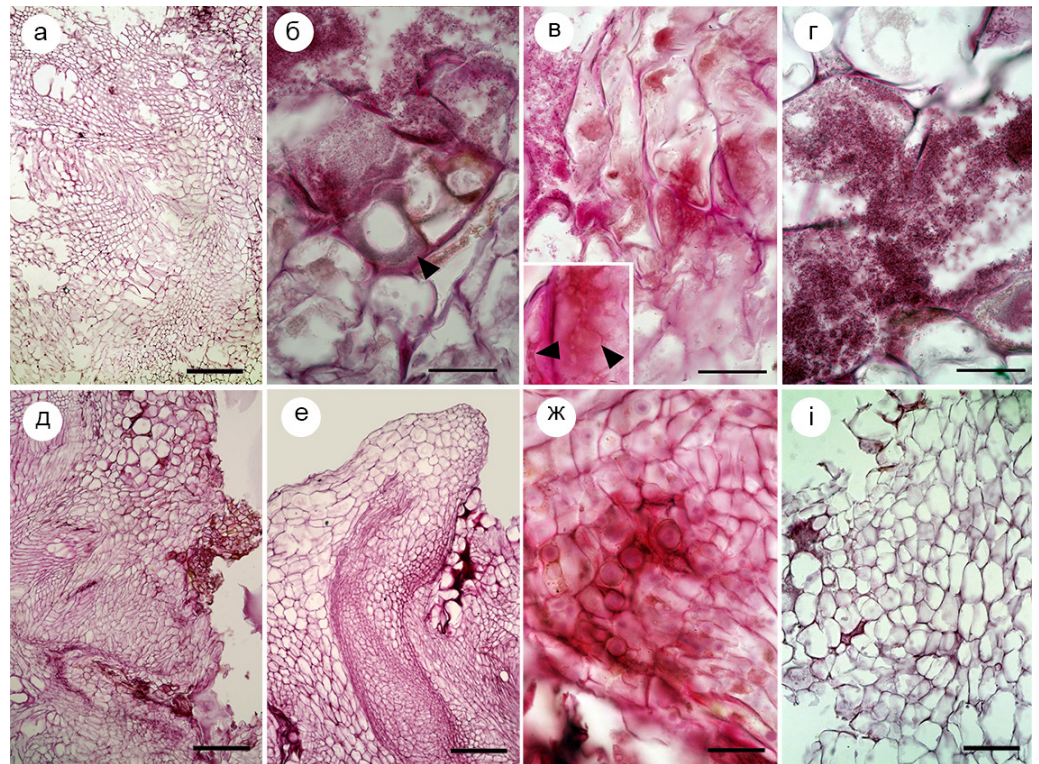


Рис. 1. Розвиток реакцій надчутливості у калюсах томату: а – контроль; б–г – під впливом *P. syringae* pv. *tomato* Pst-2: б – індукована лігніфікація клітинних стінок і заповнення протопласта поліцукридами (вказано стрілками); в – утворення вакуолярних структур; г – локалізація бактеріальної колонії в клітинах калюсу; д–ж – під впливом *X. vesicatoria* 9098: д – облітерація групи зовнішніх клітин і початок розвитку реакцій надчутливості у паренхіматозних клітин; е – стан аксіального органу в умовах бактеріальної інвазії; ж – специфічна трансформація калюсних клітин; і – розвиток бактеріозу під впливом *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P115; лінійка: а, д, е – 100 мкм; б, в, г – 25 мкм; ж, і – 50 мкм).

Fig. 1. Development of hypersensitivity reactions in tomato callus: а – control; б–г – under the influence of *P. syringae* pv. *tomato* Pst-2: б – induced lignification of cell walls and protoplast filling with polysaccharides (indicated by arrows) в – formation of vacuolar structures; г – localization of bacterial colony in callus cells; д–ж – under the influence of *X. vesicatoria* 9098: д – obliteration of a group of external cells and the onset of development of hypersensitivity reactions in parenchymal cells; е – state of the axial organ in conditions of bacterial invasion; ж – specific transformation of callus cells; і – development of bacteriosis under the influence of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* P115; ruler: а, д, е – 100 μm ; б, в, г – 25 μm ; ж, і – 50 μm).



За високої вірулентності мікроорганізмів у калюсах розвивалася реакція надчутливості (РНЧ), внаслідок якої у деяких клітин потовщувалися клітинні стінки, відбувалася компартментація протопластів, руйнувався ядерний апарат (рис. 1, д, ж, і). З часом такі клітини втрачали життєздатність і створювали тканинні бар'єри, які перешкоджали поширенню інфекції в здорові тканини. За умов контакту *X. vesicatoria* штам 9098 з рихлим калюсом, бактерії легко руйнували клітини і рухалися далі по міжклітинниках. Швидкий розвиток бактеріозу призупинявся біля морфогенних зон калюсних структур з відносно щільно складеними і просторово упорядкованими клітинами правильної геометрії.

Міжклітинники в таких зонах калюсів були менш розвинутими. Площа контакту між клітинами і відповідно швидкість переносу продуктів пластичного обміну, у тому числі сигнальних молекул, які запускають каскади біохімічних трансформацій і захисних реакцій, в таких структурах потенційно є значно вищою. Підтвердженням цьому є специфіка поширення бактерій *X. vesicatoria* 9098 в зоні формування аксіального органу, який за анатомічною будовою схожий на корінь-ризоїдну структуру (рис. 1, е). На рисунку показано, що ураження відбувалося лише в клітинах, які оточували аксіальний орган. Патогенні мікроорганізми зупинялися біля покривних тканин і орган залишався неушкодженим. Дана особливість, пов'язана з фізіологічною специфікою покривних тканин кореневої системи, зокрема наявності спеціальних молекулярних механізмів, які забезпечують їхню стійкість. Про те, що анатомічна форма стійкості рослин залежить від особливостей клітин і тканин та їх здатності мінімізувати дію стрес-чинників зазначалося в літературі [6]. Оскільки типова реакція індукованого імунітету не виражена, у даному випадку стійкість ризоїдної структури проти збудника чорної бактеріальної плямистості є конститутивною.

Трансформація калюсних тканин під дією вірулентного штаму *P. syringae* pv. *tomato* Pst-2 в цілому була типовою для даного мікроорганізму. Клітинні стінки рослин у відповідь на токсичну дію просочувалися суберином і наповнювалися компонентами лігніну, що узгоджується із зазначеним в літературі фактом активації РНЧ-специфічних генів характерних для реакцій індукованого імунітету [3]. Лігнін інтенсивніше відкладався на тангентальних і фронтальних антиклінальних стінках, створюючи перешкоди на потенційних напрямках транслокації фітопатогенних бактерій. Втім, в розвитку патогенезу спостерігалися і певні відмінності. При ураженні тканин *P. syringae* pv. *tomato* у калюсах достатньо швидко розвивалися ознаки запрограмованої загибелі клітин: відбувалася конденсація і вакуоляризація цитоплазми, диспергування ядерної ДНК з вивільненням доволі крупних фрагментів нуклеїнових кислот. Важливою особливістю патогенезу даного типу є утворення у цитоплазмі рослинних клітин оптично густої однорідної маси поліцукридної природи. На мікрофотознімках (рис. 1, б–г) чітко визначено результат взаємодії калюсних клітин з бактеріями *P. syringae* pv. *tomato*. Важливою ознакою трансформації клітин під дією продуктів життєдіяльності *P. syringae* pv. *tomato* є формування у протопластах нових внутрішньоклітинних кластерів, що ізольовані між собою. За результатами наших досліджень процес їх



утворення відбувався в декілька етапів: спочатку уздовж плазмалеми, біля клітинних стінок, виявлявся оптично густий секрет. До його хімічного складу, як показали гістохімічні дослідження, входять поліцукриди. Останні заповнювали клітини і викликали розвиток специфічної захисної реакції. У протопластах *de novo* створювалися внутрішні клітинні стінки, які обмежували дифузний рух ендополіцукридів. Їх формування було подібним утворенню серединних пластинок при мітозі. На завершальних етапах новоутворені клітинні стінки мали не товстий, проте достатньо щільний лігнінофікований матрикс, який здатний уповільнювати транслокацію токсинів бактерій *P. syringae* pv. *tomato* і *X. vesicatoria*. На нашу думку, за умов поділу протопласту, клітини забезпечують тимчасову функціональну автономність і відстрочують процеси загибелі. Саме для даних видів патогенних мікроорганізмів нами виявлено специфічну компартментизацію клітин в калюсах томатів.

Характер розвитку бактеріозів і поширення бактерій *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* по калюсним тканинам сортів томатів у наших експериментах був не агресивним та відносно повільним. Для бактерій даного виду характерним було виділення у зовнішнє середовище ЕПС. Відповідні захисні реакції з боку рослинних клітин мали менш виражений характер (рис. 1, і). Бактерії виявлялися переважно в міжклітинному просторі калюсних структур. Уражені клітини досить швидко відмежовувалися від здорових тканин і поширення інфекції блокувалися клітинними полімерами.

У калюсах з достатньо оформленою системою гідроцитів та інших гетерогенних структур, створювалися неоднорідні умови для проникнення бактерій у глибокі шари клітин. Розвиток бактеріозів, напрямок і швидкість поширення інфекції, виявляли тканини і групи клітин з різним рівнем стійкості. Застосування імунофлуоресцентного аналізу для виявлення локалізації бактерій *P. syringae* pv. *tomato* дозволили підтвердити це положення (рис. 2, а–б). Також було з'ясовано, що провідні пучки калюсних тканин, які складені системою гідроцитів або трахеїдоподібних елементів, в осередку інфекції не сприяли їхньому переносу, а були центрами активної протидії збуднику. В калюсах бактерії не долали створених тканинних бар'єрів, а між ураженими та живими клітинами утворювалася гістохімічно визначена межа (рис. 2, в).

На особливу увагу заслуговує той факт, що при поширенні інфекції не визначається чіткого переходу, який би свідчив про підвищення інтенсивності трансформацій вторинної клітинної стінки у здорових клітин, яку зазвичай викликають сигнальні системи рослин в умовах поширення інфекції. Наші спостереження свідчать про реактивний тип захисної системи калюсних тканин, який представляє найбільшу наукову цінність, оскільки розкриває потенційні можливості молекулярної взаємодії в системі – патоген-хазяїн.

Таким чином, під дією продуктів життєдіяльності *X. vesicatoria* і *P. syringae* pv. *tomato* відбувається трансформація клітин калюсу томатів, внаслідок якої в протопластах накопичуються густий секрет, до складу якого входять поліцукриди і утворюються клітинні перетинки. Розвиток бактеріозів, напрямок і швидкість поширення бактерій дозволили виявляти в калюсних тканинах томатів групи клітин з різним рівнем чутливості до інфекції. Високу стійкість проти *X. vesicatoria* виявили аксіальні структури



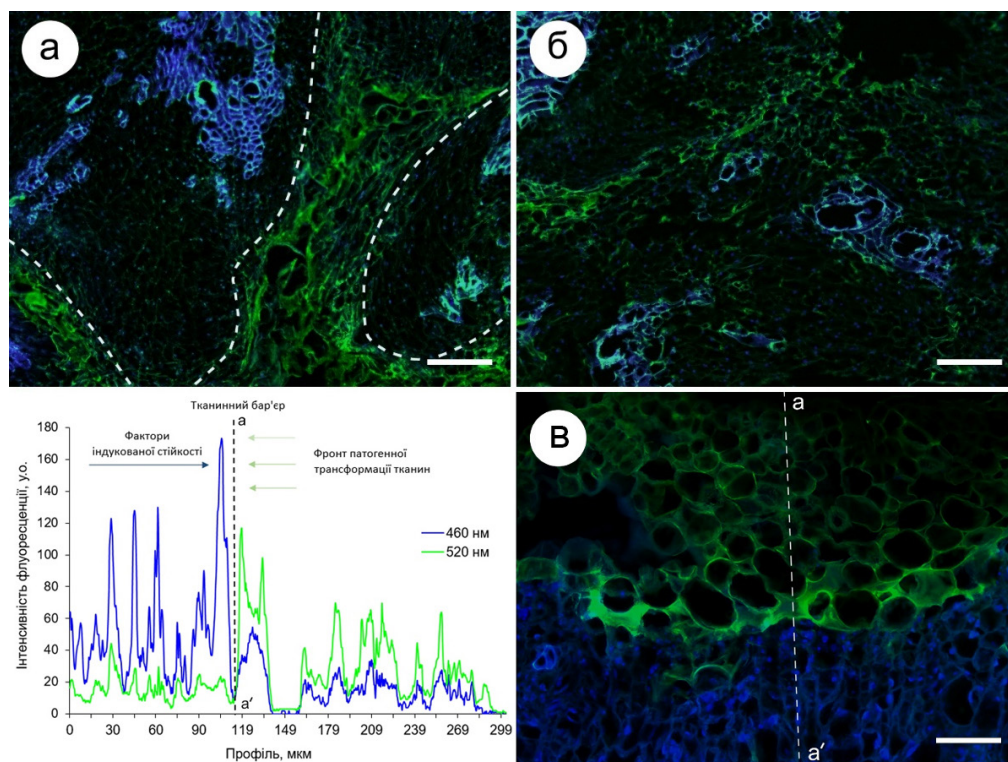


Рис. 2. Локалізація бактерій *P. syringae* pv. *tomato* в морфогенному калюсі томатів і розвиток захисних реакцій в зоні інфікування: а, б – зона транслокації бактерій (пунктиром виділена зона переважна для транслокації бактерій); синя флуоресценція – ДНК (DAPI) і лігніфіковані клітинні стінки; зелена флуоресценція – антитіла до білків *P. syringae* pv. *tomato* (FITC); в – профіль флуоресценції тканини на межі тканинного бар'єру, який створений у відповідь на ураження клітин; зелений фільтр – FITC; синій фільтр – DAPI (лінійка – а, б 100 мкм, в – 50 мкм).

Fig. 2. Localization of *P. syringae* pv. *tomato* in morphogenic tomato callus and the development of protective reactions in the infection zone: а, б – the zone of bacterial translocation (dotted line is the zone is preferred for translocation of bacteria); blue fluorescence – DNA (DAPI) and lignification of the cell walls; green fluorescence – antibodies to proteins of *P. syringae* pv. *tomato* (FITC); в – the tissue fluorescence profile on the face of the tissue barrier, created in response to cell damage; green filter – FITC; blue filter – DAPI (ruler – а, б 100 μm, в – 50 μm).

ризогенного типу, що пов'язано з функціональними особливостями покривних тканин. У калюсах томатів в умовах інокуляції патогенів *P. syringae* pv. *tomato* виявлено специфічний процес, що має реактивний характер. Він виражається у тому, що між ураженою і неуразеною частинами калюсу виділяється чітка межа, яка зумовлена відсутністю типових для рослинних клітин ознак реакцій індукovanого імунітету.

Ю.В. Коломієць¹, А.Ф. Ліханов², І.П. Григорюк¹

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборонь, 13 Киев, 03041, e-mail: julyja@i.ua

²Институт эволюционной экологии НАН Украины,
ул. Академика Лебедева, 37, Киев, 03143, e-mail: likhanov.bio@gmail.com

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ИНДУЦИРОВАННОГО БАКТЕРИОЗА В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. *IN VITRO*

Реферат

Цель. Исследовать специфические реакции индуцированного иммунитета каллусных тканей томатов в условиях инокуляции возбудителями бактериальных болезней *X. vesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Методы.** Гистохимические исследования каллусных структур томатов и специфики патогенеза проводили на постоянных препаратах. **Результаты.** Показано, что в морфогенных каллусах создаются неоднородные условия для проникновения бактерий в глубокие слои ткани. Подтверждено, что направления и скорость распространения возбудителей в каллусах зависят от гетерогенности структур и типа сформированных тканей. Выяснено, что проводящие пучки, которые в каллусах составлены системой трахеидовидных элементов и находятся в очаге инфекции, не способствуют ее системному распространению, а являются центрами активного противодействия патогенам. **Выводы.** Высокий уровень устойчивости к *X. vesicatoria* проявляли аксиальные структуры ризогенного типа, что связано с функциональными особенностями их покровных тканей. Определено, что бактерии не преодолевают созданных каллусом тканевых барьеров. В отдельных группах клеток каллусов томатов *in vitro* обнаружен эффект их устойчивости против *P. syringae* pv. *tomato* при отсутствии типичных признаков индуцированного иммунитета, что раскрывает новые аспекты в системе взаимодействия патоген-хозяин.

Ключевые слова: *Lycopersicon esculentum* Mill., возбудители бактериальных болезней, каллус.

Yu. V. Kolomiets¹, A. F. Likhanov², I. P. Grigoryuk¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine,
13, Geroev Oborony str., Kyiv, 03041, e-mail: julyja@i.ua

²Institute of evolutionary ecology of NAS of Ukraine,
37, Academician Lebedev str., Kyiv, 03143, e-mail: likhanov.bio@gmail.com

SPATIAL HETEROGENICITY AND SPECIFICITY OF INDUCED BACTERIOSIS IN CALLUS TISSUES *LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL. *IN VITRO*

Summary

Aim. To investigate specific reactions of induced immunity of callus tissues of tomatoes under conditions of inoculation with bacterial pathogens *X. vesicatoria*,



P. syringae pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Methods.** Histochemical studies of callus structures of tomatoes and specific pathogenesis were carried out on permanent preparations. **Results.** It was shown that inhomogeneous conditions are created in morphogenic calluses for penetration of bacteria into deep layers of tissue. It was confirmed that the direction and speed of propagation of pathogens in callus depends on the heterogeneity of the structures and the type of tissue formed. It was found that the conduction beams, which in callus are made up of a system of tracheoidal elements and are located in a source of infection, do not contribute to its systemic spread, but are the centers of active resistance to pathogens. **Conclusions.** A high level of resistance to *X. vesicatoria* was exhibited by axial structures of the rhizogenic type, which was associated with the functional characteristics of their integumentary tissues. It is determined that bacteria do not overcome the callus-created tissue barriers. In some groups of tomato callus cells, the effect of their resistance against *P. syringae* pv. *tomato* was detected in vitro in absence of typical signs of induced immunity, that reveals new aspects in the pathogen-host interaction system.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill., agents of bacterial diseases, callus.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дьяков Ю.Т. Фундаментальная фитопатология. – М.: Красанд, 2012. – 512 с.
2. Желдакова Р.А., Мямин В.Е. Фитопатогенные микроорганизмы. – Мн.: БГУ, 2006. – 116 с.
3. Карпун Н.Н., Янушевская Э.Б., Михайлова Е.В. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – 50, № 5. – С. 540–549.
4. Козулин В.В. Углеводсодержащие биополимеры *Xanthomonas campestris* и их роль в фитопатогенных процессах : дисс. на соис. науч. степ. канд. биол. наук : специальность 03.00.07 «Микробиология». – Саратов, 2009. – 151 с.
5. Сайфитдинова А.Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. – СПб: Соло, 2008. – 72 с.
6. Смирнова О.Г., Кочетов А.В. Клеточная стенка растений и механизмы устойчивости к патогенам // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015 – 19, № 6. – С. 715–723.
7. Bermpohl A., Dreier J., Bahro R., Eichenlaub R. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants // Microbiological Research. – 1996 – Vol. 151, № 4. – P. 391–399.
8. Pellicciari C., Biggiogera M. Histochemistry of single molecules. Methods and Protocols. – Humana Press, 2017. – P. 313–337.
9. Preston G.M. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time // Molecular plant pathology. – 2000. – Vol. 1 (5). – P. 263–275.



References

1. Dyakov YuT Fundamental phytopathology. Moscow: Krassand, 2012. 512 p.
2. Zheldakova RA, Mamin VE Phytopathogenic microorganisms. Moscow: BSU, 2006. 116 p.
3. Karpun NN, Yanushevskaya EB, Mikhailova EV Mechanisms of formation of nonspecific induced immunity in plants under biogenic stress. Agricultural biology. 2015; 50 (5): 540–549.
4. Kozulin VV Carbohydrate-containing biopolymers *Xanthomonas campestris* and their role in phytopathogenic processes: diss. cand. biol. sciences: specialty 03.00.07 "Microbiology". Saratov, 2009. 151 p.
5. Sayfitdinova AF Two-dimensional fluorescence microscopy for the analysis of biological samples. St. Petersburg: Solo, 2008. 72 p.
6. Smirnova OG, Kochetov AV Cell wall of plants and mechanisms of resistance to pathogens. Vavilovsky Journal of Genetics and Selection. 2015; 19 (6): 715–723.
7. Bermpohl A, Dreier J, Bahro R, Eichenlaub R. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. Microbiological Research. 1996; 151 (4): 391–399.
8. Pellicciari C, Biggiogera M. Histochemistry of single molecules. Methods and Protocols. Humana Press, 2017: 313–337.
9. Preston GM. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular plant pathology. 2000; 1 (5): 263–275.

Стаття надійшла до редакції 16.08.2017 р.



А.С. Семенець, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

ВПЛИВ АНТИБІОТИКІВ НА БІОПЛІВКИ ШТАМІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* З РІЗНИМ РІВНЕМ ВМІСТУ ЦИКЛІЧНОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТУ

Мета роботи: встановлення впливу антибіотиків на процес утворення та зрілу біоплівку штамів *P. aeruginosa* з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату (цикло-ди-ГМФ). **Матеріали та методи.** Як тест-мікроорганізми використовували штами *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ *wspF* (підвищений вміст цикло-ди-ГМФ) і *P. aeruginosa* PA01 ρ JN2133 (знижений вміст цикло-ди-ГМФ). Культивування проводили у пробірках при визначенні мінімальних інгібувальних концентрацій (МІК) антибіотиків або у 96-лункових плоскодонних планшетах Nucleon у середовищі LB при 37 оС впродовж 24 годин при дослідженні утворення біоплівки. Для оцінки впливу досліджуваних антибіотиків на зрілу біоплівку їх додавали в лунки через добу після початку інкубації, видаляючи попередньо планктонні клітини. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим. **Результати.** Після попередньої оцінки чутливості штамів до широкого спектру антибіотиків за диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера для вивчення були відібрані стрептоміцин, цiproфлoксацин та цефепім, чутливими до яких виявилися усі досліджувані штами. Мінімальні інгібувальні концентрації цiproфлoксацину і стрептоміцину були однаковими для усіх штамів *P. aeruginosa* і становили 0,15 та 10 мкг/мл, відповідно. Більш чутливим до цефепіму виявився штам *P. aeruginosa* PA01 ρ JN2133 (МІК 12,5 мкг/мл). МІК цього антибіотику для двох інших штамів становила 20 мкг/мл. За додавання антибіотиків на початку культивування усі вони ефективно знижували кількість планктонних клітин (на 70–90%) і масу біоплівок (на 40–70%). При цьому не було встановлено відмінностей між штамами з різним вмістом цикло-ди-ГМФ. За впливу на зрілу біоплівку цiproфлoксацин пригнічував утворення клітин персистерів, але знижував масу біоплівки лише у *P. aeruginosa* PA01 ρ JN2133. Цефепім і стрептоміцин знижували вміст персистерів лише у концентраціях 5 і 10 мкг/мл і не чинили впливу на біоплівки. **Висновки.** Знижений вміст цикло-ди-ГМФ у клітинах *P. aeruginosa* підвищує чутливість біоплівок до антимікробних препаратів. Цiproфлoксацин є найбільш перспективним антибіотиком для розробки комбінованих засобів, здатних запобігати утворенню біоплівок псевдомонадами та руйнувати їх.

Ключові слова: цикло-ди-ГМФ, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ *wspF*, *P. aeruginosa* PA01 ρ JN2133, антибіотики, біоплівка.

© А.С. Семенець, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова



Pseudomonas aeruginosa – відомий опортуністичний патоген, здатний викликати шпитальні інфекції завдяки утворенню біоплівок, які сприяють виживанню бактерії у несприятливих умовах: за впливу антибіотиків, дезінфектантів тощо [13]. Біоплівки утворюються не тільки на медичному обладнанні, але і в організмі хворих, зокрема у дихальних та сечових шляхах, на ранових поверхнях, катетерах та імплантах [5, 17]. У складі біоплівок бактерії зазнають фенотипічних і генотипічних змін, які сприяють розповсюдженню і хронізації інфекції. Розповсюдження інфекції забезпечується так званими персистерами – клітинами, що вивільняються з біоплівки та переходять до вільного, рухливого способу існування [6, 8, 13]. Бактерії, що залишилися прикріпленими до субстрату, сприяють довготривалому перебігу захворювань. Одним з головних механізмів, які регулюють перемикання між двома способами існування, є система цикло-ди-ГМФ. Цей вторинний месенджер бактерій також регулює інші фізіологічні процеси: систему міжклітинної комунікації, утворення біоплівок, рухливість, диференціювання, вірулентність, чутливість до антибіотиків [10, 14, 15]. Підвищення концентрації цикло-ди-ГМФ у цитоплазмі викликає адгезію клітин і формування біоплівок, у той час як зниження концентрації, навпаки, призводить до розпаду мікробної спільноти і утворенню персистерів [9]. Крім того, система цикло-ди-ГМФ є потенційною мішенню при розробці антибіоплівкових засобів для попередження ускладнень у пацієнтів зі штучними суглобами, при застосуванні катетерів та у хворих на муковісцидоз, в яких саме *P. aeruginosa* часто утворює біоплівки на поверхні епітелію дихальних шляхів, що призводить до летального результату [5, 17]. Враховуючи високий рівень резистентності біоплівкових бактерій до антимікробних засобів ефективне їх знищення можливе лише із застосуванням комбінованої терапії, яка передбачає сумісне з антибіотиками використання засобів, що мають здатність знижувати рівень цикло-ди-ГМФ і руйнувати матрикс біоплівки [3, 11, 18]. Однак спочатку було необхідним визначити коло антибіотиків, які можна було б використати як складові таких комбінованих засобів.

Тому метою даного дослідження було встановлення впливу антибіотиків на процес утворення та зрілу біоплівку штамів *P. aeruginosa* PA01 з різним рівнем вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату (цикло-ди-ГМФ).

Матеріали та методи

В роботі були використані штам дикого типу *P. aeruginosa* PA01 з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова і штами *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 з низьким та *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF з підвищеним вмістом цикло-ди-ГМФ, люб'язно надані О. Ржепішевською з університету м. Умео, Швеція. Культивування здійснювали при 37 °С у рідкому середовищі LB з таким складом (г/л): пептон – 15,0, дріжджовий екстракт – 10,0, хлорид натрію – 5,0.

Попередню оцінку чутливості штамів до широкого кола антибіотиків здійснювали за диско-дифузійним методом Кірбі-Бауера [2]. На підставі одержаних результатів для подальшого вивчення було обрано три антибіотика: стрептоміцин, ципрофлоксацин та цефепім, чутливими до яких виявилися усі



досліджувані штами *P. aeruginosa*.

Визначення мінімальних інгібувальних концентрацій (МІК) проводили за культивування у пробірках, в які вносили досліджувані антибіотики у діапазоні концентрацій 0,05–30 мкг/мл [12]. Вивчення впливу антибіотиків на біоплівку здійснювали у 96-лункових плоскодонних планшетах Nuclon. При дослідженні дії антибіотиків на процес утворення біоплівки їх вносили у лунки планшетів одночасно з суспензіями бактерій, стандартизованих до вмісту 1×10^3 клітин/мл, і інкубували 24 години при 37 °С. У разі вивчення впливу на вже сформовану, зрілу біоплівку антибіотики додавали у планшети через добу від початку інкубації після ретельного видалення планктонних клітин та продовжували культивування ще впродовж 24 год.

Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 нм. Масу біоплівок визначали загальноприйнятим методом [4]. Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин їх вміст фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв, висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хвилин барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 0,2 мл лізуючого розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густину вимірювали за довжини хвилі 592 нм.

Усі експерименти проводили у 3 незалежних дослідах з 3–6 повторами у кожному. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S\bar{X}$). Достовірність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи достовірність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили з використанням комп'ютерної програми Excel [1].

Результати та їх обговорення

Для визначення кількісних відмінностей у здатності формувати біоплівку досліджувані штами культивували впродовж доби у плоскодонних 96-лункових планшетах і оцінювали масу біоплівок та кількість планктонних, що вільно існують у рідині над біоплівками клітин. Кількісні характеристики біоплівок досліджуваних штамів наведені у табл.

Таблиця

Маса добової біоплівки і кількість планктонних клітин досліджуваних штамів *P. aeruginosa*

Table

The mass of the daily biofilm and the number of planktonic cells of investigated strains of *P. aeruginosa*

Показник	<i>P. aeruginosa</i> PA01	<i>P. aeruginosa</i> PA01 Δ wspF	<i>P. aeruginosa</i> PA01 pJN2133
Кількість планктонних клітин, OG_{540}	0,227 ± 0,025	0,252 ± 0,019	0,362 ± 0,032*
Маса біоплівки, OG_{592}	1,667 ± 0,184	2,218 ± 0,193	0,450 ± 0,052*

Примітка: * - різниця достовірна у порівнянні з іншими штамми
Note: * – significant difference as compared with other strains



Встановлено, що *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 порівняно з *P. aeruginosa* PA01 і PA01 $\Delta wspF$ утворює біоплівку, маса якої знижена у 3,7 і 5 разів, відповідно. У той же час, кількість планктонних клітин над біоплівкою *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 була вищою ніж у двох інших штамів на 60% та 44%, відповідно. Раніше за даними світлової та лазерної конфокальної мікроскопії нами було показано, що біоплівка штаму з низьким вмістом цикло-ди-ГМФ має порушену структуру і виглядає як одношарова [7, 18]. Порівнюючи між собою штам дикого типу і штам з підвищеним вмістом вторинного месенджера, можна відмітити, що маса біоплівки *P. aeruginosa* PA01 $\Delta wspF$ на 30% вища, ніж у *P. aeruginosa* PA01.

За визначення впливу антибіотиків на зрілу біоплівку їх додавали до середовища через добу після початку культивування і подовжували його ще 24 год. Зміни кількості планктонних клітин та маси біоплівок досліджуваних штамів *P. aeruginosa* наведені на рис. 1. Показники, одержані через добу, були прийняті за одиницю і позначені на рис. 1 як контроль.

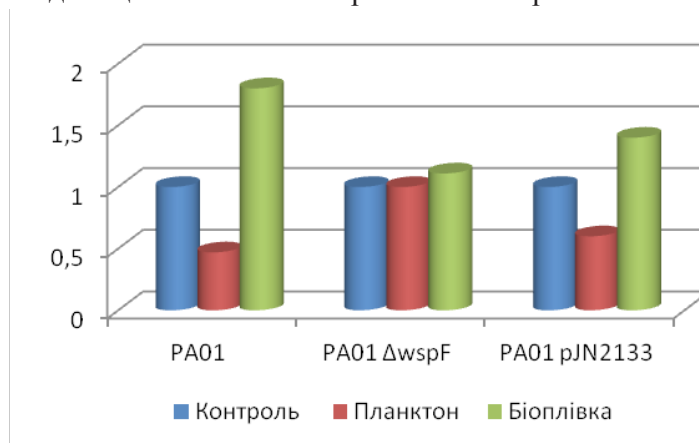


Рис. 1. Зміни кількості планктонних клітин і маси біоплівок впродовж другої доби культивування

Примітка: вісь абсцис – штами *P. aeruginosa*

Fig. 1. Changes in the amount of planktonic cells and mass of biofilms during the second day of cultivation

Note: X-axis – *P. aeruginosa* strains

Якщо у *P. aeruginosa* PA01 $\Delta wspF$ обидва показники не змінювалися, то у разі *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 відбувалося зменшення кількості планктонних клітин і зростання маси біоплівок. Крім того, слід зазначити, що маса біоплівки більш виразно зростала у штаму дикого типу. Джерелом планктонних клітин після заміни середовища є біоплівки, що сформувалися впродовж першої доби культивування. Одержані результати свідчать, що клітини більш інтенсивно вивільняються з біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, яка має порушену структуру [7, 16].

За культивування досліджуваних штамів *P. aeruginosa* у суспензійній культурі, що запобігає утворенню біоплівок, встановлені мінімальні інгібувальні концентрації антибіотиків. МІК ципрофлоксацину і стрептоміцину були однаковими для усіх штамів *P. aeruginosa* і становили 0,15 та 10 мкг/мл,

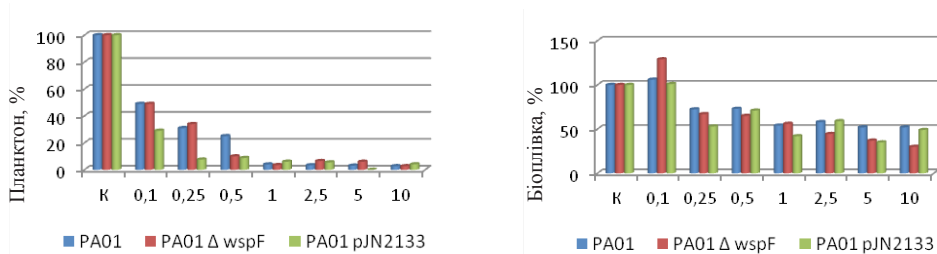


відповідно. Більш чутливим до цефепіму виявився штам *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 (МІК 12,5 мкг/мл). МІК цього антибіотику для двох інших штамів становила 20 мкг/мл.

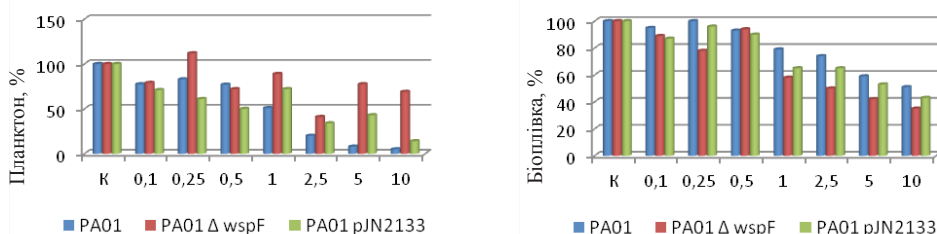
Визначення дії ципрофлоксацину, цефепіму та стрептоміцину на утворення біоплівки проводили у діапазоні концентрацій 0,05–30 мкг/мл. Показано, що жоден з антибіотиків у концентрації 0,05 мкг/мл не впливав на цей процес. У той же час, їх ефекти за впливу 20 і 30 мкг/мл не відрізнялися від зареєстрованих при концентрації 10 мкг/мл. Тому далі наведено результати, які були отримані з використанням концентрацій 0,1–10 мкг/мл.

Враховуючи значні відмінності маси біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 від двох інших штамів, дані на рис. 2–3 наведені у відсотках до відповідного контролю. Результати, одержані при вивченні впливу досліджуваних антибіотиків на процес формування біоплівки представлені на рис. 2.

Ципрофлоксацин



Цефепім



Стрептоміцин

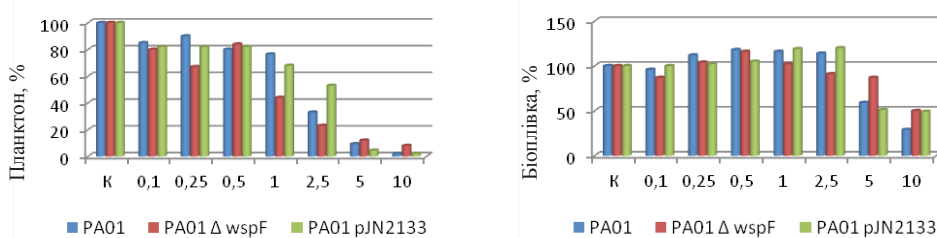


Рис. 2. Вплив ципрофлоксацину, цефепіму і стрептоміцину на утворення біоплівок

Примітка: вісь абсцис – концентрації антибіотиків, мкг/мл

Fig. 2. Effect of ciprofloxacin, cefepime and streptomycin on the biofilm formation

Note: X-axis – antibiotics concentration, μg/ml



Отримані дані свідчать, що процес формування біоплівки більш суттєво сповільнюється за дії ципрофлоксацину. Кількість планктонних клітин знижується вдвічі у разі *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF, та на 75% у разі *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 вже за його присутності у концентрації 0,1 мкг/мл. З підвищенням концентрації ципрофлоксацину кількість планктонних клітин постійно зменшується і, починаючи з концентрації 0,5 мкг/мл не перевищує 10% від контролю. Для *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 90% зниження вмісту, клітин що вільно існують спостерігається вже при концентрації 0,25 мкг/мл. Процес утворення біоплівки гальмується ципрофлоксацином меншою мірою. Маса біоплівки у більшості випадків є меншою тільки на 40–50% і лише при концентраціях 5 і 10 мкг/мл у деяких штамів вона складає 30% від контролю.

Два інші антибіотики, цефепім і стрептоміцин, були застосовані у субоптимальних концентраціях, тобто менших за МІК. Характер їх впливу на утворення біоплівок виявився тотожним дії ципрофлоксацину. За їх присутності більш значно знижується кількість планктонних клітин, аніж маса біоплівки. Найбільш ефективними концентраціями цефепіму і стрептоміцину є 5 і 10 мкг/мл. Результати визначення впливу досліджуваних антибіотиків на зрілу біоплівку наведені на рис. 3.

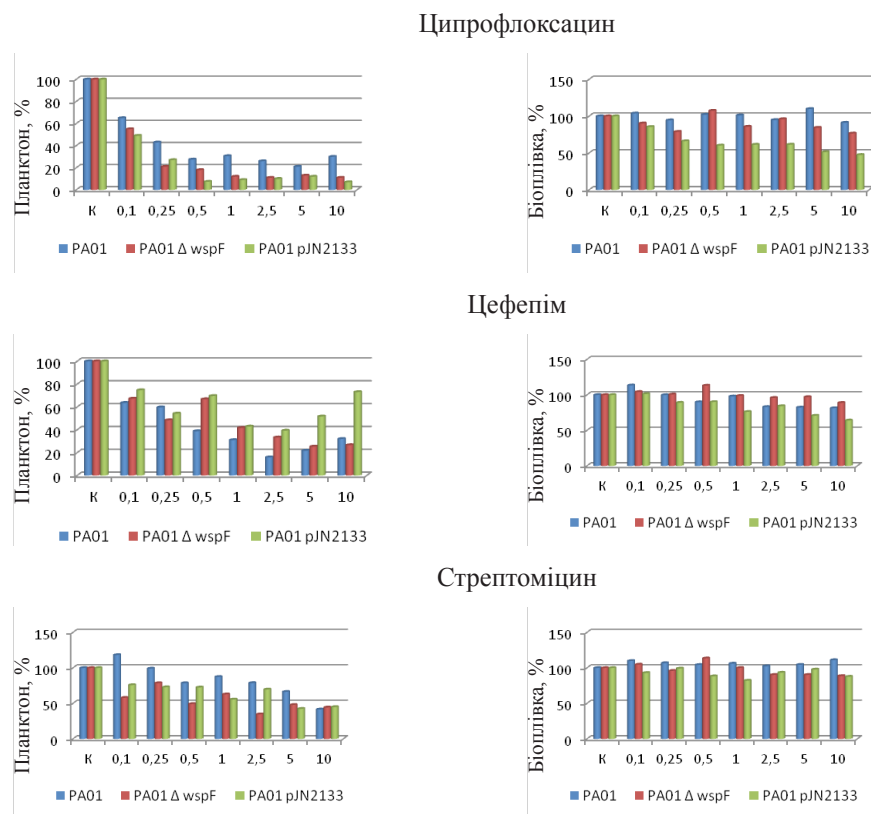


Рис. 3. Вплив ципрофлоксацину, цефепіму і стрептоміцину на зрілі біоплівки
Примітка: вісь абсцис – концентрації антибіотиків, мкг/мл

Fig. 3. Effect of ciprofloxacin, cefepime and streptomycin on the mature biofilm.
Note: X-axis – antibiotics concentration, μ g/ml



У даній серії експериментів виявлений майже ідентичний характер впливу досліджуваних антибіотиків на вміст планктонних клітин: їх кількість, як правило, знижувалася при підвищенні концентрації антимікробних сполук. Однак, слід зазначити, що клітини планктону у даному випадку мають дещо інше походження. Так, у разі одночасного внесення антибіотиків і клітин у живильне середовище і культивування впродовж 24 год накопичення планктонних клітин відбувається переважно за рахунок їх розмноження і, частково, за рахунок вивільнення з біоплівки. В умовах додавання антибіотиків до зрілої біоплівки джерелом планктонних клітин є виключно біоплівка. Цефепім і стрептоміцин в цьому випадку виявилися менш ефективними порівняно з першою серією експериментів, що дає можливість припустити більш високий рівень резистентності вивільнених з біоплівки клітин до цих антибіотиків. У той же час, здатність ципрофлоксацину зменшувати кількість планктонних клітин не змінювалася, що свідчить про збереження клітинами *P. aeruginosa* чутливості до нього у складі біоплівки.

Усі досліджувані антибіотики не змінювали маси зрілих біоплівок *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* PA01 *ΔwspF*. Ципрофлоксацин у діапазоні концентрацій 0,25–10 мкг/мл зменшував масу біоплівки *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 у середньому на 50%. Причому це відбувалося за рахунок руйнування біоплівки, що була утворена за першу добу культивування. Про це свідчить порівняння абсолютних мас біоплівок у контролях та за дії ципрофлоксацину. Так, маса добової біоплівки у контролі становила 0,450 умовних одиниць, за наступні 24 год культивування вона зростала до 0,630, а за присутності ципрофлоксацину зменшувалася до 0,300–0,350 умовних одиниць. Отже цей антибіотик може проникати усередину дуже тонкої біоплівки, яку утворює штам *P. aeruginosa* з низьким рівнем цикло-ди-ГМФ, але він не може долати бар'єр, що утворюється матриксом біоплівок бактерій з достатньо високим вмістом вторинного месенджера.

Таким чином, одержані результати свідчать, що серед досліджених антибіотиків найбільш перспективним для запобігання утворенню біоплівок та їх руйнування є ципрофлоксацин. Але сам по собі він ефективно пригнічує лише утворення клітин персистерів, а для знищення біоплівок необхідним є його комбіноване застосування із засобами, які здатні руйнувати поліцукридний матрикс [3, 11].

А.С. Семенец, Н.Б. Галкин, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел. : +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova @ ukr.net

ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИКОВ НА БИОПЛЕНКИ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНЫМ УРОВНЕМ СОДЕРЖАНИЯ ЦИКЛИЧЕСКОГО ДИГУАНОЗИНМОНОФОСФАТА

Реферат

Цель работы: установление действия антибиотиков на процесс образования



и зрелую биопленку штаммов *P. aeruginosa* с различными уровнями содержания циклического дигуанозинмонофосфата (цикло-ди-ГМФ). **Материалы и методы.** Как тест-микроорганизмы использовали штаммы *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF (повышенное содержание цикло-ди-ГМФ) и *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 (пониженное содержание цикло-ди-ГМФ). Культивирование проводили в пробирках при определении минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибиотиков или в 96-луночных плоскодонных планшетах Nucleon в среде LB при 37 °C в течение 24 часов при исследовании образования биопленки. Для оценки влияния исследуемых антибиотиков на зрелую биопленку их добавляли в лунки через сутки после начала инкубации, удаляя предварительно планктонные клетки. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, массу биопленки - по методу окраски кристаллическим фиолетовым. **Результаты.** После предварительной оценки чувствительности штаммов к широкому числу антибиотиков диско-диффузным методом Кирби-Бауэра для изучения были отобраны стрептомицин, цiproфлоксацин и цефепим, чувствительными к которым оказались все исследуемые штаммы. Минимальные ингибирующие концентрации цiproфлоксацина и стрептомицина были одинаковыми для всех штаммов *P. aeruginosa* и составили 0,15 и 10 мкг/мл, соответственно. Более чувствительным к цефепиму оказался штамм *P. aeruginosa* PA01 pJN2133 (МИК 12,5 мкг/мл). МИК этого антибиотика для двух других штаммов составляла 20 мкг/мл. При добавлении антибиотиков в начале культивирования все они эффективно снижали количество планктонных клеток (на 70–90%) и массу биопленок (на 40–70%). При этом не было выявлено различий между штаммами с разным содержанием цикло-ди-ГМФ. При воздействии на зрелую биопленку цiproфлоксацин подавлял образование клеток персистеров, но снижал массу биопленки только у *P. aeruginosa* PA01 pJN2133. Цефепим и стрептомицин снижали содержание персистеров только в концентрациях 5 и 10 мкг/мл и не оказывали влияния на биопленки. **Выводы.** Пониженное содержание цикло-ди-ГМФ в клетках *P. aeruginosa* повышает чувствительность биопленок к антимикробным препаратам. Цiproфлоксацин является наиболее перспективным антибиотиком для разработки комбинированных средств, способных предотвращать образование биопленок и разрушать их.

Ключевые слова: цикло-ди-ГМФ, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ wspF, *P. aeruginosa* PA01 pJN2133, антибиотики, биопленка.

A.S. Semenets, M.B. Galkin, B.M. Galkin, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,

2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine, phone: +38 (0482) 63 57 61,

e-mail: tphilippova@ukr.net

INFLUENCE OF ANTIBIOTICS ON BIOFILMS OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS WITH DIFFERENT LEVEL OF CYCLIC DIGUANOSINE MONOPHOSPHATE

Summary

Aim of the study was to determine the effect of antibiotics on the formation process



and mature biofilm of strains of *P. aeruginosa* with different levels of cyclic diguanosine monophosphate (*c-di-GMP*). **Materials and methods.** As test microorganisms, strains *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ *wspF* (elevated level of *c-di-GMP*) and *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133* (reduced level of *c-di-GMP*) were used. Cultivation was performed in test tubes to determine minimum inhibitory concentrations of antibiotics (MICs) or 96-well flat-bottomed Nuclon plates in LB medium at 37 °C for 24 hours when studying biofilm formation. To assess the effect of the antibiotics on mature biofilm, they were added to the wells one day after the start of the incubation, removing previously plankton cells. The amount of plankton cells was evaluated spectrophotometrically, biofilm mass was determined by the crystalline violet staining method. **Results.** After preliminary assessment of susceptibility of the strains to a broad range of antibiotics by the disco-diffuse Kirby-Bauer method, streptomycin, ciprofloxacin and cefepime were selected for study, all of the strains tested were susceptible. Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin and streptomycin were similar for all the strains of *P. aeruginosa* and were 0.15 and 10 μ g/ml, respectively. *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133* (MIC 12.5 μ g/ml) was more sensitive to cefepime. MIC of this antibiotic for the other two strains was 20 μ g/ml. With the addition of antibiotics at the beginning of the cultivation, they effectively reduced number of plankton cells (by 70–90%) and mass of biofilms (by 40–70%). In this case, there was no difference between strains with different content of *c-di-GMP*. When exposed to mature biofilms, ciprofloxacin suppressed the formation of persistent cells, but reduced the mass of biofilm only in *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133*. Cefepime and streptomycin reduced the content of persisters only in concentrations of 5 and 10 μ g/ml and had no effect on biofilms. **Conclusions.** The decreased content of *c-di-GMP* in *P. aeruginosa* cells increases the sensitivity of biofilms to antimicrobial drugs. Ciprofloxacin is the most promising antibiotic for the development of combined agents that can prevent the formation of biofilms and destroy them.

Key words: cyclic-di-GMP, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* PA01 Δ *wspF*, *P. aeruginosa* PA01 *pJN2133*, antibiotics, biofilm.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медуко-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2001. – 260 с.
2. Bjorkman J., Andersson D. I. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective // Drug Resist Updat. – 2000. – V. 3. – P. 237 – 245.
3. Borlee B.R., Goldman A.D., Murakami K., Samudrala R., Wozniak D.J., Parsek M. R. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 2010. –V. 75. – P. 827–842.
4. Christensen G.D., W.A. Simpson, J. J. Younger et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. clin. microbiol. – 1985. –V. 22. – № 6. – P. 996–1006.
5. Cole S.J., Lee V.T. Cyclic di-GMP signaling contributes to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated catheter-associated urinary tract infection // J. Bacteriol. – 2016. – V. 198. – P.91–97. doi:10.1128/JB.00410-15.



6. Cotter P. A., Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – V. 10. – P. 17–23.
7. Galkin M.B., Semenets A.S., Finogenova M.O., Galkin B.M., Filipova T.O. Biofilm formation and motility of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with different c-di-GMP level // *Microbiology & Biotechnology.* – 2017 – T. 38, № 2. – P. 40–50.
8. Habimana O., Semizo A.J.C., Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes // *Journal of Membrane Science.* – 2014. – V. 454. – P. 82–96.
9. Hickman J. W., Tifrea D. F., Harwood C. S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels // *PNAS.* – 2005. – V. 102. – P. 14422–14427.
10. Jones J.C., Newsom D., Kelly B. et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa* // *PLoS Pathog.* – 2014. – V. 10(3): e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
11. Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production // *Mol. Microbiol.* – 2007. – V. 65. – P. 1474–1484.
12. *Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents.* EUCAST Definitive document // *J. Clin Microbiol Infect.* – 1998. – V 4. – P. 497–507.
13. Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
14. Römling U., Galperin M.Y., Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2013. – V. 77, № 1. – P. 1–52.
15. Römling U., Gomelsky M., Galperin M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system // *Mol. Microbiol.* – 2005. – V. 53. – P. 629–639.
16. Semenets A.S., Galkin M.B., Filipova T.O. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level // *Microbiology & Biotechnology.* – 2016. – T. 33, № 1. – P. 19–28.
17. Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections // *Trends Microbiol.* – 2016. – V. 24. – P. 327–337.
18. Zemke A.C., Kocak B.R., Bomberger J.M. Sodium nitrite inhibits killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by ciprofloxacin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. 61:e00448-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.00448-16>.

References

1. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v medikobio­logicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260p. (in Russian).
2. Bjorkman J, Andersson DI The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resist Updat.* 2000;3:237–245.



3. Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesion to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2010;75:827–842. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x.
4. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J. clin. microbiol.* 1985;22(6):996–1006.
5. Cole SJ, Lee VT. Cyclic di-GMP signaling contributes to *Pseudomonas aeruginosa*-mediated catheter-associated urinary tract infection. *J Bacteriol.* 2016;198:91–97. doi:10.1128/JB.00410-15.
6. Cotter PA, Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007;10:17–23. doi:10.1016/j.mib.2006.12.006.
7. Galkin MB, Semenets AS, Finogenova MO, Galkin BM, Filipova TO. Biofilm formation and motility of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* with different c-di-GMP level. *Microbiology & Biotechnology.* 2017;38:40-50.
8. Habimana O, Semiro AJC, Casey E. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation of Nanofiltration/Reverse Osmosis membranes. *Journal of Membrane Science.* 2014;454:82–96. doi:10.1016/j.memsci.2013.11.043
9. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *PNAS.* 2005;102:14422–14427. doi: 10.1073/pnas.0507170102
10. Jones JC, Newsom D, Kelly B, et al. ChIP-Seq and RNA-Seq Reveal an AmrZ-Mediated Mechanism for Cyclic di-GMP Synthesis and Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS Pathog.* 2014;10(3):e1003984. doi:10.1371/journal.ppat.1003984
11. Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa YA. Cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 2007;65:1474–1484. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
12. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document. *J. Clin Microbiol Infect.* 1998;4:497 – 507.
13. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
14. Römling U, Galperin MY, Gomelsky M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2013;77(1):1–52. doi: 10.1128/MMBR.00043-12.
15. Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signaling system. *Mol. Microbiol.* 2005; 53:629-639. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x
16. Semenets AS, Galkin MB, Filipova TO. Biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 PJN2133 strain with low c-di-GMP level. *Microbiology & Biotechnology.* 2016;33:19-28. <http://mbt.onu.edu.ua/article/view/65360/60613>.



17. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. Trends Microbiol. 2016;24:327–337. doi: 10.1016/j.tim.2016.01.008.

18. Zemke AC, Kocak BR, Bomberger JM. Sodium nitrite inhibits killing of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2017.61:e00448-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.00448-16>.

Стаття надійшла до редакції 15.09.2017 р.



А.Г. Мерліч, І.Д. Жунько, Н.В. Ліманська, В.О. Іваниця
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса,
Україна, 65082.; тел.: +38 (0482) 68 79 64;
e-mail: andriymerlich@gmail.com

**АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ
ПРОДУКТІВ МЕТАБОЛІЗМУ БАКТЕРІЙ
LACTOBACILLUS PLANTARUM ТА *ENTEROCOCCUS
ITALICUS* ЗА СУМІСНОЇ ДІЇ ПРОТИ
ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ**

Мета. Виявлення антагоністичної активності продуктів метаболізму бактерій штамів *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* ОНУ547 за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій *in vitro*. **Методи.** Антагоністичну активність бактеріальних штамів *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 проти фітопатогенних бактерій *Rhizobium radiobacter* C58, *Rhizobium vitis* UA6, *Rhizobium rhizogenes* 15834, *Erwinia carotovora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* B-1109-УКМ, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511 та *P. syringae* pv. *atropaciens* D13 вивчали *in vitro* методом агарових лунок. **Результати.** Комбінація продуктів метаболізму двох штамів лактобацил продемонструвала найвищий рівень пригнічення серед перевірених сумішей ($p \leq 0,05$) проти фітопатогенів *Rhizobium vitis* та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* з утворенням зон пригнічення з радіусом $7,2 \pm 0,4$ та $7,8 \pm 0,4$ мм. Антагоністична активність комбінації продуктів метаболізму бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 в більшості випадків не збільшувалася порівняно з активністю окремих штамів. Штам *E. italicus* ОНУ547 окремо не пригнічував ріст фітопатогенних бактерій. Антагоністична активність досліджених комбінацій статистично не відрізнялася проти *Rhizobium radiobacter* та *Erwinia carotovora*. **Висновки.** Всі досліджені суміші лактобактерій проявили різний рівень антагоністичної активності проти використаних в роботі фітопатогенних бактерій, що зумовлено дією органічних кислот, які вони продукують.

Ключові слова: антагоністична активність, метаболіти, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus italicus*.

Зростаюча стійкість фітопатогенів до існуючих хімічних препаратів повернула увагу вчених до проблеми боротьби з фітопатогенними бактеріями [1]. Однією з можливих альтернатив застосуванню хімікатів можуть бути молочнокислі бактерії (МКБ), які є перспективними агентами біоконтролю завдяки антагоністичній активності проти фітопатогенів, зумовлену продуктами метаболізму [1, 10]. Дійсно, в багатьох публікаціях показано антагоністичну активність різних МКБ проти різноманітних видів фітопатогенних бактерій, таких як *Erwinia carotovora*, *Rhizobium radiobacter*, *Pseudomonas syringae*,



Pseudomonas syringae, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, [1, 13, 14]. У той же час, відсутня інформація про антагоністичну активність сумісної дії метаболітів бактерій штамів *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus*. Бактеріоцини МКБ є перспективними антимікробними агентами та для виду МКБ *E. italicus* було показано продукцію бактеріоцинів [4].

Метою роботи було виявлення антагоністичної активності продуктів метаболізму бактерій штамів *Lactobacillus plantarum* та *Enterococcus italicus* ОНУ547 за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій *in vitro*.

Матеріали і методи

Вивчали антагоністичну активність бактерій штамів *E. italicus* ОНУ547, *Lactobacillus plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311, які були виділені з рослинного матеріалу в попередніх дослідженнях [9]. Як тест-штами використовували фітопатогенні бактерії *Rhizobium radiobacter* C58, *Rhizobium vitis* UA6, *Rhizobium rhizogenes* 15834, *Erwinia carotovora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* B-1109-УКМ, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511 та *P. syringae* pv. *atofaciens* D13. *P. syringae* pv. *syringae* та *P. syringae* pv. *atofaciens* є близькоспорідненими патоварами та збудниками дуже поширених захворювань пшениці бактеріальної етіології наслідками яких є зменшення врожаю [6, 7].

Антагоністичну активність визначали *in vitro* методом агарових лункок. Добові культури лактобактерій вирощували в MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) бульйоні [1] при 37 °С (*L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311 – до концентрації 10⁹ кл/мл, а *E. italicus* ОНУ547 – до 10⁸ кл/мл). Культуральні рідини стерилізували шляхом фільтрування (0,20 μm, Minisart®, Sartorius stedim biotech, Німеччина). Фільтрати змішували та отримували комбінації: *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311 (1:1), *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 (1:1), *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311 + *L. plantarum* ОНУ12 (1:1:1) та *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 (1:1).

Для приготування газонів фітопатогенних бактерій 200 мкл добової культури додавали до 20 мл розплавленого живильного агару (HiMedia, Індія) (1% індикатора), перемішували та вносили в чашку Петрі. В агарі вирізали лунки діаметром 8 мм та в отримані лунки вносили по 50 мкл фільтратів стерильної культуральної рідини. Для визначення природи антагоністичних речовин органічні кислоти нейтралізували за допомогою 1М NaOH та стерилізували як описано вище. У випадку використання тест-штамів бактерій роду *Pseudomonas* тестували також окремі вихідні та нейтралізовані фільтрати *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311. Контролем слугував стерильний MRS бульйон. Інкубацію проводили при 28 °С протягом ночі. На другий день відмічали наявність зони пригнічення росту та визначали її розмір [12]. Експерименти проводили в трьох повторах, статистичну обробку (середнє значення, стандартне відхилення, помилка середнього арифметичного) та побудову графіків виконували за допомогою програми Microsoft Office Excel. Для визначення статистичної достовірності використовували t-тест, різницю вважали достовірною при p≤0,05.



Результати та їх обговорення

Досліджені комбінації метаболітів штамів МКБ проявили антагоністичну активність проти всіх використаних в роботі штамів фітопатогенів. Так, штам фітопатогенних бактерій *R. radiobacter* C58 пригнічували продукти метаболізму всіх отриманих сумішей, що утворювали зони пригнічення з радіусами від $6,5 \pm 0,3$ до $7,7 \pm 0,3$ мм, та за рівнем антагонізму ці суміші статистично не відрізнялися між собою ($p > 0,05$) (рис. 1). Антагоністична активність суміші продуктів метаболізму двох штамів лактобацил також статистично не відрізнялася від такої, що продемонстрували окремі штами *L. plantarum* ОНУ311 та *L. plantarum* ОНУ12 в нашому попередньому дослідженні ($p > 0,05$) [2].

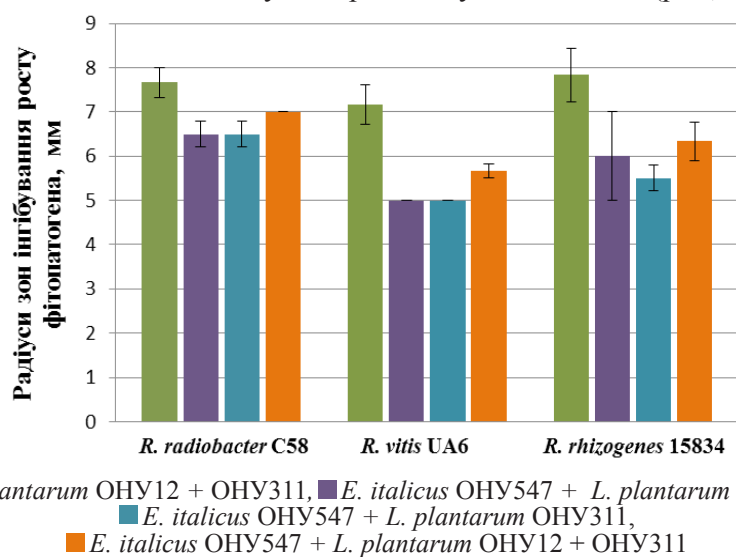


Рис. 1. Антагоністична активність комбінацій продуктів метаболізму бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311 та *E. italicus* ОНУ547 проти *R. radiobacter* C58, *R. vitis* UA6 та *R. rhizogenes* 15834

Fig. 1. Antagonistic activity of metabolic products combinations of bacterial strains *L. plantarum* ONU12, ONU311 and *E. italicus* ONU547 against *R. radiobacter* C58, *R. vitis* UA6 and *R. rhizogenes* 15834

Проти фітопатогену *R. vitis* UA6 найвища антагоністична активність ($p \leq 0,05$) в даних умовах експерименту виявлена для комбінації продуктів метаболізму бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 з утворенням зон затримки росту радіусом $7,2 \pm 0,4$ мм, що статистично не відрізняється від антагоністичної дії продуктів метаболізму окремих штамів *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311 [2]. Високу антагоністичну активність цієї суміші можна пояснити найнижчим значенням рН серед досліджених комбінацій, який складав 4,3, що в свою чергу може вказувати на найвищу концентрацію органічних кислот. Суміш усіх трьох штамів сприяла утворенню зон затримки росту з меншим радіусом ($5,7 \pm 0,2$ мм). Суміш *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 та *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311 показала меншу пригнічувальну активність ніж у комбінації штамів лактобацил.

Суміш метаболітів бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311



пригнічувала ріст *R. rhizogenes* 15834, утворюючи зони пригнічення росту фітопатогену з радіусом $7,8 \pm 0,6$ мм, що є вищим, ніж за комбінації *E. italicus* ONU547 + *L. plantarum* ONU311 ($5,5$ мм, $p \leq 0,05$) та статистично не відрізняється від *E. italicus* ONU547 + *L. plantarum* ONU12. Як і в випадку попередньої комбінації штамів, пригнічувальна активність комбінації продуктів метаболізму лактобацил статистично не відрізнялася від окремих штамів [2].

Комбінація продуктів метаболізму бактерій обох штамів лактобацил, при перевірці проти штаму *E. carotovora* ZM1 утворювала зони затримки росту з радіусом $6,2 \pm 0,6$ мм, тоді як суміш метаболітів двох штамів лактобацил та ентерокока – лише $5,3 \pm 0,3$ мм (рис. 2). Суміш метаболітів бактерій штамів лактобацил проявила антагонізм однакового рівня порівняно з дією окремих штамів *L. plantarum* ONU12 та ONU 311 [2]. Антагоністична активність сумішей *E. italicus* ONU547 окремо з *L. plantarum* ONU12 та ONU311 була однаковою ($4,7 \pm 0,7$ мм) та статистично не відрізнялася від суміші продуктів метаболізму решти комбінацій ($p > 0,05$).

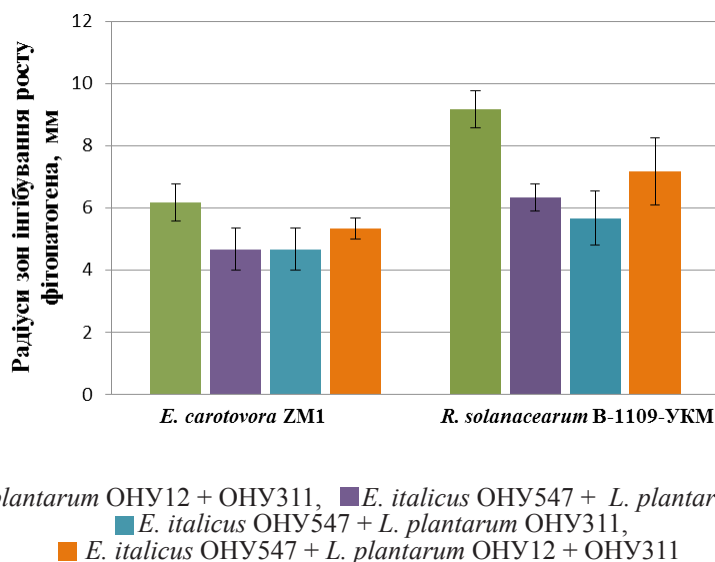


Рис. 2. Антагоністична активність комбінацій продуктів метаболізму бактерій штамів *L. plantarum* ONU12, ONU311 та *E. italicus* ONU547 проти *E. carotovora* ZM1 та *R. solanacearum* B-1109-УКМ

Fig. 2. Antagonistic activity of metabolic products combinations of bacterial strains *L. plantarum* ONU12, ONU311 and *E. italicus* ONU547 against *E. carotovora* ZM1 and *R. solanacearum* B-1109-UCM

Проти штаму *R. solanacearum* B-1109-УКМ антагоністичну активність проявила комбінація продуктів метаболізму двох штамів лактобацил *L. plantarum* ONU12 та ONU311 з радіусами зон пригнічення $9,2 \pm 0,6$ мм. Цей рівень пригнічення був вищим ($p \leq 0,05$), ніж за комбінацій *E. italicus* ONU547 + *L. plantarum* ONU12 та *E. italicus* ONU547 + *L. plantarum* ONU311, які утворювали зони пригнічення з радіусами $6,3 \pm 0,4$ та $5,7 \pm 0,9$ мм, відповідно. Антагоністична активність комбінації метаболітів двох штамів лактобацил статистично не відрізнялася від суміші всіх трьох штамів МКБ і окремого штаму



L. plantarum ОНУ311 та була дещо вищою від окремого штаму *L. plantarum* ОНУ12 [2].

Про антагоністичну активність бактерій окремих штамів *L. plantarum* ОНУ12 та ОНУ311 проти фітопатогенів *R. radiobacter* C58, *R. vitis* UA6, *R. rhizogenes* 15834, *E. carotovora* ZM1 та *R. solanacearum* B-1109-УКМ було повідомлено в нашій попередній роботі [2], тоді як пригнічувальні властивості їх сумішей *in vitro*, в тому числі з *E. italicus* ОНУ547, в цій роботі показано вперше.

Проти бактерій штаму *P. syringae* pv. *syringae* 8511 антагоністичну активність проявили метаболіти бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311, які пригнічували ріст фітопатогену з утворенням зон радіусом 7,8 мм (рис. 3). Це узгоджується з результатами Василюк та ін., 2014 та Visser та ін., 1986, які показали пригнічення цього фітопатогену *in vitro* бактеріями *L. plantarum* [1, 14]. Серед сумішей, найбільш ефективною ($p \leq 0,05$) виявилася комбінація продуктів метаболізму бактерій двох штамів *L. plantarum* ОНУ12 та *L. plantarum* ОНУ311, яка пригнічувала ріст *P. syringae* pv. *syringae* 8511 та утворювала зони з радіусом $7,8 \pm 0,4$ мм, хоча вона не відрізнялася від антагоністичної дії, що спричиняють окремі штами *L. plantarum*. Антагоністична активність комбінацій *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12, *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ311 та *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 + ОНУ311 була приблизно на однаковому рівні з утворенням зон пригнічення росту з радіусами $5,7 \pm 0,2$, $5,3 \pm 0,4$ та $6 \pm 0,5$ мм, відповідно.

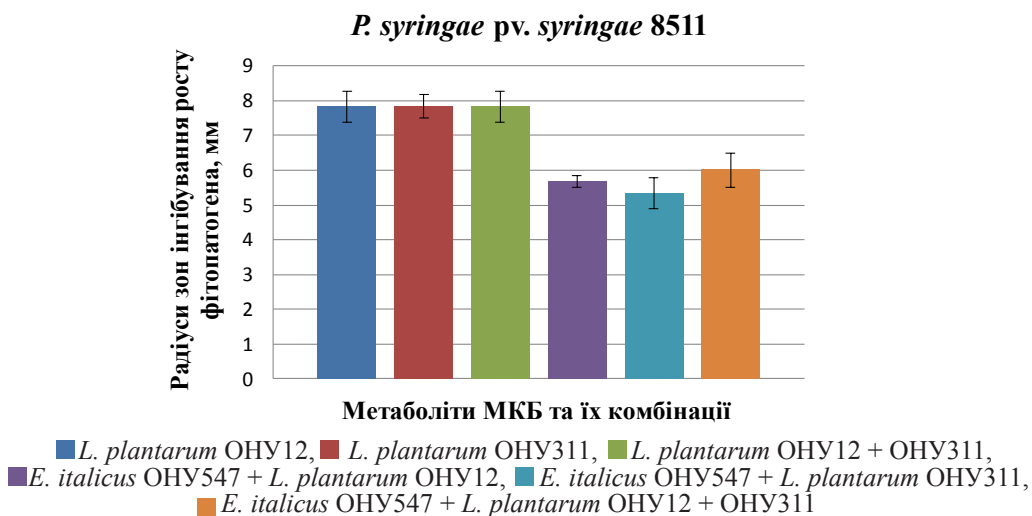


Рис. 3. Антагоністична активність метаболітів бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, *E. italicus* ОНУ547 та їх комбінацій проти *P. syringae* pv. *syringae* 8511

Fig. 3. Antagonistic activity of metabolic products of *L. plantarum* ONU12, ONU311, *E. italicus* ONU547 bacterial strains and their combinations against *P. syringae* pv. *syringae* 8511

Продукти метаболізму бактеріальних штамів *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311 та їх суміш виявили антагоністичну активність проти іншого штаму псевдомонад – *P. syringae* pv. *atrofaciens* D13 з радіусами зон

пригнічення $8,8 \pm 0,9$, $8,3 \pm 0,3$ та $8 \pm 0,5$ мм, відповідно (Рис. 4). Пригнічення сумішню метаболітів бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12 + *L. plantarum* ОНУ311 не відрізнялося за своїм рівнем від дії метаболітів окремих штамів лактобацил, комбінації метаболітів *E. italicus* ОНУ547 + *L. plantarum* ОНУ12 та від суміші метаболітів усіх трьох штамів ($p > 0,05$).

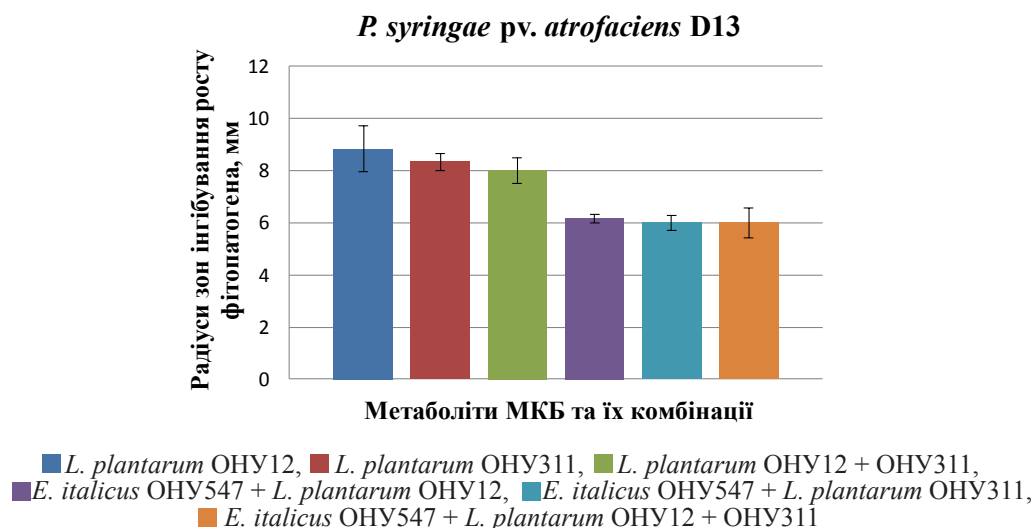


Рис. 4. Антагоністична активність метаболітів бактерій штамів *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, *E. italicus* ОНУ547 та їх комбінацій проти *P. syringae* pv. *atrofaciens* D13

Fig. 4. Antagonistic activity of metabolic products of *L. plantarum* ONU12, ONU311, *E. italicus* ONU547 bacterial strains and their combinations against *P. syringae* pv. *atrofaciens* D13

Дослідження культуральної рідини штамів *L. plantarum*, у яких вихідний рН 3,5–4,3 був доведений розчином NaOH до значень рН 7,0, не виявили антагоністичної активності до всіх досліджуваних індикаторних штамів. Такі результати вказують на те, що природою антагоністичних сполук є органічні кислоти. Як нейтралізовані так і кислі продукти метаболізму штаму *E. italicus* ОНУ547 не проявили антагоністичної активності при вивченні проти жодного використаного в роботі штаму індикатора. Це пояснюється незначною продукцією органічних кислот цим штамом. Дійсно, рН культурального середовища *E. italicus* ОНУ547 складав лише 5,0, що узгоджується з даними літератури про низьку продукцію органічних кислот ентерококами [3, 4, 5]. Хоча в наших попередніх дослідженнях для *E. italicus* ОНУ547 було показано здатність до продукції бактеріоцину, активного проти деяких грампозитивних бактерій, культуральна рідина цього штаму виявилася неактивною проти грамнегативних індикаторних штамів фітопатогенів, використаних у цьому дослідженні. Це узгоджується з даними літератури, згідно з якими бактеріоцини грампозитивних бактерій пригнічують лише бактерії, що мають грампозитивну клітинну стінку та є неактивними проти грамнегативних бактерій, що пояснюється присутністю в будові їх клітинних стінок зовнішньої цитоплазматичної мембрани, яка виконує бар'єрну функцію [8, 11].



Консорціуми молочнокислих бактерій з антагоністичною активністю проти фітопатогенних бактерій можуть бути використані як основа для розробки біологічних препаратів для захисту рослин у зв'язку з чим можна вважати перспективним подальше вивчення антагоністичних властивостей консорціумів цих штамів проти фітопатогенних бактерій в дослідах *in vivo* на рослинних моделях.

В результаті дослідження антагоністичної активності комбінацій метаболітів бактерій штамів *L. plantarum* та *E. italicus* ОНУ547 показано, що в дослідах *in vitro* всі суміші проявили антагоністичну активність проти ряду фітопатогенних бактерій. У більшості випадків пригнічувальна активність перевірених комбінацій метаболітів була на однаковому рівні з метаболітами окремих досліджуваних штамів. Показано, що антагоністична активність зумовлена дією органічних кислот.

Автори висловлюють подяку д.б.н., професору Патиці М.В. за люб'язно надані штами фітопатогенних псевдомонад.

А.Г. Мерлич, И.Д. Жунько, Н.В. Лиманская, В.А. Иваныця
Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина; тел.: +38 (0482) 68 79 64;
e-mail: andriymerlich@gmail.com

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* И *ENTEROCOCCUS ITALICUS* ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Цель. Выявление антагонистической активности продуктов метаболизма бактерий штаммов *Lactobacillus plantarum* и *Enterococcus italicus* ОНУ547 при совместном действии против фитопатогенных бактерий *in vitro*. **Методы.** Антагонистическую активность бактериальных штаммов *E. italicus* ОНУ547, *L. plantarum* ОНУ12 и *L. plantarum* ОНУ311 против фитопатогенных бактерий *Rhizobium radiobacter* C58, *Rhizobium vitis* UA6, *Rhizobium rhizogenes* 15834, *Erwinia carotovora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* B-1109-УКМ, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511 и *P. syringae* pv. *atropaciens* D13 изучали *in vitro* методом агаровых лунок. **Результаты.** Комбинация продуктов метаболизма двух штаммов лактобацилл проявила наивысший уровень угнетения среди проверенных смесей ($p \leq 0,05$) против фитопатогенов *Rhizobium vitis* и *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* с образованием зон угнетения с радиусом $7,2 \pm 0,4$ и $7,8 \pm 0,4$ мм. Антагонистическая активность комбинации продуктов метаболизма бактерий штаммов *L. plantarum* ОНУ12 и *L. plantarum* ОНУ311 в большинстве случаев не увеличивалась по сравнению с активностью отдельных штаммов. Штамм *E. italicus* ОНУ547 отдельно не угнетал рост фитопатогенных бактерий. Антагонистическая активность исследованных комбинаций статистически не отличалась против *Rhizobium radiobacter* и *Erwinia carotovora*.



Выводы. Все исследованные смеси лактобактерий проявили разный уровень антагонистической активности против использованных в работе фитопатогенных бактерий, что обусловлено действием органических кислот, которые они продуцируют.

Ключевые слова: антагонистическая активность, метаболиты, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus italicus*.

A.G. Merlich, I.D. Zhunko, N.V. Limanska, V.O. Ivanytsia
Odesa National Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine;
tel.:+38 (0482) 68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF METABOLIC PRODUCTS OF BACTERIA *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND *ENTEROCOCCUS ITALICUS* WITH JOINT ACTION AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

Summary

Aim. Detection of antagonistic activity of metabolic products of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus italicus* ONU547 bacterial strains with joint action against phytopathogenic bacteria in vitro. **Methods.** Antagonistic activity of bacterial strains of *E. italicus* ONU547, *L. plantarum* ONU12 and *L. plantarum* ONU311 against phytopathogenic bacteria *Rhizobium radiobacter* C58, *Rhizobium vitis* UA6, *Rhizobium rhizogenes* 15834, *Erwinia carotovora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* B-1109-УКМ, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* D13 was studied in vitro by the agar well diffusion method. **Results.** The combination of metabolic products of two lactobacilli strains showed the highest inhibition level among the tested mixtures ($p \leq 0,05$) against plant pathogens *Rhizobium vitis* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* with formation of inhibition zones with radius $7,2 \pm 0,4$ and $7,8 \pm 0,4$ mm. Antagonistic activity of metabolic products combinations of bacterial strains *L. plantarum* ONU12 and *L. plantarum* ONU311 was not increased compared with the activity of separated strains in most cases. The separated strain *E. italicus* ONU547 did not inhibit the growth of plant pathogenic bacteria. Antagonistic activity of the studied combinations was not statistically different against *Rhizobium radiobacter* and *Erwinia carotovora*. **Conclusions.** All of the tested lactobacteria mixtures showed antagonistic activity with different levels against phytopathogenic bacteria used in this work because of the activity of produced organic acids.

Key words: antagonistic activity, metabolic products, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus italicus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Василюк О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т. 76, № 3. – С. 24–30.



2. Мерліч А.Г., Ліманська Н.В. Антагоністична активність бактерій *Lactobacillus plantarum*, виділених з рослинних джерел України та Франції, проти фітопатогенних бактерій // Мікробіологія і Біотехнологія. – 2016. – № 4. – С. 71–85.

3. Andrighetto C., Knijff E., Lombardi A., Torriani S., Vancanneyt M., Kersters K., Swings J., Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses // Journal of Dairy Research. – 2001. – V. 68, № 2. – P. 303–316.

4. Gaaloul N., Braiek O. B., Berjeaud J. M., Arthur T., Cavera V. L., Chikindas M. L. Hani K. and Ghrairi T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN 10 strain isolated from tunisian bovine raw milk // Journal of Food Safety. – 2014. – P. 1–12.

5. Giraffa G. Functionality of Enterococci in dairy products // International Journal of Food Microbiology – 2003. – V. 88. – P. 215–222.

6. Iacobellis N.S., Figliuolo G., Janse J., Scortichini M., and Ciuffreda G. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Developments in Plant Pathology. – Kluwer Academic Publisher, 1997. – V. 9. – P. 500–504.

7. Kazempour M.N., Kheyrghoo M., Pedramfar H., and Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran // African Journal of Biotechnology. – 2010. – V. 9, № 20. – P. 2860–2865.

8. Martin-Visscher L.A., Yoganathan S., Sit C.S., Lohans C.T., Vederas J.C. The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment // FEMS Microbiology Letters. – 2011. – V. 317, № 2. – P. 152–159.

9. Merlich A.G., Ivanytsia V.O., Korotaeva N.V., Zlatogurska M.A., Vasylieva N.Yu., Babenko D.O., Limanska N.V. *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine // Microbiology and Biotechnology. – 2013, № 3. – P. 31–39.

10. Narasimha M., Malini M., Savitha J. and Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* // Pest Management in Horticultural Ecosystems. – 2012. – V. 18, № 1. – P. 60–65.

11. Stevens K.A., Sheldon B.W., Arlene Klapes N., Klaenhammer T.R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – V. 57, № 12. – P. 3613–3615.

12. Sumathi V. and Reetha D. Screening of Lactic Acid Bacteria for their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria // International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives. – 2012. – V. 3, № 4. – P. 802–808.

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

14. Visser R., Holzappel W.H., Bezuidenhout J.J., and Kotzé J.M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria // Applied and Environmental Microbiology. – 1986. – V. 52, № 3. – P. 552–555.



Reference

1. Vasyliuk OM, Kovalenko NK, Garmasheva IL. Antagonistic properties of strains of *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional fermented products of Ukraine. *Journal of Microbiology*. 2014; (76):24 – 30 (In Ukrainian).
2. Merlich AG, Limanska NV. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum*, isolated from plant sources of Ukraine and France, against phytopathogenic bacteria. *Microbiology and Biotechnology*. 2016; (4):71 – 85 (In Ukrainian).
3. Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torriani S, Vancanneyt M, Kersters K, Swings J, Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *Journal of Dairy Research*. 2001;(68):303 – 316.
4. Gaaloul N, Braiek OB, Berjeaud JM, Arthur T, Cavera VL, Chikindas ML, Hani K and Ghrairi T. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN 10 strain isolated from tunisian bovine raw milk. *Journal of Food Safety*. 2014;1 - 12.
5. Giraffa G. Functionality of Enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;(88):215 – 222.
6. Iacobellis NS, Figliuolo G, Janse J, Scortichini M, and Ciuffreda G. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*. In: *Developments in Plant Pathology*. Eds Rudolph K et al. Kluwer Academic Publisher, 1997: 500 – 504.
7. Kazempour MN, Kheyrghoo M, Pedramfar H, and Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2010; (20): 2860 – 2865.
8. Martin-Visscher LA, Yoganathan S, Sit CS, Lohans CT, Vederas JC. The activity of bacteriocins from *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307 against gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;(317):152 - 159.
9. Merlich AG, Ivanytsia VO, Korotaeva NV, Zlatogurska MA, Vasylieva NYu, Babenko DO, Limanska NV. *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine. *Microbiology and Biotechnology*. 2013;(3):31-39.
10. Narasimha M, Malini M, Savitha J and Srinivas C. Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*. 2012;(18):60-65.
11. Stevens KA, Sheldon BW, Arlene Klapes N, Klaenhammer TR. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991;(57):3613 - 3615.
12. Sumathi V and Reetha D. Screening of Lactic Acid Bacteria for their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2012;(3):802 - 808.
13. Trias R, Baneras L, Montesinos E, Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. *International Microbiology*. 2008;(11):231 - 236.
14. Visser R, Holzapfel WH, Bezuidenhout JJ, and Kotzé JM. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986;(52):552 - 555.

Стаття надійшла до редакції 07.09.2017 р.



**О.М. Волощук¹, Ю.В. Короткий², О.А. Смертенко²,
С.Л. Рибалко³, Ю.І. Порва⁴, В.П. Широбоков¹**

¹Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Т. Шевченка, 13, Київ, 01004, Україна, e-mail: nauka@ntmu.edu.ua;

²Інститут органічної хімії НАН України, вул. Мурманська, 5, Київ, 02660, Україна, e-mail: iochkiiev@ukrpack.net;

³Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського, вул. Миколи Амосова, 5, Київ, 03038, Україна, e-mail: epidemics@ukr.net

⁴ТОВ «Український лікувально-діагностичний центр», вул. Микільсько-Слобідська, 6-Д, оф. 6, Київ, 02002, тел./факс: +38044 492-3483, e-mail: lab@uldc.com.ua

АНТИВІРУСНА ДІЯ ПОХІДНИХ АМІНОПРОПАНОЛУ-2 НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МОДЕЛІ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ С

Мета роботи – дослідити антивірусну дію нових сполук амінопропанолу-2 до вірусу бичачої вірусної діареї (BVDV) та в експериментальній продукувальній моделі вірусу гепатиту С (HCV). **Матеріали і методи.** Антивірусну дію визначали у 7 похідних амінопропанолу-2, серед яких: норборніл вмісна речовина (сполука 51), речовина з циклічним замісником в алкоксигрупі (сполука 48), та речовини з аліциклическими замісниками в алкоксигрупі (сполуки 46, 47, 49, 50 і 52). Оцінку антивірусної дії досліджуваних речовин проводили *in vitro* за показниками їх хіміотерапевтичних індексів (ХТІ) та методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в експериментальній продукувальній моделі HCV. **Результати.** Встановлено, що сполуки 50 і 52 пригнічують репродукцію BVDV на $2 \lg ID_{50}$ в концентраціях 3,125 і 6,25 мкг/мл відповідно та мають високі показники ХТІ, що характеризує ці речовини як ефективні пригнічувачі репродукції BVDV. Антивірусну дію сполуки 50 було підтверджено за даними ПЛР на моделі продукувальної культури HCV та показано дозозалежний вплив цієї речовини на репродукцію вірусу гепатиту С. **Висновки.** Серед досліджених похідних амінопропанолу-2 в групі речовин з аліциклическими замісниками в алкоксигрупі ідентифіковано сполуку з вираженими противірусними властивостями: 1-трет-бутоксигрупа-3-(2,2,6,6-тетраметил-4-гідрокси-піперидино)-2-пропанол (речовина 50). Отримані результати можуть бути використані для цілеспрямованого синтезу активних молекул з заданими властивостями та будуть корисними при вивченні закономірних взаємозв'язків «структура-активність».

Ключові слова: похідні амінопропанолу-2, антивірусна дія, експериментальна модель вірусу гепатиту С.

Інфекції з парентеральним механізмом передачі, до яких належить і гепатит С (HCV), становлять серйозну медичну та соціальну проблему. HCV-інфекція небезпечна для людини у зв'язку із хронічним перебігом і можливим розвитком цирозу печінки та гепатоцелюлярної карциноми [11].

© О.М. Волощук¹, Ю.В. Короткий², О.А. Смертенко², С.Л. Рибалко³, Ю.І. Порва⁴, В.П. Широбоков¹



За оцінками експертів ВООЗ, в нашій Державі спостерігається одна з найбільших епідемій у Європі, – більше 3% населення України інфіковано HCV, це приблизно 1,3 млн людей [9]. Загалом, у світі на хронічний гепатит С страждає близько 150 млн осіб, а 350 тисяч щорічно помирає внаслідок вище зазначених тяжких захворювань печінки, спричинених даним вірусом. Захворюваність та летальність внаслідок гепатиту С прогресивно збільшується на планеті та, за даними експертів, подвоїться до 2015–2020 рр. [10].

До недавнього часу HCV-інфекція вважалася невиліковною, а її терапія в основному проводилася препаратами інтерферону (ІФН), які при тривалому застосуванні спричинювали негативні побічні ефекти на організм, а ефективність такої терапії складала 48% [9]. Вже декілька років, з появою препаратів прямої дії на HCV, ця інфекція може бути виліковна. Сьогодні у світі традиційну схему лікування вірусного гепатиту С замінюють безінтерфероною терапією з використанням новітніх препаратів прямої противірусної дії (наприклад, софосбувір, ледіпасвір), завдяки чому курс лікування триває всього 3 місяці, а шанси остаточно вилікуватися зростають до 90% [8]. Нагальна потреба таких препаратів, з одного боку, обмежена їх кількістю, з іншого, спонукає дослідників до подальшого пошуку активних сполук стосовно вірусу гепатиту С.

Одними з перспективних в фармакологічному плані для одержання високоактивних сполук є аміноспирти: два реакційні центри дозволяють легко модифікувати ці речовини різноманітними формакофорами з одержанням великої кількості похідних. Різноманітна біологічна активність аміноспиртів та продуктів їх заміщення по аміно- та гідроксильним групам [1] дає підстави розглядати ці сполуки, як джерело отримання високоактивних молекул.

Метою нашої роботи було дослідити антивірусну дію нових сполук амінопропанолу-2 до *BVDV* та в експериментальній продукувальній моделі HCV.

Матеріали і методи

Синтезовані сполуки. Було досліджено сім сполук амінопропанолу-2, серед яких: одна сполука з норборнілом в алкоксигрупі та амінним радикалом 2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидином (№ 51); одна сполука з циклопентилом в алкоксигрупі та амінним радикалом 2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидином (48); та п'ять речовин з аліциклічними замісниками в алкоксигрупі (46, 47, 49, 50 і 52). Сполука 46 мала аліциклічний замісник 3-метил-1-пентин та амінний радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидин. У сполук 47 та 49 з однаковим аліциклічним замісником третамілом амінні радикали були 2,6,-діметил-піперидин та 2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидин відповідно. У сполук 50 та 52 з однаковим амінним радикалом 2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидином були аліциклічні замісники трет-бутил та 2-метил-3-бутен відповідно. Ці сполуки були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України за розробленими методиками [2]. Сполуки являють собою безбарвні кристалічні речовини без запаху, у різному ступені розчинні у воді та 96% спирті. Матричний розчин сполук з концентрацією 1 мг/мл робили в середовищі для культур клітин без сироватки і стерилізували за допомогою нітроцелюлозного фільтру з діаметром пор 0,22 мкм. До використання розчин зберігали в стерильних пробірках при -20 °С.



Вірус та культура клітин. Відомо, що для вірусу гепатиту С ще не знайдено культур клітин, в яких вони здатні розмножуватися. Тому, як модель вірусу гепатиту С, в наших дослідженнях ми використали споріднений до нього вірус бичачої вірусної діареї (*BVDV*). Обидва ці віруси належать до однієї родини *Flaviviridae* та мають дуже близьку молекулярно-генетичну структуру, їх геном складається із одного позитивного ланцюга РНК [7]. Вірусний матеріал *BVDV* на четвертому пасажі був наданий Державним науково-дослідним інститутом з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи у місті Києві. В дослідженні також, використали чутливі до *BVDV* перещеплювані культури клітин *MDBK* (клітини нирки теляти *Madin Darbi*), одержані з колекції музею культур тканин Інституту вірусології імені Д.І. Івановського (РАМН, Москва). Клітини вирощували в 96-лункових плашках (Nunclon, Surface, Данія) в ростовому живильному середовищі, яке готували на основі середовища RPMI-1640 з додаванням 10% ембріональної сироватки (Sigma, США), пеніциліну 100 Од/мл та стрептоміцину 100 мкг/мл («Артеріум», Україна). Середовище підтримки (СП) росту було аналогічного складу без додавання сироватки. Інфекційний титр вірусу після десяти проведених пасажів в культурі клітини *MDBK* складав 6-7 lg ID₅₀. Розрахунок інфекційного титру вірусу проводили за методом Кербера [4] і виражали в логарифмах 50% цитотоксичної дози (lg ID₅₀).

Також, в дослідженні була використана експериментальна продукувальна модель вірусу гепатиту С, а саме культура клітин МТ-4, отримана методом трансфекції кДНК *HCV*, синтезованої на РНК, виділеної із крові хворих на гепатит С [3]. Для виділення РНК використовували комплект реагентів «РИБО-сорб» (ФДУН «ЦНДІЕ», Росія), додаючи до проб сироватки лізуючий розчин і сорбент згідно з інструкцією фірми-виробника. Для отримання кДНК *HCV* проводили реакцію зворотної транскрипції РНК, виділеної на попередньому етапі, із застосуванням комплекту реагентів «Реверта-Л» (ФДУН «ЦНДІЕ», Росія), де реакційна суміш містила DDT ліофілізований, розчин RT-mix та ревертазу MMLv. Трансфекцію культур суспензійних клітин МТ-4 проводили кальцій-фосфатним методом. Трансфеговані культури інкубували при температурі 37 °С з подачею 5% CO₂ та на другому і п'ятому пасажах проводили тестування щодо здатності продукувати вірус гепатиту С. Кількість РНК *HCV*, або вірусне навантаження в культурі клітин МТ-4, визначали методом ПЛР в режимі «реального часу» з використанням реагентів «АмпліСенс HCV-Монітор-FRT» (ФДУН «ЦНДІЕ», Росія) та приладу Rotor-Gen 3000/6000 («Corbett Research», Австралія).

Вірусологічні дослідження in vitro. Антивірусну дію досліджуваних сполук до *BVDV* оцінювали за показниками їх хіміотерапевтичних індексів (ХТІ), які визначали за співвідношенням максимально толерантної дози (МТД) до мінімально активної концентрації (МАК) речовин, у відповідності до методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України [5]. МТД визначали наступним шляхом: суспензію клітин *MDBK* у ростовому живильному середовищі у посівній концентрації 5x10⁵ кл/мл вносили у лунки 96-лункового планшету і вирощували в термостаті у присутності 5% CO₂ при 37 °С. Через 48 годин після утворення суцільного моношару клітин



ростове середовище із лунок планшету повністю видаляли. На сформовані клітинні моношари (по 10 для кожної концентрації) наносили по 200 мкл різних концентрацій досліджуваних речовин, отриманих шляхом послідовних розведень сполук у СП, де передбачувальна кількість активної речовини відповідала концентраціям: 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 мкг/мл. Максимальне розведення речовин, яке не спричинювало цитопатичної дії (ЦПД) в жодному з оброблених ними клітинних моношарів впродовж 72 годин експозиції за даними прижиттєвого цитологічного дослідження відповідало значенню МТD.

МАК сполук визначали мікрметодом за зниженням інфекційного титру *BVDV* в культурі клітин *MDBK*. З цією метою культуру клітин обробляли різними концентраціями речовин і через 30 хвилин додавали *BVDV* у дозі 100 ТЦД₅₀/0,1 мл. Діапазон досліджуваних концентрацій становив від 0,78 мкг/мл до 12,5 мкг/мл. На кожну концентрацію речовини використовували три лунки з культурою клітин. Оброблені клітини інкубували в термостаті з подачею 5% CO₂ при 37 °С до специфічної ЦПД в контролі вірусу, після чого порівняльно визначали інфекційний титр вірусу в культуральному середовищі різних розведень сполук і в контролі. Різниця інфекційних титрів в досліді порівняно з контролем давала змогу встановити МАК речовин.

Визначення антивірусної дії досліджуваних сполук в трансфорованій культурі клітин МТ-4 проводили наступним чином. Досліджувані речовини у певних концентраціях додавали до трансфорованої культури клітин МТ-4 на першу та третю добу від початку експерименту, після чого методом ПЛР визначали вірусне навантаження (в геном/еквівалент на об'єм аналіту) РНК *HCV* в досліді і контролі та робили висновок про ефективність пригнічення репродукції *HCV*. На кожну концентрацію речовини використовували не менше, ніж 3 лунки. Вірусне навантаження відповідало середньому значенню з трьох дослідів. Оскільки вірусне навантаження відображає інфекційний титр вірусу, визначення ефективності пригнічення проводили за формулою для підрахунку зниження врожаю вірусу [5]:

(К – Д): $K \times 100 = \% \text{ зниження врожаю вірусу}$, де

К – вірусне навантаження в контролі;

Д – вірусне навантаження в досліді.

Результати та їх обговорення

Критерієм первинної оцінки в системах *in vitro* антивірусної активності речовин є ХТІ. Для його визначення необхідно встановити МТD та МАК сполук. З огляду на те, що як сурогатний вірус гепатиту С в дослідженні використали вірус бичачої вірусної діареї (*BVDV*), МТD визначали в чутливій до нього перещеплюваній культурі клітин *MDBK* за описаними вище методиками [5]. Згідно отриманих результатів сполуки 48, 49, 50 та 52 не спричинили цитопатичної дії на культуру клітин *MDBK* у всіх досліджених концентраціях, в той час, як речовини 51 та 47 викликали такий ефект на культуру клітин *MDBK* в концентрації 12,5 мкг/мл. Визначені показники МТD для сполук 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 наведені в таблиці 1.



Таблиця 1

Максимально толерантні дози похідних амінопропанолу-2 в культурі клітин *MDBK*

Table 1

Maximum tolerate doses of aminopropanol-2 derivatives in *MDBK* cells culture

сполука	наявність ЦПД в лунках при відповідних концентраціях сполук					
	100 мкг/мл	50 мкг/мл	25 мкг/мл	12,5 мкг/мл	6,25 мкг/мл	3,125 мкг/мл
51	10/10	10/10	10/10	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
46	10/10	-	-	-	-	-
47	10/10	10/10	10/10	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-
Контроль клітин	-	-	-	-	-	-

Примітка: 51 – норборніл вмісна сполука; 48 – сполука з циклічним замісником в алкоксигрупі; 46, 47, 49, 50, 52 – сполуки з аліциклічними замісниками в алкоксигрупі.

Note: 51 – norbornyl-containing substance; № 48 – substance with a cyclic substituent in the alkoxy group; 46, 47, 49, 50 and 52 – substances with alicyclic substituents in the alkoxy group.

Визначення концентрацій речовин, які пригнічують репродукцію *BVDV* порівняно з контролем, дало змогу встановити показники МАК досліджуваних сполук (табл. 2).

Таблиця 2

Репродукція *BVDV* (інфекційний титр в $\lg ID_{50}$) під впливом похідних амінопропанолу-2

Table 2

BVDV reproduction (infection titer in $\lg ID_{50}$) under the action of aminopropanol-2 derivatives

Розведення	Концентрація, мкг/мл	сполука						
		46	47	48	49	50	51	52
1:80	12,5	6,0	-	5,0	5,0	4,0	-	4,0
1:160	6,25	6,0	6,0	4,0	5,0	5,0	2,0	4,0
1:320	3,125	6,0	6,0	5,0	5,0	4,0	4,0	5,0
1:640	1,56	6,0	6,0	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0
1:1280	0,78		6,0	-	-	-	5,0	-
Контроль вірусу	-	6,0	6,0	4,0	6,0	6,0	6,0	6,0



У відповідності до методичних рекомендацій [5] перспективними для подальших досліджень є сполуки, для яких показник МАК відповідає концентрації речовини, що знижує інфекційний титр вірусу на $1,25-2 \lg ID_{50}$ порівняно з титром вірусу в контролі без додавання сполуки. Відповідно до отриманих результатів, сполуки 50 та 51 зменшують інфекційний титр вірусу на $2,0 \lg ID_{50}$ в концентраціях 3,125 мкг/мл, а речовина 52 – в концентрації 6,25 мкг/мл. Також, із наведених в таблиці 2 даних видно, що речовини 46, 47, 48 та 49 у всіх досліджених концентраціях не призводять до зниження інфекційного титру вірусу *BVDV* в межах $1,25-2,0 \lg ID_{50}$.

При первинному відборі потенційних антивірусних засобів вираховують ХТІ сполуки, який визначають при порівнянні цитотоксичності сполуки та її антивірусної дії. Перспективними є сполуки, які проявляють виражену антивірусну активність у концентраціях, вже нетоксичних для клітин. Речовини, величина ХТІ яких дорівнює 16, або вище, і які знижують титр інфекційного вірусу за умов одноциклового дослідження на $1,25-2,0 \lg TID_{50}$, вважаються високоактивними та перспективними для подальшого дослідження на тваринах [5].

Визначені в попередніх дослідженнях показники МТД та МАК дозволили встановити ХТІ сполук 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 по відношенню до *BVDV* (табл. 3).

Таблиця 3

Хіміотерапевтичні індекси похідних амінопропанолу-2 по відношенню до *BVDV*

Table 3

Chemical therapeutic indexes for aminopropanol-2 derivatives in relation to *BVDV*

Сполуки	МТД, мкг/мл	МАК, мкг/мл	ХТІ
46	50,0	0	-
47	12,5	0	-
48	<100	0	-
49	<100	0	-
50	<100	3,125	32
51	12,5	3,125	4
52	<100	6,25	16

Відповідно до показників ХТІ, наведених в таблиці 3, серед усіх досліджених похідних амінопропанолу-2 тільки сполуки 50, 51 і 52 виявляють антивірусну дію до сурогатного вірусу *HCV*: вони пригнічують репродукцію *BVDV* в концентраціях від 3,125 до 6,25 мкг/мл. Найактивнішими виявилися речовини 50 та 52, ХТІ яких дорівнював 32 і 16, відповідно. За хімічною структурою речовини 50 і 52 споріднені: вони містять однаковий амінний фрагмент (2,2,6,6-тетраметил-4-оксипіперидин), але аліциклічні замісники в алкоксигрупі у них різні: трет-бутил (у речовини 50) і 2-метил-3 бутин (у речовини 52). З огляду на спорідненість хімічної структури сполук 50 та 52, для вивчення антивірусної активності в експериментальній продукувальній моделі вірусу гепатиту С, а саме в культурах клітин МТ-4, було обрано сполуку з найвищим показником ХТІ за результатами попереднього дослідження.



Це речовина 50 (1-трет-бутоксид-3-(2,2,6,6-тетраметил-4-гідроксипіперидино)-2-пропанол), ХТІ якої виявився найбільшим і становив 32. Антивірусна активність сполуки 50 в експериментальній продукувальній моделі вірусу гепатиту С, визначалася наступним чином. Сполуку 50 у концентраціях 20 мкг/мл та 25 мкг/мл (в 5 та 4 рази нижчих за МПК відповідно) додавали до трансфекованої культури клітини МТ-4 на першу та третю добу від початку експерименту. Контрольні продукувальні клітини культивували без додавання досліджуваної речовини відповідно до варіанту дослідження. По закінченні терміну впливу методом ПЛР визначали вірусне навантаження (геном/еквівалент на об'єм аналізу) РНК *HCV* в досліді і контролі та обчислювали ефективність пригнічення репродукції *HCV*. Результати цих досліджень представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

Вплив 1-третбутоксид-3-(2,2,6,6-тетраметил-4-гідроксипіперидино)-2-пропанолу на репродукцію *HCV* в культурі клітин МТ-4

Table 4

Influence of 1-tret-butoxy-3-(2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidino)-2-propanol on *HCV* reproduction in MT-4 cells culture

Варіант дослідження	Термін введення (доба)	Концентрація (мкг/мл)	Вірусне навантаження, геном/екв	пригнічення, %
HCV+сполука 50	1	25	1092	44,6
	1	20	1346	32
	3	25	-	100
	3	20	287	80
Контроль HCV	1	-	1971	-
	3	-	1430	-

При інтерпретації показників, наведених в таблиці 4, брали до уваги, що процент пригнічення <40% свідчить про відсутність антивірусної дії сполуки, процент пригнічення >40% демонструє наявність антивірусної дії речовини, а у разі, якщо процент пригнічення >60% – сполука вважається активною [5]. Із даних, наведених в таблиці 4, видно, що сполука 50 пригнічує репродукцію *HCV* за даними ПЛР вірусного навантаження РНК *HCV* в геном/еквівалент при одноразовому введенні на 32% в концентрації 20 мкг/мл та на 44,6% в концентрації 25 мкг/мл. Тобто, в такому варіанті експерименту сполука 50 проявляє антивірусну дію лише в концентрації 25 мкг/мл. В той час, як повторне введення речовини на третю добу експерименту демонструє антивірусну активність сполуки в обох концентраціях. Згідно з отриманими результатами, сполука 50 у дозі 20 мкг/мл на третю добу знижувала вірусне навантаження *HCV* на 80%, а у дозі 25 мкг/мл – на 100%, тобто повністю гальмувала репродукцію *HCV*.

В результаті вивчення антивірусної дії нових сполук амінопропанолу-2 знайдена речовина 1-трет-бутоксид-3-(2,2,6,6-тетраметил-4-гідроксипіперидино)-2-пропанол (сполука 50), яка ефективно пригнічує репродукцію сурогатного вірусу гепатиту С (*BVDV*) та має високий ХТІ до нього [6].



Антивірусну дію сполуки 50 було підтверджено на моделі продукувальної культури *HCV* та показано дозозалежний вплив цієї речовини на репродукцію вірусу гепатиту С.

Отримані результати в подальшому можуть бути використані для створення ліків антивірусної дії та для цілеспрямованого синтезу активних молекул з заданими властивостями.

**Е.М. Волощук¹, Ю. В. Короткий², Е.А.Смертенко²,
С. Л. Рыбалко³, Ю.І. Порва⁴, В. П. Ширококов¹**

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, бульвар Т. Шевченка, 13, Киев, 01004, Украина, e-mail: nauka@nmu.edu.ua;

²Институт органической химии НАН Украины, ул. Мурманская, 5, Киев, 02660, Украина, e-mail: iochkiev@ukrpack.net;

³Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского, ул. Николая Амосова, 5, Киев, 03038, Украина, e-mail: epidemics@ukr.net

⁴ТОВ «Український лічобно-діагностический центр», ул. Никольско-Слободская, 6-Д, оф. 6, Киев, 02002, тел. / Факс: +38044 492-3483, e-mail: lab@uldc.com.ua

АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОПРОПАНОЛА-2 НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Реферат

Цель работы – изучить антивирусное действие новых соединений аминопропанола-2 к вирусу бычьей вирусной диареи (BVDV) и в экспериментальной продуцирующей модели вируса гепатита С (HCV). **Материалы и методы.** Антивирусное действие определяли у 7 производных аминопропанола-2, среди которых: норборнил содержащее вещество (соединение 51), вещество с циклическим заместителем в алкоксигруппе (соединение 48), и вещества с алициклическими заместителями в алкоксигруппе (соединения 46, 47, 49, 50 и 52). Оценку антивирусной активности исследуемых веществ проводили *in vitro* по показателям их химиотерапевтических индексов (ХТИ) и методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в экспериментальной продуцирующей модели HCV. **Результаты.** Установлено, что соединения 50 и 52 подавляют репродукцию BVDV на $2 \lg ID_{50}$ в концентрациях 3,125 и 6,25 мкг/мл соответственно и имеют высокие показатели ХТИ, что характеризует эти вещества как эффективные ингибиторы репродукции BVDV. Антивирусное действие соединения 50 было подтверждено данными ПЦР на модели продуцируемой культуры HCV и показано дозозависимое действие этого вещества на репродукцию вируса гепатита С. **Выводы.** Среди исследованных производных аминопропанола-2 в группе веществ с алициклическими заместителями в алкоксигруппе выявлено соединение с выраженными антивирусными свойствами: 1 третбутоксн-3-(2,2,6,6-тетраметил-4-гидроксиперидино)-2-пропанол (вещество № 50). Полученные результаты могут быть использованы для целенаправленного синтеза активных молекул с заданными свойствами и будут полезны при изучении закономерных взаимосвязей «структура-активность».

Ключевые слова: производные аминопропанола-2, антивирусное действие, тест-модель вирусного гепатита С.



**O.M. Voloshchuk¹, Yu.V. Korotkiy², O.A. Smertenko²,
S.L. Rybalko³, Yu.I. Porva⁴, V.P. Shyrobokov¹**

¹O.O. Bohomolets National Medical University Ministry of Health of Ukraine, 13, T. Shevchenka Boulevard, Kyiv, 1004, Ukraine, e-mail: nauka@nmu.edu.ua;

²Institute of Organic Chemistry of ANS Ukraine, 5, Murmanska Str., Kyiv, 02660, Ukraine, e-mail: iochkiev@ukrpack.net;

³SI «L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of AMS Ukraine», 5, Amosova Str., Kyiv, 03038, Ukraine, e-mail: epidemics@ukr.net

⁴TOV "Ukrainian Medical and Diagnostic Center", 6-D, Nikolsko-Slobidska str., of. 6, Kyiv, 02002, tel./fax: +38044 492-3483, e-mail: lab@uldc.com.ua

ANTIVIRAL ACTION OF AMINOPROPANOL-2 DERIVATIVES ON THE EXPERIMENTAL MODELS OF HEPATITIS C VIRUS

Summary

Aim. The purpose of the work is to investigate the antiviral action of new aminopropanol-2 compounds against bovine viral diarrhea virus (BVDV) and on the experimental hepatitis C virus (HCV) production model. **Materials and methods.** Antiviral activity was determined in 7 aminopropanol-2 derivatives, among which there were: norbornyl-containing substance (compound № 51), a substance with a cyclic substituent in the alkoxy group (compound № 48), and the substances with alicyclic substituents in the alkoxy group (compounds №№ 46, 47, 49, 50 and 52). The evaluation of antiviral effect of the studied substances was conducted in vitro according to their chemo-therapeutic indices (HTI) and polymerase chain reaction (PCR) in the experimental HCV model. **Results.** It was found that compounds №№ 50 and 52 had high HTI and inhibited the reproduction of BVDV by 2 lg ID₅₀ at concentrations of 3,125 and 6.25 µg/ml, respectively, that characterizes these substances as the effective BVDV reproduction inhibitors. The antiviral activity of compound № 50 was confirmed by PCR data on the experimental hepatitis C virus (HCV) production model. There were also shown the dose-dependent effect of this substance on the reproduction of hepatitis C virus. **Conclusions.** Among the investigated aminopropanol-2 derivatives there were identified a compound with pronounced antiviral properties. This is 1-tret-butoxy-3-(2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidino)-2-propanol (substance №50) which belongs to the group of substances with alicyclic substituents in the alkoxy group. The obtained results can be used for a purposeful synthesis of active molecules with given properties and will be useful in studying the relationships of "structure-activity".

Key words: aminopropanol-2 derivatives, antiviral action, test-model of viral hepatitis C.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Касьян Л.И., Пальчиков В.А. Аминоспирты с каркасными фрагментами. Синтез, реакции и пути использования // Журн. Органической химии. – 2010. – Т. 46, (вып.1). – С. 7–43
2. Короткий Ю.В., Вринчану Н.О., Дронова М.Л., Суворова З.С., Смертенко О.А. Синтез, антибактеріальна та антифунгальна активність похідних 1|4 (1,1,3,3, тетраметилбутил) фенокси |3 діалкіламіно 2 пропанолу // Фармацевтичний журнал. – 2015. – № 1. – С. 56–62.



3. Порва Ю.И., Рыбалко С.Л., Дядюн С.Т., Завелевич М.П., Боровиков В.М., Старосила Д.Б., Алексеенко И.П., Дерабин О.Н. Культивирование вируса гепатита С с использованием метода трансфекции // Лабораторная диагностика. – 2010. – 1(51). – С. 20–23.

4. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита / ВОЗ Женева, Москва 2005, 114 с.

5. Стефанов А.В. (ред.) Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. – Київ: Авіцена, 2001. – С. 371–396.

6. Патент України на корисну модель № 91886. МПК C07C 213/04 (2006.01). 1-трет-бутоксид-3-(2,2,6,6-тетраметил-4-гідрокси піперидино)-2-пропанол / Короткий Ю.В., Волощук О.М., Рыбалко С.В., Порва Ю.І., Смертенко О.А., Ширококов В.П. (Україна). – № 91886; заявл. 07.11.2013; опубл. 25.07.2014, Бюл. № 14.

7. Buckwold V.E., Beer B.E., Donis R.O. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents // Antiviral Res. – 2003. – V. 60, № 1. – P. 1–15.

8. Dhingra A., Kapoor S., Alqahtani S.A. Recent advances in the treatment of hepatitis C // Discov. Med. – 2014. – V. 18(99). – P. 203–208.

9. Dragomiretskaya N., Izha A., Kalinichenko N., et al. Use of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. // Open Medicine. – 2015. – V. 10(1). – P. 209–215.

10. Hope V.D., Eramova I., Capurro D., Donoghoe M.C. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association // Epidemiol. Infect. – 2014. – V. 142, № 2. – P. 270–286.

11. Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. // Hepatology. – 2013. – V. 57, № 4. – P. 1333–1342.

References

1. Kasjan LI, Palchikov VA. Amino-alcohols with carcass fragments. Synthesis, reactions and ways of using. J. Org. Chem. 2010;46(1):7-43.

2. Korotkiy YuV, Vrinchanu NO, Dronova ML, Suvorova ZS, Smertenko OA. Synthesis, antibacterial and antifungal activity of derivatives of 1-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy)propan-2-ol. Pharm. J. 2015;1:56-62.

3. Porva YuI, Rybalko SL, Dyadyun ST, Zavelevich MP, Borovikov VM, Starosila DB, Alekseenko IP, Derabin ON. Hepatitis C virus cultivation with using the transfection method. Laboratory diagnostics. 2010;1(51):20-23.

4. Guidelines of virological polio research. WHO Geneva, Moscow. 2005:114.

5. Stefanov AV (eds.). Pre-clinical research of medicines. Method. Recommendations. Kyiv, 2001:371-396.

6. Patent of Ukraine N 91886. MBI C07C 213/04 (2006.01). 1-tret-butoksi-3-(2,2,6,6-tetrametil-4-gidroksipiperidino)-2-propanol. Korotkiy YuV, Voloshchuk OM, Rybalko SV, Porva YuI, Smertenko OA. Shirbokov VP (UA). - N 91886; заявл. 07.11.2013; опубл. 25.07.2014, Бюл. N 14



7. Buckwold VE, Beer BE, Donis RO. Bovine viral diarrhea virus as a surrogate model of hepatitis C virus for the evaluation of antiviral agents. *Antiviral Res.* 2003;60(1):1-15.

8. Dhingra A, Kapoor S, Alqahtani SA. Recent advances in the treatment of hepatitis C. *Discov. Med.* 2014 Oct;18(99):203-8.

9. Dragomiretskaya N, Izha A, Kalinichenko N, et al. Use of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Open Medicine.* 2015;10(1):209-215.

10. Hope VD, Eramova I, Capurro D, Donoghoe MC. Prevalence and estimation of hepatitis B and C infections in the WHO European Region: a review of data focusing on the countries outside the European Union and the European Free Trade Association. *Epidemiol. Infect.* 2014;142(2):270-286.

11. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013;57(4):1333-1342.

Стаття надійшла до редакції 30.06.2017 р.



УДК 579.695

**О.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач,
Т.О. Беляєва, І.П. Конуп**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна;
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

ВИЛУЧЕННЯ CU (II) З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ІММОБІЛІЗОВАНИМИ КЛІТИНАМИ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Мета. Розробити спосіб очищення води від Cu (II) з використанням бактерій роду *Pseudomonas*, іммобілізованих на природних сорбентах. **Методи.** Для проведення досліджень використовували непатогенні штами бактерій *P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329. Вміст Cu (II) у воді визначали атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі "Сатурн" у полум'ї суміші "повітря – пропан – бутан" за довжини хвилі для Cu (II) 324,7 нм. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Office Excel 2003» із визначенням *t*-критерію Стьюдента. **Результати.** Експериментально встановлено, що передочищення води від Cu (II) з концентрацією 50 мг/дм³ у присутності асоціації бактерій *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327, іммобілізованих на бентонітовій глині та хітозані, знижувало концентрацію йонів міді на 70–75%, що відповідало залишковій концентрації міді 15,0–12,5 мг/дм³. Після глибокого доочищення води від Cu (II) іммобілізованими у складі біофлокул бактеріями (за присутності перекису водню і хлориду кальцію залишковий вміст Cu (II) складав 0,10±0,008 мг/дм³, що не перевищувало норму ГДК у воді водойм санітарно-побутового водокористування (0,1 мг/дм³) та у воді для скидання в каналізаційну систему. **Висновок.** Розроблений спосіб глибокого очищення води від Cu (II) з використанням бактерій роду *Pseudomonas*, іммобілізованих на природних сорбентах (глині та хітозані) та у складі біофлокул, дозволяє зменшити вміст йонів міді з 50 мг/дм³ до 0,10±0,008 мг/дм³ та скидати очищену воду в каналізаційну систему.

Ключові слова: очищення води, Cu (II), *Pseudomonas*, бентонітова глина, хітозан.

Широке застосування міді в промисловості зумовлено її високою електропровідністю, пластичністю, доброю корозійною стійкістю, теплопровідністю, ливарними властивостями. Повсюдне використання міді та її сполук неминуче призводить до потрапляння Cu (II) у водне середовище [7]. Гранично допустима концентрація (ГДК) йонів міді у воді водойм санітарно-побутового водокористування складає 0,1 мг/дм³ (лімітуюча ознака шкідливості – загальносанітарна), у воді рибогосподарських водойм – 0,001 мг/дм³.

© О.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп



Тому на сьогодні вилучення міді (II), що відноситься до важких металів I класу небезпеки, є важливим науково-технічним та екологічним завданням.

Очищення води від токсичних забруднень, зокрема від йонів міді, може бути проведено хімічним, фізико-хімічним, електрохімічним способами. Однак, вони дорогі, громіздкі та не завжди забезпечують високий рівень очищення [5].

Підвищення вимог до якості води та допустимих концентрацій забруднень в промислових металовмісних стічних водах, які скидаються у водойми, змушує шукати нові, екологічно чисті та економічно вигідні способи вилучення з них йонів важких металів, зокрема Cu (II). До таких методів, можна віднести сорбцію на різних сорбентах, в тому числі хімічно або біологічно модифікованих [12]. Для очищення промислових металовмісних стічних вод часто застосовують синтетичні полімерні катіоніти, окислені синтетичні полімери, вуглецеві [4] та інші природні сорбенти [6, 13, 14].

На сьогоднішній день детоксикація води, що забруднена йонами важких металів, зокрема Cu (II), біосорбентами є альтернативою більш дорогим і менш ефективним фізико-хімічним технологіям, здійснення яких потребує громіздкого складного обладнання і певних витрат електроенергії [8, 9, 11, 15].

Мета дослідження – розробити спосіб очищення води від Cu (II) з використанням бактерій роду *Pseudomonas*, іммобілізованих на природних сорбентах.

Матеріали та методи

Для проведення досліджень використовували непатогенні штами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. ceracia* ONU327 (виділений із ґрунту), *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (виділені з морської води), що зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Як природні сорбенти застосовували бентонітову глину і хітозан медичного призначення, складений з 15% хітину раків і 85% хітозану. Бентонітові глини мають шарувату структуру, складаються із мінералів монтмориллонітової групи зі змінним складом $\text{Si}_8\text{Al}_4\text{O}_{20}(\text{OH})_4\frac{1}{2}n\text{H}_2\text{O}$, в яких катіони кремнію (Si^{4+}) можуть замінюватися катіонами Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} і т.д. Частинки глинистих мінералів набухають у воді і характеризуються підвищеною катіонообмінною здатністю [6].

На природних сорбентах – бентонітовій глині і хітозані здійснювали іммобілізацію бактеріальної асоціації, складеної із штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327 (1:1:1 за об'ємом). Попередньо бактерії культивували при температурі 28 °C, pH 7, у живильному середовищі М-9, що містило (г/л): KH_2PO_4 – 1,5; Na_2HPO_4 – 3; NaCl – 5; NH_4Cl – 1; пептон – 10; глюкоза – 2; дріжджовий екстракт – 5. Нарощування біомаси здійснювали протягом 48 год до досягнення щільності культур не менш 5 г/л по сухій біомасі, після чого бактеріальною асоціацією модифікували природні сорбенти. Іммобілізацію бактерій на природних носіях здійснювали шляхом змішування сорбентів (4 г) з суспензією (100 мл) життєздатних бактерій, яка містила 1×10^9 кл/мл, та витримування 60 хв.



Вміст Cu (II) у воді визначали атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі "Сатурн" у полум'ї суміші "повітря – пропан – бутан" за довжини хвилі для Cu (II) 324,7 нм.

Експерименти здійснювали в п'яти повторах. Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Office Excel 2003» із визначенням *t*-критерію Стьюдента. Статистично вірогідною вважали різницю при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

З метою попередження потрапляння високонебезпечних йонів важких металів, зокрема Cu (II), у навколишнє середовище в місцях скидання металовмісних промстоків проведено комплекс досліджень, спрямованих на розробку ефективного способу очищення води від йонів міді з використанням іммобілізованих клітин асоціації непатогенних бактерій роду *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329). Розроблена схема очищення води від Cu (II) представлена на рис. 1.

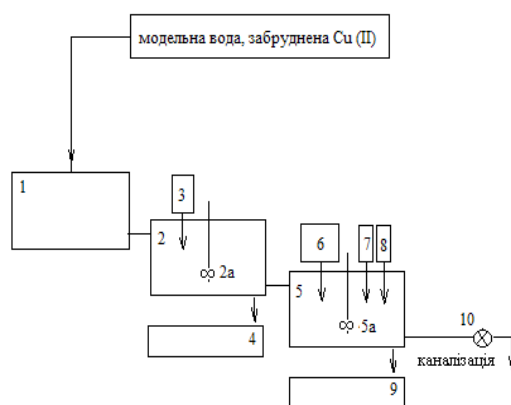


Рис. 1. Схема способу очищення водних розчинів від Cu (II) з використанням іммобілізованих бактерій роду *Pseudomonas*

Fig. 1. Scheme of a method of purifying of aqueous solutions from Cu (II) using immobilized bacteria of the genus *Pseudomonas*

Модельну воду, що не містила після відстоювання (відстійник (1)) механічних домішок, спрямовували у резервуар (2) з перемішувачем (2а), де відбувалася стадія передочищення води від Cu (II) з концентрацією 50 мг/дм³. Перемішування здійснювали протягом 30 хв у присутності природних сорбентів – бентонітової глини та хітозану з іммобілізованими бактеріями, що вводили із ємності (3) у кількості з розрахунку 2 г суміші сорбентів (1:1 за масою) на 1 л забрудненої води. Після відстоювання (30 хв) у резервуарі (2) вода від міді (II) очищувалася на 70–75%, що відповідало залишковій концентрації міді 15,0–12,5 мг/дм³. Далі для доочищення воду направляли у резервуар (5) з перемішувачем (5а), куди вводили із ємності (6) бактеріальну асоціацію. Із дозаторів (7, 8) для утворення біофлокул вводили 3%-ий розчин перекису водню (3 мл H₂O₂/1л) і 10%-ний розчин хлориду кальцію (50 мл CaCl₂/1л), що приводили до зшивання між собою екзополіцукридних



комплексів бактеріальних клітин та супроводжувалося різким зростанням адсорбційної ємності.

На виході з системи (10) залишковий вміст Cu (II) у обробленій воді складав $0,10 \pm 0,008$ мг/дм³, що не перевищувало норму ГДК у воді водойм санітарно-побутового водокористування (0,1 мг/дм³) та у воді для скидання її в каналізаційну систему (0,1 мг/дм³).

Після кожної біосорбційної обробки води із резервуарів (2) і (5) осади, що містили Cu (II) та біомасу з непатогенних штамів бактерій та їх метаболітів, збирали у відстійниках (4) і (9). Утворені осади можуть бути використані у подальших циклах очищення води.

Результати по очищенню модельних водних розчинів від йонів міді вільними та іммобілізованими клітинами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 і їх асоціацією представлені на рис. 2. Встановлено, що при введенні у водний розчин міді (CuSO₄) суспензій бактерій *Pseudomonas* до концентрації мікробних клітин 1×10^9 кл·мл⁻¹ ступінь вилучення Cu (II) був невисоким і коливався в межах від 20 до 28% (залежно від використаного штаму). Так, за дії штаму *P. fluorescens* ONU328 та асоціації штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 (1:1:1) концентрація Cu (II) в розчині зменшувалася з 15,0 мг/дм³ до $12,0 \pm 1,85$ мг/дм³ і $9,75 \pm 1,57$ мг/дм³, відповідно, за ступеня очищення від Cu (II) 28% і 35% (рис. 2А).

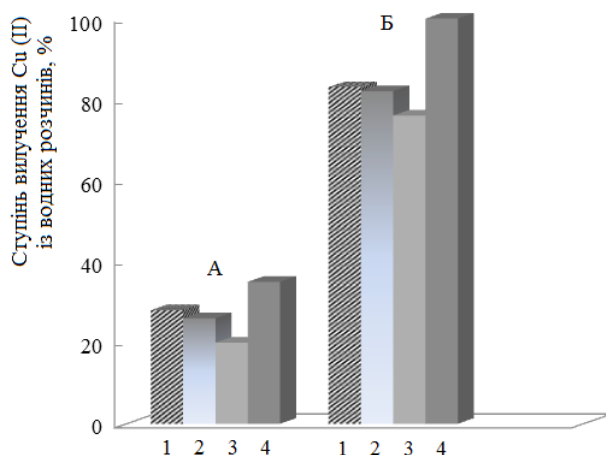


Рис. 2. Ступінь вилучення Cu (II) із водних розчинів за дії штамів бактерій роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328 (1), *P. maltophilia* ONU329 (2), *P. cepacia* ONU327 (3) та їх асоціації (4) у вільному (А) та іммобілізованому складі біофлокул (Б) станах. Примітка: вихідна концентрація Cu (II) – 15 мг/дм³; 10^{-6} моль/л H₂O₂; 0,046 моль/л CaCl₂.

Fig. 2. Degree of extraction of Cu (II) from aqueous solutions by strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU328 (1), *P. maltophilia* ONU329 (2), *P. cepacia* ONU327 (3) and their associations (4) in free (A) and immobilized in the composition of biofloculs (B) states.

Note: the initial concentration of Cu (II) is 15 mg/dm³; 10^{-6} mol/l H₂O₂; 0.046 mol/l CaCl₂.

За мікробіологічного очищення водних розчинів від Cu (II) за відсутності хімічних реагентів (H₂O₂, CaCl₂) агрегація бактерій протікала повільно (від 60 до 90 хв) і відбувалася за участі поліцукридних комплексів

клітинних стінок. Експериментально доведено, що під впливом хімічних реагентів у 2–3 рази пришвидшувався процес утворення у воді бактеріальних агрегатів. При цьому різко збільшувалася загальна адсорбційна ємність системи і, відповідно, ефективність очищення водних розчинів від Cu (II). За оптимально встановлених концентрацій реагентів: H_2O_2 – 10^{-6} моль/л, CaCl_2 – 0,046 моль/л, ступінь вилучення Cu (II) іммобілізованими у складі біофлокул клітинами бактерій роду *Pseudomonas* підвищувався у 3 рази порівняно з обробкою Cu-вмісних розчинів вільними клітинами цих бактерій, та варіював від 76% (за дії штаму *P. cepacia* ONU327) до 83% (за дії штаму *P. fluorescens* ONU328) при залишковій концентрації Cu (II) відповідно $3,6 \pm 0,52$ мг/дм³ і $2,55 \pm 0,44$ мг/дм³. Із досліджуваних штамів бактерій найбільш активним біосорбентом і біоаккумулятором йонів міді є бактерії штаму *P. fluorescens* ONU328. Його комбінування із штамми *P. maltophilia* ONU329 і *P. cepacia* ONU327 в об'ємному співвідношенні 1:1:1 супроводжувалося синергетичною дією відносно сорбції йонів міді. Ступінь вилучення Cu (II) іммобілізованими у складі біофлокул клітинами бактеріальної асоціації був максимальним 99,9%, залишкова концентрація йонів міді в розчині була $0,10 \pm 0,008$ мг/дм³.

Основною перевагою розробленого способу на основі іммобілізованих на природних сорбентах і у складі біофлокул непатогенних бактерій роду *Pseudomonas* є висока ефективність при очищенні водних розчинів від Cu (II), простота здійснення, екобезпека.

Раніше нами було встановлено, що бактеріальна асоціація *P. cepacia* ONU327 *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 (1:1:1 за об'ємом) володіє поліфункціональною здатністю: сорбційно-аккумулятивною щодо йонів важких металів як в катіонній [Pb(II), Zn(II), Cd(II)], так і в аніонній формах [Cr(VI)] [1–3, 16], і деструктивною щодо органічних сполук [10].

Унікальні біотехнологічні властивості бактеріальної асоціації дозволяють рекомендувати використовувати її для очищення багатоконпонентних стічних вод підприємств металообробної промисловості, мідь-вмісних водних технологічних розчинів гальванічних цехів та стічних вод за умов їх забруднення неорганічними (йони важких металів) і органічними (нафтопродукти, поверхнево-активні речовини, фенольні сполуки) поліюгантами.

Таким чином, розроблений спосіб глибокого очищення води від Cu (II) з використанням бактерій роду *Pseudomonas*, іммобілізованих на природних сорбентах (глині та хітозані) та у складі біофлокул, що дозволяє зменшити вміст йонів міді з 50 мг/дм³ до $0,10 \pm 0,008$ мг/дм³ та скидати очищену воду в каналізаційну систему.

**Е.Г. Горшкова, Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач,
Т.А. Беляева, И.П. Конуп**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина;
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

ВЫДЕЛЕНИЕ Cu (II) ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS



Реферат

Цель. Разработать способ очистки воды от Cu (II) с использованием бактерий рода *Pseudomonas*, иммобилизованных на природных сорбентах. **Методы.** Для проведения исследований использовали непатогенные штаммы бактерий *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329. Содержание Cu (II) в воде определяли атомно-абсорбционным методом на пламенном атомно-абсорбционном спектрофотометре "Сатурн" в пламени смеси "воздух - пропан - бутан" при длине волны для Cu (II) 324,7 нм. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2003» с определением *t*-критерия Стьюдента. **Результаты.** Экспериментально установлено, что предочистка воды от Cu (II) с концентрацией 50 мг/дм³ в присутствии ассоциации бактерий *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. ceracia* ONU327, иммобилизованных на бентонитовой глине и хитозане, снижало концентрацию ионов меди на 70–75%, что соответствовало остаточной концентрации меди 15,0–12,5 мг/дм³. После глубокой доочистки воды от Cu (II) иммобилизованными в составе биофлокул бактериями (в присутствии перекиси водорода и хлорида кальция остаточное содержание Cu (II) составляло 0,10±0,008 мг/дм³, не превышало норму ПДК в воде водоемов санитарно-бытового водопользования (0,1 мг/дм³) и в воде для сброса в канализационную систему. **Вывод.** Разработанный способ глубокой очистки воды от Cu (II) с использованием бактерий рода *Pseudomonas*, иммобилизованных на природных сорбентах (глине и хитозане) и в составе биофлокул, позволяет уменьшить содержание ионов меди с 50 мг/дм³ до 0,10±0,008 мг/дм³ и сбрасывать очищенную воду в канализационную систему.

Ключевые слова: очистка воды, Cu (II), *Pseudomonas*, бентонитовая глина, хитозан.

**O.G. Gorshkova, T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach,
T.O. Beliaeva, I.P. Konup**

Odesa National I.I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine;
tel.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

ISOLATION OF CU (II) FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY IMMOBILIZED BACTERIAL CELLS OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*

Summary

Aim. To develop a method for purifying water from Cu (II) using bacteria of the genus *Pseudomonas* immobilized on natural sorbents. **Methods.** For research use nonpathogenic bacterial strains *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329. The content of Cu (II) in water was determined by atomic absorption method for flame atomic absorption spectrophotometer "Saturn" in the flame of a mixture of "air - propane - butan" at the wavelength for Cu (II) 324,7 nm statistical processing results of research conducted by using the computer program "Microsoft Office Excel 2003" with the definition of Student's *t*-test. **Results.** It was experimentally established that the water purification from Cu (II) at a concentration of 50 mg/dm³ in the presence of the association of bacteria



P. fluorescens ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 immobilized on bentonite clay and chitosan reduced the concentration of copper ions by 70–75%, which corresponded to a residual copper concentration of 15.0–12.5 mg/dm³. After deep purification of water from Cu (II) by immobilized bacteria in the composition of the bioflocs (in the presence of hydrogen peroxide and calcium chloride, the residual content of Cu (II) was 0.10 ± 0.008 mg/dm³, did not exceed the maximum allowable concentration in water of the sanitary-household water use (0.1 mg/dm³) and in water for discharge into the sewage system. **Conclusion.** The developed method for deep water purification from Cu (II) using bacteria of the genus *Pseudomonas* immobilized on natural sorbents (clay and chitosan) and in the composition of bioflocs allows to reduce the content of copper ions from 50 mg/dm³ to 0.10±0.008 mg/dm³ and discharge clean water into the sewage system.

Key words: water purification, Cu (II), *Pseudomonas*, bentonite clay, chitosan.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О., Волювач О.В. Очищення води від хрому (VI) за присутністю мікроорганізмів // *Science Rise*. – 2015. – № 9/4 (14). – С. 57 – 60. – DOI: 10.15587/2313-8416.2015.50645
2. Горшкова О.Г., Волювач О.В. Біологічний спосіб очищення води від цинку (II) // *Science Rise*. – 2015. – № 10/6 (15). – С. 11–13. DOI: 10.15587/2313-8416.2015.51665
3. Гудзенко Т.В., Пузирьова І.В., Беляева Т.О., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Вилучення кадмію з водних розчинів природними сорбентами з іммобілізованими бактеріями роду *Pseudomonas* // *Проблеми екологічної біотехнології* – № 2. – 2013. – С. 1–11.
4. Ознобихин Л.М., Дударев В.И. Использование нефтяных коксов для получения углеродных адсорбентов // *Химия твердого топлива*. – 1999. – № 2. – С. 25–32.
5. Скрылев Л.Д., Сазонова В.Ф. Коллоидно-химические основы защиты окружающей среды от ионов тяжелых металлов. Ионная флотация. – Киев: УМКВО, 1992. – 215 с.
6. Тарасевич Ю.И., Овчаренко Ф.Д. Адсорбция на глинистых минералах. – Киев: Наукова думка, 1975. – 351 с.
7. Филов В.А. Вредные вещества в окружающей среде. Справочник. – СПб.: ПНО “Профессионал”, 2005. – 462 с.
8. Шулаев М.В. Научные основы обезвреживания и жидких отходов гальванических и металло-обрабатывающих производств с использованием анаэробной биосорбционной технологии: Автореф. дис. ...д-ра. техн. наук. Казань, 2009. – 23 с.
9. Cojocaru C., Diaconu M., Cretescu J., Savie J., Vasic V. Biosorption of copper (II) ions from aqua solution using dried yeast biomass // *Colloids and Surfaces. A.: Physiochem. Eng. Aspects*. – 2009. – 335. – P. 181–188. – DOI: 10.1026/j.colsurfa.2008.11.003



10. Gudzenko T.V., Voliuvach O.V., Belyaeva T.O., Puzyreva I.V., Lisyutin G.V., Gorshkova O.G., Ivanytsia V.O. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus // *Microbiology&Biotechnology*. – 2013. – 24, № 4. – P. 72–80.

11. Vasquez TGP., Botero AEC., LMS de Mesquita, Torem M.L. Biosorptive removal of Cd and Zn from liquid streams with a *Rhodococcus opacus* strain // *Miner. Eng.* – 2007. – 20, № 9. – P. 939–944. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.02.072

12. Wang J., Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and future // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – 27, № 2. – P. 195–226. – DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.002

13. Патент України №7782. Спосіб очищення природних та стічних вод від катіонів полівалентних металів / Ступін О.Б., Жерякова Г.І., Манько К.І. – №7782; опубл.: 2005. Бюл. №7.

14. Патент України №37251. Спосіб очищення природних та стічних вод від катіонів міді і свинцю / Жерякова Г.І., Ступін О.Б., Сухарева С.П. – №37251; опубл. 2008. Бюл. №22.

15. Патент України №58979А. Спосіб очищення стічних вод від іонів міді / Гулий І.С., Горобець С.В., Горобець О.Ю., Гойко І.Ю., Касаткіна Т.П. – №58979А; опубл.: 2003. Бюл. №8.

16. Патент України на корисну модель №106378. Спосіб мікробіологічної очистки розчинів від іонів свинцю / Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Конуп І.П. – №106378; опубл.: 2016. Бюл. № 8.

References

1. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Ivanytsia VO, Voliuvach OV. Purification of water from chromium (VI) in the presence of microorganisms. *Science Rise*. 2015;9/4(14):57–60. DOI: 10.15587/2313-8416.2015.50645

2. Gorshkova OG, Voliuvach OV. Biological method of water purification from zinc (II). *Science Rise*. 2015;10/6(15):11-13. DOI: 10.15587/2313-8416.2015.51665

3. Gudzenko TV, Puzyreva IV, Belyaeva TO, Voliuvach OV, Gorshkova OG, Ivanytsia VO. Isolation of cadmium from aqueous solutions by natural sorbents with immobilized bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Problems of environmental biotechnology. Problemy ekologichnoi' biotekhnologii'*. 2013;2:1–11.

4. Oznohin LM, Dudarev VI. Use of petroleum cokes to produce carbon adsorbents. *Himija tverdogo topliva*. 1999;2:25–32.

5. Skrylev LD, Sazonova VF. *Kolloidno-himicheskie osnovy zashhity okruzhajushhej sredy ot ionov tjazhelyh metallov. Ionnaja flotacija*. – Kiev: UMKVO, 1992. 215.

6. Tarasevich JuI, Ovcharenko FD. *Adsorbicija na glinistyh mineralah*. – Kiev: Nauk. dumka, 1975. 35.

7. Filov VA. *Vrednye veshhestva v okruzhajushhej srede. Spravochnik*. – SPb.: PNO “Professional“, 2005. 462.



8. Shulaev MV. Scientific foundations of neutralization and liquid wastes of galvanic and metal-processing industries using anaerobic biosorption technology. PhD thesis, Kazan, 2009: 23.
9. Cojocaru C, Diaconu M, Cretescu J, Savie J, Vasic V. Biosorption of copper (II) ions from aqua solution using dried yeast biomass. *Colloids and Surfaces. A.: Physiochem. Eng. Aspects.* 2009;335:181–188. DOI: 10.1026/j.colsurfa.2008.11.003
10. Gudzenko TV, Voliuvach OV, Belyaeva TO, Puzyreva IV, Lisyutin GV, Gorshkova OG, Ivanytsia VO. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus. *Microbiology&Biotechnology.* 2013;4 (24):72–80.
11. Vasquez TGP, Botero AEC, LMS de Mesquita, Torem ML. Biosorptive removal of Cd and Zn from liquid streams with a *Rhodococcus opacus* strain. *Miner. Eng.* 2007;9(20):939–944. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.02.072
12. Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and future. *Biotechnol. Adv.*2009;2(27):195–226. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.002
13. Patent of Ukraine №7782. Method of purification of natural and sewage from cations of polyvalent metals. Stupin OB, Zheryakova GI., Manko KI. – №7782; opubl.: 2005, Byul. N 7.
14. Patent of Ukraine №37251. Method of purifying natural and sewage from cations of copper and lead. Zheryakova GI, Stupin OB, Sukhareva SP.– №37251; opubl.: 2008, Byul. N 22.
15. Patent of Ukraine №58979A. Method of treating sewage from copper ions. Guli IS, Gorobets SV, Gorobets OYu, Goyko IYu, Kasatkina T.P. – №58979A; opubl.: 2003, Byul. N 8.
16. Patent of Ukraine №106378. Method for microbiological purification of solutions from lead ions. Ivanytsia VO, Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Belyaeva TO, Konup IP. (UA). – №106378; opubl.: 2016, Byul. N 8.

Стаття надійшла до редакції 12.09.2017 р.



Л.О. Максименко, О.І. Балко, О.Б. Балко

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38 (044) 526 94 24; e-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ КАРОТОВОРИЦІНИ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*

Мета. Вивчення властивостей низькомолекулярних бактеріоцинів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4. **Методи.** Низькомолекулярні каротоворицини отримували індукцією налідиксовою кислотою із 13 штамів *Pectobacterium carotovorum*, концентрували висоловлюванням сульфатом амонію, розділяли ультрацентрифугованням, додаткову очистку проводили на ДЕАЕ-сефарозі. Активність отриманих каротоворицинів перевіряли на *Pectobacterium carotovorum* б6А, а також *Escherichia coli* ВЕ, К12 і С600. Для досліджуваних речовин визначали молекулярну масу та перевіряли серологічну спорідненість із піоцинами S1-S5 підтипу. **Результати.** Отримані низькомолекулярні каротоворицини відрізнялися за рівнем та спектром кілерної активності відносно індикаторних штамів, проте найвищу активність проявляли щодо *E. coli* ВЕ. Було показано, що до складу сумарної фракції каротоворицинів штаму *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4 входять білки 30, 38, 42 і 54 кДа. При подальшій очистці було виділено єдиний активний компонент з молекулярною масою 54 кДа, який впливав лише на *E. coli* ВЕ. Перевірка гомології досліджуваного каротоворицину із піоцинами S1-S5 підтипів показала відсутність серологічної спорідненості. **Висновки.** Досліджуваний бактеріоцин *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4 з молекулярною масою 54 кДа за виявленими властивостями не відповідає жодному із описаних на даний момент бактеріоцинів і може бути новим представником низькомолекулярних каротоворицинів. Відсутність серологічної спорідненості із низькомолекулярними піоцинами S підтипу і активність виключно щодо штаму *E. coli* ВЕ можуть вказувати на гомологію даного білка із коліцинами.

Ключові слова: *Pectobacterium carotovorum*, низькомолекулярні каротоворицини, серологічна спорідненість, піоцини, коліцини.

Зростання антибіотикорезистентності збудників гнійно-запальних захворювань, необхідність впровадження екологічно безпечних препаратів для контролю за поширенням фітопатогенних бактерій та очистки природних ресурсів від мікробної контамінації розглядаються як пріоритетні проблеми сьогодення [10, 14]. В основу їх вирішення може бути покладено використання нових речовин з антимікробною активністю [11]. Одними із найбільш поширених чинників мікробного антагонізму вважаються бактеріоцини [10].



Відомо, що фітопатогенні бактерії *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* при лізогенній індукції здатні виділяти високо- та низькомолекулярні бактеріоцини (каротоворицини, кароцини) [4, 5]. В роботах вітчизняних вчених дані речовини позначають як «каротоворицини» [4], а закордонні дослідники вживають термін «кароцини» [7, 8, 15]. Високомолекулярні каротоворицини є аналогами фагових хвостових відростків, тоді як низькомолекулярні – це протеазочутливі білки, які не седиментують при ультрацентрифугуванні, не візуалізуються при електронній мікроскопії, здатні вільно дифундувати в агаризованому середовищі [4, 8]. В проведених раніше дослідженнях встановлено, що окремі низькомолекулярні бактеріоцини *P. carotovorum* характеризуються вузьким спектром активності [6]. Виявлена особливість є нетиповою для зазначених бактеріоцинів і потребує подальшого дослідження.

Тому, метою даної роботи було вивчення властивостей низькомолекулярних бактеріоцинів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були каротоворицини, які синтезуються фітопатогенними бактеріями *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, виділеними із різних регіонів [3] (табл. 1).

Таблиця 1

Штами *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, продуценти каротоворицинів

Table 1

***Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains, producers of carotovoricins**

Штам	Джерело виділення
J2 (NCPPB 1744)	<i>Daucus sativus</i> Roehl, Японія
Б1	<i>Solanum tuberosum</i> L., Черкаська обл., Україна
Б3, Б4, Б13, Б15	<i>Solanum tuberosum</i> L., Київська обл., с. Новосілки, Україна
Б2, Б11, Б12, Б16, Б17, Б23	<i>Solanum tuberosum</i> L., Київська обл., м. Васильків, Україна
Б26	<i>Solanum tuberosum</i> L., Вінницька обл., с. Сокольці, Україна

Культури-продуцентів вирощували в середовищі М9, індукцію та отримання бактеріоцинів проводили відповідно до загальноприйнятих методик [5, 6].

Концентрування каротоворицинів здійснювали методом висолювання сульфатом амонію, який вносили в 0,1 М розчин NaCl до 50% насичення в лізати штамів *P. carotovorum*. Отриманий преципітат осаджували центрифугуванням при 10 тис. g протягом 30 хв. Осад ресуспендували в 1 мл А-буферу [5] із 20 мМ MgSO₄, обробляли РНК-азою і ДНК-азою (Thermoscientific) (по 1 мкг/мл) при 37 °С протягом 30 хв, після чого доводили 0,05 М натрій фосфатним буфером (рН 7,2) до необхідного об'єму (3 мл).

Розділення суміші концентрованих бактеріоцинів об'ємом 3 мл проводили за допомогою ультрацентрифугування при 120 тис g протягом 4 год на центрифугі Beckman (ротор SW-40) в 8 мл 5–20% градієнті сахарози, який містив 20% етанолу в 0,01 М трис-НCl буфері (рН 7,2). Для подальших досліджень відбирали верхні шари отриманого градієнта об'ємом 5–6 мл,



які містили низькомолекулярні каротоворицини. Додаткову очистку відібраних бактеріоцинів здійснювали методом колонкової хроматографії на ДЕА-Е-сефарозі [6]. Для цього використовували колонку 40×15 мм, яку зрівноважували 30 мл 0,05 М натрій фосфатного буферу (рН 7,2). На колонку наносили зразок концентрованих низькомолекулярних каротоворицинів об'ємом 2 мл. Елюцію проводили ступеневим градієнтом за допомогою 0,1 М; 0,2 М та 0,3 М розчинів NaCl по 6 мл і відбирали фракції об'ємом 2 мл. Активні фракції об'єднували і використовували для подальших досліджень.

Для перевірки кілерної активності низькомолекулярних каротоворицинів застосовували фракції, розділені за допомогою ультрацентрифугування та колонкової хроматографії. Дослідження проводили стандартними методами [6], як індикаторні штами використовували *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 66A, а також *Escherichia coli* BE, K12 і С600.

Електрофоретичне розділення білків низькомолекулярних бактеріоцинів *P. carotovorum* проводили за методом Laemmli [12], як маркери застосовували суміш білків фірми Pharmacia: фосфорилаза – 94000 Да, альбумін – 67000 Да, овальбумін – 43000 Да, карбонік-ангідраза – 30000 Да, трипсин-інгібітор – 20100 Да, лактоальбумін – 14400 Да. Дослідження гомології каротоворицинів і піоцинів здійснювали за стандартною методикою по Оухтерлоні [13]. Для визначення серологічної спорідненості використовували піоцини, отримані із 5 колекційних штамів *Pseudomonas aeruginosa* (УКМ, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України) відповідно до описаних раніше методів [2]. Належність піоцинів до відповідного підтипу встановлювали за допомогою ПЛР із підібраними праймерами за стандартною методикою [9].

Результати та їх обговорення

На початковому етапі роботи проводили дослідження кілерної активності низькомолекулярних каротоворицинів, виділених із 13 штамів *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* J2 та Б1-Б26, щодо індикаторних культур *P. carotovorum* 66A та *E. coli* BE, K12 і С600 (рис. 1).

Встановлено, що низькомолекулярні каротоворицини, отримані із бактерій з різних регіонів, відрізняються за рівнем та спектром кілерної активності відносно використаних індикаторних штамів. Дані речовини спричиняли утворення зон лізису діаметром від 3 до 20 мм. Більшість із отриманих бактеріоцинів проявляли найвищу активність до *E. coli* BE, про що свідчила поява негативних зон великого діаметру.

З метою ідентифікації досліджуваних бактеріоцинів проводили порівняння їх властивостей із характеристиками описаних в літературі кароцинів. Відомо, що пошкодження нуклеїнової кислоти клітини-хазяїна за допомогою фізичних (ультрафіолетове опромінення) або хімічних (мітоміцин С, налідиксова кислота) чинників активує ген *hcsA*, продукт якого розщиплює репресорний білок PrtR, стимулюючи виділення бактеріоцинів [10]. Аналогічна залежність рівня індукції від впливу фізичних та хімічних чинників була показана для кароцина D [15]. Для кароцина S2 індукційний ефект викликає лише ультрафіолетове опромінення, тоді як обробка штаму-продуцента хімічними чинниками не стимулює продукцію бактеріоцинів [7].



На відміну від попередніх бактеріоцинів, виділення кароцина S1 посилюється лише при додаванні в ростове середовище глюкози та лактози і не пов'язане із пошкодженням нуклеїнової кислоти [8]. У проведеній роботі синтез низькомолекулярних каротоворицинів *P. carotovorum* посилювали за допомогою обробки штамів-продуцентів налідиксовою кислотою. Наведене свідчить, що за механізмом індукції досліджувані бактеріоцини близькі до кароцина D.

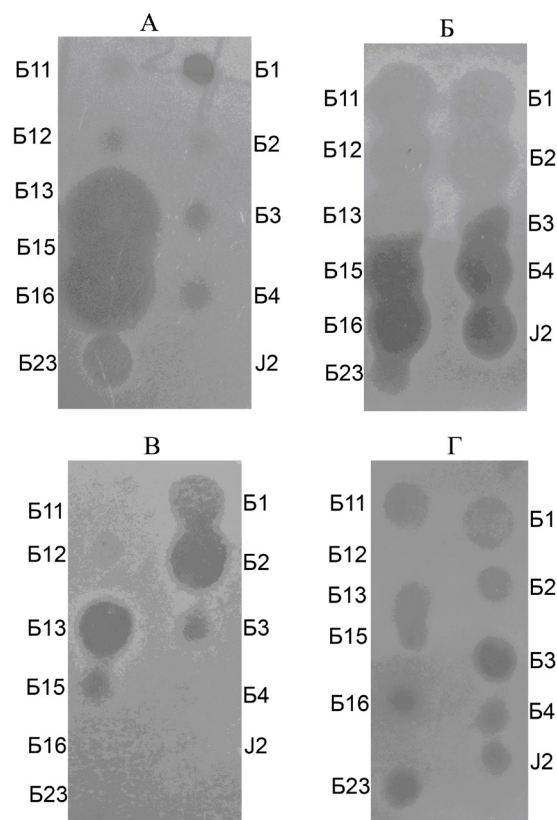


Рис. 1. Активність низькомолекулярних каротоворицинів штамів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* щодо *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 66A (А), *Escherichia coli* BE (Б), *E. coli* C600 (В) і *E. coli* K12 (Г).

Номер штаму продуцента низькомолекулярного каротоворицину вказано поруч із ділянкою нанесення відповідного зразка.

Fig 1. Activity of low-molecular-weight carotovoricins of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 66A (A), *Escherichia coli* BE (B), *E. coli* C600 (B) і *E. coli* K12 (Г).

The number of strain-producers of low-molecular-weight carotovoricins is shown near the section of corresponding sample application.

Одним із основних критеріїв ідентифікації бактеріоцинів вважається їх молекулярна маса. При визначенні діючих компонентів штаму *P. carotovorum* Б4 у складі сумарної фракції низькомолекулярних каротоворицинів було виявлено білки масою 30, 38, 42 і 54 кДа (рис. 2А) Аналогічні білкові компоненти, а також додаткові мінорні білки масою 58 та 67 кДа було виділено раніше із фракції низькомолекулярних бактеріоцинів штаму *P. carotovorum* J2 [1], що свідчить про типовість досліджуваних каротоворицинів *P. carotovorum* Б4.



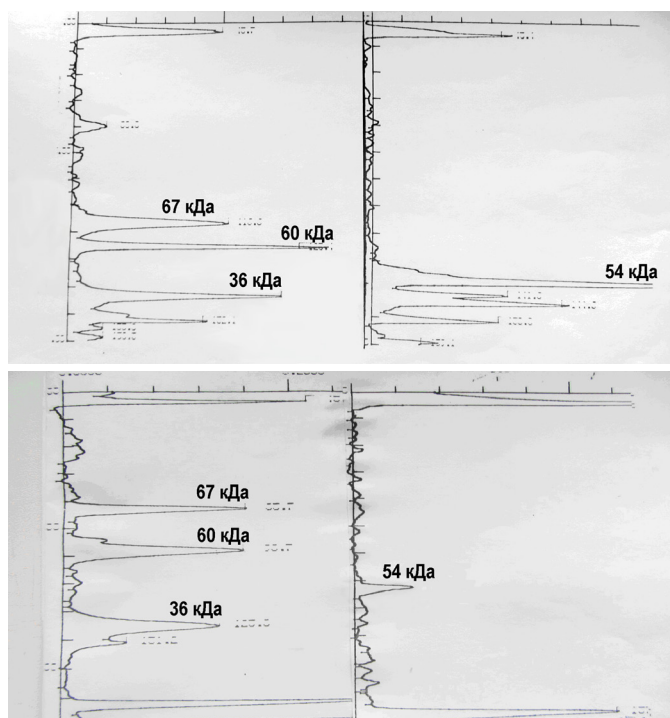


Рис. 2. Денситограма профілю електрофоретичного розділення сумарної (А) та очищеної (Б) фракцій білків низькомолекулярних каротоворицинів, виділених із *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4.
1 – фракція низькомолекулярних каротоворицинів,
2 – маркери молекулярної маси (Pharmacia).

Fig 2. The densitogram of electrophoretic separation profile of summary (A) and purified protein fraction of low-molecular-weight carotovoricins, isolated from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B4.
1 – low-molecular-weight carotovoricin fraction,
2 – molecular mass markers (Pharmacia).

При подальшому розділенні компонентів сумарної фракції на ДЕА-Е-сефарозі було отримано очищений низькомолекулярний каротоворицин *P. carotovorum* Б4. Дана фракція містила єдиний компонент із молекулярною масою 54 кДа (рис. 2Б). Серед описаних в літературі низькомолекулярних бактеріоцинів *P. carotovorum* схожою молекулярною масою – 55,5 кДа, характеризується лише кароцин S1 [8]. Молекулярна маса кароцина S2 є вищою і становить 85 кДа [7], тоді як кароцина D – є значно нижчою – близько 29 кДа [15]. Таким чином, виділений нами каротоворицин *P. carotovorum* Б4 за молекулярною масою близький до кароцина S1 і відрізняється від схожого за механізмом індукції кароцина D.

Порівняння генетичної спорідненості кароцинів із бактеріоцинами інших видів бактерій дозволило встановити, що N-кінцева ділянка кароцина D на 30% гомологічна коліцину E3 *E. coli* і на 27% – до піоцинів S-типу *P. aeruginosa*. Натомість, C-кінцева ділянка даного кароцина виявляє 55% ідентичності із доменом транслокації піоцинів [15]. Гени іншого низькомолекулярного бактеріоцина *P. carotovorum* – кароцина S1 є гомологічними до

генів піоцинів S3 та AP41 [8], а кароцина S2 – характеризуються високою спорідненістю до коліцина D і клебіцина D [7]. Наведене свідчить, що низькомолекулярні бактеріоцини *P. carotovorum* можуть бути схожими або до піоцинів S-типу *P. aeruginosa*, або до коліцинів *E. coli*.

Перевірка гомології отриманих каротоворіцинів *P. carotovorum* Б4 із низькомолекулярними піоцинами S1, S2, S3, S4 і S5 підтипів показала відсутність серологічної спорідненості. Проте, досліджуваний бактеріоцин *P. carotovorum* Б4 у складі очищеної фракції пригнічував ріст лише *E. coli* BE. Зважаючи на вузький спектр кілерної активності виділеного білка можна зробити припущення про його гомологію із коліцинами. Отже, за серологічною спорідненістю отриманий нами каротоворіцин близький до кароцина S2 і відрізняється від схожих за механізмом індукції кароцина D та молекулярною масою кароцина S1.

Таким чином, досліджуваний бактеріоцин *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4 з молекулярною масою 54 кДа за виявленими властивостями не відповідає жодному із описаних на даний момент бактеріоцинів і може бути новим представником низькомолекулярних каротоворіцинів. Відсутність серологічної спорідненості із низькомолекулярними піоцинами S підтипу і активність виключно щодо штаму *E. coli* BE можуть вказувати на гомологію даного білка із коліцинами.

L.O. Maksimenko, O.I. Balko, O.B. Balko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 94 24; e-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

***PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM* LOW-MOLECULAR-WEIGHT CAROTOVORICINS**

Summary

The aim was studying of properties of low-molecular-weight bacteriocins of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B4. **Methods.** Low-molecular-weight bacteriocins were obtained from 13 *Pectobacterium carotovorum* strains by nalidixic acid induction, concentrated by salting-out with ammonium sulphate, separated by ultracentrifugation, additional purification was carried out at DEAE-sepharose. The activity of obtained bacteriocins was tested against *Pectobacterium carotovorum* 66A, as well as *Escherichia coli* BE, K12 and C600. Molecular mass was determined and serologic relationships with pyocins of S1-S5-type were checked for the researched substances. **Results.** The obtained low-molecular-weight carotovoricins differed in level and spectrum of killer activity against indicator strains, but the highest activity was against *Escherichia coli* BE. It was shown that proteins of 30, 38, 42 and 54 kDa were the parts of summary fraction of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B4 carotovoricins. After further purification a single active component with molecular mass of 54 kDa was isolated. This protein was characterized by narrow pectrum of killer activity and influenced only on *Escherichia coli* BE. Checking of homology of the researched carotovoricin and pyocins of S1-S5-type indicated the absence of



serologic relationships. **Conclusions.** According to revealed properties, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* B4 carotovoricin with molecular mass of 54 kDa doesn't conform to the characteristics of any described bacteriocins and can be a member of new low-molecular-weight carotovoricins. The absence of serologic relationships with low-molecular-weight pyocins of S-type and activity against only *Escherichia coli* BE can indicate the homology of this protein and colicins.

Key words: *Pectobacterium carotovorum*, low-molecular-weight carotovoricins, serologic relationships, pyocins, colicins.

Л.А.Максименко, О.И. Балко, А.Б. Балко

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
тел.: +38 (044) 526 94 24; e-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ КАРОТОВОРИЦИНЫ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*

Реферат

Цель. Изучение свойств низкомолекулярных бактериоцинов *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4. **Методы.** Низкомолекулярные каротоворицины были получены индукцией налидиксовой кислотой из 13 штаммов *Pectobacterium carotovorum*, сконцентрированы высаливанием сульфатом аммония, разделены ультрацентрифугированием и дополнительно очищены на ДЕАЕ-сефарозе. Активность полученных каротоворицинов проверяли на *Pectobacterium carotovorum* 66А, а также *Escherichia coli* BE, K12 и С600. У исследуемых веществ определяли молекулярную массу и наличие серологического родства с пиоцинами S1-S5 подтипов. **Результаты.** Полученные низкомолекулярные каротоворицины отличались по уровню и спектру киллерной активности, однако наивысшую активность проявляли по отношению к *E. coli* BE. Суммарная фракция каротоворицинов штамма *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4 представлена белками 30, 38, 42 и 54 кДа. В результате дальнейшей очистки был выделен единственный активный компонент с молекулярной массой 54 кДа, который обладал узким спектром киллерной активности и влиял только на *E. coli* BE. При изучении гомологии данного каротоворицина с пиоцинами S1-S5 подтипов показано отсутствие серологического родства. **Выводы.** Согласно полученным результатам, исследованный бактериоцин *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б4 с молекулярной массой 54 кДа отличается от изученных на данный момент бактериоцинов и может быть новым представителем низкомолекулярных каротоворицинов. Отсутствие серологического родства с низкомолекулярными пиоцинами S подтипа и активность исключительно по отношению к штамму *E. coli* BE могут свидетельствовать о гомологии данного белка с колицинами.

Ключевые слова: *Pectobacterium carotovorum*, низкомолекулярные каротоворицины, серологическое родство, пиоцины, колицины.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Балко О.Б. Структурно-функціональна організація каротоворіцинів та їх роль в мікробному антагонізмі: Автореф. дис...канд. біол. наук. К., 2007. – 20 с.
2. Балко А.Б., Видасов В.В., Авдеева Л.В. Оптимизация условий индукции бактериоцинов *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, № 1. – С. 79–85.
3. Максименко Л.А., Пархоменко Н.И., Мороз С.Н., Горб Т.Е. Изучение свойств изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий, выделенных в Украине // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, №6. – С. 66–72.
4. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – 67, № 6. – С. 767–774.
5. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – 71, № 3. – С. 359–367.
6. Товкач Ф.І., Максименко Л.О., Балко О.Б. Множинність бактеріоцинів *Erwinia carotovora* // Вісник державного агроєкологічного університету. – 2005. – № 2. – С. 163–168.
7. Chan YC, Wu JL, Wu HP, Tzeng KC, Chuang DY. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum* // BMC Microbiol. 2011 May 12;11:99. DOI: 10.1186/1471-2180-11-99
8. Duen-yau Chuang, Yung-chei Chien, Huang-Pin Wu. Cloning and Expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Gene Encoding the Low-Molecular-Weight Bacteriocin Carocin S1 // Journal of bacteriology. – 2007. – 189, № 2. – P. 620–626.
9. Elfarash A., Wei Q., Cornelis P. The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor. // Microbiology. – 2012. – 1. – P. 268–275.
10. Ghequire M.G.K., De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. // FEMS Microbiol. Rev. – 2014. – 38. – P. 38523–38568.
11. Gillor O, Nigro LM, Riley MA. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. // Curr Pharm Des. – 2005. – 11, № 8. – P. 1067–75.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T // Nature. – 1970. – 227. № 5259. – P. 680–685.
13. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. In: Handbook Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor. Michigan.: Ann. Arbor. Science Publishers, 1968. – P. 37.
14. Roh E., Lee Y., Ra D., Choi J., Moon E., Heu S. Diverse Antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. // J.Microbiol Biotechnol. – 2009. – 19, № 1. – P. 42–50.
15. Roh E., Park T.H., Kim Mi, Lee S., Ryu S., Oh Cs., Rhee S., Kim Dh., Park Bs., Heu S. Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc 21 // Appl Environ Microbiol. – 2010. – 76, № 22. – P. 7541–7549.



References

1. Balko OB. Structural and functional organization of carotovoricins and their role in bacterial antagonism. PhD thesis, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2007: 20. (In Ukrainian)
2. Balko AB, Vidasov VV, Avdeeva LV. Optimization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriocin induction. Microbiol. j. 2013;(75):79–85. (In Russian)
3. Maksymenko LA, Parkhomenko NI, Moroz SN, Gorb TE. Properties investigation of isolates of pectolitic phytopathogenic bacteria obtained in Ukraine. Microbiol. j. 2013;75(6):66–72. (In Russian)
4. Tovkach FI. Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins. Microbiology. 1998;67(6):767-774. (In Russian)
5. Tovkach FI. Defective lisogeny in *Erwinia carotovora*. Microbiology. 2002;71(3):359-367. (In Russian)
6. Tovkach FI, Maksimenko LA, Balko OB. The multiplicity of bacteriocins of *Erwinia carotovora*. Bull Agroecol State Univ. 2005;2:163-168.
7. Chan YC, Wu JL, Wu HP, Tzeng KC, Chuang DY. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. BMC Microbiol. 2011 May 12;11:99. DOI: 10.1186/1471-2180-11-99
8. Duen-yau Chuang, Yung-chei Chien, Huang-Pin Wu. Cloning and Expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Gene Encoding the Low-Molecular-Weight Bacteriocin Carocin S1. Journal of bacteriology. 2007;189(2):620-626.
9. Elfarash A, Wei Q, Cornelis P. The soluble pyocins S2 and S4 from *Pseudomonas aeruginosa* bind to the same FpvAI receptor. Microbiology. 2012;(1):268-275.
10. Ghequire MGK, De Mot R. Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. FEMS Microbiol. Rev. 2014;(38):38523-38568.
11. Gillor O, Nigro LM, Riley MA. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. Curr Pharm Des. 2005;11(8):1067-75.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature. 1970;227(5259):680-685.
13. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. In: Handbook Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann. Arbor. Michigan. Ann. Arbor. Science Publishers, 1968. 37.
14. Roh E, Lee Y, Ra D, Choi J, Moon E, Heu S. Diverse Antibacterial activity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolated in Korea. J. Microbiol. Biotechnol. 2009;19(1):42-50.
15. Roh E, Park TH, Kim Mi, Lee S, Ryu S, Oh Cs, Rhee S, Kim Dh, Park Bs, Heu S. Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc 21. Appl Environ Microbiol. 2010;76(22):7541-7549.

Стаття надійшла до редакції 29.06.2017 р.



И.П. Конуп, Т.В. Гудзенко, Л.А. Конуп, О.В. Волювач

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОПОРИСТОГО КРЕМНИЯ

***Цель.** Исследование взаимодействия некоторых природных и полусинтетических поверхностно-активных веществ (ПАВ) с поверхностью полупроводниковых структур на основе нанопористого кремния (нано-ПК) **Методы.** Образцы нано-ПК с высоким уровнем легирования (КЭС-0,01) были получены методом анодного электрохимического травления монокристаллического кремния в электролите на основе 48%-ного водного раствора фтористо-водородной кислоты. Низкое сопротивление контактов определялось отжигом (450 °С) образцов нано-ПК с нанесенными на них алюминиевыми контактами. Детектирование проводили для биосурфактантов: саркозила (натрий лаурилсаркозин), рамнолипида (рамнозо- ди β-гидроксидеканоеновая кислота) и циклогептадекановой кислоты. **Результаты.** Изучено взаимодействие биосурфактантов с поверхностью нано-ПК. Показано, что эти соединения существенно влияют на вольтамперные характеристики (ВАХ) образцов нано-ПК. В рамках адсорбционной модели объяснено взаимодействие исследованных ПАВ с нано-ПК. Изменение ВАХ образцов нано-ПК при нанесении супрамолекулярных объектов связано с наполнением нанопор этими макромолекулами, обладающими значительной диэлектрической проницаемостью. Показано, что влияние изученных ПАВ на электрические параметры нано-ПК имеет характерные особенности для каждого из исследованных соединений, что позволяет дифференцировать идентифицировать различные ПАВ сенсорами на основе нано-ПК. **Вывод.** Физическая причина изменения ВАХ образцов нано-ПК при нанесении биосурфактантов связана с наполнением нанопор кремния мультислойными структурами ПАВ. Сложный вид ВАХ при адсорбции саркозила, рамнолипида, циклогептадекановой кислоты определяется гетеропереходами между планарными алюминиевыми контактами и наноструктурами кремния, и изменениями в области микрорельефов, сформированных между нитевидными кристаллами поверхности нано-ПК.*

Ключевые слова: нанопористый кремний, сенсоры, саркозил, рамнолипид, циклогептадекановая кислота.

Развитие современных технологий в промышленности требует создания новых сенсорных элементов, являющихся основой для приборов контроля окружающей среды. Это обусловлено серьезными экологическими проблемами, среди которых загрязнение атмосферы, воды и почвы промышленными отходами и органическими соединениями, что особенно актуально.

© И.П. Конуп, Т.В. Гудзенко, Л.А. Конуп, О.В. Волювач



Для контролю степени загрязнения окружающей среды были созданы измерительные контролирующие системы, которые определяют состав атмосферы и содержание вредных веществ в той или иной среде. С этой целью были разработаны различные типы аналитических приборов. В большинстве случаев эти приборы могут с достаточной точностью определять состав исследуемого объекта, однако они являются дорогостоящим оборудованием с большим временем обработки результатов и очень редко могут быть использованы в режиме реального времени.

В качестве альтернативных методов были предложены твердотельные сенсорные элементы [5, 8, 13, 14]. Сенсорный элемент состоит из адсорбционно чувствительного слоя, который при адсорбции на нем молекул газа или жидкости меняет свойства, и трансдюсера, который позволяет перевести сигнал сенсора в более удобный для обработки.

В настоящее время имеются разработки полупроводниковых сенсоров на основе новых перспективных материалов, таких, как ПК [11]. Важной особенностью пористого кремния является высокая адсорбционная способность по отношению к биологическим и органическим молекулам [12]. Это свойство кремния уже используется в медицине для создания материалов, получивших торговое название “Biosilicon” [2]. Развитие полупроводниковой биосенсорной электроники стимулирует проведение экспериментальных исследований электронных и адсорбционно-десорбционных процессов, происходящих на поверхности полупроводниковых материалов типа ПК при взаимодействии их с молекулярными и надмолекулярными объектами биологической среды. Влияние адсорбции таких биоорганических объектов на полупроводниковые структуры на основе ПК вызывает сложные изменения электронных свойств материала, что и проявляется в изменениях закономерностей адсорбционных процессов.

Цель работы – исследовать взаимодействие некоторых природных и полусинтетических ПАВ с поверхностью полупроводниковых структур на основе нано-пористого кремния.

Материалы и методы

Образцы нано-ПК с высоким уровнем легирования (КСС-0,01) были получены методом анодного электрохимического травления монокристаллического кремния в электролите на основе 48%-ного водного раствора фтористо-водородной кислоты [7]. В процессе травления использовали световую и ультразвуковую обработку поверхности кремния. На поверхность нано-ПК наносились специальные электрические контакты из алюминия. Контакт алюминия с нано-ПК омический. Низкое сопротивление этого контакта определялось высоким уровнем легирования исходных образцов монокристаллического кремния и отжигом при температуре 450 °С в течение 30 минут образцов нано-ПК с нанесенными на них алюминиевыми контактами.

Выбранные для исследований образцы проходили дополнительную плазмохимическую обработку ионами фтора и водорода. Ионы фтора и водорода оказывают стабилизирующее действие на электрические свойства материала. Фтор активной кислорода, поэтому после обработки фтором контакт



образца с воздушной атмосферой не сопровождался изменениями состава поверхности материала. Эта технологическая операция замедляла процессы «старения» кремния при взаимодействии с воздухом и водой [10].

Исходные образцы нано-ПК, выдержанные один час в вакууме при $t = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ имели классические [6] вольтамперные характеристики: при сканировании от 0,7 до 10 в ток изменялся в пределах двух порядков. Сила тока (I) прямо пропорционально зависела от напряжения (U).

Детектирование проводили для полусинтетического сурфактанта саркозила (замещенный лауриновой кислотой природный саркозин - метаболит, встречающийся в том числе и у микроорганизмов), природных ПАВ: метаболитов псевдомонад – рамнолипида (рамнозо- ди β -гидроксидеканоеновая кислота) и циклогептадекановой кислоты.

В работе использовали высокочастотный вольтметр В7-21 и электрометр (амперметр) постоянного тока (типа В7-30 и В7-21), позволяющие измерять токи в диапазоне от 10^{-13} до 10^{-3} А.

Всего было исследовано 12 образцов при трехкратной повторяемости для каждого из ПАВ и контроля. Математическую обработку экспериментальных данных проводили методом дисперсионного анализа с помощью компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2003» с определением t -критерия Стьюдента. Статистически вероятной считали разницу при $p < 0,05$.

Методика нанесения органических молекул на поверхность ПК. Особенность методики заключалась в необходимости анализа амфифильных молекул на поверхности сенсорного элемента, работающего в газовой среде, например, в воздухе. После растворения исследуемых веществ в свежеприготовленной дистиллированной воде в концентрации 0,1 % растворы подвергались дегазации, в вакууме удалялся воздух при давлении 10 мм рт. ст. в течение 30 мин. при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. На образцы нано-ПК наносили растворы дозатором в объеме 5 мкл. После 3 мин экспозиции в вакууме с поверхности нано-ПК удаляли краешками фильтровальной бумаги остатки растворов исследуемых веществ. Адсорбцию исследуемых молекул проводили в течение 45 мин. при нормальных условиях ($P = 760$ мм рт. ст., $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Затем растворы высушивали в эксикаторе с CaCl_2 в течение 1 часа.

Результаты исследований и их обсуждение

Для проведения исследований были выбраны серии образцов нано-ПК с размерами пор от 10 до 200 нм (размер пор определяется технологией изготовления нано-ПК). Размер пор определялся по результатам атомно-силовой микроскопии [3] и практически идентичными электронными параметрами при изготовлении (кристаллы из одной матрицы анодированного высоколегированного кремния). Размеры исследованных ПАВ (мицеллы и мультиламеллярные структуры) [1] были соизмеримы с размерами нанопор в структурах нано-ПК. Это делает нано-ПК наиболее подходящим материалом для селективного определения органических молекул, в том числе и выбранных супрамолекулярных структур поверхностно-активных соединений.

Электрофизические характеристики образцов нано-ПК до и после адсорбции саркозила, рамнолипида, циклогептадекановой кислоты определяли на



установке, позволяющей проводить измерения на воздухе.

Влияние адсорбции органических молекул на электрофизические свойства структур nano-ПК. После адсорбции органических молекул (ПАВ) на поверхность образцов nano-ПК вольтамперные характеристики $I(U)$, измеренные при комнатной температуре, приобретают сложный характер (рис. 1). Изменения ВАХ однозначно связаны с наличием супрамолекулярных структур исследованных ПАВ внутри нанопористого слоя кремния, которые приводят к таким изменениям зависимостей тока от напряжения. Погрешность измерений составляла менее 2%, поэтому сложный характер полученных кривых с максимумами и перегибами связан с внутренней микроструктурой образцов (рис. 1).

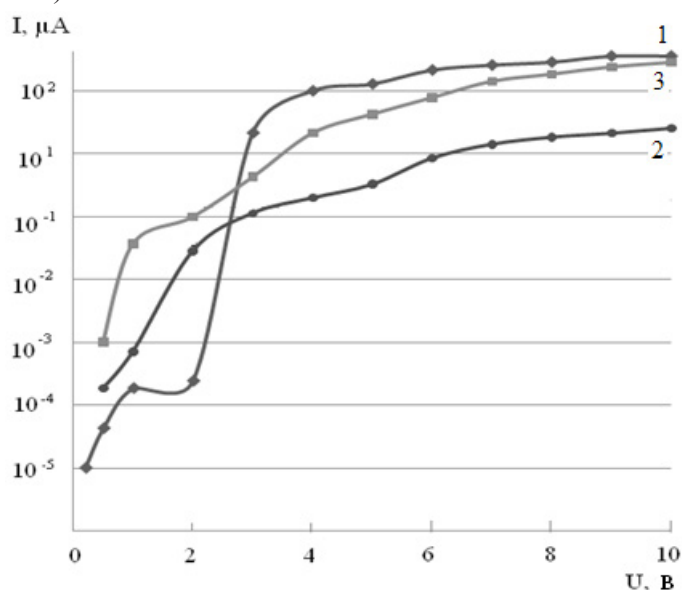


Рис. 1. Вольтамперные характеристики, измеренные в планарном режиме структур nano-ПК, при адсорбции саркозила, рамнолипида и циклогептадекановой кислоты (кривые 1–3 соответственно).

Fig. 1. The type of current-voltage characteristics measured in the planar regime of nano-PS structures upon adsorption of sarcosyl, rhamnolipid and cycloheptadecanoic acid (the curves 1–3 respectively).

На рис. 1 представлена зависимость ВАХ при нанесении молекул саркозила, рамнолипида и циклогептадекановой кислот на образцы nano-ПК. Видно, что помимо роста тока на шесть-семь порядков вид вольтамперных характеристик приобретает сложный характер с несколькими максимумами.

Анализ полученных результатов (рис. 1) показывает, что ВАХ максимально отличаются от обычных для nano-ПК [6] для соединения (1): $\Delta I = f(u_{1v-10v})$ составляет более семи порядков, кривая имеет два максимума. Соединения (2) и (3) в меньшей степени, но также сильно влияют на ВАХ nano-ПК $\Delta I = f(u_{1v-10v})$ для соединения 2 составляет приблизительно четыре порядка; для соединения 3 $\Delta I = f(u_{1v-10v})$ составляет более, чем четыре порядка. Отмеченные выше свойства саркозила, по всей видимости, определяются свойствами N-метилглицинового фрагмента молекулы.

На рис. 2 показана адсорбционная чувствительность γ для этих же соединений, вычисленная как отношение тока после адсорбции к исходному значению тока. Как видно, наблюдается значительный рост нормированного тока по сравнению с исходным значением. Оценка измерения проводимости (адсорбционная чувствительность γ) в зависимости от приложенного напряжения представлена на рис. 2. Максимальная чувствительность имеет место при напряжении 5,5 в.

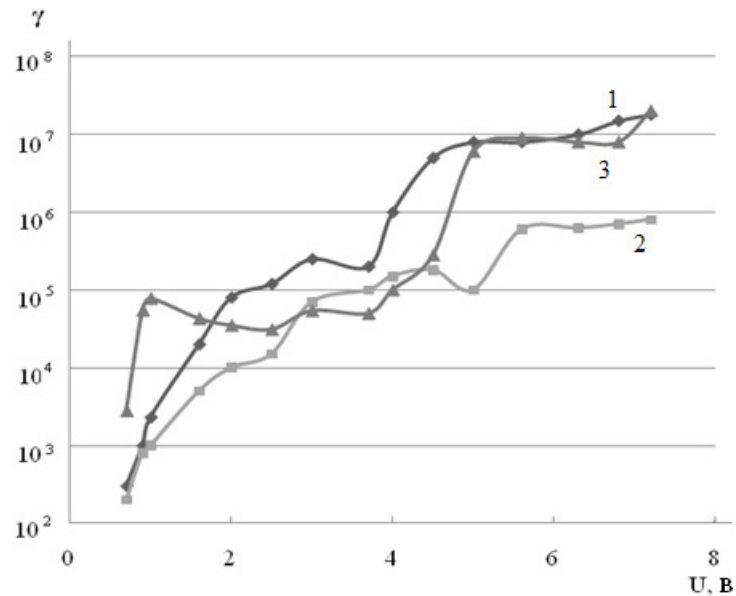


Рис. 2. Типичная зависимость адсорбционной чувствительности образца нано-ПК к исследованным супрамолекулярным структурам поверхностно-активных веществ при адсорбции саркозила (1), рамнолипида (2) и циклогептадекановой кислоты (3).

Fig. 2. Typical dependence of the adsorption sensitivity of a sample of nano-PS on the investigated supramolecular structures of surfactants upon adsorption of sarcosyl (1), rhamnolipid (2) and cycloheptadecanoic acid (3).

Обращает на себя внимание, что зависимость адсорбционной чувствительности не линейно изменяется при росте напряжения. Этот факт существенно отличается от линейной зависимости адсорбционной чувствительности при адсорбции органических молекул на поверхности нано-ПК [12]. Как видно из рис. 2, максимальная адсорбционная чувствительность наблюдается для саркозила и циклогептадекановой кислоты. Высокая степень сродства саркозила к нано-ПК отмечена выше. Значительная адсорбционная чувствительность нано-ПК к циклогептадекановой кислоте, по всей видимости, определяется циклогептиловым фрагментом молекулы этого ПАВ.

Ни один из известных механизмов [4] не может описать такое поведение вольтамперных характеристик, которое наблюдается после адсорбции исследованных биосурфактантов. Если считать, что структура нано-ПК состоит из значительного числа соединённых между собой нитей разного диаметра, то при наличии омических контактов из алюминия механизм переноса тока можно связать с изменениями свойств барьеров, формируемыми между ними. Очевидно, что имеет место значительное число включенных последовательно



и параллельно структур, имеющих переменную ширину зоны и обладающих эффектом выпрямления. Тогда характер ВАХ определяется прохождением тока по включенным в прямом направлении диодным цепочкам. В этом случае форма ВАХ зависит от приложенного напряжения, что и наблюдалось в эксперименте (рис. 1) [9].

Физическая причина изменения ВАХ образцов nano-ПК при нанесении биосурфактантов связана с наполнением нанопор кремния мультислойными структурами ПАВ, обладающими значительной диэлектрической проницаемостью [1]. Сложный вид ВАХ определяется переключением диодных структур детерминированных гетеропереходами (между двумя контактами щелевого типа и nano-ПК образуются гетеропереходы, которые представляют собой диоды) между планарными алюминиевыми контактами и наноструктурами кремния с различными емкостными параметрами. На электрические параметры nano-ПК оказывает существенное влияние адсорбция супрамолекулярных структур ПАВ. При адсорбции саркозила, рамнолипида, циклогептадекановой кислоты на поверхности nano-ПК происходили изменения в области микрорбарьеров, сформированных между нитевидными кристаллами поверхности. Эти явления определяют характер изменения ВАХ nano-ПК при адсорбции на его развитой поверхности исследованных ПАВ.

I.P. Konup, T.V. Gudzenko, L.O. Konup, O.V. Voliuvach

Odesa National I.I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

DETECTION OF BIOSURFACTANTS ON THE SURFACE OF NANOPOROUS SILICON

Summary

Aim. The investigation of the interaction of certain natural and semi-synthetic surfactants with the surface of semiconductor structures based on nanoporous silicon (nano-PC). **Methods.** The samples of nano-PS with a high doping level (KC-0.01) were obtained by anodic electrochemical etching of single-crystal silicon in an electrolyte on the basis of 48% aqueous solution of hydrofluoric acid. The low contact resistance was determined by annealing (450 °C) of the samples of nano-PS with aluminum contacts deposited on them. The detection was carried out for biosurfactants: sarcosyl (sodium lauryl sarcosine), ramolipid (rhamnolipid β -hydroxydecanoic acid) and cycloheptadecanoic acid. **Results.** The interaction of biosurfactants with the surface of nano-PC was studied. It is shown that these compounds significantly influence the volt-ampere characteristics of nano-PC samples. Within the framework of the adsorption model, the interaction of the investigated surfactants with nano-PC is explained. The change in current-voltage characteristic (CVC) samples of nano-PC during the deposition of supramolecular objects is associated with the filling of nanopores with these macromolecules possessing a significant dielectric constant. It is shown that the effect of the surfactants studied on the electrical parameters of nano-PC has the characteristic features for each of the compounds studied, which allows differentiating the different surface-active substances differentially on the basis of nano-PC.



Conclusion. The physical reason for the change in the I–V characteristics of nano-PC samples during application of biosurfactants is related to the filling of nano-PS with multilamellar surfactant structures. The complex form of the CVC for the adsorption of sarcosyl, rhamnolipid, cycloheptadecanoic acid is determined by heterojunctions between planar aluminum contacts and silicon nanostructures, and changes in the region of microballoons formed between filamentary crystals of the surface of the nano-PC.

Key words: nano-porous silicon, sensors, sarcosyl, rhamnolipid, cycloheptadecanoic acid.

І.П. Конуп, Т.В. Гудзенко, Л.А. Конуп, О.В. Волювач

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна;

тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

ДЕТЕКТУВАННЯ БІОСУРФАКТАНТІВ НА ПОВЕРХНІ НАНОПОРИСТОГО КРЕМНІЮ

Реферат

Мета. Дослідження взаємодії деяких природних і напівсинтетичних поверхнево-активних речовин (ПАР) з поверхнею напівпровідникових структур на основі нанопористого кремнію (нано-ПК). **Методи.** Зразки нано-ПК з високим рівнем легування (КСС-0,01) були отримані методом анодного електродічного травлення монокристалічного кремнію в електроліті на основі 48%-ного водного розчину фтористо-водневої кислоти. Низький опір контактів визначалося відпадом (450 0С) зразків нано-ПК з нанесеними на них алюмінієвими контактами. Детектування проводили для біосурфактантів: саркозилу (натрій лаурилсаркозин), рамноліпиду (рамнозо-ди-β-гідроксидеканоєнова кислота) і циклогептадеканоєвої кислоти. **Результати.** Вивчено взаємодію біосурфактантів з поверхнею нано-ПК. Показано, що ці сполуки суттєво впливають на вольтамперні характеристики (ВАХ) зразків нано-ПК. В рамках адсорбційної моделі пояснено взаємодію досліджених ПАР з нано-ПК. Зміна ВАХ зразків нано-ПК при нанесенні супрамолекулярних об'єктів пов'язано з наповненням нанопор цими макромолекулами, що володіють значною діелектричною проникністю. Показано, що вплив вивчених ПАР на електричні параметри нано-ПК має характерні особливості для кожного з досліджених сполук, що дозволяє диференційовано ідентифікувати різні ПАР сенсорами на основі нано-ПК. **Висновок.** Фізична причина зміни ВАХ зразків нано-ПК при нанесенні біосурфактантів пов'язана з наповненням нанопор кремнію мультіламелярними структурами ПАР. Складний вид ВАХ при адсорбції саркозилу, рамноліпиду, циклогептадеканоєвої кислоти визначається гетеропереходами між планарними алюмінієвими контактами і наноструктурами кремнію, і зміною в області мікробар'єрів, сформованих між ниткоподібними кристалами поверхні нано-ПК.

Ключові слова: нанопоруватий кремній, сенсори, саркозил, рамноліпід, циклогептадеканоєва кислота.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ивков В.Г., Берестовский Г.Н.* Динамическая структура липидного слоя. – М.: Наука, 1981. – 296 с.
2. *Bechelany Mikhael, Balme Sebastien, Miele Philippe.* Atomic layer deposition of biobased nanostructured interfaces for energy, environmental and health applications // *Pure Appl. Chem.* – 2015. – 2(61). – P. 242–250.
3. *Bisi O., Ossicini Stefano, Pavesi L.* Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics // *Surface Science Report.* – 2000. – **38**. – P. 1–126.
4. *Deachapunya S.* Slow beams of massive molecules // *Eur. Phys. J.D.* – 2008. – **46**. – P. 307–313.
5. *Elhag S., Ibutoto Z.H., Khranovskyy V., Willander M., Nur O.,* Habit-modifying additives and their morphological consequences on photoluminescence and glucose sensing properties of ZnO nanostructures, grown via aqueous chemical synthesis // *Vacuum.* – 2015. – **116**. – P. 21–26.
6. *Gerlich Stefan, Eibenberger Sandra, Tomandl Mathias, Nimmrichter Stefan, Hornberger Klaus, Paul J. Fagan, Jens Tuxen, Marcel Mayor, Markus Arndt.* Quantum interference of large organic molecules // *Nature Communications.* – 2011 – 2(263). – P. 1–5.
7. *Jing Wang, Yang Jiao, Yang Liu, Zhenglin Zhang, Fengyu Qu, and Xiang Wu.* Gas Phase Growth of Wurtzite ZnS Nanobelts on a Large Scale // *Journal of Nanomaterials.* – 2013. – (1–4) DOI: 10.1155/2013/596313
8. *Kang Z., Gu Y., Yan X., Bai Z., Liu Y., Liu S., Zhang X., Zhang Z., Zhang X, Zhang Y.* Enhanced photoelectrochemical property of ZnO nanorods array synthesized on reduced graphene oxide for self-powered biosensing application // *Biosens. Bioelectron.* – 2015. – **64**. – P. 499–504.
9. *Kasemo Bengt.* Biological surface science // *Surface Science.* – 2001. – P. 22–23.
10. *Makaraviciute A., Ruzgas T., Ramanavicius A.* Antibody fragment immobilization on planar gold and gold nanoparticle modified quartz crystal microbalance with dissipation sensor surfaces for immunosensor applications // *Analytical Methods.* – 2014. – **6**. – P. 2134–2140.
11. *Picciolini S., Castagnetti N., Vanna R., Mehn D., Bedoni M., Gramatica F., Villani M., Calestani D., Pavesi M., Lazzarini L., Zappettini A., Morasso C.* Branched gold nanoparticles on ZnO 3D architecture as biomedical SERS sensors, *RSC Adv.* – 2015. – **5**. – P. 93644–93651.
12. *Politi J., Rea I., Dardano P., De Stefano L., Gioffrè M.* Versatile synthesis of ZnO nanowires for quantitative optical sensing of molecular biorecognition // *Sens. Actuators B.* – 2015. – **220**. – P. 705–711.
13. *Sodzel D., Khranovsky V., Beni V., Turner A.P.F., Viter R., Eriksson M.O., Holtz P.-O., Janot J.-M., Bechelany M., Balme S., Smyntyna V., Kolesneva E., Dubovskaya L., Volotovskii I., Ubelis A., Yakimova R.* Continuous sensing of hydrogen peroxide and glucose via quenching of the UV and visible luminescence of ZnO nanoparticles // *Microchimica Acta.* – 2015. – **182**. – P. 1819–1826.
14. *Yakimova R., Selegård L., Khranovskyy V., Pearce R., Lloyd Spetz A., Uvdal K.* ZnO materials and surface tailoring for biosensing // *Front. Biosci.* – 2012. – **4**. – P. 254–278.



References

1. Ivkov VG, Berestovsky G.N. Dynamic structure of the lipid layer. Moscow: Nauka, 1981. 296.
2. Bechelany Mikhael, Balme Sebastien, Miele Philippe. Atomic layer deposition of biobased nanostructured interfaces for energy, environmental and health applications. *Pure Appl. Chem.* 2015; 2(61): 242-250.
3. Bisi O, Ossicini Stefano, Pavesi L. Porous silicon: a quantum sponge structure for silicon based optoelectronics. *Surface Science Report.* 2000; 38: 1-126.
4. Deachapunya S. Slow beams of massive molecules. *Eur. Phys. J.D.* 2008;46:307–313.
5. Elhag S, Ibupoto ZH, Khranovsky V, Willander M, Nur O. Habit-modifying additives and their morphological consequences on photoluminescence and glucose sensing properties of ZnO nanostructures, grown via aqueous chemical synthesis. *Vacuum.* 2015;116:21–26.
6. Gerlich Stefan, Eibenberger Sandra, Tomandl Mathias, Nimmrichter Stefan, Hornberger Klaus, Paul J. Fagan, Jens Tuxen, Marcel Mayor, Markus Arndt. Quantum interference of large organic molecules. *Nature Communications.* 2011;2(263):1–5.
7. Jing Wang, Yang Jiao, Yang Liu, Zhenglin Zhang, Fengyu Qu, and Xiang Wu, Gas Phase Growth of Wurtzite ZnS Nanobelts on a Large Scale. *Journal of Nanomaterials.* 2013:1–4 DOI: 10.1155/2013/596313
8. Kang Z, Gu Y, Yan X, Bai Z, Liu Y, Liu S, Zhang X, Zhang Z, Zhang X, Zhang Y. Enhanced photoelectrochemical property of ZnO nanorods array synthesized on reduced graphene oxide for self-powered biosensing application. *Biosens. Bioelectron.* 2015;64:499–504.
9. Kasemo Bengt. Biological surface science. *Surface Science.* 2001: 22–23.
10. Makaraviciute A, Ruzgas T, Ramanavicius A. Antibody fragment immobilization on planar gold and gold nanoparticle modified quartz crystal microbalance with dissipation sensor surfaces for immunosensor applications. *Analytical Methods.* 2014; 6:2134–2140.
11. Picciolini S, Castagnetti N, Vanna R, Mehn D, Bedoni M, Gramatica F, Villani M, Calestani D, Pavesi M, Lazzarini L, Zappettini A, Morasso C. Branched gold nanoparticles on ZnO 3D architecture as biomedical SERS sensors, *RSC Adv.* 2015;5:93644–93651.
12. Politi J, Rea I, Dardanoa P, De Stefano L, Gioffrè M. Versatile synthesis of ZnO nanowires for quantitative optical sensing of molecular biorecognition. *Sens. Actuators B.* 2015;220:705–711.
13. Sodel D, Khranovsky V, Beni V, Turner APF, Viter R, Eriksson MO, Holtz PO, Janot JM, Bechelany M, Balme S, Smyntyna V, Kolesneva E, Dubovskaya L, Volotovskii I, Ubelis A, Yakimova R. Continuous sensing of hydrogen peroxide and glucose via quenching of the UV and visible luminescence of ZnO nanoparticles. *Microchimica Acta.* 2015;182:1819–1826.
14. Yakimova R, Selegård L, Khranovsky V, Pearce R, Lloyd Spetz A, Uvdal K. ZnO materials and surface tailoring for biosensing. *Front. Biosci.* 2012;4:254–278.

Стаття надійшла до редакції 13.09.2017 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), еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми та віруси.

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

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

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

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

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. №7-5/1, 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 мети 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 рукописи (2 примірники) обсягом не більше 15 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису 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;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);



- 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);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200- 250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

- назва статті великими літерами;
- прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
- 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);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200 - 250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; список використаної літератури мовою оригіналу цитованої статті, список використаної літератури (Referens) англійською мовою (за вимоги міжнародних наукометричних баз).

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (українською/російською) та англійською мовою.

Враховуючи, що реферат відображає основний зміст статті і використовується в інформаційних, в тому числі автоматизованих системах для пошуку документів та інформації, необхідно дотримуватися певних вимог при його написанні:

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
- компактним (200-250 слів);
- ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

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 з 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.

Розділ “Матеріали і методи”:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) - Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммоль/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

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.

Підписи, а також пояснення, примітки до таблиць та рисунків подаються мовою оригіналу та англійською мовою.

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 використаної літератури

1. Список використаної літератури в оригіналі цитованої статті складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця). 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.

2. Список використаної літератури англійською мовою (Referens), за вимогами міжнародних наукометричних баз.

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

Прізвища, імена та по-батькові авторів, назву цитованого видання (журнал, монографія, збірник тощо) наводять послуговуючись безкоштовними сайтами (<http://www.easybib.com/> <http://www.bibme.org/>, <http://www.sourceaid.com/>, <https://www.citethisforme.com/>), що дозволяють здійснити переклад з використанням однієї з міжнародних систем транслітерації.

Назви статей наводять англійською мовою.

Порядок подання посилань Referens (список 2) має повністю співпадати зі списком використаної літератури (список 1).

Зразки посилання літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англійські джерела)

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 phthalate 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 амилазной 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.

Зразки посилань літератури в романській абетці

References

Стиль шрифту для англomовного варіанту списку джерел – NLM (National Library of Medicine), зразок:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53.

Статті в журналах:

DeLong EF, Karl DM. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 2015;(437):336–342.

Klochov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

Best RJ. Tomato spotted wilt virus. In: Advances Virus Res Eds Smith KM, Lauffer MA. Academic Press, New York, 1968:65–146.

Speissel B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O. TNM atlas: illustrated guide to the TNM. pTNM classification of malignant tumours. Berlin New York: Springer-Verlag. 1989. 12.

Sastry SK. Seed-borne plant virus diseases. India: Springer, 2013. 327 p.

Матеріали з'їздів, конференцій:

Dikova B, Djournanski A, Lambev H. Establishment of economically important viruses on *Echinacea purpurea* and their influence on the yield. In: Proceedings of the conference «Innovative aspects to coneflower study». Ed. Pospelov S. Poltava: Dyvosvit, 2013:36–45.



Yin R, Francis F, Bragard C, Liu Y, Chen J. Study on transmission efficiency of CMV transmitted by *Myzus persicae* from different places. In: Proceedings of 9th International Symposium on Aphids, Beijing, China. 2013:49–50.

Диссертационные работы:

Koreneva AA. Biological properties of medicinal plants viruses. PhD thesis, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2009: 22.

Сборники:

Dunich A, Mishchenko L. Heavy metals content in virus infected purple coneflower plants. Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol. 2013; 65(3):22–26.

Rose PI. Gelatin. In: Encyclopedia of polymer science and engineering Eds: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI New York: Wiley; 1987;7, 2nd ed. 488–513.

Shrago MI, Guchok MM, Kalugin YuV. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants. In: Current Problems of Cryobiology. Eds. Pushkar NS and Belous AM. Kiev: Naukova Dumka, 1981:157–201.

Патенти, заявки:

A.s. 4411066/14 SSSR, MBI G 01 N 33/50. A method of determining bile acids in biological fluids. Veselskiy SP, Lyashchenko PS, Лукьяненко IA. (SSSR). – N 1624322; zayavl. 25.01.1988; opubl. 30.01.1991, Byul. N 4.

Статті з електронних журналів:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53, available at: www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/

За наявності в статті DOI (Digital Object Identifier), яка є міжнародним ISO стандартом (<http://www.doi.org/>), в списку літератури бажано вказати її ідентифікатор, наприклад:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53. Cited 2 times. doi: 10.1134/S1023193508080077

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов перший варіант тексту статті.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки 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.



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 С. О. Остапенко
Підписано до друку 27.09.2017 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 10,32. Тираж 100 пр.
Зам. № 1648.

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