

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

№ 4 (36)
2016

Одеса
ОНУ
2016

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

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р.А. Волков (Чернівці, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П.І. Гвоздяк (Київ, Україна), 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), 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), 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.onu.edu.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>

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

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. Iutynska (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), 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.uran.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.uran.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>

З М І С Т

О Г Л Я Д О В І П Р А Ц І

М.Б. Галкін, В.О. Іваниця, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова МАТРИКС БІОПЛІВКИ – ХІМІЧНИЙ СКЛАД, СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ.....	6
--	---

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

Н.О. Бабій ВЕРТИКАЛЬНА ТРАНСМІСІЯ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	28
---	----

О.М. Василів, О.Д. Масловська, С.О. Гнатуш, О.І. Білий, Я.П. Ференсович ГЕНЕРУВАННЯ ЕЛЕКТРИЧНОГО СТРУМУ <i>DESULFUROMONAS</i> <i>ACETOXIDANS</i> IMV B-7384 ЗА ВНЕСЕННЯ ФЕРУМ (III) ЦИТРАТУ, ФУКСИНУ І МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО	42
---	----

Ж.Ю. Сергєєва, О.В. Басюл, О.Г. Горшкова, Т.І. Гаврилюк, Г.М. Назаренко АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ФЕРМЕНТОВАНИХ РОСЛИННИХ ПРОДУКТІВ ІЗ В'ЄТНАМУ	50
--	----

Ю.Б. Паньківська, Л.О. Білявська, О.Ю. Повниця, С.Д. Загородня ВИВЧЕННЯ АНТИАДЕНОВІРУСНОЇ ДІЇ ФТОРВМІСНИХ СПОЛУК НУКЛЕОЗИДНОЇ ТА НЕНУКЛЕОЗИДНОЇ ПРИРОДИ	60
--	----

А.Г. Мерліч, Н.В. Ліманська АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>PLANTARUM</i> , ВИДІЛЕНИХ З РОСЛИННИХ ДЖЕРЕЛ УКРАЇНИ ТА ФРАНЦІЇ, ПРОТИ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ	71
---	----

О.О. Нечипуренко, Д.В. Древаль, Д.Д. Провозін, І.О. Собко АДЕНОВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ, ЯК ОДНА З МОЖЛИВИХ ПРИЧИН ЖИРОВОГО ГЕПАТОЗУ У ОДНОДЕННИХ КУРЧАТ	86
---	----

Н.А. Ямборко, Н.О. Леонова, Г.О. Іутинська СИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ ҐРУНТОВИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ- ДЕСТРУКТОРАМИ ХЛОРООРГАНІЧНИХ СПОЛУК.....	96
--	----

С Т О Р І Н К И І С Т О Р І Ї

В.О. Кузнєцов ОДЕСЬКИЙ ПЕРІОД ЖИТТЯ ТА НАУКОВОЇ ДІЯЛЬНОСТІ АКАДЕМІКА Д.К. ЗАБОЛОТНОГО (28.12.1866 – 15.12.1929).....	108
---	-----

Х Р О Н І К А Н А У К О В О Г О Ж И Т Т Я

ХІІ МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ <i>DAROSTIM</i> 2016 «БІОТЕХНОЛОГІЯ ДЛЯ АГРАРНОГО ВИРОБНИЦТВА ТА ЗАХИСТУ ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА» УКРАЇНА, М. ОДЕСА, 7–10 ВЕРЕСНЯ 2016.....	119
---	-----

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	121
---	-----

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

M.B. Galkin, V.O. Ivanytsia, B.M. Galkin, T.O. Filipova BIOFILM MATRIX – CHEMICAL COMPOSITION, STRUCTURE, FUNCTIONS	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

N.O. Babii THE LEVEL OF HUMAAN IMMUNODEFICENCY VIRUS VERTICAL TRANSMISSION BY THE RESULTS OF MOLECULAR-GENETICS TESTS .	28
O.M. Vasyliy, O.D. Maslovska, S.O. Hnatush, O.I. Bilyy, Ya.P. Ferensovych ELECTRIC CURRENT GENERATION BY <i>DESULFUROMONAS</i> <i>ACETOXIDANS</i> IMV B-7384 WHILE FERRIC CITRATE, FUCHSINE AND METHYLENE BLUE APPLICATION	42
Zh.Yu. Sergieieva, O.V. Basiul, O.G. Gorshkova, T.Y. Gavriluk, G.M. Nazarenko VIETNAMESE FERMENTED PLANTS LACTOBACTERIA ANTAGONISTIC ACTIVITY.....	50
Yu. Pankivska, L. Biliavska, O. Povnitsa, S. Zagorodnya ANTIADENOVIRAL ACTIVITY OF FLUORIDE-CONTAINING NUCLEOSIDES AND BISPHTHONATES DERIVATES.....	60
A.G. Merlich, N.V. Limanska ANTAGONISTIC ACTIVITY OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> , ISOLATED FROM PLANT SOURCES OF UKRAINE AND FRANCE, AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA	71
O. Nechypurenko, D. Dreval, D. Provozin, I. Sobko ADENOVIRUS INFECTION AS ONE OF POSSIBLE CAUSES OF FATTY HEPATOSIS IN ONE DAY-OLD CHICKENS	86
N.A. Yamborko, N.O. Leonova, G.O. Iutyńska THE SYNTHESIS OF PHYTOHORMONES BY SOIL MICROORGANISMS- DESTRUCTORS OF ORGANOCHLORINES	96

PAGES OF HISTORY

V.A. Kuznetsov ODESA PERIOD OF ACADEMICIAN D.K. ZABOLOTNY (28.12.1866 – 15.12.1929) LIFE AND SCIENTIFIC ACTIVITY	108
---	-----

THE CHRONICLE OF A SCIENTIFIC LIFE

XII INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE 2016 <i>DAROSTIM</i> "BIOTECHNOLOGY FOR AGRICULTURAL PRODUCTION AND ENVIRONMENTAL PRITECTION" UKRAINE, ODESSA, 7-10 SEPTEMBER 2016	119
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	121

М.Б. Галкін, В.О. Іваниця, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеській національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65058, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

МАТРИКС БІОПЛІВКИ – ХІМІЧНИЙ СКЛАД, СТРУКТУРА, ВЛАСТИВОСТІ

Біоплівки є спільнотами мікробних клітин, які беруть участь в різних процесах, в тому числі в біоремедіації стічних вод, стимулюванні зростання рослин, хронічних інфекціях і промислових обростаннях. Клітини-резиденти біоплівки занурені в гідратований екзополімерний матрикс, компоненти якого синтезуються самими мікроорганізмами. Матрикс зазвичай містить поліцукриди, білки, нуклеїнові кислоти і ліпіди; він забезпечує механічну стабільність біоплівок, опосередковує їх адгезію до поверхонь і утворює компактну тривимірну полімерну структуру, яка забезпечує контакт між клітинами і їх транзиторне утримання в біоплівці. Матрикс виконує різні функції для спільноти: від забезпечення структурної жорсткості і захисту від зовнішнього середовища до контролю генної регуляції і адсорбції поживних речовин. Глибоке знання властивостей матриксу має виключно важливе значення для розробки нових стратегій контролю біопліткових інфекцій, для промислового і біотехнологічного використання біоплівок. Це стосується структури окремих компонентів, характеру взаємодії між молекулами і тривимірної просторової організації.

Дана робота присвячена огляду сучасних уявлень щодо складу структури та властивостей матриксу біоплівки як мікросередовища для існування клітин мікроорганізмів.

Ключові слова: біоплівка, матрикс, поліцукриди, білки, еДНК, ліпіди, біосурфактанти.

Найважливішим компонентом біоплівки є так званий матрикс (позаклітинна полімерна субстанція). Він є комплексом біополімерів, який синтезується клітинами мікроорганізмів, що формують біоплівку [2, 15, 34]. До складу матриксу входять поліцукриди, структурні білки, екзоферменти, нуклеїнові кислоти, тощо (рис. 1). Якісний і кількісний склад цих компонентів значно варіює в залежності від видів мікроорганізмів, що формують біоплівку, і від умов, в яких ці біоплівки утворюються. Так, у складі матриксу біоплівок, утворених хемолітотрофними мікроорганізмами, міститься значна кількість різних неорганічних сполук, наприклад сірки або кремнію.



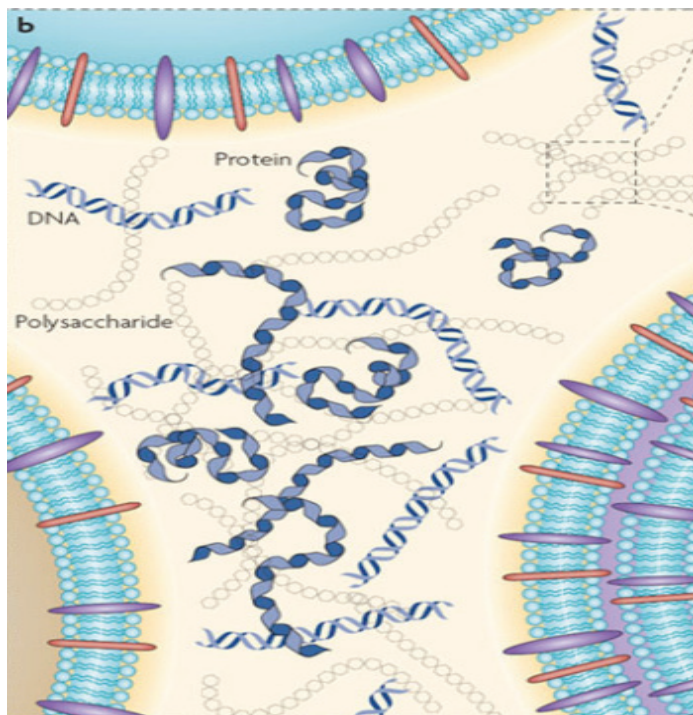


Рис. 1. Основні компоненти матриксу біоплівки [16]

Fig. 1. The major biofilm matrix components [16]

Матрикс відіграє головну роль в організації та функціонуванні біоплівки. Насамперед, він сприяє просторовій організації цих структур, відокремлює мікроорганізми від зовнішнього середовища та захищає від його негативного впливу. Значний ступінь в'язкості матриксу, зумовлений поліцукридами, що входять до його складу, дозволяє, з одного боку, сконцентрувати синтезовані екзоферменти поряд з клітинами, а, з іншого боку, перешкоджає рівномірному розподілу по всій біоплівці несприятливих для неї речовин, таких як, наприклад, антибіотики і дезінфектанти.

Компоненти матриксу біоплівки можуть так само слугувати резервними джерелами основних біогенних елементів у разі дефіциту поживних речовин, що дозволяє мікроорганізмам біоплівки, деякий час існувати за їх рахунок. Серед основних функцій матриксу можна виділити такі [16]:

1. Участь у процесі адгезії – матрикс забезпечує початкові етапи колонізації різних поверхонь клітинами і довготривале прикріплення біоплівок до них.
2. Участь в агрегації клітин – створення зв'язків між клітинами, тимчасова іммобілізація популяції, підвищення щільності клітин в певній точці простору.
3. Коhezія – формування полімерних мереж, що забезпечують механічну стабільність біоплівок, і складної архітектури.

4. Утримання води – утворення поліцукридного гелю, який протидіє втраті вологи в сухих умовах.
5. Створення захисного бар'єру – забезпечення резистентності до неспецифічних і специфічних чинників захисту макроорганізму, толерантність до антимікробних засобів, захист ферментів від несприятливого впливу (наприклад, нітрогенази ціанобактерій від негативного впливу кисню), протидія поїданню деякими найпростішими.
6. Сорбція органічних сполук і неорганічних йонів – зв'язування поживних речовин, ксенобіотиків, йонів важких металів; участь в обміні йонів; формування поліцукридного гелю.
7. Каталітична активність – забезпечення підвищеної активності екзоферментів за рахунок їх іммобілізації в поліцукридній матриці та переробки поживних речовин.
8. Створення запасів джерел живлення – карбон-нітроген- і фосфорвмісних сполук.
9. Сприяння генетичній мінливості – забезпечення горизонтального переносу генетичного матеріалу між клітинами в біоплівках.
10. Підтримання окисно-відновного потенціалу – забезпечення міжклітинного перенесення електронів за участі фімбрій та білкових нанодротів.
11. Експорт клітинних компонентів – забезпечення обміну з навколишнім середовищем за допомогою везикул, що містять білки, нуклеїнові кислоти, ліпополіцукриди і фосфоліпіди.

Поліцукриди матриксу біоплівки

Серед усіх компонентів, що входять до складу матриксу біоплівки, основну роль у його побудові відіграють екзополіцукриди (ЕПС). У кількісному співвідношенні це найбільш поширені в матриксі біополімери. У середньому, в залежності від конкретної біоплівки, їх кількість варіює від 50 до 90% від загальної маси сухої речовини матриксу. Більшість екзополіцукридів біоплівки це досить великі полімери з молекулярною масою від $0,5 \times 10^6$ до 2×10^6 дальтон [16]. На сьогоднішній день поліцукриди знайдені в матриксі біоплівок практично всіх досліджених мікроорганізмів. Застосування різних біохімічних методів, а також методів електронної та флуоресцентної мікроскопії (з використанням мічених флуоресцентними барвниками лектинів і моноклональних антитіл) дозволило детально охарактеризувати ці біополімери [53]. Основна роль поліцукридів у складі матриксу біоплівки – додання жорсткості конструкції за рахунок взаємодії між окремими полімерами. Це зумовлено тим, що між ланцюгами ЕПС здійснюються слабкі фізико-хімічні взаємодії, що стабілізують структуру (рис. 2).

Серед таких взаємодій можна виділити:

1. Формування водневих зв'язків – утворюються між ОН-групами орієнтованими на зовні від основного полімерного скелета.
2. Електростатичні взаємодії – виникають між гідрофільними і гідрофобними групами поліцукридних ланцюгів (наприклад, між ОН- і CH_3 -групами).



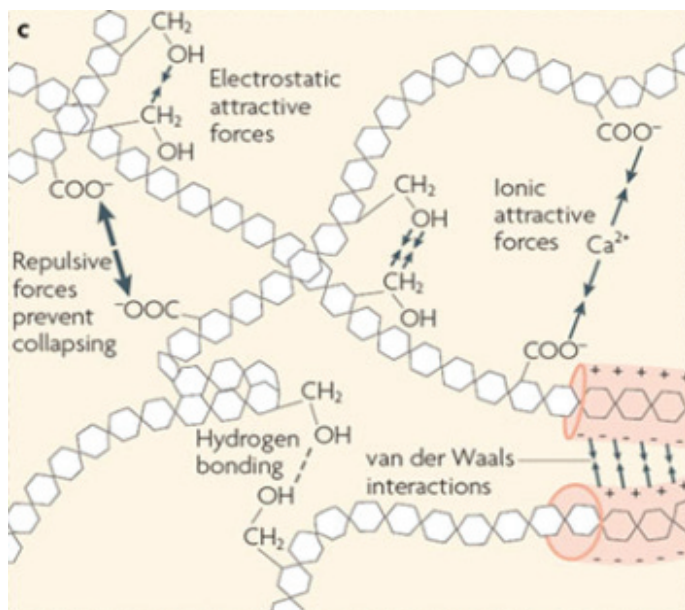


Рис. 2. Види слабких фізико-хімічних взаємодій між ланцюгами ЕПС матриксу [16]

Fig. 2. The varieties of weak physicochemical interactions and the entanglement of biopolymers that dominate the stability of the EPS matrix [16]

3. Йонні взаємодії – зумовлені зв’язуванням негативно заряджених груп поліцукридних ланцюгів за допомогою катіонів двовалентних металів (наприклад, $\text{COO}^- \text{-Ca}^{2+} \text{-OOC}^-$)
4. Сили відштовхування – виникають між однаково зарядженими групами запобігаючи колапсу структури.
5. Ван дер Ваальсові взаємодії – орієнтовані взаємодії в тих ділянках поліцукридних ланцюгів де зовнішні угруповання поліцукридів формують диполі.

За своїм складом поліцукриди матриксу біоплівки можна розділити на два основних типи – гомополіцукриди і гетерополіцукриди. Гомополіцукриди у складі матриксу біоплівки зустрічаються лише у відносно невеликого числа мікроорганізмів. Вони зазвичай представлені глюкоанами і фруктанами, що синтезуються бактеріями роду *Streptococcus* в біоплівках на поверхні зубів [43], та целюлозою, що синтезується *Gluconobacter xylinus*, *Agrobacterium tumifaciens*, *Rhizobium spp.* а також деякими представниками родини *Enterobacteriaceae* [67].

Екзополіцукриди матриксу біоплівок більшості бактерій є сумішшю з нейтральних і заряджених гетерополіцукридів. Вони також містять значну кількість різних органічних і неорганічних замісників, які значною мірою впливають на їх фізичні та біологічні властивості. Так, у зв’язку з наявністю у складі уронових кислот деякі з таких поліцукридів, включаючи альгінат, ксантан і коланову кислоту, є поліаніонними. Так само існують і полікатионні адгезини. Прикладом може слугувати інтерклітинний адгезин *Staphylococcus aureus* і *S. epidermidis*,

що складається із залишків β -1,6-N-ацетилглюкозаміну. У *S. epidermidis* також є екзополіцукрид, що складається з 130 залишків 2-деокси-2-аміно-D-глюкопіранозила. Характерною особливістю цього екзополіцукриду є те, що він існує у двох формах – мажорній (близько 80%) і мінорній. Мінорна форма цього поліцукриду відрізняється тим, що містить меншу кількість не-ацетильованих залишків, а також значну кількість фосфатних залишків [8, 41].

Склад екзополіцукридів матриксу біоплівки може значно відрізнятися не тільки у різних видів мікроорганізмів, але і в межах штамів одного виду. Наприклад, різні штами *S. termophilus* синтезують гетерополіцукриди, які відрізняються один від одного складом мономерів і молекулярною масою [58]. У *P. aeruginosa* у складі матриксу біоплівки виявлено як мінімум три екзополіцукриди, що відрізняються за хімічною будовою та фізико-хімічними властивостями – Pel, Psl і альгінат [44], який є найбільш вивченим екзополіцукридом матриксу біоплівки цієї бактерії. За своїм хімічним складом він відноситься до класу аніонних гетерополіцукридів, який будується з уронових кислот. Альгінат є нерозгалуженим гетерополімером з високою молекулярною масою, складається з 1,4-зв'язаних залишків β -D-мануронату і α -L-гулурунату. Ці мономери укладаються в гомополімерні блоки полімануронату і гетерополімерні послідовності з випадково розташованими залишками α -L-гулурунату і частково з O-ацетильованими залишками манноуронату [16]. Надпродукція цього екзополіцукриду зумовлює приналежність до мукоїдних штамів *P. aeruginosa* і викликана мутацією в гені *mucA*, який негативно регулюється σ -фактором AlgU. Альгінат задіяний у процес утворення мікроколоній на ранніх етапах формування біоплівки *P. aeruginosa*, проте, він грає велику роль і у процесі стабілізації зрілої біоплівки. У немуккоїдних штамів *P. aeruginosa* цю роль виконують Pel і Psl. Pel це поліцукрид з високим вмістом глюкози, тоді як Psl є структурою, що складається з повторюваних послідовностей пентацукридів, які містять D-манозу, D-глюкозу і L-рамнозу [5]. Pel є необхідним для формування так званих пеліклів – біоплівок, що утворюються на межі розділу фаз повітря-рідина, тоді як Psl забезпечує прикріплення до абіотичних і біотичних поверхонь, а також формування відповідної архітектури біоплівки *P. aeruginosa*. Psl зв'язується на поверхні клітин у вигляді спіралей, і, можливо, забезпечує агрегацію клітин між собою [27].

Для багатьох мікроорганізмів екзополіцукриди є ключовими для процесу формування біоплівки. Мутантні штами цих мікроорганізмів, дефектні за синтезом екзополіцукридів, або зовсім не можуть формувати зрілі біоплівки, або цей процес у них значно порушується [7, 27, 60]. Іноді такі мутанти зберігають здатність до адгезії, а також обмежену здатність до формування мікроколоній. Однак, в полівидових біоплівках за наявності в їх складі видів, що синтезують власні екзополіцукриди, такі мутанти отримують можливість інтегруватися до складу співтовариства [52]. Тому, пропорція різних екзополіцукридів в змішаних біоплівках не завжди збігається з біорізноманітністю такої спільноти [49].



Білки матриксу біоплівки

Другим за вмістом компонентом матриксу біоплівки є екзобілки, які поділяються за своїм призначенням на дві великі групи [13, 20]: структурні білки та екзоферменти.

У біоплівках виявляється значна кількість різних екзоферментів, багато з яких залучаються до деградації біополімерів. Субстратом цих ферментів є водорозчинні компоненти (такі як поліцукриди, нуклеїнові кислоти і білки), а так само деякі водонерозчинні полімери (целюлоза, хітин, ліпіди) і різні органічні частки захоплені біоплівкою [62]. Основні ферменти матриксу біоплівки наведені в таблиці.

Таблиця

Головні ферменти матриксу біоплівки [63]

Table

Major enzymes in biofilm matrix [63]

Ферменти	Функція
Протеази Пептидази	Гідроліз білків
Ендоцеллюлази Хітинази α -Глюкозооксидази β -Глюкозооксидази β -Ксилозидази N-Ацетил- β -глюкозамінідази Хітобіозидази β -Глюкуронідази	Гідроліз полі- або олігоцукридів
Фосфатази	Фосфомоноестеразна активність
Фенооксидази Пероксидази	Оксидоредуктазна активність

Наявність в матриксі біоплівки ферментів забезпечує його деградацію, сприяє розпаду біополімерів на низькомолекулярні продукти, які згодом можуть бути використані мікроорганізмами як джерела вуглецю і енергії. Ці ж ферменти беруть участь і в завершенні життєвого циклу біоплівки, провокуючи відкріплення клітин. Деякі інші ферменти, такі як еластаза і гіалуронідаза є важливими факторами патогенності, що забезпечують розвиток інфекційного процесу [1].

Деякі ферменти матриксу біоплівки бактерій і грибів становлять значний комерційний інтерес. Завдяки широкому спектру різних ферментів у складі матриксу, біоплівки можуть бути використані для біоочищення, наприклад, стічних вод, від органічних забруднювачів.



Ферменти матриксу також зумовлюють деградацію синтетичних полімерів мікроорганізмами. Більш того, ферменти матриксу біоплівки, які беруть участь у підтримці окисно-відновного потенціалу, зумовлюють біокорозію.

Ферменти добре інтегруються в матрикс біоплівки, у зв'язку зі своєю здатністю іммобілізуватися на екзополіцукридах [62, 63]. Наприклад, у *P. aeruginosa* екзоліпаза LipA іммобілізується на альгінаті за рахунок слабкої взаємодії [29]. Іммобілізація ферментів на поліцукридних ланцюгах сприяє підвищенню їх активності, а також, забезпечує протікання реакцій, що каталізуються цими ферментами, на оптимальній відстані від клітин, що призводить до оптимізації процесу поглинання клітинами кінцевих продуктів цих реакцій. Більш того, взаємодія ферментів і ЕПС підвищує їх термостабільність і резистентність до протеолізу [51].

Багато екзоферментів мікроорганізмів активно беруть участь у деградації компонентів матриксу біоплівки у випадку нестачі поживних речовин [13, 66]. Прикладом компонентів матриксу, що зазнають ферментативного руйнування у разі голодування можуть слугувати декстран, інουλін і леван, що синтезуються бактеріями роду *Streptococcus* у ротовій порожнині, а також леван, який присутній в так званих “матричних порожнинах” (порах і каналах всередині матриксу біоплівки, що містять ліпіди і воду, але не містять гідратовані молекули поліцукридів) біоплівки *Pseudomonas syringae* [25, 37]. Екзополіцукриди зазвичай руйнуються шляхом гідролізу або лізису, однак, швидкість такої деградації є досить низькою [56]. У морських строматолітах екзополіцукриди і білки матриксу секретуються бактеріями, і, потім швидко фрагментуються і перебудовуються, зазвичай сульфат-редуквальними бактеріями в більш стійкі полімери [10].

Другою групою білків матриксу біоплівки є структурні білки, такі як білки, асоційовані з клітинною поверхнею, і глікопептиди. Структурні білки грають важливу роль у стабілізації та підтримці структури біоплівки, забезпечуючи формування поліцукридних мереж, а також забезпечуючи їх зв'язок з поверхнею клітин мікроорганізмів [16]. Прикладами таких білків можуть слугувати глюканвмісний білок *S. mutans*, лектини зовнішньої мембрани *Azospirillum braziliensis*, а також галактозо-специфічний LecA та фукозо-специфічний LecB *P. aeruginosa*, які залучені в процес формування біоплівки цим мікроорганізмом [11, 17, 26, 31, 55]. Синтетичні високоафінні мультивалентні ліганди, які зв'язуються з LecB, не тільки інгібують процес формування біоплівки *P. aeruginosa*, але і індують розпад вже сформованих біоплівок цього мікроорганізму незалежно від їх віку та стадії розвитку. Це відбувається через те, що комплекс ліганд-LecB втрачає здатність здійснювати стабілізуювальну функцію [21]. Було показано, що секреторний білок CdrA здатний безпосередньо приєднуватися до Psl у біоплівці *P. aeruginosa* [4]. Припускається, що цей білок може існувати у двох формах – екстраклітинній, і мембранозв'язаній. Екстраклітинна форма CdrA сприяє зв'язуванню ланцюгів Psl між собою, тим самим, підсилюючи жорсткість структури матриксу, а мембранозв'язана форма забезпечує взаємодію між матриксом і клітинами.



Іншою важливою групою структурних білків матриксу біоплівки є поверхневі білки, асоційовані з біоплівкою (Var) *S. aureus* і Вар-подібні білки. Це високомолекулярні білки, що знаходяться на поверхні клітин і зумовлюють формування біоплівки деякими видами бактерій [24]. Вони містять коровий домен, що складається з тандемних амінокислотних повторів, які необхідні для формування біоплівки, а також для прояву патогенних властивостей. Важливими білковими компонентами матриксу біоплівки є амілоїди. Амілоїди містять впорядковані білкові повтори довільної довжини, що формують фібрили, які містять бічні ланцюги з β -складчастою вторинною структурою. Ці ланцюги розташовані перпендикулярно до основної осі амілоїдів. Амілоїди залучаються до адгезії до поверхонь неживих клітин і живих організмів, перебігу процесу інвазії, а також виконують функцію цитотоксинів [36].

Нарешті, важливу роль у процесі формування біоплівки виконують складні білкові структури, які знаходяться на поверхні клітин мікроорганізмів, такі як джгутики, фімбрії і пілі. Не входячи формально до компонентів матриксу, ці структури забезпечують взаємодію клітин з компонентами останнього. Так, фімбрії IV типу *P. aeruginosa* здатні зв'язувати позаклітинну ДНК і, можливо, грають роль зв'язувальної структури між клітинами і компонентами матриксу [46]. У *Salmonella typhimurium* і *Escherichia coli* біосинтез тонких агрегативних фімбрій і целюлози, призводить до швидкого формування ригідного гідрофобного матриксу. Порушення ж синтезу таких фімбрій призводить до утворення більш тендітного матриксу, навіть якщо синтез целюлози не порушується [40].

Нуклеїнові кислоти в матриксі біоплівки

Біоплівки багатьох мікроорганізмів містять у складі матриксу екстрацелюлярну ДНК (еДНК) [13]. Кількість еДНК в матриксі біоплівки може сильно відрізнятися навіть у філогенетично споріднених видів. Так, у *S. aureus* кількість еДНК в матриксі біоплівки може досягати 25–30% від сухої маси речовин матриксу, тоді як у близько спорідненого *S. epidermidis* еДНК є мінорним компонентом матриксу біоплівки [19].

Раніше еДНК вважалася лише резидентним компонентом матриксу біоплівки що вивільняється лише у зв'язку з лізисом клітин, проте дослідження останніх років показали, що еДНК є важливим інтегральним компонентом матриксу біоплівки [30, 63]. Важливість нуклеїнових кислот для процесу агрегації клітин була показана для бактерій роду *Rhodovulum*, здатних до самоосадження [59]. Обробка клітин цих бактерій нуклеазами призводить до припинення процесу самоосадження, тоді як використання цукролітичних і пептолітичних ферментів не викликає подібного ефекту [59]. еДНК також є мажорним компонентом матриксу біоплівки *P. aeruginosa*, у якої вона виконує функцію міжклітинного конектора [65]. Показано, що обробка ДНКазми призводить до повного інгібування процесу формування біоплівки цим мікроорганізмом [61].

Джерела еДНК в матриксі біоплівки мабуть не є ідентичними у всіх мікроорганізмів. У гамма-протеобактерії штаму F8 було показано наявність подібності, так і суттєві відмінності в будові еДНК у порівнянні з геномною ДНК,



що є доказом того, що наявність еДНК в матриксі біоплівки цієї бактерії не можна пояснити простим лізисом клітин [2]. Однак, у *P. aeruginosa* і *P. putida* еДНК ідентична геномній [50]. У *S. epidermidis* джерелом еДНК є особлива субпопуляція клітин, які піддаються лізису за участі біфункціонального автолізину (AtlE). Ця ДНК індукує утворення біоплівки іншою частиною популяції [30]. Не дивлячись на все вище описане, функції та природа еДНК в матриксі біоплівки сьогодні ще повністю не з'ясовані.

Ліпіди і сурфактанти матриксу біоплівки

Такі компоненти матриксу як екзополіцукриди, білки і еДНК є гідрофільними компонентами з високим ступенем гідратації, однак у складі матриксу біоплівки зустрічаються і гідрофобні компоненти. Наприклад, ті штами бактерій роду *Rhodococcus*, які не мають фімбрій, адгезуються до поверхні за рахунок наявності сильно гідрофобної капсули, хімічний склад якої відповідає хімічному складу матриксу, що потім утворюється [32]. Капсула і матрикс цих бактерій побудовані з амфіфільних поліцукридів, що містять такі бічні замісники як метильні та ацетильні групи [33].

У матриксі біоплівок також присутні ліпіди, як в асоціації з екзополіцукридами, так і у вільній формі [6]. Так, для *Thiobacillus ferrooxidans* провідну роль у процесі адгезії і формуванні біоплівки грає ліпополіцукрид [45]. *Serratia marcescens* активно синтезує групу ліпідів, які володіють поверхнево-активними властивостями і відомі як серраветтини [28]. Іншими важливими ліпідними продуктами, що входять до складу матриксу біоплівок деяких бактерій є сурфактин, віскозин та емульсан. Вони також мають поверхнево-активні властивості і використовуються для руйнування гідрофобних сполук, підвищуючи тим самим їх біодоступність.

Іншою групою алкаліфільних компонентів матриксу біоплівки є біосурфактанти. Ці речовини володіють антимікробною і антифунгальною активністю, а також регулюють чисельність клітин у складі біоплівки шляхом їх руйнування або провокування відкріплення.

Одними з найбільш вивчених біосурфактантів є рамноліпіди *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* синтезує два основних види рамноліпідів, що відрізняються за кількістю залишків рамнози, яка входить до їх складу – монорамноліпід і дирамноліпід [9]. Рамноліпіди виконують ряд найважливіших біологічних функцій, необхідних для підтримання функціонування біоплівок, сформованих *P. aeruginosa*. Вони забезпечують агрегацію клітин, формування грибоподібних тіл зрілих біоплівок, регулюють газообмін у біоплівці шляхом протидії колонізації матричних порожнин, регулюють чисельність популяції клітин, а також виконують функцію гемолізинів [3, 37].

Вода як компонент матриксу біоплівки

Вода, в кількісному відношенні, є найбільшим компонентом матриксу біоплівки. Матрикс створює дуже гідратоване середовище, яке висихає повільніше, ніж оточення, тим самим, оберігаючи біоплівки від змін водного балансу. Багато



компонентів матриксу біоплівки є дуже гігроскопічними, і збереження води всередині матриксу носить скоріше механічний характер, а не здійснюється за рахунок залучення будь-яких специфічних механізмів її утримання. Передбачається, що в матриксі біоплівки існують так звані «гідралічні розв'язки» (зони, які не обмінюються водою з навколишнім середовищем, наприклад, сухі шари матриксу, які покривають зони з великим вмістом води, проте володіють слабкою здатністю до її транспорту), які утворюються в умовах швидкої гідратації або зневоднення, запобігаючи порушенню водного балансу в біоплівці [35]. Включені в матрикс клітини ціанобактерії *Nostoc commune* підтримують свою фотосинтетичну активність у процесі висушування та регідратації, тоді як за відсутності матриксу, за тих самих умов відбувається порушення процесу фотосинтезу [54].

Формування матриксу біоплівки є відповіддю мікроорганізмів на висушування [39]. Висушування, очевидно, є одним з тих чинників навколишнього середовища, коли формування біоплівки, і, зокрема матриксу, надає найбільшу взаємну вигоду як здатним до синтезу компонентів матриксу, так і не здатним до цього членам спільноти [38]. Висушування призводить до концентрування матриксу, що зумовлює появу великої кількості неспецифічних сайтів зв'язування, здатних реагувати між собою, зменшуючи розміри біоплівки. Подібне можна спостерігати у біоплівках фототрофних мікроорганізмів, які залежно від зсуву водного балансу в навколишньому середовищі в той чи інший бік здатні значно зменшувати або збільшувати свої розміри.

Матрикс біоплівки може грати роль молекулярного сита, регулюючи надходження катіонів, аніонів, неполярних сполук, а також різних частинок з водної фази [14]. У матриксі біоплівки є неполярні регіони, групи з потенційною здатністю до утворення водневих зв'язків, полярні групи (катіонні і аніонні) [57]. У зв'язку з цим, частки і наночастки можуть вловлюватися і накопичуватися в матриксі біоплівки. Важкі метали, такі як Ni^{2+} , Zn^{2+} і Cd^{2+} зв'язуються з клітинною стінкою бактерій, тоді як гідрофобні сполуки, такі як фенол, ксилол і толуол накопичуються безпосередньо в матриксі біоплівки [64]. Наявність у навколишньому середовищі деяких сполук, може призводити до перебудов у структурі та організації матриксу. Так, було виявлено, що у відповідь на присутність толуолу у навколишньому середовищі в матриксі біоплівки *P. putida* значно зростає кількість карбоксильних груп [47].

Матрикс і механічні властивості біоплівки

Механічна стійкість є важливим параметром, що забезпечує тривале існування біоплівок в природних умовах, які постійно змінюються. Як було описано вище, основну роль в процесі механічної стабілізації біоплівки відіграють екзополіцукриди. Для запобігання обростанню будь-яких поверхонь не бажаними біоплівками доводиться враховувати адгезивні і когезивні властивості матриксу. У разі обростання, наприклад катетерів, ступінь стабільності матриксу відіграє визначальну роль у процесі відкріплення і формування клітинно-матричної



емболії, а, відповідно, і в імовірності зараження [51]. У природних умовах, матрикс біоплівки відіграє провідну роль у стабілізації осаджених клітин [14].

Важливу роль у процесі стабілізації біоплівки можуть також грати сили зсуву, що дозволяє припустити наявність фенотипової адаптації в біоплівках [51]. Виявлено, що мікроколонії бактерій під дією постійних сил зсуву здатні переміщуватися по поверхні [42].

Завдяки матриксу біоплівки проявляють в'язко-еластично-пружні властивості. Для них є характерним як наявність зворотної еластичної відповіді, так і незворотної деформації, в залежності від природи і вираженості сил, які діють на матрикс біоплівки. Експерименти з біоплівками *P. aeruginosa* показали, що у відповідь на тиск вони проходять через фазу еластичної реакції до певної критичної точки, за якою біоплівка втрачає в'язко-еластично-пружні властивості [23]. Це, можна пояснити тим, що компоненти матриксу зв'язуються між собою за рахунок описаних вище слабких фізико-хімічних взаємодій. Біоплівки *S. aureus* виявляють еластично-пружну відповідь на короткі за часом стимули і в'язко-рідинну – на тривалі [42]. Зворотна деформація матриксу дозволяє біоплівкам переживати помірні за силою короточасні зовнішні впливи. Це супроводжується певною реорганізацією біоплівки і підвищенням міцності матриксу за рахунок гіперпродукції екзополіцукридів [48]. Важливу роль в процесі зміцнення матриксу біоплівки визначає взаємодія його компонентів з мультивалентними йонами. Наприклад, йони кальцію здатні вступати у взаємодію з альгінатом *P. aeruginosa* зшиваючи між собою його поліаніонні ланцюги [22].

Вивчення реологічних властивостей біоплівок із залученням новітніх методів показало, що у відповідь на будь-які зовнішні стресові впливи в біоплівках значно посилюється когезія (так зване штамове зміцнення) [18]. Магнітуда модуля еластичності (тобто тенденції об'єкта або матеріалу зворотно формувати еластичні сили для відповіді на деформацію), і в'язкості значно варіює серед полівидових біоплівок, що дозволяє використовувати цей параметр як показник еласто-в'язкої відповіді на зовнішні впливи [21, 51]. Час стрес-релаксації (тобто відхилення від ідеальної еластичної поведінки об'єкта або матеріалу у зв'язку з внутрішнім звільненням від стресу під час константної деформації), зазвичай, близько 18 хвилин, часто збігається у багатьох природних біоплівок [48]. Останнє твердження дає підставу припустити, що зазначений час є найкоротшим періодом, за який біоплівка формує фенотипову відповідь на тимчасовий механічний стрес. Проте, у деяких біоплівок час релаксації може бути значно коротшим. Так, у біоплівки *S. epidermidis* час стрес-релаксації становить лише 13,8 секунд [18]. Причини такого явища на сьогодні залишаються не ясними.

Виходячи з вище описаного, можна зробити висновок, що матрикс біоплівки завдяки своєму складу та будові формує оптимальне мікросередовище для існування клітин мікроорганізмів. Його функції численні: він забезпечує механічну стійкість біоплівок і захищає мікроорганізми від висихання; матрикс виконує роль бар'єру від несприятливих хімічних і біологічних впливів, таких як осмотичний шок, зміна рН і концентрація кисню, антибіотик і антисептик, імунна система макроорганізму, поїдання найпростішими. Крім того, він сприяє



сорбції та зберіганню поживних речовин і мікроелементів, є місцем протікання позаклітинних ензиматичних реакцій. Матрикс забезпечує тісний контакт бактеріальних клітин один з одним, що полегшує обмін генетичним матеріалом між ними. Часто біоплівку образно називають “містом” мікроорганізмів. Тоді матрикс можна розглядати як їх інфраструктуру. Поглиблення знань щодо цієї інфраструктури дасть можливість покращити контроль за інфекційним процесом, а також широко використовувати біоплівкові технології у промисловості.

Н.Б. Галкин, В.А. Иваныця, Б.М. Галкин, Т.О. Филиппова

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

МАТРИКС БИОПЛЁНКИ – ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СТРУКТУРА, СВОЙСТВА

Реферат

Биопленки являются сообществами микробных клеток, которые принимают участие в различных процессах, в том числе в биоремедиации сточных вод, стимулировании роста растений, хронических инфекциях и промышленных обрастаниях. Клетки-резиденты биопленки заключены в гидратированный экзополимерный матрикс, компоненты которого синтезируются самими микроорганизмами. Матрикс обычно содержит полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и липиды; он обеспечивает механическую стабильность биопленок, опосредует их адгезию к поверхностям и образует компактную трехмерную полимерную структуру, которая обеспечивает контакт между клетками и их транзитное удержание в биопленке. Матрикс выполняет различные функции для сообщества: от обеспечения структурной жесткости и защиты от внешней среды до контроля генной регуляции и адсорбции питательных веществ. Глубокое знание свойств матрикса имеет исключительно важное значение для разработки новых стратегий контроля биопленочных инфекций, для промышленного и биотехнологического использования биопленок. Это касается структуры отдельных компонентов, характера взаимодействия между молекулами и трехмерной пространственной организации.

Даная работа посвящена обзору современных представлений о составе, структуре и свойствах матрикса биоплёнки, как микросреды для существования клеток микроорганизмов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: биоплёнка, матрикс, полисахариды, белки, эДНК, липиды, биосурфактанты.



M.B. Galkin, V.O. Ivanytsia, B.M. Galkin, T.O. Filipova

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

**BIOFILM MATRIX – CHEMICAL COMPOSITION,
STRUCTURE, FUNCTIONS**

Summary

Biofilms are the communities of microbial cells that underpin diverse processes including sewage bioremediation, plant growth promotion, chronic infections and industrial biofouling. The cells resident in the biofilm are encased within a self-produced hydrated exopolymeric matrix. The matrix commonly comprises polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids; they provide the mechanical stability of biofilms, mediate their adhesion to surfaces and form a cohesive, three-dimensional polymer network that interconnects and transiently immobilizes biofilm cells. This matrix fulfils a variety of functions for the community, from providing structural rigidity and protection from the external environment to controlling gene regulation and nutrient adsorption. Profound knowledge of the biofilm matrix properties is extremely important for the development of novel strategies to control biofilm infections, for the industrial and biotechnological biofilm using. It concerns the structure of the individual components, the nature of the interactions between the molecules and the three-dimensional spatial organization. This work is the overview of the modern looks about the chemical composition, structure and functions of the biofilm matrix as microenvironment for the biofilm cells life.

Key words: biofilm, matrix, polysaccharides, proteins, eDNA, lipids, biosurfactants.

СПИСОК ЦИТОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Adair C. G., Gorman S. P., Feron B. M. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia // *Intens. Care Med.* – 1999. – V. 25. – P. 1072–1076.
2. Böckelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T.R., Wecke J., Lawrence J.R., Szewzyk U. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – V. 262. – P. 31–38.
3. Boles B.R., Thoendel M., Singh P.K. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilms communities // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101. – P. 16630–16635.
4. Branda S.S., Chu F., Kearns D.B., Losick R., Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix // *Mol. Microbiol.* – 2006. – V. 59. – P. 1229–1238.
5. Byrd M. S., Sadvovskaya I., Vinogradov E., Lu H. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production // *Mol. Microbiol.* – 2009. – V. 73. – P. 622–638.
6. Conrad A., Suutari M. K., Keinänen M. M., Cadoret A., Faure P., Mansuy-Huault L., Block J. C. Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs // *Lipids.* – 2003. – V. 38. – P. 1093–1105.



7. Danese P. N., Pratt L. A., Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture // J. Bacteriol. – 2000. – V. 182. – P. 3593–3596.
8. Davey M. E., O’Toole G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microb. mol. boil. rev. – 2000. – V. 64. – № 4. – P. 847–867.
9. Davey M. E. Cajazza N. C., O’Toole, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185. – P. 1027–1036.
10. Decho A. W., Visscher P. T., Reid R. P. Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite // Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleoecol. – 2005. – V. 219. – P. 71–86.
11. Diggle S. P., Stacey R. E., Dodd C., Cámara M., Williams P., Winzer K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8. – P. 1095–1104.
12. Flemming H. C., Neu T. R., Wozniak D. The EPS matrix: the house of biofilm cells // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189 – P. 7945–7947.
13. Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen, P. H. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin // Water Res. – 1996. – V. 30. – P. 1749–1758.
14. Gerbersdorf S. U., Jancke T., Westrich B., Paterson, D. M. Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances // Geobiology. – 2008. – V. 6. – P. 57–69.
15. Hall-Stoodley, Nistico L., Luanne K.S., et al. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates // BMC Microbiology. – 2008. – V 8. – P. 1–16.
16. Hans-Curt Flemming, Jost Wingender. The biofilm matrix // Nat. rev. microbial. – 2010. – V. 8. – P. 623–633.
17. Higgins M. J., Novak J. T. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation // J. Environ. Eng. – 1997. – V. 123. – P. 479–485.
18. Hohne D. N., Younger G. J., Solomon M. J. Flexible multifluidic device for mechanical property characterization of soft viscoelastic solids such as bacterial biofilms // Langmuir. – 2009. – V. 25. – P. 7743–7751.
19. Izano E. A., Amarante M. A., Kher W. B., Kaplan J. B. Differential roles of poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – V. 74. – P. 470–476.
20. Jahn A., Nielsen P. H. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms // Water Sci. Technol. – 1998. – V. 37 – P. 17–24.
21. Johansson E. M., Cruz E., Kolomiets L., Buts, R. U., Kadam, K. M., Bartels S. P. Diggle, et al. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB // Chem. Biol. – 2008. – V. 15. – P. 1249–1257.



22. Klausen M. M., Thomsen T. R., Nielsen J. L., Mikkelsen L. H. Nielsen P. H. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs // FEMS Microbiol. Ecol. – 2004. – V. 50. – P. 123–132.
23. Körstgens V., Flemming H. C., Wingender J., Borchard W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* // Water Sci. Technol. – 2001. – V. 43. – P. 49–57.
24. Lasa I., Penadés J. R. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation // Res. Microbiol. – 2006. – V. 157. – P. 99–107.
25. Laue H., Schenk A., Li H., Lambertsen L., Neu T. R., Molin S., Ullrich M. S. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae* // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 2909–2918.
26. Lynch D. J., Fountain T. L., Mazurkiewicz, Banas J. A. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – V. 268. – P. 158–165.
27. Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5. – P. 1–11
28. Matsuyama T., Nakagawa Y. Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions // J. Microbiol. Methods. – 1996. – V. 25. – P. 165–175.
29. Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H. C. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms // Int. J. Biol. Macromol. – 1999. – V. 26. – P. 3–16.
30. Molin S., Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure // Curr. Opin. Biotechnol. – 2003. – V. 14. – P. 255–261.
31. Mora P., Rosconi F., Franco Fraguas L., Castro-Sowinski S. *Azospirillum brasilense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium // Arch. Microbiol. – 2008. – V. 189. – P. 519–524.
32. Neu T. R., Poralla K. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain // FEMS Microbiol. Lett. – 1988. – V. 49. – P. 389–392.
33. Neu T. R., Dengler T., Jann B., Poralla K. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain // J. Gen. Microbiol. – 1992. – V. 138. – P. 2531–2537.
34. O'Toole G. A. To Build a Biofilm // Journal of Bacteriology. – 2003. – V. 185. – № 9. – P. 2687–2689.
35. Or D., Phutane S., Dechesne A. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils // Vadose Zone J. – 2007. – V. 6. – P. 298–305.
36. Otzen D., Nielsen P. H. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid // Cell. Mol. Life Sci. – 2007. – V. 65. – P. 910–927.
37. Pamp S. J., Gjermansen, M., Tolker-Nielsen T. In The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations / eds Kjelleberg, S., Givskov M. – Horizon Bioscience, Norfolk, UK. – 2007. – P. 37–69



38. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes // *Microbiol. Rev.* – 1994. – V. 58. – P. 755–805.

39. Roberson E. B., Firestone M. K. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58. – P. 1284–1291.

40. Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix // *Mol. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – P. 1452–1463.

41. Rupp M. E., Ulphani J. S., Fey P. D., Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutination of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67. – P. 2627–2632.

42. Rupp C. J., Fux C. A., Stoodley P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 2175–2178.

43. Russell R. R. B. Bacterial Polysaccharides in Dental Plaque. In *Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends* / Ed. Ullrich, M. Caister Academic, Norfolk, UK. – 2009. – P. 143–156.

44. Ryder C., Byrd M., Wozniak D. J. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – V. 10 – P. 644–648.

45. Sand W., Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria // *Res. Microbiol.* – 2006. – V. 157. – P. 49–56.

46. van Schaik E. J., Giltner C. L., Audette G. F., Keizer D. W., Bautista D. L., Shupsky C. M., Sykes B. D., Irvin R. T. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili // *J. Bacteriol.* – 2005. – V. 187. – P. 1455–1464.

47. Schmitt J., Nivens D., White D. C., Flemming, H. C. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances — an FTIR-ATR-study // *Water Sci. Technol.* – 1995. – V. 32. – P. 149–155.

48. Shaw T., Winston M., Rupp C. J., Klapper I., Stoodley P. Commonality of elastic relaxation times in biofilms // *Phys. Rev. Lett.* – 2004. – V. 93. – P. 98–102.

49. Skillman L., Sutherland I. W., Jonse, M. V. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – V. 85. – P. 13–18.

50. Steinberger R. E., Holden P. A. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 5404–5410.

51. Stoodley P., Cargo R., Rupp C. J., Wilson S., Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – V. 29. – P. 361–367.

52. Sutherland I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment // *Trends Microbiol.* – 2001. – V. 9. – P. 222–227.

53. Sutherland I. W. in *Comprehensive Glycoscience* / ed. Kamerling, J. P. – Elsevier, Doordrecht. – 2007. – V. 2. – P. 521–558.



54. Tamaru Y., Takami Y., Yoshida T., Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 7327–7333.
55. Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation // Microbiology. – 2005. – V. 151. – P. 1313–1323.
56. Ude S., Arnold D. L., Moon C. D., Timms-Wilson T., Spiers A. J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates / Ude S., Arnold D. L., Moon C. D., Timms-Wilson T., Spiers A. J. // Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8. – P. 1997–2011.
57. VanHullebusch E. D., Zandvoord M. H., Lens P. N. L. Metal immobilization by biofilms: mechanisms and analytical tools // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2004. – V. 2. – P. 9–33.
58. Vaningelgem F., Zamfir M., Mozzi F., Adriany T., Vancanneyt M., Swings J., De Vuyst L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70. – P. 900–912.
59. Watanabe M. Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – V. 50. – P. 682–691.
60. Watnik P. I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. // Mol. Microbiol. – 1999. – V. 34. – P. 586–595.
61. Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. S., Mattick J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation // Science. – 2002. – V. 295. – P. 1487.
62. Wingender J., Jaeger K. E., Flemming H. C. In Microbial Extracellular Polymeric Substances. / eds Wingender J., Neu T., Flemming, H. C. – Springer, Heidelberg. – 1999. – P. 231–251.
63. Wingender J., Jaeger K. E. In Encyclopedia of Environmental Microbiology. / ed. Bitton G. – Wiley, New York. – 2002. – P. 1207–1223.
64. Wuertz S. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals // Water Sci. Technol. – 2001. – V. 43. – P. 25–34.
65. Yang L., Barken K. B., Skindersoe M. E., Christensen A. B., Givskov M., Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 1318–1328.
66. Zhang X., Bishop P. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances // Chemosphere. – 2003. – V. 50. – P. 63–69.
67. Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix // Mol. Microbiol. – 2001. – V. 39. – P. 1452–1463.



REFERENCES

1. Adair CG, Gorman SP, Feron BM. Implications of endotracheal tube biofilm for ventilator-associated pneumonia. *Intens. Care Med.* 1999;25:1072–1076.
2. Böckelmann U, Janke A, Kuhn R, Neu TR, Wecke J, Lawrence JR, Szewzyk U. Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006;262:31–38.
3. Boles BR, Thoendel ., Singh P. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilms communities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2004;101:16630–16635.
4. Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Mol. Microbiol.* 2006; 59:1229–1238.
5. Byrd MS, Sadvskaya I, Vinogradov E, Lu H. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol. Microbiol.* 2009;73: 622–638.
6. Conrad A, Suutari MK, Keinänen MM, Cadoret A, Faure P, Mansuy-Huault L, Block JC Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids.* 2003;38:1093–1105.
7. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 2000;182:3593–3596.
8. Davey ME, O’Toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microb. mol. boil. rev.* 2000;64:847–867.
9. Davey ME, Cajazza NC, O’Toole, GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 2003;185:1027–1036.
10. Decho AW, Visscher PT, Reid RP. Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Paleogeogr. Paleoclimatol. Paleocol.* 2005;219:71–86.
11. Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Cámara M, Williams P, Winzer K. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 2006;8:1095–1104.
12. Flemming HC, Neu TR, Wozniak D. The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J. Bacteriol.* 2007;189:7945–7947.
13. Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen, PH. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.* 1996;30:1749–1758.
14. Gerbersdorf SU, Jancke T, Westrich B, Paterson DM. Microbial stabilization of riverine sediments by extracellular polymeric substances. *Geobiology.* 2008;6:57–69.
15. Hall-Stoodley, Nistico L, Luanne KS. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiology.* 2008;8:1–16.



16. Flemming HG, Jost Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. rev. microbial.* 2010;8:623–633.
17. Higgins MJ, Novak JT. Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environ. Eng.* 1997;123:479–485.
18. Hohne DN, Younger GJ, Solomon MJ. Flexible multifluidic device for mechanical property characterization of soft viscoelastic solids such as bacterial biofilms. *Langmuir.* 2009;25:7743–7751.
19. Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. Differential roles of poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008;74:470–476.
20. Jahn A, Nielsen PH. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Water Sci. Technol.* 1998;37:17–24.
21. Johansson EM, Crusz E, Kolomiets L, Buts RU, Kadam KM, Bartels SP, Diggle SP. Inhibition and dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by glycopeptide dendrimers targeting the fucose-specific lectin LecB. *Chem. Biol.* 2008;15:1249–1257.
22. Klausen MM, Thomsen TR, Nielsen JL, Mikkelsen LH, Nielsen PH. Variations in microcolony strength of probe-defined bacteria in activated sludge flocs. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2004;50:123–132.
23. Körstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W. Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Sci. Technol.* 2001;43:49–57.
24. Lasa I, Penadés JR. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* 2006;157:99–107.
25. Laue H, Schenk A, Li H, Lambertsen L, Neu TR, Molin S, Ullrich MS. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology.* 2006;152:2909–2918.
26. Lynch DJ, Fountain TL, Mazurkiewicz, Banas JA. Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007;268:158–165.
27. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.* 2009;5:1–11
28. Matsuyama T, Nakagawa Y. Surface-active exolipids: analysis of absolute chemical structures and biological functions. *J. Microbiol. Methods.* 1996;25:165–175.
29. Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borchard W, Maibaum R, Wingender J, Flemming HC. The role of intermolecular interactions studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 1999;26:3–16.
30. Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003;14:255–261.



31. Mora P, Rosconi F, Fraguas FL, Castro-Sowinski S. *Azospirillum brasiliense* Sp7 produces an outer-membrane lectin that specifically binds to surface-exposed extracellular polysaccharide produced by the bacterium. Arch. Microbiol. 2008;189:519–524.
32. Neu TR, Poralla K. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain. FEMS Microbiol. Lett. 1988;49:389–392.
33. Neu TR, Dengler T, Jann B, Poralla K. Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. J. Gen. Microbiol. 1992;138:2531–2537.
34. O’Toole GA. To Build a Biofilm. J. of Bacteriol. 2003;185:2687–2689.
35. Or D, Phutane S, Dechesne A. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils. Vadose Zone J. 2007;6:298–305.
36. Otzen D, Nielsen PH. We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. Cell. Mol. Life Sci. 2007;65:910–927.
37. Pamp SJ, Gjermansen, M, Tolker-Nielsen T. In The Biofilm Mode of Life. Mechanisms and Adaptations / eds Kjelleberg, S., Givskov M. – Horizon Bioscience, Norfolk, UK. 2007:37–69
38. Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes. Microbiol. Rev. 1994;58:755–805.
39. Roberson EB, Firestone MK. Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. 1992;58:1284–1291.
40. Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. Mol. Microbiol. 2001;39:1452–1463.
41. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Mack D. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutination of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. Infect. Immun. 1999;67:2627–2632.
42. Rupp CJ, Fux CA, Stoodley P. Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. Appl. Environ. Microbiol. 2005;71:2175–2178.
43. Russell RRB Bacterial Polysaccharides in Dental Plaque. In Bacterial Polysaccharides. Current Innovations and Future Trends / Ed. Ullrich, M. Caister Academic, Norfolk, UK. – 2009;143–156.
44. Ryder C, Byrd M, Wozniak D.J. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Curr. Opin. Microbiol. 2007;10:644–648.
45. Sand W, Gehrke T. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. Res. Microbiol. 2006;157:49–56.

46. van Schaik EJ, Giltner CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD, Irvin RT. DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *J. Bacteriol.* 2005;187:P. 1455–1464.
47. Schmitt J, Nivens D, White DC, Flemming, HC. Changes of biofilm properties in response to sorbed substances — an FTIR-ATR-study. *Water Sci. Technol.* 1995;32:149–155.
48. Shaw T, Winston M, Rupp CJ, Klapper I, Stoodley P. Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Phys. Rev. Let.* 2004;93:98–102.
49. Skillman L, Sutherland IW, Jonse MV. The role of exopolysaccharides in dual species biofilm development. *J. Appl. Microbiol.* 1999;85:13–18.
50. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:5404–5410.
51. Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003;29:361–367.
52. Sutherland IW. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 2001;9:222–227.
53. Sutherland IW. In *Comprehensive Glycoscience* / ed. Kamerling, J. P. – Elsevier, Doordrecht. 2007;2:521–558.
54. Tamaru Y, Takami Y, Yoshida T, Sakamoto T. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005;71:7327–7333.
55. Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S., Rosenau F, Jaeger K. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology.* – 2005;151:1313–1323.
56. Ude S, Arnold DL, Moon CD, Timms-Wilson T, Spiers AJ. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. *Environ. Microbiol.* 2006;8:1997–2011.
57. VanHullebusch ED, Zandvoord MH, Lens PNL. Metal immobilization by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2004;2: P. 9–33.
58. Vaningelgem F, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Vancanneyt M, Swings J, De Vuyst L. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:900–912.
59. Watanabe M. Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998;50:P. 682–691.
60. Watnik PI, Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999;34:586–595.
61. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PS, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002;295:1487.



62. Wingender J, Jaeger KE, Flemming HC. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. / eds Wingender J., Neu T., Flemming, H. C. – Springer, Heidelberg. 1999:Р. 231–251.

63. Wingender J, Jaeger KE. In *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. / ed. Bitton G. – Wiley, New York. 2002:1207–1223.

64. Wuertz S. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Sci. Technol.* 2001;43:25–34.

65. Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, Tolker-Nielsen T. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2007;153:1318–1328.

66. Zhang X, Bishop P. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. *Chemosphere*. 2003;50:63–69.

67. Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 2001;39:1452–1463.

Стаття надійшла до редакції 26.09.2016 р.



Н.О.Бабій

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України»,
вул. М. Амосова, 5, Київ, Україна, 03680, тел.: +38(044) 275 37 11,
e-mail: epidemics@ukr.net

ВЕРТИКАЛЬНА ТРАНСМІСІЯ ВІРУСУ ІМУНОДЕФІЦИТУ ЛЮДИНИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Мета. За допомогою молекулярно-генетичних методів оцінити частоту вертикальної трансмісії (ВТ) вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) в шести регіонах України. **Методи.** Методом полімеразної ланцюгової реакції виявляли провірусну ДНК ВІЛ в зразках крові дітей, народжених ВІЛ-позитивними матерями. Дані аналізували по роках та в залежності від того, чи проводилася специфічна хіміопрофілактика ВТ ВІЛ-позитивним вагітним жінкам та дітям, народженим ними. **Результати.** Частота ВТ ВІЛ за умови отримання повної специфічної хіміопрофілактики парою мати-дитина у середньому за три роки склала 1,51%, при отриманні часткової профілактики – 13,12%, в той час, як за її відсутності більше 25% малят інфікувалися ВІЛ. **Висновки.** За результатами молекулярно-генетичних досліджень, на сучасному етапі епідемії ВІЛ-інфекції/СНІДу частота ВТ ВІЛ в досліджуваних регіонах склала в середньому 3,0%. Своєчасне призначення специфічної профілактики ВІЛ-позитивним вагітним жінкам та новонародженим дітям дозволить знизити ВТ ВІЛ до рівня нижче, ніж 2%.

Ключові слова: ВІЛ, вертикальна трансмісія, антиретровірусна профілактика.

Однією з особливостей епідемії ВІЛ-інфекції/СНІДу в Україні в останні декілька років стала активізація природних шляхів передачі ВІЛ [1,2,3]. Насамперед, мова йде про статевий шлях інфікування. Згідно з оцінками національних експертів, у структурі шляхів передачі ВІЛ питома вага статевого шляху, який реалізується переважно через гетеросексуальні контакти, в 2015 році склала 72,5% [3]. Наслідком такої тенденції є зростання кількості ВІЛ-інфікованих жінок репродуктивного віку та народжених ними дітей, а також збільшення ймовірності реалізації іншого природного шляху поширення ВІЛ – передачі збудника від матері до дитини під час вагітності, пологів та грудного вигодування, так званої вертикальної трансмісії (ВТ) вірусу [2].

© Н.О.Бабій, 2016



ВТ є переважальним шляхом інфікування ВІЛ дітей молодшого віку. Відомо, що її рівень при відсутності будь-яких профілактичних втручань суттєво перевищує ризик зараження при незахищених статевих контактах. Так, імовірність інфікування жінки від ВІЛ-позитивного статевого партнера при одноразовому незахищеному статевому контакті становить від 0,05 до 0,15% (5–15 випадків на 10 тис.), що в три рази перевищує ймовірність інфікування чоловіка. В той же час, за умови відсутності профілактики, частота ВТ ВІЛ складає 35–40% для дітей на грудному вигодовуванні, та 15–30% для дітей на штучному вигодовуванні. При цьому, приблизно 5–10% випадків інфікування дитини відбувається під час вагітності, 15% – під час пологів, близько 15% – при грудному вигодовуванні [11, 12].

На сьогодні розроблені комплексні підходи, що дозволяють суттєво знизити ризик ВТ ВІЛ, серед яких, насамперед, проведення медикаментозної профілактики передачі ВІЛ від матері до дитини (ППМД), вибір правильної тактики пологів та відмова від грудного вигодовування [9]. В Україні клінічні аспекти ППМД до 2016 року регламентувалися клінічним протоколом з акушерської допомоги «Попередження передачі ВІЛ від матері до дитини», (наказ МОЗ України № 716 від 14.11.2007 року) [5], згідно з яким, режим специфічної медикаментозної профілактики ВІЛ-позитивним вагітним жінкам під час вагітності і пологів та дітям, народженим ними, обирався у відповідності до клінічного сценарію, в залежності від показників рівня вірусного навантаження ВІЛ та концентрації CD4-лімфоцитів у крові жінок. Нині затверджено новий уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної та третинної медичної допомоги «Профілактика передачі ВІЛ від матері до дитини» (наказ МОЗ України № 449 від 15.06.2016р.), який передбачає призначення антиретровірусної терапії з метою ППМД усім ВІЛ-інфікованим вагітним жінкам незалежно від клінічної стадії та рівня CD4-лімфоцитів [6]. Метою специфічної антиретровірусної профілактики (АРВП) у вагітних жінок є повна супресія реплікації ВІЛ до третього триместру вагітності.

За оцінками експертів, завдяки реалізації міжнародної та національної стратегій ППМД в Україні вдалося досягти значного прогресу у сфері попередження ВТ ВІЛ: частота передачі ВІЛ від матері до дитини на національному рівні зменшилася майже в 7,3 рази – з 27,80% у 2001 році до 3,82% у 2011 році (за результатами серологічної діагностики) [3, 17]. Однак, уже в наступному 2012 році цей показник склав 4,31%, і майже в половині регіонів перевищив середній по Україні [3].

Зазначене вказує на необхідність ретельного моніторингу рівня ВТ ВІЛ для оцінки ефективності діючих профілактичних програм та вчасного виявлення чинників, які можуть впливати на зростання ризику інфікування дітей. Як відомо, дані офіційної статистики спираються на результати, отримані при застосуванні серологічних методів діагностики, які доцільно використовувати лише по досягненні дитиною віку 18 місяців. У зв'язку з цим оцінка рівня ВТ ВІЛ носить ретроспективний характер, в той час, як молекулярно-генетичні

методи надають змогу визначити ВІЛ-статус дитини значно раніше – у 3–4 місячному віці.

Метою роботи було оцінити за допомогою молекулярно-генетичних методів частоту ВТ ВІЛ в шести регіонах України.

Матеріали і методи

Для оцінки рівня ВТ визначали частку ВІЛ-позитивних серед дітей, народжених ВІЛ-інфікованими матерями протягом 2011–2014 років. Зразки крові дітей, віком до 18 місяців, отримували з 6 регіонів України: Донецької, Запорізької, Київської, Луганської, Харківської та Чернігівської областей – та досліджували на наявність провірусної ДНК ВІЛ-1 методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

У відповідності до алгоритму ранньої діагностики ВІЛ-інфекції дітям, народженим ВІЛ-інфікованими матерями (наказ МОЗ України №740 від 23.11.07р.), відбір зразків крові для дослідження проводився двічі: перше тестування здійснювали по досягненню дитиною віку 1–2 місяці, друге – 3–4 місяці. Якщо результат першого тестування був позитивним, повторне виконували через 2–4 тижні після першого.

Щороку формувалося три групи дослідження, в залежності від того, чи проводилася дітям та їхнім матерям медикаментозна профілактика ВТ ВІЛ. В першу групу включали дітей, яким було проведено повний курс АРВП, тобто і діти, і їх матері приймали антиретровірусні (АРВ) препарати у відповідності до клінічного протоколу [5]. Другу групу складали діти, які отримали АРВП в неповному обсязі (тобто, в парах мати-дитина або діти, або їх матері не приймали АРВ-препарати). В третю групу включали дітей, яким специфічна АРВП не проводилася (ні дітям, ні їх матерям).

ПЛР виконували з використанням тест-систем «DIA®DNA-HIV-FRT» (Діа-Проф, Україна) у відповідності до інструкції виробника. Реакцію ампліфікації в режимі «реального часу» проводили на ампліфікаторі Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралія) за програмою, наведеною в інструкції. Результати вважали достовірними лише за умови відповідності позитивних і негативних контролів виділення і ампліфікації ДНК заданим параметрам.

Статистичне опрацювання отриманих результатів проводилася за допомогою програм R (version 2.13.1; 2015-06-18) та Excel 2010.

Результати та їх обговорення

Упродовж 2011 року було досліджено зразки крові 1491 дитини. Більшості з них (1330 дітей; 85,75%) було проведено повний курс АРВП (1 група дослідження), 139 дітей отримали АРВП в неповному обсязі (8,96%) (2 група дослідження); 22 дітям (1,42%) специфічна АРВП не проводилася (3-я група дослідження). Частка дітей, які за результатами ранньої діагностики виявилися ВІЛ-позитивними, склала 1,28% в першій групі, 14,38% – в другій та 36,36% –



в третій. (табл. 1). Загалом, серед обстежених дітей, які народилися протягом 2011р., було 45 ВІЛ-позитивних дітей, середній рівень ВТ склав $3,02 \pm 0,44\%$.

Таблиця 1

Рівень вертикальної трансмісії ВІЛ в різних групах дослідження (2011 рік)

Table 1

The level of vertical transmission of HIV in the different groups of the study (2011)

Група дослідження	Обстежено дітей, абс.	Кількість осіб з позитивним результатом дослідження	
		Абс.	Відн., $M \pm m$, %
1 група	1330	17	$1,28 \pm 0,31$
2 група	139	20	$14,38 \pm 2,98$
3 група	22	8	$36,36 \pm 10,20$
Всього обстежено дітей	1491	45	$3,02 \pm 0,44$

Протягом 2012 року на наявність провірусної ДНК ВІЛ-1 досліджено зразки крові 1603 дітей (табл. 2); із них 1446 дітей (87,80%) були включені в першу групу, 125 дітей (7,59%) – в другу, 32 дитини (1,94%) – в третю. Показники рівня ВТ ВІЛ дещо відрізнялися від тих, що отримані у 2011 році, проте достовірної різниці між ними не було: в першій групі частка ВІЛ-позитивних дітей склала 1,52%, в другій та третій – 17,60% та 21,88% відповідно (табл. 2). Середній рівень ВТ ВІЛ у 2012 році склав 3,18%.

Таблиця 2

Рівень вертикальної трансмісії ВІЛ в різних групах дослідження (2012 рік)

Table 2

The level of vertical transmission of HIV in the different groups of the study (2012)

Група дослідження	Обстежено дітей, абс.	Кількість осіб з позитивним результатом дослідження	
		Абс.	Відн., $M \pm m$, %
1 група	1446	22	$1,52 \pm 0,32$
2 група	125	22	$17,60 \pm 3,41$
3 група	32	7	$21,88 \pm 7,31$
Всього обстежено дітей	1603	51	$3,18 \pm 0,44$



З обстежених у 2013 році 1103 дітей, у першу групу увійшли 953 дитини (86,40%), у другу – 120 дітей (10,87%), у третю – 30 дітей (2,72%). Частка ВІЛ-позитивних дітей в першій групі була дещо вищою, порівняно з попередніми роками, та склала 2,10%. В другій та третій групах цей показник досяг 10,0% та 26,67% відповідно. В цілому серед дітей, обстежених в 2013р., 3,62% були ВІЛ-позитивними (табл.3).

Таблиця 3

Рівень вертикальної трансмісії ВІЛ в різних групах дослідження (2013 рік)

Table 3

The level of vertical transmission of HIV in the different groups of the study (2013)

Група дослідження	Обстежено дітей, абс.	Кількість осіб з позитивним результатом дослідження	
		Абс.	Відн., М±m, %
1 група	953	20	2,10±0,46
2 група	120	12	10,0±2,74
3 група	30	8	26,67±8,01
Всього обстежено дітей	1103	40	3,62±0,56

Як і у попередні роки, більшість дітей, обстежених у 2014 році, отримали повний курс АРВП (901 дитина; 90,37%). У другу та третю групу було включено 81 (8,12%) та 15 (1,5%) дітей відповідно. В першій групі частка ВІЛ-інфікованих дітей була найменшою – 1,22%, показники рівня ВТ в другій та третій групах становили 8,64% та 13,3% відповідно (табл. 4). Загалом, серед 997 обстежених протягом року дітей 20 (2,0%) виявилися ВІЛ-інфікованими, тобто значно менше, ніж у попередні роки дослідження.

Таблиця 4

Рівень вертикальної трансмісії ВІЛ в різних групах дослідження (2014 рік)

Table 4

The level of vertical transmission of HIV in the different groups of the study (2014)

Група дослідження	Обстежено дітей, абс.	Кількість осіб з позитивним результатом дослідження	
		Абс.	Відн., М±m, %
1 група	901	11	1,22±1,0
2 група	81	7	8,64±3,12
3 група	15	2	13,30±1,08
Всього обстежено дітей	997	20	2,0±0,44



Оцінка динаміки показника ВТ ВІЛ показує, що протягом останніх років у регіонах, включених у дослідження, він перевищував 3%: так, у 2011 році цей показник становив 3,02%, у 2012 році – 3,18%, в 2013 році – 3,62%.

Лише в 2014 році рівень ВТ ВІЛ був нижчим та склав 2,0% (рис.1). Результати, отримані при застосуванні методу ПЛР для ранньої діагностики ВІЛ-інфекції у дітей, корелюють з показниками серологічної діагностики з використанням методу ІФА. Відповідно до офіційних даних, у 2011 році частота передачі ВІЛ від матері до дитини в Україні становила 3,70%, а в регіонах, включених у дослідження, в середньому 2,95% [3]. В 2012 році за даними серологічних тестів рівень ВТ ВІЛ склав 4,31%, в регіонах, включених у дане дослідження, в середньому 2,90%; в 2013 році – 3,91% та 3,54% відповідно [2]. Існуючі розбіжності у показниках, отриманих при використанні різних методів діагностики, можна пояснити тим, що охоплення дітей як ПЛР-тестуванням, так і серологічними дослідженнями, не досягає 100%: так, наприклад, серед когорт дітей, народжених у 2011 році, у 330 дітей ВІЛ-статус не був остаточно встановлений у зв'язку з відмовою батьків від обстеження дитини або зміною місця її проживання [1]. Зменшення показника ВТ ВІЛ у 2014 році швидше за все, на жаль, не відображає реальну ситуацію, оскільки, у зв'язку з проведенням бойових дій в Донецькій, Луганській областях України і загальною нестабільною соціально-економічною ситуацією, значно знизився рівень охоплення дітей з указаних регіонів даним видом тестування.

Щороку найбільший ризик інфікування ВІЛ реєструвався серед тих дітей, які взагалі не отримували АРВП (3 група): частка ВІЛ-позитивних серед них коливалася в межах від 21,88 до 36,36%.

Серед дітей, які отримали АРВП у неповному обсязі (2 група), частота виявлення ВІЛ-позитивних осіб була меншою: в середньому за чотири роки вона становила 13,12%, щорічні показники – коливалися в межах 8,64 – 17,60%. В 2014 році, порівняно з минулими роками, помітно зменшилася частка ВІЛ-інфікованих дітей у другій та третій групах. Так, у другій групі показник частоти ВТ знизився з 17,60% у 2012 році до 8,64% у 2014 році, в третій – з 36,36% (8 із 22 дітей) у 2011 році до 13,30% (2 із 15 дітей) у 2014 році (рис. 1). Однак, у зв'язку з незначною чисельністю даної вибірки для остаточного висновку це питання потребує подальшого вивчення.

Варто зауважити, що впродовж кількох останніх років у зазначених регіонах реєструвалася приблизно однакова частка дітей з неповною АРВП та без неї: так при проведенні досліджень було визначено, що в 2011 році 8,96% обстежених дітей отримали АРВП у неповному обсязі, 1,42% дітей – профілактика не проводилася. В 2012 році – зазначені показники склали 7,59% та 1,94%; у 2013 році – 10,87% та 2,72%, у 2014 році – 8,12% та 1,50% відповідно. Тобто, в середньому за чотири роки близько 8,89% дітям із регіонів, включених у дане дослідження, АРВП не проводилася, близько 1,89% дітей отримали часткову АРВП. В 2011–2013 рр. частка дітей, яким було проведено АРВП у повному обсязі, не досягала 90%: в 2011р. вона складала 85,75%, в 2012р. – 87,80%, в 2013. – 86,40%. Лише у 2014р. цей показник сягнув 90,37%, але варто під-



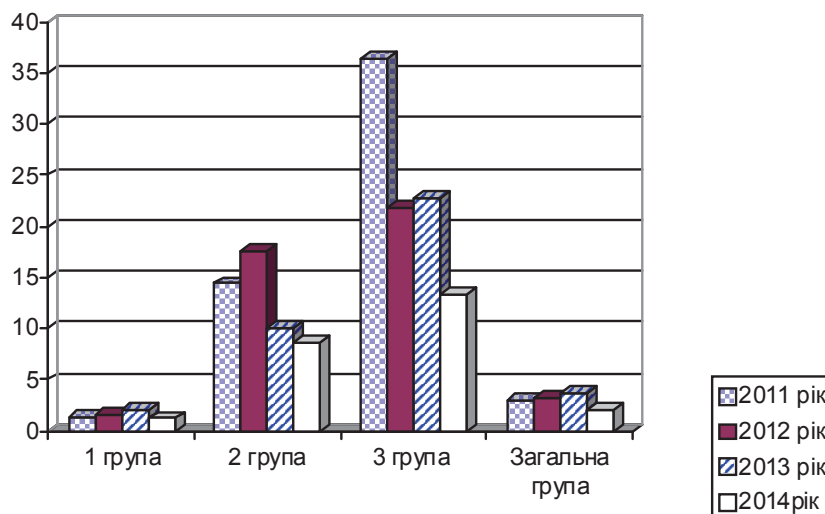


Рис. 1. Динаміка рівня вертикальної трансмісії ВІЛ в різних групах дослідження (в залежності від обсягів АРВП)

- 1 група – діти, які отримали АРВП в повному обсязі
- 2 група – діти, які отримали часткову АРВП
- 3 група – діти, що не отримували АРВП
- Загальна група – всі діти, які були обстежені протягом року

Fig.1. Dynamics of HIV vertical transmission levels (according to the receiving ARV prophylaxis)

- 1 group – children, who received a full course of ARV-prophylactic
- 2 group – children, who received a partial course of ARVP
- 3 group – children, who have not received ARVP
- Total group – all children, surveyed during the year

креслити, що ця частка вираховувалася від числа обстежених дітей, а не від загального числа дітей, народжених ВІЛ-позитивними матерями у цей період. При аналізі даних було встановлено, що відсутність специфічної профілактики або отримання її в неповному обсязі у більшості випадків були пов'язані з несвоєчасним встановленням ВІЛ-статусу вагітним жінкам, низьким рівнем їх прихильності до терапії або профілактики, відмовою від АРВП. Наведене вказує на необхідність проведення більш ретельного допологового скринінгу на наявність антитіл до ВІЛ у вагітних жінок, посилення медичного нагляду за ВІЛ-позитивними вагітними жінками та зростаючу потребу у створенні ефективної стратегії проведення інформаційно-освітніх програм з метою підвищення рівня їхньої поінформованості щодо ризику ВТ ВІЛ та заходів з її попередження.

Найбільше занепокоєння викликають випадки інфікування ВІЛ серед дітей, які отримали повний курс АРВП. Привертає увагу той факт, що в зазначеній групі показник частоти ВТ ВІЛ майже не змінювався і щороку перевищував 1%. Так, в 2011 році він становив 1,28%, у 2012 році – 1,52%, в 2013 році – 2,09% і в 2014 році – 1,22%. В той же час в розвинутих країнах світу показник частоти

ВТ ВІЛ за умови отримання специфічної профілактики ВІЛ-позитивними вагітними жінками та дітьми, народженими ними, становить, як правило, менше 1%. Наприклад, в Канаді середня частота ВТ ВІЛ в період з 1997 по 2012 рік становила 2,5%, а серед дітей, матері яких отримували АРВП тривалістю не менше, ніж 4 тижні, цей показник склав менше 0,1% [7]. В Швейцарії на сьогодні рівень ВТ ВІЛ не досягає 1%, за умови отримання повного курсу АРВП вагітними жінками [15].

В більш ранніх спостереженнях показники рівня ВТ при отриманні вагітними жінками АРВП були дещо більшими, але не перевищували 1,5%. Так, наприклад, в роботі Cooper E.R. зі співавторами [8] вивчався вплив різних режимів АРВ-профілактики на рівень ВТ ВІЛ. В дослідження було включено 1542 ВІЛ-інфікованих жінок з одноплідною вагітністю, яка закінчилася народженням живої дитини в період з 1990 по 2000 рр. Рівень ВТ в групі жінок, які не отримували АРВ-профілактику, склав 20,0%, при проведенні жінкам монотерапії зидовудином – 10,40%, в групі жінок, які отримували бітерапію – 3,80%, а за умови призначення жінкам високоактивної антиретровірусної терапії (тобто, тритерапії) – 1,20%.

Дослідники виявили чіткий зв'язок між ризиком ВТ та рівнем вірусного навантаження в крові у вагітних жінок: так, при рівні вірусного навантаження менше 400 РНК-копій ВІЛ-1/мл плазми частота ВТ ВІЛ склала 1%, а якщо рівень вірусного навантаження коливався, наприклад, в межах від більше 400 до 3499 РНК-копій – показник ВТ становив 5,30%. Найвища частота передачі ВІЛ від матері до дитини (23,40%) була виявлена в групі жінок, у яких показники рівня вірусного навантаження ВІЛ перевищували 30 тис. РНК-копій ВІЛ-1. При обстеженні ВІЛ-позитивних вагітних жінок та дітей, народжених ними, проведеному Warszawski J. зі співавторами [18] у 1997–2004 роках, було встановлено, що рівень ВТ ВІЛ становить 1,30%, за умови отримання АРВП у повному обсязі. В той же час, в групі жінок, у яких рівень вірусного навантаження ВІЛ в крові на момент пологів був нижчим, ніж 50 РНК-копій ВІЛ/мл, показник ВТ ВІЛ склав лише 0,40%. Ще одним фактором ризику інфікування дитини, як зазначають автори, була коротка тривалість АРВП у вагітних жінок.

Вищезазначене обґрунтовує потребу у з'ясуванні чинників, які можуть призвести до зростання ризику інфікування дітей ВІЛ за умови отримання АРВП. Відповідно до результатів Інституційного дослідження «Соціально-демографічні та медичні детермінанти ризику передачі ВІЛ від матері до дитини в Україні», проведеного в 2013 році за підтримки Дитячого фонду ООН (ЮНІСЕФ) в Україні, до чинників, які можуть впливати на збільшення ризику інфікування дитини ВІЛ під час вагітності та пологів, окрім вищезгаданих, можна віднести також такі, як: передчасні пологи у ВІЛ-інфікованих жінок, госпіталізація до акушерського стаціонару під час потуг, пологи вдома, тривалий пологовий період, інвазивні втручання під час пологів, супутні захворювання та активне споживання ін'єкційних наркотиків під час вагітності [4].

На нашу думку, варто звернути особливу увагу на ті чинники, які можуть збільшувати ризик саме антенатальної трансмісії ВІЛ, оскільки, судячи з



досвіду розвинутих країн, при запровадженні програм ППМД кількість ВІЛ-позитивних дітей зменшується, але серед них зростає частка інфікованих під час вагітності. Так, відповідно до результатів досліджень Magder L.S. зі співавторами, в США в 1990–1992 рр. рівень ВТ сягнув 18,20%, серед них 27,0% дітей були інфіковані антенатально; в 1997–1998рр. зазначені показники склали 4,13% та 54,0% відповідно; в 1999–2001рр. – 1,60% та 80,0% [13]. Найбільш значущим серед чинників, які можуть призводити до зростання ризику саме антенатальної трансмісії ВІЛ, згідно з літературними даними, є, знову ж таки, високий рівень вірусного навантаження ВІЛ у крові інфікованих вагітних жінок, що зумовлює необхідність не лише вчасного призначення їм АРВ-профілактики, але й ретельного контролю за її вірусологічною ефективністю [18] та моніторингу поширеності серед них резистентних до АРВ-препаратів штамів ВІЛ.

Слід відмітити, що відповідно до отриманих нами результатів, серед дітей, матері яких почали приймати антиретровірусну терапію ще до вагітності, не було жодного випадку інфікування ВІЛ. Це підтверджується даними світової літератури: показано, що повна супресія реплікації ВІЛ та, відповідно, найвищий рівень захисту дитини досягається за умови початку лікування ще до вагітності [9].

Таким чином, загалом протягом 2011–2014 рр. рання діагностика ВІЛ-інфекції методом ПЛР була проведена 5194 дітям. Більшості дітей (4630; 89,14%) проведено повний курс АРВП, 465 дітей (8,95%) отримали профілактику у неповному обсязі, 99 дітей (1,91%) АРВП не отримували (ні діти, ні їхні матері). Частка ВІЛ-інфікованих в групі дітей, які отримали повний курс профілактики, складала $1,51 \pm 0,17\%$. (рис. 2). Серед дітей, що отримали профілактику у неповному обсязі, частка ВІЛ-позитивних була у 8,6 разів більше і становила $13,12 \pm 0,47\%$, а в групі малят, яким специфічна АРВП не проводилася, цей показник був вищим майже в 17 разів і сягнув $25,25 \pm 0,60\%$ (рис. 2).

Серед 5194 дітей, обстежених протягом 2011–2014 рр., позитивні результати тестування на наявність провірусної ДНК були встановлені для 156 дітей, тобто, середній показник частоти ВТ ВІЛ за ці роки склав 3,0%. Дані, отримані при проведенні молекулярно-генетичних досліджень, були співставні з даними офіційної статистики, що підтверджує можливість використання їх для проведення моніторингу рівня ВТ ВІЛ в Україні та оперативної оцінки діючих профілактичних програм [1, 2, 3].

Порівняно з відповідними показниками 2001–2010 рр., ризик інфікування дитини ВІЛ від матері поступово зменшується, хоча в Україні і не вдалося досягти цільового індикатора Загальнодержавної програми забезпечення профілактики ВІЛ-інфекції, лікування, догляду та підтримки ВІЛ-інфікованих і хворих на СНІД на 2009–2013 рр., який уже до кінця 2013 року передбачав зниження частоти ВТ до 2%. Водночас, слід зазначити, що за умови вчасного проведення АРВП ВІЛ-позитивним вагітним жінкам та народженим ними дітям досягнення такої мети видається цілком імовірним.

Отже, відповідно до результатів дослідження, нині близько 2% пар ВІЛ-інфікованих вагітних жінок та дітей, народжених ними, взагалі не приймають



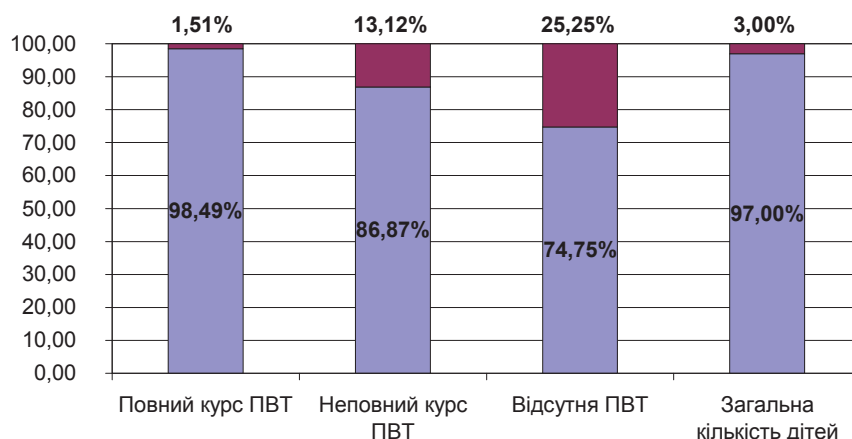


Рис. 2. Рівень вертикальної трансмісії ВІЛ в залежності від отримання АРВ-профілактики (2011–2014)

■ ВІЛ-негативні діти
 ■ ВІЛ-позитивні діти

Fig. 2. The level of vertical transmission of HIV according to receiving ARV prophylaxis (2011–2014)

■ HIV-negative children
 ■ HIV-positive children

АРВ-препаратів для профілактики ВТ, близько 9% пар мати-дитина отримують часткову профілактику. В той же час АРВП забезпечує суттєве зниження ризику інфікування дитини: частота ВТ ВІЛ за умови отримання профілактики в повному обсязі склала 1,51%, при частковій профілактиці – 13,12%, в той час, як при її відсутності більше 25% дітей інфікуються ВІЛ. Тобто, ризик ВТ ВІЛ був майже в 17 разів нижчий серед тих дітей, які отримали повний курс специфічної профілактики, порівняно з групою дітей, яким вона не проводилася.

З огляду на це, в Україні існує необхідність продовжувати роботу не лише щодо забезпечення якомога більш повного охоплення ВІЛ-інфікованих жінок специфічною терапією та АРВП, а й більш ретельного контролю за її ефективністю та дотриманням термінів призначення профілактики. Слід розширювати програми з надання соціально-психологічної підтримки жінкам з метою досягнення їх прихильності до терапії. На нашу думку, на сьогодні в країні назріла необхідність перегляду існуючих клінічних протоколів із запобігання ВТ ВІЛ та приведення їх у відповідність до сучасних рекомендацій ВООЗ, з метою досягнення повної елімінації випадків інфікування дітей ВІЛ під час вагітності та пологів [10, 16].

N.O. Babii

SI "L.Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMSU", 03680
5, M. Amosova str., Kyiv, Ukraine, tel.: +38 (044) 275 37 11, e-mail: epidemics@ukr.net

THE LEVEL OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS VERTICAL TRANSMISSION BY THE RESULTS OF MOLECULAR-GENETICS TESTS

Summary

Aim. The aim of the study was the estimation of the frequency of vertical transmission (VT) of human immunodeficiency virus (HIV) in Ukraine (in six regions) using molecular genetic methods of diagnosis. **Methods.** HIV status of children has been determined by detection of HIV-1 proviral DNA in whole blood samples of children using polymerase chain reaction. The results of the research were analyzed depending on whether HIV-positive pregnant women and children, born by them, have received antiretroviral prophylaxis of HIV VT. **Results.** On average in three years the frequency of HIV VT among children who received full prophylaxis was 1.15%, partial prophylaxis – 13.12%, among children who did not receive any prophylaxis – more than 25%. **Conclusions.** According to the results of molecular genetic tests at the present stage of the HIV-infection/AIDS epidemic the rate of HIV VT was 3% in the studied regions. With timely appointment of prophylaxis HIV mother-to-child transmission the rate of HIV vertical transmission in Ukraine can be reduced to less than 2%.

Key words: HIV, vertical transmission, antiretroviral prevention of vertical transmission.

Н.А.Бабий

ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского НАМН
Украины», ул. Н.Амосова, 5, Киев, Украина, 03680, тел.: +38 (044) 275 37 11,
e-mail: epidemics@ukr.net

ВЕРТИКАЛЬНАЯ ТРАНСМИССИЯ ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА В УКРАИНЕ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Реферат

Цель. С помощью молекулярно-генетических методов диагностики оценить частоту вертикальной трансмиссии (VT) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в Украине (на примере шести регионов). **Методы.** Методом полимеразной цепной реакции определяли провирусную ДНК ВИЧ в образцах крови детей, рожденных ВИЧ-позитивными матерями. Результаты исследований анализировали по годам и в зависимости от того, получали ли ВИЧ-позитивные беременные женщины и дети, рожденные ими, специфическую химиопрофилактику VT ВИЧ. **Результаты.** В среднем за три года частота VT ВИЧ, при условии проведения полной медикаментозной профилактики паре мать-ребенок, составила



1,51%, при отриманні частинної профілактики – 13,12%, а при відсутності профілактики більше 25% дітей були інфіковані ВІЧ. **Висновки.** Згідно з результатами молекулярно-генетических тестів на сучасному етапі епідемії ВІЧ-інфекції/СПИДа рівень ВТ ВІЧ в досліджуваних регіонах склав в середньому 3%. При своєчасному призначенні профілактики передачі ВІЧ від матері до дитини рівень ВТ ВІЧ в Україні може бути зменшений до показателя менше 2%.

Ключевые слова: ВІЧ, вертикальна трансмісія, антиретровірусна профілактика вертикальної трансмісії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень №41. – Київ, 2014. – 100с.
2. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень №43. – Київ, 2015. – 123 с.
3. ВІЛ-інфекція в Україні. Інформаційний бюлетень №45. – Київ, 2016. – 130 с.
4. Нізова Н.М., Марциновська В.А., Кузін І.В. [та ін.] Інституційне дослідження «Соціально-демографічні та медичні детермінанти ризику передачі ВІЛ від матері до дитини в Україні». Анотований звіт – К.: К.І.С., 2013 – 68 с.
5. Попередження передачі ВІЛ від матері до дитини. Клінічний протокол з акушерської допомоги. – К.:МОЗ України, 2007. – 32 с.
6. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Профілактика передачі ВІЛ від матері до дитини» – К.:МОЗ України, 2016. – 65 с.
7. Bitnun A., Brophy J., Samson L., Alimenti A., Kakkar F., Lamarre V., Moore D., Karatzios C., Seigel S., Sauve L., Vaudry W., Yudin M.H., Money D. Prevention of vertical HIV transmission and management of the HIV-exposed infant in Canada in 2014// Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. – 2014. – 25, № 2. – P. 75–77.
8. Cooper E.R., Charurat M., Mofenson L., Hanson I.C., Pitt J., Diaz C., Hayani K., Handelsman E., Smeriglio V., Hoff R., Blattner W. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission // J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. – 2002. – № 29 (5). – P. 484–494.
9. Global health sector strategy on HIV/AIDS 2011-2015. – World Health Organisation, 2011. – 48 p.
10. Global plan towards the elimination of new HIV infections among children by 2015 and keeping their mothers alive. – UNAIDS, 2011. – 48p.
11. Hoffman R.M., Black V., Technau K., van der Merve K.J., Currier J., Coovadia A., Chersich M. Effects of Highly Active Antiretroviral Therapy Duration and Regimen on Risk for Mother-to-Child Transmission of HIV in Johannesburg, South Africa // J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. – 2010. – 54(1). – P. 35–41.
12. Lehman D.A., Farquhar C. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission // Rev. Med. Virol. – 2007. – 17. – P. 381–403.



13. Magder L.S., Mofenson L., Paul M.E., Zorrilla C.D., Blattner W.A., Tuomala R.E., LaRussa P., Landesman S., Rich K.C. Risk Factors for In Utero and Intrapartum Transmission of HIV // *J. AIDS*. – 2005. – № 38(1). – P. 87–89.
14. Muenchhoff M., Prendergast A.J., Couder P.J.R. Immunity to HIV in Early Life // *Front. Immunol.* – 2014. – Vol. 5. – 13 c.
15. Nadal D., Arlettaz R., Berger C. Vertical HIV infection is preventable but remains challenging // *Ther. Umsch.* – 2014 – 71(8). – P. 503–508.
16. *PMTCT strategic vision 2010–2015: preventing mother-to-child transmission of HIV to reach the UNGASS and Millennium Development Goals.* – World Health Organisation, 2010. – 40p.
17. Thorne C., Semenenko I., Pilipenko T. Progress in prevention of mother-to-child transmission of HIV infection in Ukraine: results from a birth cohort study // *BMC Infect. Dis.* – 2009. – 9, № 40. – 10 p.
18. Warszawski J., Tubiana R., Le Chenadec J., Blanche S., Teglas J.P., Dollfus C., Faye A., Burgard M., Rouzioux C., Mandelbrot L. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort // *AIDS*. – 2008. – 22 №2. – P. 289–299.
19. *Working Group on mother-to-child transmission of HIV.* Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America and Europe: results from 13 perinatal studies // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* – 1995. – №8. – P. 506–510.

REFERENCES

1. HIV-infection in Ukraine. Bulletin №41. Kyiv, 2014. 100p.
2. HIV-infection in Ukraine. Bulletin №43. Kyiv, 2015. 123p.
3. HIV-infection in Ukraine. Bulletin №45. Kyiv, 2016. 130p.
4. Nizova N, Martsinovska VA, Kuzin IV, Tarasova TI, Privalov YO, Rokitska OY, Stelmah AS, Kovalenko TA, Sherstyuk GV, Mishkoi IP, Kozina IG. Institutional study «Socio-demographic and medical determinants of risk of HIV transmission from mother to child in Ukraine». Annotated Report. Kyiv: K.I.S., 2013. 68p.
5. Prevention of HIV mother-to-child transmission. The clinical protocol for obstetric care. Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2007. 32p.
6. Standardized clinical protocol of primary, secondary (specialized) and tertiary (highly specialized) medical care “Prevention of HIV transmission from mother to child” Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2016. 65p.
7. Bitnun A, Brophy J, Samson L, Alimenti A, Kakkar F, Lamarre V, Moore D, Karatzios C, Seigel S, Sauve L, Vaudry W, Yudin MH, Money D. Prevention of vertical HIV transmission and management of the HIV-exposed infant in Canada in 2014. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2014;25(2):75–77.
8. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, Hayani K, Handelsman E, Smeriglio V, Hoff R, Blattner W. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002;29(5):484–494.



9. Global health sector strategy on HIV/AIDS 2011-2015. World Health Organization, 2011. 48p.
10. Global plan towards the elimination of new HIV infections among children by 2015 and keeping their mothers alive. UNAIDS, 2011. 48p.
11. Hoffman RM, Black V, Technau K, van der Merve KJ, Currier J, Coovadia A, Chersich M. Effects of Highly Active Antiretroviral Therapy Duration and Regimen on Risk for Mother-to-Child Transmission of HIV in Johannesburg, South Africa. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54(1):35–41.
12. Lehman DA, Farquhar C. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev Med Virol*. 2007;(17):381–403.
13. Magder LS, Mofenson L, Paul ME, Zorrilla CD, Blattner WA, Tuomala RE, LaRussa P, Landesman S, Rich KC. Risk Factors for In Utero and Intrapartum Transmission of HIV. *J AIDS*. 2005;38(1):87–89.
14. Muenchhoff M, Prendergast AJ, Couder PJR. Immunity to HIV in Early Life. *Front Immunol*. 2014;(5):931.
15. Nadal D, Arlettaz R, Berger C. Vertical HIV infection is preventable but remains challenging. *Ther Umsch*. 2014;71(8):503–508.
16. PMTCT strategic vision 2010–2015: preventing mother-to-child transmission of HIV to reach the UNGASS and Millennium Development Goals. World Health Organisation, 2010. 40p.
17. Thorne C, Semenenko I, Pilipenko T. Progress in prevention of mother-to-child transmission of HIV infection in Ukraine: results from a birth cohort study. *BMC Infect Dis*. 2009; 9(40):10 p., available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-9-40>
18. Warszawski J, Tubiana R, Le Chenadec J, Blanche S, Teglas JP, Dollfus C, Faye A, Burgard M, Rouzioux C, Mandelbrot L. Mother-to-child HIV transmission despite antiretroviral therapy in the ANRS French Perinatal Cohort. *AIDS*. 2008;22(2):289–299.
19. Working Group on mother-to-child transmission of HIV. Rates of mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa, America and Europe: results from 13 perinatal studies. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1995;(8):506–510.

Стаття надійшла до редакції 24.10.2016 р.



УДК 579.695+537.31+[547-386+546.72]

O.M. Vasylyv, O.D. Maslovska, S.O. Hnatush, O.I. Bilyy, Ya.P. Ferensovych

Ivan Franko National University of Lviv, 1, Universytetska Str., Lviv, 79000, Ukraine;
tel.: (0322) 39 41 53, e-mail: oresta.vasylyv@gmail.com

ELECTRIC CURRENT GENERATION BY *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* IMV B-7384 WHILE FERRIC CITRATE, FUCHSINE AND METHYLENE BLUE APPLICATION

***Aim:** to investigate the process of exoelectrogenesis performed by *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 in a microbial fuel cell (MFC) under the presence of exogenous electron mediators (fuchsine, methylene blue) and Fe^{3+} . **Methods:** bioelectrochemical analysis, cultivation in the MFC. **Results:** The interrelation between $Fe(III)$ – reduction and exoelectrogenesis performed by *D. acetoxidans* IMV B-7384 in the MFC has been determined. Under the influence of ferric citrate, fuchsine and methylene blue power density decreased in comparison with addition of sodium (III) citrate (control). **Conclusions.** Ferric citrate, fuchsine and methylene blue serve as the exogenous electron acceptors while application of *D. acetoxidans* IMV B-7384 as the anode biocatalyst in the MFC that causing decrease of power density at these conditions.*

Key words: *D. acetoxidans* IMV B-7384, electric current generation, microbial fuel cell, ferric citrate, exogenous electron mediators.

Nowadays there is increasing scientific and commercial interest to one type of bioelectrochemical systems – microbial fuel cell (MFC). The essential of MFC technology is usage of an unique type of electrogenic bacterial strains that can biooxidize organic matter to produce electrons in their central metabolism and transfer part of electrons extracellularly to an external electrode [6, 11].

One of the main challenges of MFC technology is finding the most efficient electrogenic bacterial strain in term of electricity generation while biooxidation of organic matter.

Desulfuromonas acetoxidans IMV B-7384 is promising non sufficiently investigated exoelectrogenic anaerobic bacterium. It was shown that separate application of fumaric, succinic, pyruvic, citric, and malic acids into the anode chamber of MFC caused increase of maximal generated power density from 2.14 ± 0.19 mW/m² to 10.07 ± 0.17 mW/m² while presence of *D. acetoxidans* IMV B-7384 as the anode biocatalyst [9]. This bacterium possesses several advantages for being applied as the anode biocatalyst in MFC.



D. acetoxidans IMV B-7384 cell size is 0.4-0.8 μm \times 1-4 μm [3]. Due to comparably small size it could be highly beneficial while application of porous anode material because of the possibility of cell complete cover of electrode area. This particularity could significantly improves the effectiveness of electrode area usage.

It was determined that *D. acetoxidans* can oxidize elemental sulfur to sulfite and sulfate with an electrode serving as an electron acceptor, and cause S^0 -reduction with H_2S generation as well [3, 10]. Elemental sulfur can accumulate on anode surface because of abiotic oxidation of sulfide. It reveals the possibility of continuous simultaneous carrying of opposite stages of sulfur cycle in the anode chamber of MFC by activity of only one genus of bacterium. Hence simultaneous sulfur redox reactions supported by *D. acetoxidans* doubles the electron transfer to the electrode it can lead to enhancement of the effectiveness of MFC power output.

It was shown that MFC design can be easily integrated into the system of wastewater treatment. *D. acetoxidans* IMV B-7384 was determined to possess selective resistance to Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} and Co^{2+} in the range of 0.5–2.5 mM [3]. The activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione synthesis as a part of antioxidative defense system of *D. acetoxidans* IMV B-7384 were observed in spite of their obligate anaerobic metabolism under the influence of transition metal ions [3]. The obtained results show that investigated bacteria possess specific mechanisms of rapid defense against toxic influence of high concentrations of various metal ions. Therefore its application as the anode biocatalyst in MFC that contains wastewater as anolyte can be highly beneficial. In previous studies it was determined that variety of chemicals could facilitate the shuttling of electrons from inside the cell to the electrodes outside the cell. These exogenous mediators include e.g. neutral red [7], anthraquinone-2-6-disulfonate (AQDS), thionin, potassium ferricyanide [4], methyl viologen, and others [5, 8]. It was crucial to investigate the influence of possible electron shuttlers, such as fuchsine and methylene blue on *D. acetoxidans* IMV B-7384 ability to generate electric current in the constructed MFC. Since *D. acetoxidans* IMV B-7384 is capable to Fe (III) – reduction it was important to determine whether there exist dependence between the extent of exoelectrogenesis and ferric iron reduction. Therefore the aim of work was to determine the influence of Fe^{3+} , fuchsine and methylene blue on *D. acetoxidans* IMV B-7384 capability to generate electric current.

Materials and methods

D. acetoxidans IMV B-7384 is deposited in the Ukrainian Collection of Microorganisms at the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine [1]. Bacteria were cultivated in the anode chamber of constructed MFC in the modified Postgate C medium under the anaerobic conditions and temperature 25–28 °C for twenty days. 42 mM sodium (III) citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) has been added as the sole source of organic Carbon. 10 mM ferric citrate ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7$) was applied as the donor of Fe^{3+} . 0.015 mM fuchsine ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3 \times \text{HCl}$) and 0.015 mM methylene blue ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$) have been added separately as the exogenous electron mediators.



0.1% KMnO_4 solution and bacterial suspension with 0.30 ± 0.05 g of dry cell weight per liter initial biomass served as catholyte and anolyte, respectively. Anode and cathode chambers with 0.3 l volume were separated by proton-exchange membrane (Millipore) with surface area of 2.5 cm^2 . Graphite rods with the surface area of 130 cm^2 were applied as electrodes. Electric current and voltage generation in the constructed MFC were determined from the measured voltage drop across the resistor ($1.8 \text{ k}\Omega$) by multimeter DT-830C. Power generation in the constructed MFC was observed under the presence of sodium (III) citrate in concentration 42 mM and separate application of 10 mM ferric citrate, 0.015 mM fuchsine, and 0.015 mM methylene blue. The crucial statistical indices were calculated on the basis of obtained data, such as arithmetical mean (M) and standard deviation of arithmetical mean (m). Student coefficient was calculated for the estimation of validity of difference between the statistical characteristics of two alternative complexes of data. The difference was claimed to be valid under the index of validity $P > 0.95$. Statistical calculation of the results was conducted by Origin and Excel software.

Results and discussion

Power generation by *D. acetoxidans* IMV B-7384 in the MFC while presence of 10 mM ferric citrate and 32 mM sodium (III) citrate and without addition of Fe^{3+} into the growth medium has been determined. *D. acetoxidans* IMV B-7384 has been cultivated for twenty days in the MFC under the presence of 42 mM sodium (III) citrate as the electron donor (fig. 1). Power density increased up to $7.21 \pm 0.32 \text{ mW/m}^2$ at these conditions on the 40th hour of cultivation, although further increase of cultivation time caused its slight diminishing. It could be a result of partial reduction of KMnO_4 in the cathode chamber of MFC because of intensive bacterial exoelectrogenesis.

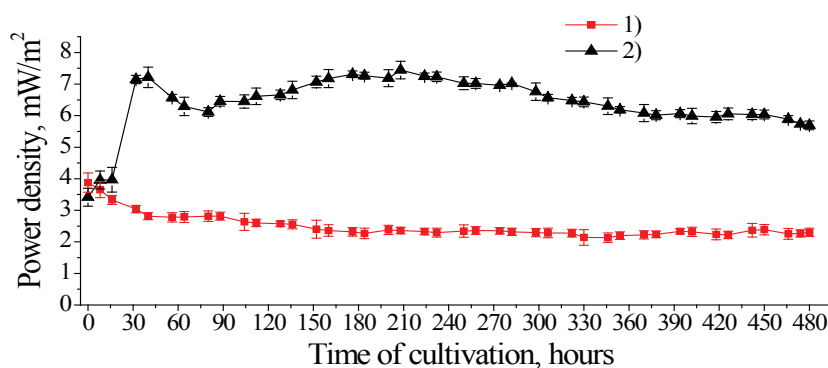


Fig. 1. Power density in the MFC during twenty days of *D. acetoxidans* IMV B-7384 growth under separate addition of 1) 10 mM ferric citrate & 32 mM sodium (III) citrate, and 2) 42 mM sodium (III) citrate

Catholyte substitution by fresh KMnO_4 solution caused further stable power generation. Maximal power density equaled $7.44 \pm 0.28 \text{ mW/m}^2$ on the 208 hour of



bacterial cultivation at these conditions. On the 480 hour its value increased by 42% in comparison with the initial value ($3.41 \pm 0.28 \text{ mW/m}^2$). At the presence of 10 mM ferric citrate and 32 mM sodium (III) citrate power density decreased by 39% and 41% respectively by 208 and 480 hours of bacteria cultivation in comparison with the initial value ($3.88 \pm 0.31 \text{ mW/m}^2$) (fig 1). Possibly, at these conditions released electrons because of organic matter oxidation were transferred to Fe^{3+} as the additional electron acceptor in the anode chamber of MFC. Consequently the output of electric current decreased since the amount of electrons that could reach the anode surface diminished in comparison with the separate application of 42 mM sodium (III) citrate. It was established that *D. acetoxidans* IMV B-7384 growth is partly inhibited at the presence of 10 mM ferric citrate [2]. Electrons are transferred to the anode surface while bacterial oxidation of organic Carbon source in MFC if additional acceptor is not present. Obviously, released electrons because of organic matter oxidation cause Fe^{3+} -reduction and respectively inhibition of exoelectrogenesis at the presence of Ferric ions in the growth medium. Carried out research confirms that *D. acetoxidans* IMV B-7384 could exogenously transfer electrons to electrode surface in MFC and perform Fe^{3+} -reduction at the presence of Fe (III) as the additional electron acceptor.

Exoelectrogenic activity of *D. acetoxidans* IMV B-7384 in MFC while presence of 0.015 mM fuchsine (F), 0.015 mM methylene blue (MB) and 42 mM sodium (III) citrate has been investigated. The maximal power density equaled to $2.40 \pm 0.21 \text{ mW/m}^2$ on the 16 hour and $3.11 \pm 0.11 \text{ mW/m}^2$ on the 32 hour at the presence of MB and F (fig. 2).

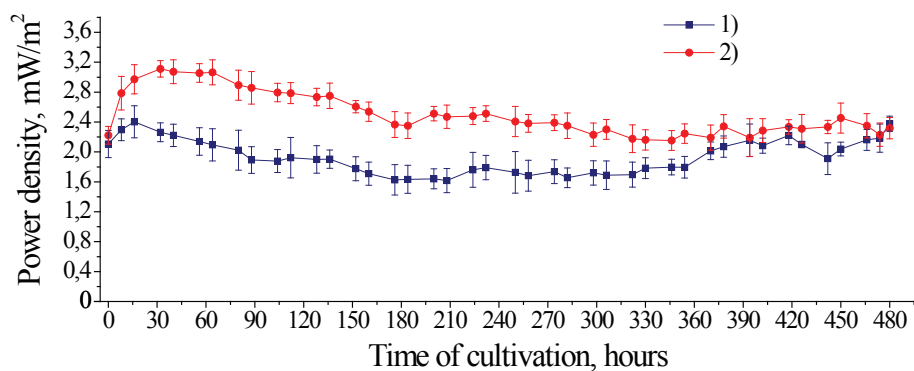


Fig. 2. Power density in MFC during twenty days of *D. acetoxidans* IMV B-7384 growth under presence of 42 mM sodium (III) citrate and addition of 1) 0.015 mM methylene blue, 2) 0.015 mM fuchsine

Generated power density decreased in comparison with the separate application of 42 mM sodium (III) citrate (control (fig 1, curve 2)). It was lower by 3.1 and 2.4 times respectively at the presence of MB and F in comparison with the highest obtained value in control ($7.44 \pm 0.28 \text{ mW/m}^2$). Presumably F and MB accept released electrons as electron mediators, although their presence in the anode chamber does not facilitate electron transfer to the anode surface. Possibly, it serves as the electron

shutters for supporting electron transfer in other metabolic processes of *D. acetoxidans* IMV B-7384.

Therefore electrons are transferred to the anode surface while bacterial oxidation of organic Carbon source in the constructed MFC if additional electron acceptor is not present. Obviously, released electrons because of organic matter oxidation cause Fe^{3+} -reduction and respectively inhibition of exoelectrogenesis at the presence of Ferric ions in the growth medium. Presence of fuchsine and methylene blue does not facilitate electron transfer to the anode surface in MFC because of decreased power density, generated by investigated bacteria in comparison with the control. Possibly these compounds accept part of the released electrons while exoelectrogenesis performed by *D. acetoxidans* IMV B-7384. The next involvement of transferred electrons by F and MB into bacterial transport and metabolic processes requires further studying.

As the conclusion, the interconnection between Fe^{3+} -reduction and exoelectrogenesis performed by *D. acetoxidans* IMV B-7384 in the constructed MFC has been determined. Presence of Fe^{3+} , methylene blue and fuchsine in the growth medium of *D. acetoxidans* IMV B-7384 partly inhibits electricity generation in MFC compared to application of sole sodium (III) citrate as the Carbon source.

**О.М. Василів, О.Д. Масловська, С.О. Гнатуш, О.І. Білий,
Я.П. Ференсович**

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Університетська, 1, Львів, 79000, Україна, тел.: (0322) 39 41 53,
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com

ГЕНЕРУВАННЯ ЕЛЕКТРИЧНОГО СТРУМУ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* IMV B-7384 ЗА ВНЕСЕННЯ ФЕРУМ (III) ЦИТРАТУ, ФУКСИНУ І МЕТИЛЕНОВОГО СИНЬОГО

Реферат

Мета: дослідити процес екзоелектрогенезу, що здійснюється *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 у мікробному паливному елементі (МПЕ) за наявності екзогенних переносників електронів та Fe^{3+} . **Методи:** біоелектрохімічний аналіз, культивування у МПЕ. **Результати.** Встановлено взаємозв'язок між Fe (III)-редукцією та екзоелектронезом, що здійснюються *D. acetoxidans* IMV B-7384. За впливу ферум (III) цитрату, фуксину та метиленового синього густина потужності зменшувалась в порівнянні із внесенням натрій цитрату (контроль). **Висновки.** Ферум (III) цитрат, фуксин та метиленовий синій виконують роль екзогенних акцепторів електронів за наявності *D. acetoxidans* IMV B-7384 як анодних біокаталізаторів у МПЕ, що призводить до зменшення густини потужності за наведених умов.

Ключові слова: *D. acetoxidans* IMV B-7384, генерування електричного струму, мікробний паливний елемент, ферум (III) цитрат, екзогенні медіатори електронів.



**О.М. Васи́лів, О.Д. Масловская, С.А. Гнатуш, А.И. Билый,
Я.П. Ференсович**

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Университетская, 1, Львов, 79000, Украина, тел.: (0322) 39 41 53,
e-mail: oresta.vasyliv@gmail.com

ГЕНЕРИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* IMV B-7384 ПРИ ВНЕСЕНИИ ФЕРРУМ (III) ЦИТРАТА, ФУКСИНА И МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Реферат

Цель: исследовать процесс экзоэлектрогенеза, осуществляемый *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 в микробном топливном элементе (МТЭ) при наличии экзогенных переносчиков электронов и Fe^{3+} . *Методы:* биоэлектрохимический анализ, культивирование в МТЭ. *Результаты.* Установлена взаимосвязь между *Fe* (III)-редукцией и экзоэлектрогенезом, осуществляемыми *D. acetoxidans* IMV B-7384. При воздействии феррум (III) цитрата, фуксина и метиленового синего плотность мощности уменьшалась, по сравнению с внесением натрий цитрата (контроль). *Выводы.* Феррум (III) цитрат, фуксин и метиленовый синий выполняют роль экзогенных акцепторов электронов при наличии *D. acetoxidans* IMV B-7384 как анодных биокатализаторов в МТЭ, что приводит к уменьшению плотности мощности при этих условиях.

Ключевые слова: *D. acetoxidans* IMV B-7384, генерирование электрического тока, микробный топливный элемент, феррум (III) цитрат, экзогенные медиаторы электронов.

Список використаної літератури

1. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Мороз О.М., Перетятко Т.Б., Васи́лів О.М. Свідчення про депонування штаму бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* Ya-2006 з наданням реєстраційного номеру IMV B-7384 // Депозитарій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. – К., 2013. – 3 с. – Деп. в IMB 10.04.13.
2. Масловська О.Д., Гнатуш С.О. Вплив ферум (III) цитрату на АТФ-гідролази *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 // Вісник Дніпропетровського університету. – 2013. – 21, № 1. – Р. 3–8.
3. Bilyy O.I., Vasylyv O.M., Hnatysh S.O. Technology and application of microbial fuel cells. – Croatia.: InTech, 2014. – Р. 33–54.
4. Bond D.R., Holmes D.E., Tender L.M., Lovley D.R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments // Science. – 2002. – 295, № 5554. – Р. 483–485.
5. Logan B.E. Extracting hydrogen and electricity from renewable resources // Environ. Sci. Technol. – 2004. – 38, № 9. – Р. 160A–167A.



6. Logan B.E. Microbial fuel cells. – NJ.: John Wiley & Sons, 2007. – 213 p.
7. Park D.H., Laivenieks M., Guettler M.V., Jain M.K., Zeikus J.G. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – 65, № 7. – P. 2912–2917.
8. Rabaey K., Boon N., Hofte M., Verstraete W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells // Environ. Sci. Technol. – 2005. – 39, № 9. – P. 3401–3408.
9. Vasylyv O.M., Maslovska O.D., Ferensovych Ya.P., Bilyy O.I., Hnatysh S.O. Interconnection between tricarboxylic acid cycle and energy generation in microbial fuel cell performed by *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 // Proc. SPIE. – 2015. – Vol. 9493. – P. 94930J1–94930J7.
10. Zhang T., Bain T.S., Barlett M.A., Dar S.A., Snoeyenbos-West O.L., Nevin K.P., Lovley D.R. Sulfur oxidation to sulfate coupled with electron transfer to electrodes by *Desulfuromonas* strain TZ1 // Microbiology. – 2014. – 160, № 1. – P. 123–129.
11. Zhuwei D., Haoran L., Tingyue G. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy // Biotechnology Advances. – 2007. – 25. – P. 464–482.

References

1. Gudz SP, Hnatysh SO, Moroz OM, Peretiatchko TB, Vasylyv OM. Certificate of deposition of bacterium *Desulfuromonas acetoxidans* Ya-2006 strain in the Depository of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine with appropriation of registration number IMV B-7384. – D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, 10.04.2013:3.
2. Maslovska OD, Hnatysh SO. The influence of ferric (III) citrate on ATP-hydrolases of *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384. Visnyk of Dnipropetrovsk University. 2013;(21(1)):3-8.
3. Bilyy OI, Vasylyv OM, Hnatysh SO. Technology and application of microbial fuel cells. InTech, Croatia, 2014. 96 p.
4. Bond DR, Holmes DE, Tender LM, Lovley DR. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. Science. 2002;(295(5554)):483-485.
5. Logan BE. Extracting hydrogen and electricity from renewable resources. Environ. Sci. Technol. 2004;(38 (9)):160A-167A.
6. Logan BE Microbial fuel cells. John Wiley & Sons, NJ, 2007. 213 p.
7. Park DH, Laivenieks M, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. Appl. Environ. Microbiol. 1999;(65 (7)):2912-2917.
8. Rabaey K, Boon N, Hofte M, Verstraete W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. Environ. Sci. Technol. 2005;(39 (9)): 3401-3408.



9. *Vasylyv OM, Maslovska OD, Ferensovych YaP, Bilyy OI, Hnatush SO.* Interconnection between tricarboxylic acid cycle and energy generation in microbial fuel cell performed by *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384. Proc. SPIE. 2015;(9493):94930J1-94930J7.

10. *Zhang T, Bain TS, Barlett MA, Dar SA, Snoeyenbos-West OL, Nevin KP, Lovley DR.* Sulfur oxidation to sulfate coupled with electron transfer to electrodes by *Desulfuromonas* strain TZ1. Microbiology. 2014;(160 (1)):123-129.

11. *Zhuwei D, Haoran L, Tingyue G.* A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. Biotechnology Advances. 2007;(25):464-482.

Стаття надійшла до редакції 09.11.2016 р.



УДК 579.64

**Ж.Ю. Сергєєва, О.В. Басюл, О.Г. Горшкова, Т.І. Гаврилук,
Г.М. Назаренко**

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

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ФЕРМЕНТОВАНИХ РОСЛИННИХ ПРОДУКТІВ ІЗ В'ЄТНАМУ

Метою дослідження була ідентифікація та вивчення антагоністичних властивостей молочнокислих бактерій, ізольованих із ферментованих рослинних продуктів із В'єтнаму. **Матеріали та методи.** Штами бактерій роду *Lactobacillus* виділяли з некомерційних автоферментованих солоних продуктів, виготовлених у В'єтнамі. Вивчення антагоністичної активності бактерій роду *Lactobacillus* *in vitro* проводили методом агарових лунок. Моделювання взаємодії бактерій роду *Lactobacillus* з фітопатогенами у системі *in vivo* проводили на бульбах картоплі *Solanum tuberosum* і коренеплодах моркви *Daucus carota*. Фізіолого-біохімічні властивості лактобактерій вивчали за допомогою API-систем. **Результати та обговорення.** За тинкторіальними, морфологічними та біохімічними властивостями відібрані штами лактобактерій ідентифіковано як *L. paracasei* ОНУ 520, *L. brevis* ОНУ 521, *L. plantarum* ОНУ 522, *L. plantarum* ОНУ 523, *L. rhamnosus* ОНУ 524. Встановлено, що через 24 год культивування навколо лунок, у які вносили культуральну рідину штампів-антагоністів, утворювалися зони затримки росту діаметром до 19 мм. Встановлено, що антагоністична дія цих бактерій зумовлена продукцією лактобактеріями органічних кислот. Показано, що досліджувані лактобактерії ефективно конкурують з фітопатогенними бактеріями *E. carotovora* та у всіх випадках інгібують їх ріст в експериментах на коренеплодах моркви та у 80% на бульбах картоплі. Суміш лактобактерій досліджуваних штампів не була більш ефективною ніж окремі штами. **Висновки.** Штами бактерій роду *Lactobacillus* ізольовані з некомерційних автоферментованих солоних продуктів, виготовлених у В'єтнамі виявили високий рівень антагоністичної активності до фітопатогенних ервіній.

Ключові слова: лактобактерій, антагоністична активність, фітопатогени.

Антагоністична активність лактобактерій зумовлена дією неспецифічних та специфічних речовин. Деякі штами лактобактерій володіють широким спектром антимікробної дії та проявляють антагоністичну активність у відношенні патогенних мікроорганізмів. Батерії *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. salivarius*, *L. curvatus*, *L. acidophilus* продукують молочну кислоту, ферменти, лізоцим,



антимікробні речовини білкової природи (нізин і лактоцидін, диплококцин, ацидолін, лактобацилін, болгарин, ацидофілін), біосурфактанти (нейтральні ліпіди, фосфоліпіди та гліколіпіди) [5]. Перекис водню здійснює пригнічувальний ефект на стафілококи, псевдомонади, ешеріхії, сальмонели, зумовлений окиснювальною дією на бактеріальні клітини і руйнуванням молекулярної структури клітинних білків [1, 2, 8]. Синтез лактобактеріями бактеріоцинів полегшує виживання штамів-продуцентів в умовах змішаних популяцій [3]. Спектр сполук з антибактеріальною активністю залежить від виду та штаму мікроорганізму та умов культивування. Переважно лактобактерії з антибіотичною активністю активно продукують органічні кислоти [9].

Молочнокислі бактерії продукують також біологічно активні речовини, що стимулюють ріст рослин: амінокислоти, вітаміни, ауксини, гібереліни [1, 4, 7].

Метою дослідження була ідентифікація та вивчення антагоністичних властивостей молочнокислих бактерій, ізольованих із автоферментованих некомерційних традиційних рослинних продуктів з В'єтнаму.

Матеріали та методи

Для ізоляції бактерій роду *Lactobacillus* ферментовані продукти, виготовлені у В'єтнамі, подрібнювали у ступці з додаванням стерильної води. Отриману суспензію висівали на агаризоване середовище MRS та інкубували за температури 36 °C впродовж 2 діб [6]. Загалом було ізольовано 102 штами лактобактерій: 39 – з проростків бамбуку, 37 – з листя гірчиці, 15 – з листя капусти, 6 – з плодів фіги, 5 – з баклажанів. За тинкторіальними, морфологічними та біохімічними властивостями виділенні бактерії були попередньо віднесені до роду *Lactobacillus*.

Штами МКБ перевіряли на наявність антагоністичних властивостей проти 12 штамів фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Антагоністичну активність бактерій роду *Lactobacillus* визначали методом дифузії антагоністичних речовин в агар (метод агарових лунок). Для роботи використовували добові культури штамів роду *Lactobacillus*, що культивувалися у рідкому MRS середовищі за температури 37 °C.

Досліджували антагоністичну активність культуральної рідини лактобацил, отриману осадженням бактерій за центрифугування впродовж 5 хв при 8800 g. Для визначення наявності інших антагоністичних метаболітів, крім органічних кислот, що продукують лактобацили, поряд з культуральною рідиною з нативним рН (рН<5), тестували культуральну рідину, нейтралізовану за допомогою розчину 2М NaOH до рН 7–7,5.

Штами фітопатогена вирощували у середовищі LB протягом доби при 28 °C, надалі готували 3-х годинну культуру (початок логарифмічної фази росту), яку використовували для засіву «газона» фітопатогена. Після застигання в агарі робили лунки діаметром 5 мм, вносили 30 мкл надосадової рідини та поміщали в термостат на добу при 28 °C.



Антагоністичну активність бактерій роду *Lactobacillus* оцінювали за діаметром зон затримки росту навколо лунок на газоні тест-штамів. Всі дослідження проводили у трьох повторях.

Ідентифікацію перспективних штамів-антагоністів роду *Lactobacillus* проводили за допомогою API-систем (Analytic Profile Index) за здатністю до ферментації різних типів вуглеводів. Для цього використовували тест-системи для ідентифікації мікроорганізмів API 50 CH (Bio Mérieux, Франція). Система передбачає визначення можливості зброджування 49 вуглеводів та їх похідних: гліцерин, еритрит, D-арабіноза, L-арабіноза, D-рибоза, D-ксилоза, L-ксилоза, D-адоніт, метил-β-D-ксилопіранозид, D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза, L-сорбоза, L-рамноза, дульцин, інозит, D-маніт, D-сорбіт, метил-α-D-манопіранозид, метил-α-D-глюкопіранозид, N-ацетилглюкопіранозид, амідгалін, арбутин, саліцин, D-целобіоза, D-мальтоза, D-лактоза, D-мелібіоза, цукроза, D-трегалоза, інουλін, D-мелецитоза, D-рафіноза, крохмаль, глікоген, ксиліт, гентибіоза, D-гураноза, D-ліксоза, D-тагатоza, D-фукоза, L-фукоза D-арабітол, L-арабітол, глюконат, 2-кетоглюконат, 5-кетоглюконат.

Вплив бактерій роду *Lactobacillus* на фітопатогенні бактерії вивчали *in vivo* на бульбах картоплі *Solanum tuberosum* і коренеплодах моркви *Daucus carota* у модельному експерименті з так званим «закладанням овочів на збереження». Одночасно оцінювали вплив ферментативної активності лактобактерій на тканини рослин [8, 9]. Для цього використали штами лактобацил, що виявили найбільшу антагоністичну активність.

Бульби картоплі *Solanum tuberosum* та коренеплоди моркви *Daucus carota* стерилізували обробкою додецил сульфатом натрію та за допомогою фламбування та УФ-опромінення протягом 30 хв. Для відтворення процесу інфікування на зовнішній поверхні бульб, розрізаних навпіл, та коренеплодів, нарізаних дисками товщиною 10–12 мм, в асептичних умовах робили по 3 лунки на один зразок глибиною 5 мм та діаметром 5 мм [7, 8]. В лунки вносили 200 мкл суспензії бактерій культури *E. carotovora*, яку відбирали в логарифмічній фазі росту. Через годину після інфікування у дослідні варіанти вносили суспензію лактобацил. Як позитивний контроль були використані рослинні тканини інфіковані ервініями, за негативні контролю слугували варіанти оброблені суспензіями штамів лактобактерій та поживним середовищем MRS. Герметично запаковані у поліетиленові пакети інфіковані бульби та коренеплоди витримували при температурі 25–30 °C дві доби.

Через 48 год візуально оцінювали ураження бульб і коренеплодів, та вимірювали масу гнилі кожного об'єкту. Появу гнилі на рослинних тканинах оцінювали за системою 4+: «4+» – розм'якшення та почорніння тканин на 75–100%; «3+» – розм'якшення тканин на 50–75% з частковим почорнінням; «2+» – розм'якшення тканин на 25–50% без почорніння; «1+» – розм'якшення тканин на 0–25%; «-» – відсутність гнилі. Для порівняння отримували середні значення за трьома повторами. Відсоток гнилі розраховували від різниці ваги рослинних зразків до проведення досліді і після видалення уражених гниллю тканин.



Всі отримані дані статистично опрацювали з використанням прикладних програм *Microsoft Office Excel*, з обчислюванням середніх значень, довірчого інтервалу, стандартного відхилення, $\alpha = 0,05$.

Результати та обговорення

Із автоферментованих рослинних продуктів, виготовлених у В'єтнамі, ізолювано 102 штами лактобактерій: 39 – з проростків бамбуку, 37 – з листя гірчиці, 15 – з листя капусти, 6 – з плодів фіги, 5 – з баклажанів. За тинкторіальними, морфологічними та біохімічними властивостями виділенні бактерії були попередньо віднесені до роду *Lactobacillus*.

У ході первинного скринінгу антагоністичної активності було відібрано п'ять штамів молочнокислих бактерій найбільш активних антагоністів (табл. 1). За фенотиповими ознаками та здатністю до зброджування вуглеводів та їх похідних: гліцерин, еритрит, D-арабіноза, L-арабіноза, D-рибоза, D-ксилоза, L-ксилоза, D-адоніт, метил- β -D-ксилопіранозид, D-галактоза, D-глюкоза, D-фруктоза, D-маноза, L-сорбоза, L-рамноза, дульцин, інозит, D-маніт, D-сорбіт, метил- α -D-манопіранозид, метил- α -D-глюкопіранозид, N-ацетилглюкопіранозид, амігдалін, арбутин, саліцин, D-целобіоза, D-мальтоза, D-лактоза, D-мелібіоза, цукроза, D-трегалоза, інулін, D-мелецитоза, D-рафіноза, крохмаль, глікоген, ксиліт, гентибіоза, D-тураноза, D-ліксоза, D-тагатоza, D-фукоза, L-фукоза D-арабітол, L-арабітол, глюконат, 2-кетоглюконат, 5-кетоглюконат їх було ідентифіковано як *L. paracasei* ОНУ 520 (L15), *L. brevis* ОНУ 521 (L21), *L. plantarum* ОНУ 522 (L24), *L. plantarum* ОНУ 523 (L26), *L. rhamnosus* ОНУ 524 (L27).

Бактерії роду *Lactobacillus* є активними кислотоутворювачами з антагоністичною активністю високого та середнього ступенів щодо умовно-патогенних та патогенних бактерій [1, 3]. Проведені дослідження показали, що після добового культивування лактобактерій, ізолюваних із авто ферментованих некомерційних рослинних продуктів з В'єтнаму, у бульйоні MRS кислотність середовища знижувалася до рН 3,8–4,3 (табл. 1).

Таблиця 1

Характеристика кислотоутворення штамів роду *Lactobacillus*

Table 1

Lactobacillus genus strains acid production characteristics

Штам	Джерело виділення	pH
<i>L. paracasei</i> ОНУ 520	Солоне листя гірчиці	4,2
<i>L. brevis</i> ОНУ 521	Листя гірчиці	4,0
<i>L. plantarum</i> ОНУ 522	Стебла бамбука	4,3
<i>L. plantarum</i> ОНУ 523	Солоне листя гірчиці	4,0
<i>L. rhamnosus</i> ОНУ 524	Солоне листя гірчиці	3,8



Досліджувані штами бактерій роду *Lactobacillus* було вивчено на наявність антагоністичних властивостей щодо 12 штамів фітопатогенної бактерії *E. carotovora* (табл. 2). Через 24 год культивування навколо лунок, у які вносили культуральну рідину бактерій-антагоністів, утворювалися зони затримки росту діаметром від 2 до 19 мм (табл. 2).

Таблиця 2

Антагоністична активність лактобактерій до фітопатогенних бактерій *E. carotovora*

Table 2

Lactobacilli antagonistic activity against pathogenic bacteria *E. carotovora*

Штам <i>E. carotovora</i>	<i>L. paracasei</i> ОНУ 520	<i>L. brevis</i> ОНУ 521	<i>L. plantarum</i> ОНУ 522	<i>L. plantarum</i> ОНУ 523	<i>L. rhamnosus</i> ОНУ 524
ОНУ 317	12*±0,5	5±1,4	13±0,8	15±1,0	14±0,7
ОНУ 318	14±0,6	10±2,1	17±1,0	19±1,2	15±0,8
ОНУ 320	15±0,8	5±1,3	14±0,9	18±1,0	16±0,6
ОНУ 319	14±0,6	5±1,4	12±0,7	14±0,9	13±0,6
ОНУ 321	13±0,8	11±1,2	13±0,8	15±1,0	16±0,7
ОНУ 322	12±0,5	5±1,4	11±0,6	14±0,9	13±0,5
ОНУ 323	14±0,6	7±1,6	14±0,9	14±0,9	15±0,5
ОНУ 324	11±0,4	2±0,5	12±0,7	14±0,9	13±0,5
ОНУ 325	11±0,3	5±1,6	12±0,7	14±0,9	13±0,5
ОНУ 326	14±0,6	2±0,5	14±0,9	14±0,9	15±0,7
ОНУ 525	12±0,5	5±1,4	11±0,7	13±0,8	13±0,5
ОНУ 526	11±0,3	2±0,5	11±0,7	14±1,0	13±0,5
Середнє значення	13±0,8	5±1,6	13±0,9	15±1,0	14±0,7

* Діаметр (мм) зон сповільнення росту через 24 год

* growth zone diameter in 24 hours

Великі за діаметром зони затримки росту утворювали чотири з п'яти штамів-антагоністів, а саме ОНУ 520, ОНУ 523, ОНУ 524, ОНУ 522, за дії на усі досліджувані тест-штами *E. carotovora* (табл. 2). В середньому діаметр зон затримки росту для них складав 13–15 мм, що є показником високої антагоністичної активності. Середнє значення діаметру зон сповільнення росту для штамів *E. carotovora* ОНУ 318 і ОНУ 321 становило 10–11 мм (табл. 2).



Підвищення розчином NaOH рН культуральної рідини до 7,0–8,0 призвело до нейтралізації антагоністичної активності штамів *Lactobacillus*. Отримані результати свідчать про те, що пригнічення росту фітопатогенних бактерій зумовлено дією органічних кислот, які продукують лактобактерії.

Захисну активність штамів-антагоністів роду *Lactobacillus* по відношенню до штамів *E. carotovora* було перевірено також у системі *in vivo* на бульбах картоплі і коренеплодах моркви (табл. 3). Вивчення здатності досліджених штамів лактобактерій до ферментації рослинних тканин показало відсутність у них суттєвої ферментативної активності по відношенню до тканин бульби картоплі та коренеплодів моркви (табл. 3, 4).

Таблиця 3

**Пригнічення лактобактеріями процесу ураження бактеріями
E. carotovora бульб картоплі та коренеплодів моркви**

Table 3

**Lactobacilli inhibition of *E. carotovora* destruction process
on potato tubers and carrot roots**

Варіант	Бульби картоплі		Коренеплоди моркви	
	Оцінка ураження	Відсоток гнилі, %	Оцінка ураження	Відсоток гнилі, %
Контроль <i>E. carotovora</i> (суміш штамів)	3*+	8,75	4+	7,30
<i>L. paracasei</i> ОНУ 520	-	-	-	-
<i>L. brevis</i> ОНУ 521	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> ОНУ 522	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> ОНУ 523	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> ОНУ 524	-	-	-	-
Контроль Суміш штамів <i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-
Суміш <i>Ec</i> + <i>L. paracasei</i> ОНУ 520	-	2,40	-	-
Суміш <i>Ec</i> + <i>L. brevis</i> ОНУ 521	1+	2,10	-	1,10
Суміш <i>Ec</i> + <i>L. plantarum</i> ОНУ 522	1+	1,42	-	-
Суміш <i>Ec</i> + <i>L. plantarum</i> ОНУ 523	2+	7,26	-	-
Суміш <i>Ec</i> + <i>L. rhamnosus</i> ОНУ 524	-	1,26	-	-
Суміш <i>Ec</i> + Суміш штамів <i>Lactobacillus</i>	1+	2,46	-	-

Примітка: «-» – відсутність гнилі; * – значення з урахуванням трьох повторів;

Ec – *E. carotovora*;

Note: «-» – not rot; * – value given with taking into consideration 3 repetitions;

Ec – *E. carotovora*.



Ефективність дії штамів-антагоністів роду *Lactobacillus* по відношенню до фітопатогенних бактерій *E. carotovora* у системі *in vivo* оцінювали по зменшенню маси гнилі бульб картоплі та коренеплодів моркви у співвідношенні до маси здорових тканин (табл. 4). Ефективність захисної дії бактерій роду *Lactobacillus* виявилася значно більшою на коренеплодах моркви і становила 100% для *L. paracasei* ОНУ 520, *L. plantarum* ОНУ 522, *L. plantarum* ОНУ 523, *L. rhamnosus* ОНУ 524, а також для суміші штамів.

Таблиця 4

Ефективність захисної дії лактобактерій щодо ураження бактеріями *E. carotovora* бульб картоплі та коренеплодів моркви

Table 4

Lactobacillus bacteria protective action effectiveness on *E. carotovora* destruction of potato tubers and carrot roots

Штам	Ефективність захисної дії, %	
	на бульбах картоплі	на дисках моркви
<i>L. paracasei</i> ОНУ 520	72,6	100
<i>L. brevis</i> ОНУ 521	76,0	85
<i>L. plantarum</i> ОНУ 522	83,7	100
<i>L. plantarum</i> ОНУ 523	17,0	100
<i>L. rhamnosus</i> ОНУ 524	85,6	100
Суміш лактобактерій	71,9	100

Найвищі показники ефективності захисної дії на бульбах картоплі було встановлено у штамів *L. plantarum* ОНУ 522, *L. rhamnosus* ОНУ 524 (83,7% і 85,6%, відповідно) (табл. 4).

Таким чином, досліджені штами молочнокислих бактерій, ізольовані із автоферментованих некомерційних рослинних продуктів з В'єтнаму, виявили високу антагоністичну активність по відношенню до фітопатогенних штамів бактерії *E. carotovora*, утворюючи зони затримки росту діаметром до 19 мм. Встановлено, що їх антагоністична дія зумовлена продукцією лактобактеріями органічних кислот. Відомо, що лактобактерії здатні пригнічувати інфікування рослин бактерією *Agrobacterium tumefaciens* і подальше провокування нею появи пухлин на дисках моркви та рослинах каланхое [5]. В даному дослідженні показано, що досліджувані лактобактерії ефективно конкурують з фітопатогенними бактеріями *E. carotovora* та в усіх випадках пригнічують їх ріст на коренеплодах моркви та у 80% на бульбах картоплі.



**Zh.Yu. Sergeieva, O.V. Basiul, O.G. Gorshkova, T.Y. Gavriluk,
G.M. Nazarenko**

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

VIETNAMESE FERMENTED PLANTS LACTOBACTERIA ANTAGONISTIC ACTIVITY

Summary

*The aim of the research was to identify and study antagonistic properties of lactic acid bacteria isolated from vietnamese fermented plant products. **Materials and methods.** Lactobacillus genus bacteria strains were isolated from vietnamese uncommercial autofermented savory products. Five Lactobacillus strains were checked for the antagonistic properties presence against 12 strains of phytopathogenic bacterium Erwinia carotovora. Lactobacillus genus bacteria antagonistic activity in vitro research was performed by agar holes. Antagonistic bacteria in vivo interaction modeling system with pathogens was carried out on Solanum tuberosum potato tubers and Daucus carota carrots. Lactobacilli strains identification was performed using API-systems. **Results and discussion.** Selected Lactobacillus strains were identified as L. paracasei ONU 520, L. brevis ONU 521, L. plantarum ONU 522, L. plantarum 523 ONU, L. rhamnosus ONU 524 based on tinctorial, morphological and biochemical properties. It was found that in 24 hours of cultivation around the agar holes into which the antagonistic strains culture liquid had been introduced there were formed the growth inhibition zones up to 19 mm in diameter. It has been determined that antagonistic effect appeared due to the organic acids production by lactobacilli. It was found that the lactobacteria effectively compete phytopathogenic bacteria E. carotovora and in all cases inhibit their growth on carrot roots and in 80% on potato tubers. Lactobacterial strains mixture showed the same efficiency as individual strains. **Conclusions.** Lactobacillus genus bacteria strains, isolated from vietnamese uncommercial autofermented savory products, showed high levels of antagonistic activity against pathogenic Erwinia.*

Key words: lactobacilli, antagonistic activity, phytopathogens.

**Ж.Ю. Сергеева, Е.В. Басюл, Е.Г. Горшкова, Т.И. Гаврилюк,
А.Н. Назаренко**

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

АНТАГОНІСТИЧЕСЬКА АКТИВНОСТЬ ЛАКТОБАКТЕРІЙ, ІЗОЛІРОВАНИХ ІЗ ФЕРМЕНТИРОВАНИХ РАСТИТЕЛЬНИХ ПРОДУКТОВ ІЗ ВЬЕТНАМА

Реферат

*Целью исследования была идентификация и изучение антагонистических свойств молочнокислых бактерий, выделенных из ферментированных растительных продуктов из Вьетнама. **Материалы и методы.** Штаммы бактерий*



рода *Lactobacillus* выделяли из некоммерческих автоферментированных соленых продуктов, изготовленных во Вьетнаме. Пять штаммов лактобактерий проверялись на наличие антагонистических свойств против 12 штаммов фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*. Исследование антагонистической активности бактерий рода *Lactobacillus* *in vitro* проводили методом агаровых лунок. Моделирование взаимодействия бактерий рода *Lactobacillus* с фитопатогенами в системе *in vivo* проводили на клубнях картофеля *Solanum tuberosum* и корнеплодах моркови *Daucus carota*. Идентификация штаммов лактобактерий проводилась с помощью АРІ-систем. **Результаты и обсуждение.** По тинкториальным, морфологическим и биохимическим свойствам выбранные штаммы лактобактерии идентифицированы как *L. paracasei* ОНУ 520, *L. brevis* ОНУ 521, *L. plantarum* ОНУ 522, *L. plantarum* ОНУ 523, *L. rhamnosus* ОНУ 524. Установлено, что через 24 часа культивирования вокруг лунок, в которые вносили культуральную жидкость штаммов-антагонистов, образовывались зоны задержки роста диаметром до 19 мм. Выявлено, что антагонистическое действие обусловлено продукцией лактобактериями органических кислот. Показано, что исследованные бактерии эффективно конкурируют с фитопатогенными бактериями *E. carotovora* и во всех случаях ингибируют их рост в экспериментах на корнеплодах моркови и в 80% на клубнях картофеля. Смесь лактобактерий исследованных штаммов не была более эффективной, чем отдельные штаммы. **Выводы.** Штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, изолированные из некоммерческих автоферментированных соленых продуктов, изготовленных во Вьетнаме, проявили высокий уровень антагонистической активности против фитопатогенных эрвиний.

Ключевые слова: лактобактерии, антагонистическая активность, фитопатогены.

Список використаної літератури

1. Batdorj B., Trinetta V., Dalgalarondo M. et al. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – V. 103. – P. 584–593.
2. Cebeci A., Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. // Food Microbiology. – 2003. – 20. – P. 511–518.
3. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. // Peptides. – 2004. – Vol. 25 (9). – P. 1405–1414.
4. Klein G., Pack A., Bonaparte C. and Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. // International Journal of Food Microbiology. – 1998. – 41. – P. 103–125.
5. Limanska N., Korotaeva N., Biscola V., Ivanytsia T., Merlich A., Franco B.D.G.M., Chobert J.M., Ivanytsia V., Haertle T. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Pathology and Microbiology. – 2015. – Vol. 6, № 8: doi: 10.4172/2157-7471.1000292
6. Limanska N. V., Korotaeva N. V., Yamborko G. V., Ivanytsia V.O. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* // Microbiology and Biotechnology. – 2014. – № 1. – P. 8–18.



7. Карпетян К. Дж. Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий // Биолог. журн. Армении. – 2009. – Т. 4 (61). – С. 36–42.

8. Самусенко Н. В. Научное обоснование применения бактерий-антагонистов при длительном холодильном хранении корнеплодов моркови: автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. техн. наук. – Санкт-Петербург, 2001. – 20 с.

9. Тихонович И. А., Проворов Н. А. Кооперация растений и микроорганизмов: новые подходы к конструированию экологически устойчивых агросистем // Усп. совр. биол. – 2007. – 4. – С. 339–357.

References

1. Batdorj B, Trinetta V, Dalgalarondo M et al. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. Journal of Applied Microbiology. 2007; 103: 584–593.

2. Cebeci A, Gurakan C Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology. 2003; 20: 511-518.

3. Kleerebezem M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. Peptides. 2004; 25 (9): 1405-1414.

4. Klein G, Pack A, Bonaparte C and Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 1998; 41: 103–125.

5. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A., Franco B.D.G.M., Chobert JM, Ivanytsia V, Haertle T. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Pathology and Microbiology. – 2015. – Vol. 6, №8: doi: 10.4172/2157-7471.1000292

6. Limanska NV, Korotaeva NV, Yamborko GV, Ivanytsia VO. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* // Microbiology and Biotechnology. – 2014. – №1. – P. 8 – 18.

7. Karapetyan KJ. Comparative evaluation of a number of lactic acid bacteria new strains properties. Armenia Biological Journal. 2009; 4 (61):36-42.

8. Samusenko NV. The scientific rationale of the antagonistic bacteria use for carrots root crops prolonged refrigerated storage. PhD thesis, St. Petersburg State University of Refrigeration and Food Engineering, 2001: 20

9. Tyhonovich IA, Provorov NA. Cooperation of plants and microorganisms: new approaches to the design of environmentally sustainable agricultural systems. Modern Biology Advances. 2007; 4: 339-357.

Стаття надійшла до редакції 29.11.2016 р.



УДК 578.826:615.281

Yu. Pankivska, L. Biliavska, O. Povnitsa, S. Zagorodnya

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 61 68, e-mail:pankivska.yulia@gmail.com

ANTIADENOVIRAL ACTIVITY OF FLUORIDE-CONTAINING NUCLEOSIDES AND BISPHTHONATES DERIVATES

*Human adenoviruses cause various acute diseases including gastrointestinal and respiratory disorders. However, there are no clinically approved specific anti-adenoviral drugs. Therefore, the search of drugs and regimens that would be effective, safe for prolonged use, and available at a cost to a wide range of patients is extremely important. **The aim of the work** was to study the cytotoxicity and antiviral activity of six new fluorochemical compounds with respect to human adenovirus serotype 5 in vitro. **Methods.** Cytotoxicity of the compounds was determined by MTT-test. The lysosomal activity of cells was estimated using neutral red dye. Cytomorphological method was used to identify adenovirus infected cells containing specific virus inclusion. In addition, the anti-adenoviral activity of the most effective compounds was confirmed by real-time PCR analysis. **Results.** CC_{50} index measured by MTT- test, ranged from 125 mg/ml to 1000 μ g/ml. CC_{50} index determined with neutral red dye ranged from 630 μ g/ml to 2500 μ g/ml. It was discovered that the toxicity of compounds dependent on their solubility. The anti-adenoviral activity was shown for three compounds referred to G22, G26 and 10S-23 with EC_{50} values of 60, 120 and 90 μ g/ml, respectively. PCR analysis also revealed anti-adenoviral activity of the compounds G26 and 10S-23. **Conclusions.** The analysis of the cytotoxic and antiviral activity of six new fluorochemical compounds was conducted. Cytomorphological analysis showed the antiviral activity against adenovirus serotype 5 for the compounds G22, G26 and 10S-23. Using PCR analysis, the anti-adenoviral activity of the compounds G26 and 10S-23 was demonstrated.*

Key words: adenovirus, fluoride-containing compounds, cytotoxicity, antiviral activity.

More than 60 serotypes of human adenoviruses, which cause a variety of course and severity of clinical signs of infectious disease are known. Particularly high risk of adenovirus infection is observed in recipients after transplantation of stem cells, and in people with immune deficiencies, particularly those receiving immunosuppressive therapy following organ transplantation or HIV-infected patients [11].

However, there is no specific drug for the treatment of adenoviral diseases [14, 7, 10]. In clinical practice, the treatment of eye diseases caused by adenovirus includes a number of substances, which possess purely virucidal action and affect the



extracellular virus (oxolinum, tebropheum, bonaphtonum). Ribavirin and cidofovir are the most frequently used for other adenoviral infections. However, their use is ineffective in some cases including disseminated adenovirus infection in persons with immunodeficiency [8, 13, 9, 22, 5]. Furthermore, cidofovir is characterized by several disadvantages including the renal toxicity, irritant effect in the adenoviral diseases of the eye, the appearance of resistant strains. In addition, several publications describe the insensitivity of some adenovirus serotypes to ribavirin [16, 18].

Recently published data describes a new drug referred to brincidofovir, a lipid conjugate of cidofovir, that show inhibiting effect on adenovirus infection. However, unlike cidofovir the new drug is much more efficient and safer due to the lipid components (flippases) that accelerate the entry and accumulation of the drug in the cell enhancing its bioavailability. At present, a phase III multicenter study of brincidofovir is recruiting participants to study its efficacy in the treatment of HAdV [21, 19].

Therefore, the search of drugs and regimens that would be effective, safe for prolonged use, and available at a cost to a wide range of patients is extremely important.

The studying of fluorinated nucleoside sugars chemistry became the basis for the development of promising chemotherapeutic agents with antitumor and antiviral effects. Based on the purine and pyrimidine nucleotide analogues and fluorinated heterocycle molecules a number of new generation drugs with anticancer effect were developed. Thus, fludarabine phosphate is an effective anticancer compound for the treatment of acute or chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. The synthesis and implementation into clinical practice of 5-fluorouracil analogue was an extremely important achievement of modern medicinal chemistry. This compound is now widely used in the treatment of malignant tumors of various organs. It is known that 3'-deoxy-3'-fluoro-D-deoxyribonucleosides act as inhibitors of several DNA- and RNA-containing viruses. For example, 3'-deoxy-3'-fluoroadenosine inhibits the replication of different RNA-containing viruses including poliovirus, Coxsackie virus, Sindbis virus, and DNA-containing cowpox virus. Some pyrimidine ribonucleosides have antiviral activity against herpes simplex virus. For instance, 2'-deoxy-2'-fluorocytidine is a strong and selective inhibitor of HCV RNA polymerase [6, 12].

The aim of the work was to study the cytotoxicity and antiviral activity of some new fluorochemical compounds synthesized at the Institute of Organic Chemistry NAS Ukraine, with respect to human adenovirus serotype 5 *in vitro*.

Materials and methods

Inoculated cell culture including MDBK (bovine kidney) and Hep-2 (larynx epidermoid carcinoma) were used. Cells were grown in a medium consisting of 45% DMEM (BioTestMed, Ukraine), 45% RPMI 1640 (Sigma, USA), 10% serum of cattle inactivated by heating (Sigma, USA), and antibiotics penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (100 µg/ml). The cultivation of cells was performed according to standard procedure [3]. The reference strain of human adenovirus serotype 5 was



obtained from the collection of the Institute of Microbiology, Medical University of Budapest. The virus was accumulated in cell culture Hep-2, titrated and stored at a temperature of -20°C .

Test compounds. G22 and G23 – nucleosides modified on carbohydrate part (2-N-substituted-4-tosyl-5-polyfluoroalkyl-1,2,3-triazole); G26 and G27 – fluorine containing nucleosides based on uracil; 10S-23 and 10S-24 – sodium salt of N-(2,2,2-trifluoroethyl) phenylalanine and N-(2,2,3,3-tetrafluoropropionyl) phenylalanine (Fig. 1). An official drug ganciclovir (“CYMEVENE” Roche, Switzerland) (Fig. 1) was used as a reference drug.

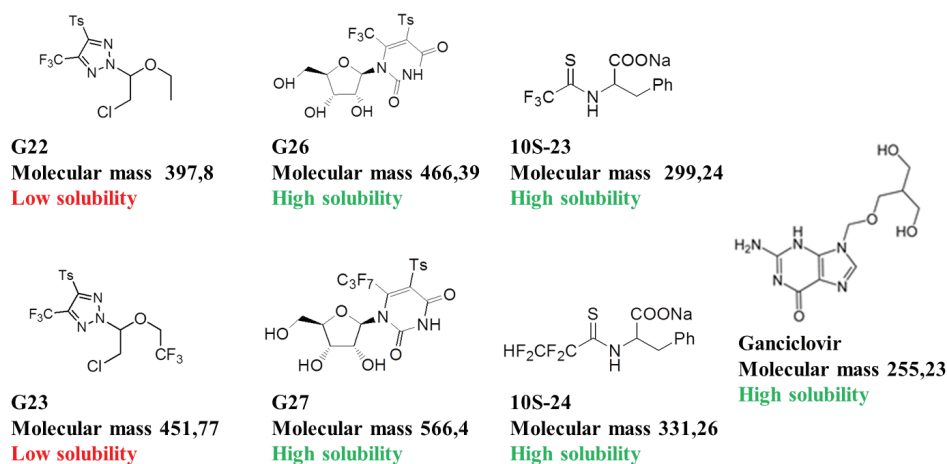


Fig. 1. Test compounds

The compounds were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, USA) to concentration of 20 mg/ml and stored at 4°C . Working twofold serial dilutions from 1 mg/ml to $8\ \mu\text{g/ml}$ were prepared in the medium for cell culture (RPMI-1640, Sigma, USA) without serum immediately before use. Solutions were sterilized using syringe filtration through membrane filters with pore diameter of 0,22 microns (Sarstedt, Germany).

Cytotoxicity of the compounds was determined by MTT-test according to the standard protocol [17]. The lysosomal activity of cells was estimated using neutral red dye [20]. The results of colorimetric analysis were recorded using Multiscan FC device (Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 540 nm. The concentrations of substances that inhibit 50% of cell viability compared to control cells (CC_{50}) were measured using a linear regression method in Microsoft Excel 10.

Cytomorphological method was used to identify adenovirus infected cells containing specific virus inclusion [2]. MDBK cells were grown in test tubes with stripes covering glasses. Then, cells were infected with the virus of plurality 10 ICU/cell. After 1,5 hours of virus adsorption at room temperature cells were washed using Hanks solution. Next, experimental substances of different concentration dissolved in a supportive medium were added. Each concentration was used in triplication. Adenovirus infected cells were used as control. The experiments were conducted using 2-fold dilutions of the compounds (31, 62, and 125 mg/ml) and time point of



48 hours after infection and compound treatment. The data analysis was performed as described previously [1]. The half maximal effective concentration (EC_{50}) was estimated as the concentration of the compound which induced to 50% of its maximal effectiveness that was observed.

In addition, to confirm the antiviral action of the most effective compounds real-time PCR analysis was used. The adenovirus genome region responsible for the synthesis of late adenovirus structural hexon protein was used as a target. Statistical analysis of the data was performed according to standard approaches with the calculation of statistical error (standard deviation) using Microsoft Excel 2010.

Results and discussion

The research of cytotoxicity of new fluorochemical compounds was conducted on inoculated monolayer cell culture MDBK, which is sensitive to human adenovirus. CC_{50} indexes were estimated using MTT-test and are presented in Figure 2. It was shown that compounds with low solubility in the growth medium significantly greater toxicity. Compounds G22 and G23, which have similar structure and differ only by the presence of additional trifluoromethyl group (CF₃- group) in compound G23 showed toxic effects. However, CC_{50} index was 250 $\mu\text{g/ml}$ for G22 and 125 $\mu\text{g/ml}$ for compound G23. Therefore, it was suggested that the presence of the CF₃-group increases the toxicity. Compounds G26 and G27 also differ only in the number of fluorine atoms in the molecules. However, no difference in the bioavailability was detected, whereas both compounds showed low toxic effect and high solubility. CC_{50} indexes for both substances were 630 $\mu\text{g/ml}$. The compounds 10S-23 and 10S-24 demonstrated relatively low rate of cytotoxicity at the maximal concentration used in the study (1000 $\mu\text{g/ml}$). Therefore, using the method of statistical analysis (function prediction in Microsoft Excel 10) CC_{50} indexes for these compounds were determined (1250 and 1700 $\mu\text{g/ml}$, respectively). Their high solubility is caused by the presence of polar groups (-NH,-COO), which can form hydrogen bonds with the solvent increasing the solubility of the compound. Reference drug ganciclovir showed high solubility and increased rates of cytotoxicity with CC_{50} value greater than 1000 $\mu\text{g/ml}$ (1200 $\mu\text{g/ml}$).

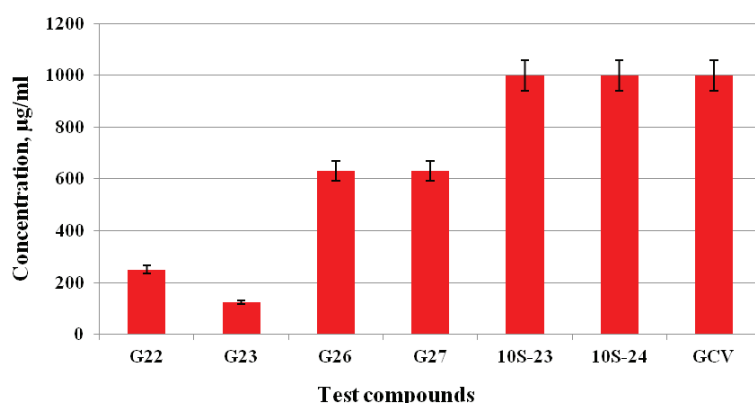
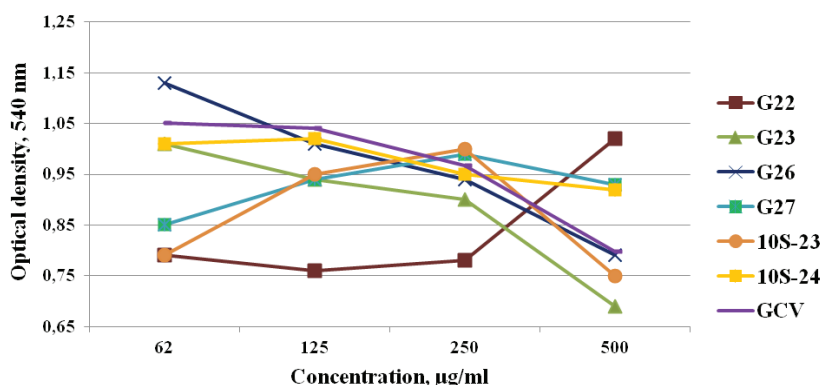


Fig. 2. CC_{50} indexes of compounds identified by MTT method

Therefore, the higher CC_{50} indexes of compounds and, as a result, their lower toxicity are likely related to their solubility in the medium. Moreover, highly soluble compounds including G26, G27, 10S-23, 10S-24 have low toxicity even at high concentrations.

The influence of these compounds on the lysosomal activity of the cell was analyzed using neutral red dye staining. Lysosomal membranes are well-permeable for the dye only when the cell is alive and fully functioning. The dye is able to accumulate in lysosomal matrix and cannot be washed out with ethanol, allowing the identification of the alive and proliferating cells [20]. Lysosomal activity of the compounds was estimated in the concentration range of 16-500 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 3). Using statistical analysis (function prediction in Microsoft Excel 10) it was found that the rates of lysosomal activity ranged from 630 $\mu\text{g/ml}$ and, in some cases, exceeded the index of 1000 $\mu\text{g/ml}$ (>2500 $\mu\text{g/ml}$ for 10S-24).

Comparing the effects on cell viability estimated by two methods it was suggested that compounds G22 and G23 have different influences on cell compartments. These compounds showed significant inhibitory effect on the functioning of the mitochondria with increased levels of lysosomal activity, indicating the activation of cell death.



Annotation: The optical density of control was 0,85

Fig. 3. The levels of the lysosomal activity determined using neutral red dye staining

For the analysis of antiviral activity of the compounds non-toxic concentrations with the values lower than CC_{50} index were used. Compounds added as part of a growth medium after virus adsorption. Compounds G23 and G27 did not inhibit the reproduction of human adenovirus serotype 5. However, inhibition of adenovirus reproduction was shown for compounds G22, G26 and 10S-23 (Table 1).

Therefore, the compounds G22 and G26 suppressed reproduction of HAdV-5 by 56 % at a concentration of 125 $\mu\text{g/ml}$ and over 30 % at the concentration of 31 $\mu\text{g/ml}$.

Compound 10S-23 suppressed the reproduction of HAdV-5 by 62% and 2% at the concentrations of 125 $\mu\text{g/ml}$ and 31 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Compound 10S-24 showed low inhibitory effect on the reproduction of adenovirus (6%) at the concentration of 125 $\mu\text{g/ml}$. The effective antiviral concentrations that cause the reduction of specific



virus inclusions by 50 % (EC_{50}) were 60, 120 and 90 $\mu\text{g/ml}$ for compounds G22, G26 and 10S-23, respectively. The EC_{50} index of the reference compound was 50 $\mu\text{g/ml}$.

Table 1

Antiviral activity of the compounds

Chemical structure of compounds	Compound code	% Inhibition of virus reproduction		
		Concentration, $\mu\text{g/ml}$		
		31	62	125
Nucleosides derivatives	G22	39	52	56
	G23	N/A	N/A	N/A
	G26	30	41	56
	G27	N/A	N/A	N/A
Bisphosphonates derivatives	10S-23	2	42	62
	10S-24	N/A	N/A	6

Annotation: N/A – not active

Compounds that demonstrated significant anti-adenoviral activity were also examined by real-time PCR. Compound G22 showed no suppressive effect on the adenovirus reproduction at analyzed concentrations. Compound G26 inhibited replication of viral DNA by 100% at the concentration of 31 $\mu\text{g/ml}$ and by 27% at the concentration of 125 $\mu\text{g/ml}$. The inhibition of the viral DNA replication was shown for all analyzed concentrations of the compound 10S-23 with the inhibition effect ranging between 27% and 40%, depending on the concentration of the compound. Although, PCR analysis showed that the reference drug ganciclovir caused the inhibition of adenovirus reproduction, the partial replication of viral DNA occurred.

The largest number of drugs used in medical practice is represented by nucleosides with various modifications in the structure. The presence of fluorine atoms in the molecule of nucleoside leads to the changes of its chemical, physical and biological properties [4, 12]. There are already enough fluoride-containing nucleoside drugs used for the treatment of diseases caused by viruses such as Coxsackie virus, poliovirus, HCV and HIV [15]. Therefore, further progress in the synthesis of new fluorochemical compounds will contribute to the understanding of their molecular mechanisms of action.

It is known that the antiviral effect of abnormal nucleosides in most cases is caused by the intracellular phosphorylation of inactive nucleoside and formation of active nucleotide [4]. As nucleotide analogues, they compete with natural nucleotides for the enzymes involved in the synthesis of nucleotides and nucleic acids. Therefore, the incorporation of abnormal nucleosides into the nucleic acids makes them non-functional [18, 6].

Analysis of the compounds cytotoxicity demonstrated that the cytotoxicity correlates with the compound solubility in growth medium. The insoluble compounds



were shown to be toxic for cells. Their soluble components were suggested to affect the integrity of the cell structure increasing the level of cell death.

Determination of the antiviral activity assessed via cytomorphological method and real-time PCR (for the most active compounds) demonstrated the inhibitory effect of the most compounds on the reproduction of the virus. The results of the both approaches confirmed that the compounds reduced the number of viral DNA. Therefore, it can be assumed that the compounds G26 and 10S-23 affected the stage of the viral DNA replication. Inhibition of this phase of the adenovirus reproduction led to the problems with the life cycle progression and infectious particles formation.

Using cytomorphological method the antiviral effect of the compound G22 was shown. However, the antiviral effect of this compound was not confirmed by the PCR suggesting that the compound affects other stages of virus reproduction including mRNA synthesis. Therefore, the compound G22 suppressed further synthesis of viral proteins, disrupting the formation of viral particles. As a result, that caused the absence of the adenovirus specific inclusions in the cell nuclei. However, that did not affect process of the viral genome replication confirmed by the real-time PCR.

The analysis of the cytotoxic and antiviral activity of six new fluorochemical compounds was conducted. It was found that the cytotoxic and antiviral activity of the related compounds depend on the presence or absence of certain chemical groups and a number of fluorine atoms in the molecule. Cytomorphological analysis showed the antiviral activity against adenovirus serotype 5 for the compounds G22, G26 and 10S-23. Using PCR analysis, the anti-adenoviral activity of the compounds G26 and 10S-23 was demonstrated.

Ю.Б. Паньківська, Л.О. Білявська, О.Ю. Повниця, С.Д. Загородня

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38 (044) 526 61 68, e-mail:pankivska.yulia@gmail.com

ВИВЧЕННЯ АНТИАДЕНОВІРУСНОЇ ДІЇ ФТОРВМІСНИХ СПЛУК НУКЛЕОЗИДНОЇ ТА НЕНУКЛЕОЗИДНОЇ ПРИРОДИ

Реферат

Мета роботи: дослідження цитотоксичності та антивірусної активності ряду нових фторвмісних сполук відносно аденовірусу людини 5 серотипу в системі *in vitro*. **Методи.** Визначення мітохондріальної активності клітин проводили за допомогою МТТ-методу. Лізосомальну активність клітин досліджували із застосуванням барвника нейтрального червоного. Антивірусну активність речовин досліджували цитоморфологічним методом із застосуванням фарбника акридинового оранжового та за допомогою ПЛР аналізу. **Результати.** Показник CC_{50} встановлений за допомогою МТТ-тесту, коливався від 125 мкг/мл (сполука G23) до >1000 мкг/мл (сполуки 10S-23 та 10S-24). CC_{50} визначений з використанням нейтрального червоного мав значення: від 630 мкг/мл до >2500



мкг/мл. Була виявлена залежність токсичності сполук від їх розчинності. Показана антиаденовірусна активність для 3-х сполук – G22, G26 та 10S-23, EC_{50} для них складала 60, 120 і 90 мкг/мл, відповідно. ПЛР аналізом також було виявлено антиаденовірусну дію сполук G26 та 10S-23. **Висновки.** Отже, було проведено дослідження цитотоксичної та антивірусної дії 6 нових фторвмісних сполук. Виявлено, що у споріднених сполук, що відрізнялись кількістю атомів фтору у молекулі змінювалась їх цитотоксичність та антивірусна дія. Цитоморфологічним методом показано антивірусну активність відносно аденовірусу 5 серотипу сполук G22, G26 та 10S-23. З використанням ПЛР аналізу також встановлено антивірусну дію антивірусну дію сполук G26 та 10S-23.

Ключові слова: аденовірус, фторвмісні сполуки, цитотоксичність, антивірусна активність.

Ю.Б. Паньківська, Л.А. Белявська, О.Ю. Повниця, С.Д. Загородня

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина, тел.: +38 (044) 526 61 68,
e-mail: pankivska.yulia@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАДЕНОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НУКЛЕОЗИДНОЙ И НЕНУКЛЕОЗИДНОЙ ПРИРОДЫ

Реферат

Цель работы: исследование цитотоксичности и антивирусной активности ряда новых фторсодержащих соединений относительно аденовируса человека 5 серотипа в системе *in vitro*. **Методы.** Определение митохондриальной активности клеток проводили с помощью МТТ-метода. Лизосомальную активность клеток исследовали с применением красителя нейтрального красного. Антивирусную активность веществ определяли цитоморфологическим методом с применением красителя акридинового оранжевого и ПЦР анализа. **Результаты.** Показатель CC_{50} установленный с помощью МТТ-теста, колебался от 125 мкг/мл (соединение G23) до > 1000 мкг/мл (соединения 10S-23 и 10S-24). Показатель CC_{50} определенный с использованием нейтрального красного имел значения: от 630 мкг/мл до >2500 мкг/мл. Была выявлена зависимость токсичности соединений от их растворимости. Показана антиаденовирусная активность для 3-х соединений – G22, G26 и 10S-23, EC_{50} для них составляла 60, 120 и 90 мкг/мл, соответственно. ПЦР анализом также было обнаружено антиаденовирусное действие соединений G26 и 10S-23. **Выводы.** Таким образом, было проведено исследование цитотоксического и антивирусного действия 6 новых фторсодержащих соединений. Виявлено, что в соединениях, которые отличались количеством атомов фтора в молекуле, изменялись показатели их цитотоксичности и антивирусное действие. Цитоморфологическим методом показано антивирусную активность в отношении аденовируса 5 серотипа соединений G22, G26 и 10S-23. С использованием ПЦР анализа также установлено антивирусное действие соединений G26 и 10S-23.

Ключевые слова: аденовирус, фторсодержащие соединения, цитотоксичность, антивирусная активность.



References:

1. *Белявская Л.А., Повниця О.Ю., Шермолович Ю.Г., Гудзь А.П., Нестерова Н.В.* Исследование антиаденовирусной активности новых фторсодержащих гетероциклических соединений // *Микробиология и биотехнология*. – 2014. – N. 1 – P. 19–26.
2. *Носач Л.Н., Дяченко Н.С.* Цитопатология аденовирусной инфекции. Наукова думка. – 1982.
3. *European Collection of Animal Cell Cultures Catalog*. Porton Down: Salisbury (UK) PHLS Centre of Applied Microbiology and Research, 1990.
4. *Filler R., Saha R.* Fluorine in medicinal chemistry: a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights. // *Future Med. Chem.* – 2009. – 1, N. 5 – P. 777–791.
5. *Kampmann B., Cubitt D., Walls T., et al.* Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. // *Br. J. Haematol.* – 2005. – 130, N. 4 – P. 595–603.
6. *Kang L., Kim E., Choi E.J., et al.* Synthesis and conformation of novel 4'-fluorinated 5'-deoxythreosyl phosphonic acid nucleosides as antiviral agents // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2012. – 33, N. 12 – P. 4007–4014.
7. *Kinchington P.R., Romanowski E.G., Gordon Y.J.* Prospects for adenovirus antivirals // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2005. – 55, N. 4 – P. 424–429.
8. *La Rosa a M., Champlin R.E., Mirza N., et al.* Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – 32, N. 6 – P. 871–876.
9. *Lankester a C., Heemskerk B., Claas E., et al.* Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – 38, N. 11 – P. 1521–5.
10. *Lenaerts L., Naesens L.* Antiviral therapy for adenovirus infections // *Antiviral Res.* – 2006. – 71, N.2-3 SPEC. ISS. – P. 172–180.
11. *Lion T.* Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2014. – 27, N. 3 – P. 441–462.
12. *Liu P., Sharon A., Chu C.K.* Fluorinated nucleosides: Synthesis and biological implication // *J. Fluor. Chem.* – 2008. – 129, N. 9 – P. 743–766.
13. *Ljungman P., Ribaud P., Eyrich M., et al.* Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – 31, N. 6 – P. 481–486.
14. *Martinez-Aguado P., Serno-Gallego A., Marrugal-Lorenzo J.* Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies // *Drug Discov. Today.* – 2015. – 20, N. 15 – P. 1235–42.
15. *Martínez-Montero S., Fernández S., Sanghvi Y.S., et al.* Synthesis, evaluation of anti-HIV-1 and anti-HCV activity of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2012. – 20, N. 23 – P. 6885–93.
16. *Morfin F., Dupuis-Girod S., Mundweiler S., et al.* In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. // *Antivir. Ther.* – 2005. – 10, N. 2 – P. 225–9.



17. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – **65**, N. 1-2 – P. 55–63.

18. *Naesens L., Lenaerts L., Andrei G., et al.* Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – **49**, N. 3 – P. 1010–1016.

19. *Painter W., Robertson A., Trost L.C., et al.* First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – **56**, N. 5 – P. 2726–2734.

20. *Repetto G., del Peso A., Zurita J.L.* Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. // *Nat. Protoc.* – 2008. – **3**, N. 7 – P. 1125–1131.

21. *Toth K., Spencer J.F., Dhar D., et al.* Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – **105**, N. 20 – P. 7293–7.

22. *Walls T., Hawrami K., Ushiro-Lumb I., et al.* Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – **40**, N. 9 – P. 1244–9.

References:

1. Biliavska L.O., Povnitsia O.Yu., Shermolovich Yu.G., Gudz G.P., Nesterova N.V. Study of antiadenoviral activity of new fluorine-containing heterocyclic compounds // *Microbiology and biotechnology.* – 2014. – N.1 – P.19–26.

2. Nosach L.N., Diachenko N.S. Cytopathology of adenovirus infection. Naukova dumka. 1982.

3. European Collection of Animal Cell Cultures Catalog. Porton Down: Salisbury (UK) PHLS Centre of Applied Microbiology and Research, 1990.

4. Filler R., Saha R. Fluorine in medicinal chemistry: a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights. // *Future Med. Chem.* – 2009. – **1**, N.5 – P.777–791.

5. Kampmann B., Cubitt D., Walls T., et al. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. // *Br. J. Haematol.* – 2005. – **130**, N.4 – P.595–603.

6. Kang L., Kim E., Choi E.J., et al. Synthesis and conformation of novel 4'-fluorinated 5'-deoxythreosyl phosphonic acid nucleosides as antiviral agents // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2012. – **33**, N.12 – P.4007–4014.

7. Kinchington P.R., Romanowski E.G., Gordon Y.J. Prospects for adenovirus antivirals // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2005. – **55**, N.4 – P.424–429.

8. La Rosa a M., Champlin R.E., Mirza N., et al. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. // *Clin. Infect. Dis.* – 2001. – **32**, N.6 – P.871–876.

9. Lankester a C., Heemskerk B., Claas E., et al. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. // *Clin. Infect. Dis.* – 2004. – **38**, N.11 – P.1521–5.



10. Lenaerts L., Naesens L. Antiviral therapy for adenovirus infections // *Antiviral Res.* – 2006. – **71**, N.2-3 SPEC. ISS. – P.172–180.
11. Lion T. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2014. – **27**, N.3 – P.441–462.
12. Liu P., Sharon A., Chu C.K. Fluorinated nucleosides: Synthesis and biological implication // *J. Fluor. Chem.* – 2008. – **129**, N.9 – P.743–766.
13. Ljungman P., Ribaud P., Eyrich M., et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. // *Bone Marrow Transplant.* – 2003. – **31**, N.6 – P.481–486.
14. Martinez-Aguado P., Serno-Gallego A., Marrugal-Lorenzo J. Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies // *Drug Discov. Today.* – 2015. – **20**, N.15 – P.1235–42.
15. Martínez-Montero S., Fernández S., Sanghvi Y.S., et al. Synthesis, evaluation of anti-HIV-1 and anti-HCV activity of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides. // *Bioorg. Med. Chem.* – 2012. – **20**, N.23 – P.6885–93.
16. Morfin F., Dupuis-Girod S., Mundweiler S., et al. In vitro susceptibility of adenovirus to antiviral drugs is species-dependent. // *Antivir. Ther.* – 2005. – **10**, N.2 – P.225–9.
17. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – **65**, N.1-2 – P.55–63.
18. Naesens L., Lenaerts L., Andrei G., et al. Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – **49**, N.3 – P.1010–1016.
19. Painter W., Robertson A., Trost L.C., et al. First pharmacokinetic and safety study in humans of the novel lipid antiviral conjugate CMX001, a broad-spectrum oral drug active against double-stranded DNA viruses // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – **56**, N.5 – P.2726–2734.
20. Repetto G., del Peso A., Zurita J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. // *Nat. Protoc.* – 2008. – **3**, N.7 – P.1125–1131.
21. Toth K., Spencer J.F., Dhar D., et al. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – **105**, N.20 – P.7293–7.
22. Walls T., Hawrami K., Ushiro-Lumb I., et al. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – **40**, N.9 – P.1244–9.

Стаття надійшла до редакції 09.11.2016 р.



А.Г. Мерліч, Н.В. Ліманська

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082,
Україна, тел.: (0482) 68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ВИДІЛЕНИХ З РОСЛИННИХ ДЖЕРЕЛ УКРАЇНИ ТА ФРАНЦІЇ, ПРОТИ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

Мета. Дослідження антагоністичної активності бактерій *Lactobacillus plantarum*, ізольованих з рослинних джерел України та Франції проти фітопатогенних бактерій. **Методи.** Антагоністичну активність *L. plantarum* досліджено *in vitro* за допомогою методу агарових лунок та *in vivo* шляхом інокуляції експлантів моркви та зараження рослин каланхоє. **Результати.** Показано антагоністичну активність досліджених молочнокислих бактерій проти фітопатогенних бактерій як *in vitro*, так і *in vivo*. Встановлено, що у випадку всіх використаних тест-систем не спостерігалось значної залежності між рН культуральної рідини та рівнем антагоністичної активності. Найбільш активними антагоністами у більшості використаних тест-систем були ізоляти *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ313, ОНУ476, ОНУ312 і ОНУ12 з України та ОНУ352, ОНУ353 і ОНУ355 з Франції. **Висновки.** Рівень антагонізму *L. plantarum* проти фітопатогенів відрізнявся залежно від штаму лактобацил, його походження, штаму фітопатогена та використаної у роботі тест-системи.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, фітопатогенні бактерії, антагоністична активність.

Фітопатогенні бактерії постійно супроводжують як культурні, так і дикі види рослин. За сприятливих умов вони уражують насіння та всі органи рослин протягом вегетації, погіршують якість та знижують обсяг продукції, що призводить до значних економічних збитків сільському господарству. Пестициди, насамперед фунгіциди, порушують екологічну рівновагу між бактеріальною та грибною мікробіотою. Результатом цього є загострення проблеми бактеріозів сільськогосподарських культур [1]. З літературних джерел відомо про високу антагоністичну активність молочнокислих бактерій (МКБ) проти фітопатогенних бактерій. Так, в роботі Visser та ін., 1986, було показано антагоністичну активність різних молочнокислих бактерій, виділених з рослинних поверхонь, до тест-штамів фітопатогенів *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* та *Pseudomonas syringae*. Авторами було показано ефективне пригнічення *in vitro* на щільних поживних середовищах та в бульйонних культурах [11]. Застосу-



вання хімікатів та бактерицидів у сільському господарстві, так само, як і забруднення навколишнього середовища, можна було би уникнути за допомогою МКБ, і тому вони є перспективними стимуляторами росту рослин бактеріями та агентами біоконтролю [7].

Метою роботи було дослідити антагоністичну активність бактерій *L. plantarum*, ізольованих з рослинних джерел України та Франції проти фітопатогенних бактерій.

Матеріали і методи

Для дослідження антагоністичної активності використано 25 штамів молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum*, виділених з рослинного матеріалу України та Франції, та два колекційних штами. Для культивування використовували середовище MRS, в якому бактерії вирощували при температурі 37 °С. Як індикатори застосовували штами фітопатогенних бактерій: *Rhizobium radiobacter* C58, *R. vitis* MR1, *R. vitis* UA6, *R. vitis* 379, *R. rhizogenes* 15834, *Erwinia carotovora* ZM1, люб'язно надані доктором біологічних наук Ф.І. Товкачем, та *Ralstonia solanacearum* B-1109-УКМ з колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Штами фітопатогенів перед експериментом інкубували в рідкому середовищі NB (nutrient broth, HIMEDIA) при 28 °С впродовж доби.

Антагоністичну активність лактобактерій *in vitro* вивчали методом агарових лунок згідно з *Sumathi* та ін., 2010 з деякими модифікаціями. Добові культури лактобактерій нейтралізували 1М NaOH та фільтрували крізь фільтр з діаметром пор 0,20 мкм (Minisart, sartorius stedim biotech, Германия). Для приготування газонів до 20 мл NB агару додавали добові культури фітопатогенів. Після застигання агару в ньому робили лунки діаметром 8 мм, які заповнювали фільтратом культур лактобактерій. Посіви інкубували при 28 °С впродовж доби та вимірювали радіус зон відсутності росту [8]. Дослідження було виконано у 5 повторях.

Для вивчення антагоністичної активності *in vivo* на експлантах моркви (*Daucus carota* L.) коренеплоди відмивали від залишків ґрунту за допомогою миючого засобу в воді з водогону, обробляли 1% розчином дезінфектанту "Білизна", після чого ретельно промивали під проточною водою. У стерильних умовах знімали верхній шар коренеплоду, фламбували за допомогою 96% етилового спирту на нарізали на диски. Диски викладали у чашки Петрі з шаром фільтрувального паперу апікальною стороною вгору. Далі на кожен диск, в районі камбіального кільця, наносили спочатку 100 мкл добових культур *L. plantarum*, потім 100 мкл добових культур фітопатогенів *Rhizobium radiobacter* C58 або *Erwinia carotovora* ZM1. За контролю слугували диски з нанесеними середовищами NB та MRS та диски, оброблені MRS та фітопатогенами. Через 14–21 день експланти моркви обстежували на наявність пухлин та гнилей, оцінювали відсоток ураження та, відповідно, обраховували відсоток пригнічення фітопатогенів лактобацилами.



Крім того, для вивчення антагоністичної активності лактобацил *in vivo* проводили зараження рослин *Kalanchoe daigremontiana* Mill. Для цього суміш нічних культур штамів *L. plantarum* та *R. radiobacter* C58 (1:1) було введено у верхні тканини листків та стебел у кількості 30 уколів на рослину. Культура *R. radiobacter* з еквівалентним об'ємом середовища MRS та без середовища були введені як позитивні контролю. Рахували кількість утворених пухлин на пагонах і листі рослин та визначали відсоток інгібування фітопатогена, порівнюючи кількість пухлин з кількістю нанесених уколів [5].

Результати та їх обговорення

У дослідженні антагоністичної активності методом агарових лунок були використані 25 ізолятів *L. plantarum*, виділених з рослинного матеріалу України (У) та Франції (Ф), та два контрольні штами з колекції Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України – *L. plantarum* В-2694 та *L. plantarum* В-2709. Досліджені ізоляти *L. plantarum* проявили антагоністичну активність проти усіх тест-штамів фітопатогенних бактерій. Висока антагоністична активність *L. plantarum* узгоджується з даними Василюк та ін., 2014, згідно з якими при дослідженні антагоністичної активності штамів *L. plantarum* показано, що майже усі вони різною мірою проявляли антагоністичну дію [2]. Антагоністична активність в нашому дослідженні також була різною та залежала від ізоляту МКБ та від штаму фітопатогена.

Усі досліджені ізоляти *L. plantarum* проявили антагоністичну активність проти *R. radiobacter* C58 (рис. 1). Ці данні також узгоджуються з Василюк та ін., 2014, згідно з якими більше 90% штамів виявили пригнічувальну дію щодо даного виду фітопатогена [2]. Найбільшу активність проти цього тест-штаму проявили 6 ізолятів *L. plantarum* (22,2% від загальної кількості): ОНУ12, ОНУ311, ОНУ313 (У) та ізоляти *L. plantarum* ОНУ352, ОНУ353, ОНУ355 (Ф). Ці ізоляти утворювали зони затримки росту з радіусами від 8 до 9 мм. Решта ізолятів проявили антагоністичну активність більш низького рівня з радіусами зон інгібування 4,5–7 мм (рис. 1). Найнижчу антагоністичну активність проти цього штаму фітопатогена проявили три ізоляти *L. plantarum* – ОНУ357, ОНУ365 та ОНУ471. Ці ізоляти утворювали зони пригнічення з радіусом 4,5 мм. Цікаво, що антагоністична активність, яка відрізнялася за своїм рівнем в залежності від ізоляту лактобацил, не залежала в значній мірі від рівня рН. Так, фільтрат ізоляту *L. plantarum* ОНУ12, який утворював зони пригнічення росту фітопатогена з радіусом 9 мм, показав значення рН 3,9, тоді як рН такого ж рівня було характерним для фільтратів ізолятів *L. plantarum* ОНУ471, ОНУ365, які утворювали зони пригнічення з радіусом 4,5 мм та показали найнижчий антагонізм порівняно з рештою перевірених в дослідженні штамів. Це може вказувати на те, що дані ізоляти лактобацил, крім органічних кислот, продукують інші антагоністичні сполуки, такі, наприклад, як перекис водню або бактеріоцини. Антагоністичну активність *L. plantarum* проти фітопатогена



R. radiobacter C58 при перевірці методом агарових лунок було показано також у роботі Limanska та ін., 2014 [4].

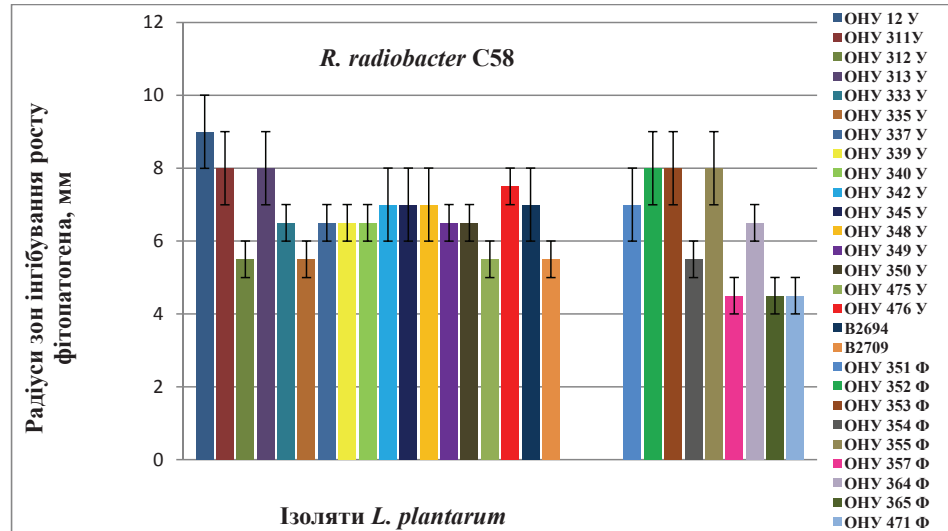


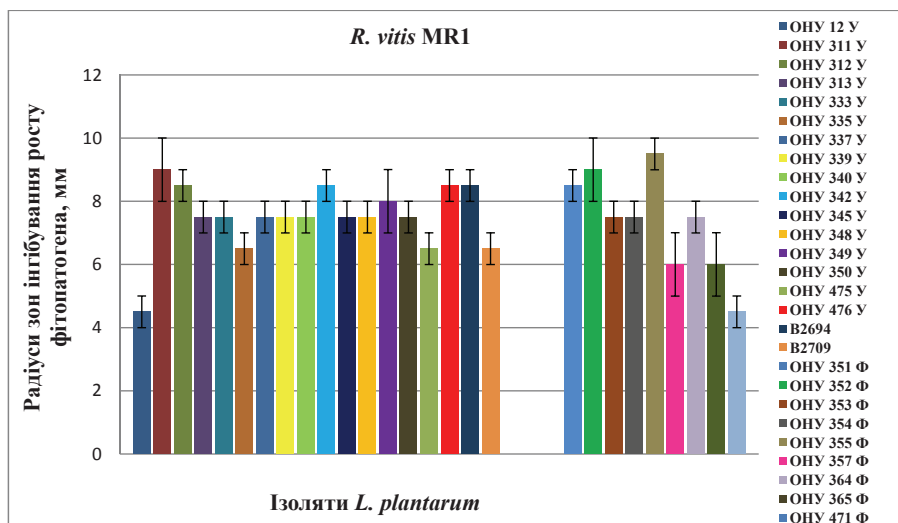
Рис. 1. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. radiobacter* C58

Fig. 1. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against the phytopathogen *R. radiobacter* C58

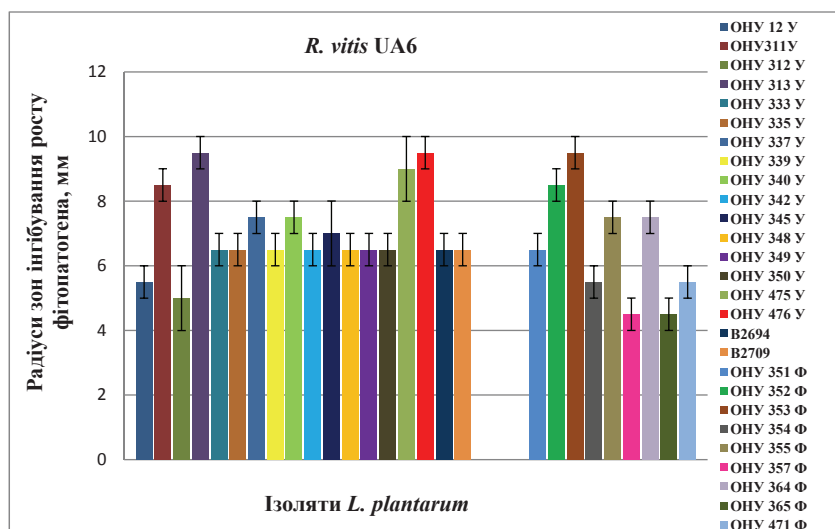
Крім *R. radiobacter*, в нашому дослідженні МКБ ефективно пригнічували ріст штамів *R. vitis* та *R. rhizogenes* (рис. 2–5). Нами було перевірено антагоністичну активність ізолятів МКБ проти трьох штамів *R. vitis* – MR1, UA6 та 379. Фітопатогенна бактерія *R. vitis* викликає захворювання корончатих галів на винограді [5]. Найбільшу активність проти *R. vitis* MR1 проявили ізоляти *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ312, ОНУ342, ОНУ476 (У), колекційний штам В2694, а також ізоляти ОНУ351, ОНУ352 та ОНУ355 (Ф), які утворювали радіуси зон інгібування росту фітопатогена від 8,5 до 9,5 мм (рис. 2). Ізоляти з найбільшою антагоністичною активністю склали 29,6% від загальної кількості лактобактерій. Решта ізолятів (70,3%) проявили більш низький рівень антагонізму та утворювали зони інгібування з радіусами 4,5–8 мм. Найменшу антагоністичну активність проти цього фітопатогена показали два ізоляти *L. plantarum* – ОНУ12(У) та ОНУ471 (Ф). Рівень антагоністичної активності проти цього штаму фітопатогенних бактерій також не залежав від рН фільтратів. Так, рН фільтрату *L. plantarum* ОНУ12 складав 3,9, приблизно такі ж значення рН були характерними для ізолятів з найвищим рівнем антагоністичної активності.

Фітопатогенну бактерію *R. vitis* UA6 найбільш активно пригнічували 6 ізолятів *L. plantarum*: ОНУ311, ОНУ313, ОНУ475, ОНУ476 (У), та ОНУ352, ОНУ353 (Ф) (рис. 3). Ці ізоляти утворювали зони відсутності росту з радіусами 8,5–9,5 мм та склали 22,2% від загальної кількості перевірених *L. plantarum*.



Рис. 2. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти *R. vitis* MR1Fig. 2. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against *R. vitis* MR1

Решта 77,7% ізолятів проявила менш виражений антагонізм проти даного штаму фітопатогенних бактерій, утворюючи зони відсутності росту з радіусами 4,5–7,5 мм. Найменшу антагоністичну активність з радіусами зон пригнічення росту фітопатогена 4,5–5,5 мм показали ізоляти *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ312, ОНУ354, ОНУ357, ОНУ365 та ОНУ471. Як і проти двох попередньо описаних штамів ризобій, рівень антагоністичної активності проти *R. vitis* UA6 не залежав від рН отриманих фільтратів.

Рис. 3. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. vitis* UA6Fig. 3. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against the phytopathogen *R. vitis* UA6

Проти штаму *R. vitis* 379 найбільшу антагоністичну активність показали ізоляти *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, ОНУ312, ОНУ313, ОНУ476 (У) та ОНУ352, ОНУ353, ОНУ355 (Ф) (рис. 4). Ці 8 ізолятів (29,6%) утворювали зони інгібування росту *R. vitis* 379 з радіусами 7,5–10,5 мм. Ізолят *L. plantarum* ОНУ12 проявив також високий рівень антагонізму проти *R. radiobacter* C58, *L. plantarum* ОНУ311 – проти *R. vitis* UA6, MR1 та *R. radiobacter* C58, *L. plantarum* ОНУ312 – проти *R. vitis* MR1, *L. plantarum* ОНУ313 – проти *R. vitis* UA6 та *R. radiobacter* C58. Ізоляти *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ476 та ОНУ352 проявили високу антагоністичну активність проти всіх трьох тест-штамів *R. vitis*: 379, UA6 та MR1.

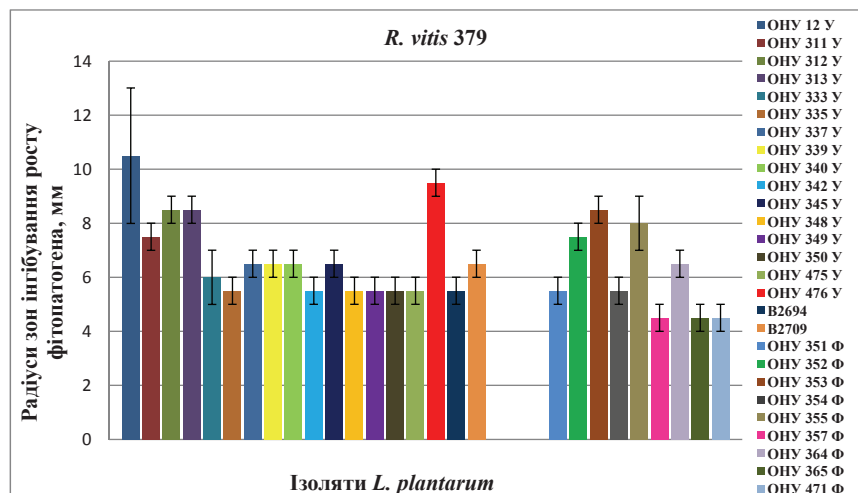


Рис. 4. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. vitis* 379

Fig. 4. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against the phytopathogen *R. vitis* 379

Решта ізолятів проявили більш низький рівень антагоністичної активності проти *R. vitis* 379 з зонами пригнічення росту фітопатогена 4,5–6,5 мм. Найменша активність проти цього штаму фітопатогена була характерною для ізолятів *L. plantarum* ОНУ357, ОНУ365 та ОНУ471, які утворювали зони пригнічення з радіусом 4,5 мм. Ці три ізоляти проявили також найнижчу активність проти штаму фітопатогена *R. vitis* UA6. Ізоляти *L. plantarum* ОНУ357, ОНУ365, та ОНУ471 були ізолятами з найнижчою антагоністичною активністю також проти *R. radiobacter* C58.

Патогенні ризобії *R. rhizogenes* викликають тканинну проліферацію рослин у вигляді волосяного кореня [5]. Проти *R. rhizogenes* 15834 найбільший антагонізм проявили ізоляти *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, ОНУ312, ОНУ313, ОНУ476 (У), референс-штам B2709, а також ізоляти ОНУ352, ОНУ353 та ОНУ355 (Ф) (рис. 5). Ізоляти з найбільшою антагоністичною активністю склали 33,3% від загальної кількості використаних в дослідженні *L. plantarum* та



утворювали зони пригнічення росту фітопатогена з радіусами 7,5–10 мм. Решта ізолятів проявляла більш низьку антагоністичну активність та утворювала зони пригнічення 4,5–6,5. Найнижчу антагоністичну активність проти тест-штаму *R. rhizogenes* 15834 проявили 4 ізоляти *L. plantarum*: ОНУ351, ОНУ357, ОНУ365 та колекційний штам В2694. Ці ізоляти утворювали зони пригнічення фітопатогена з радіусом 4,5 мм.

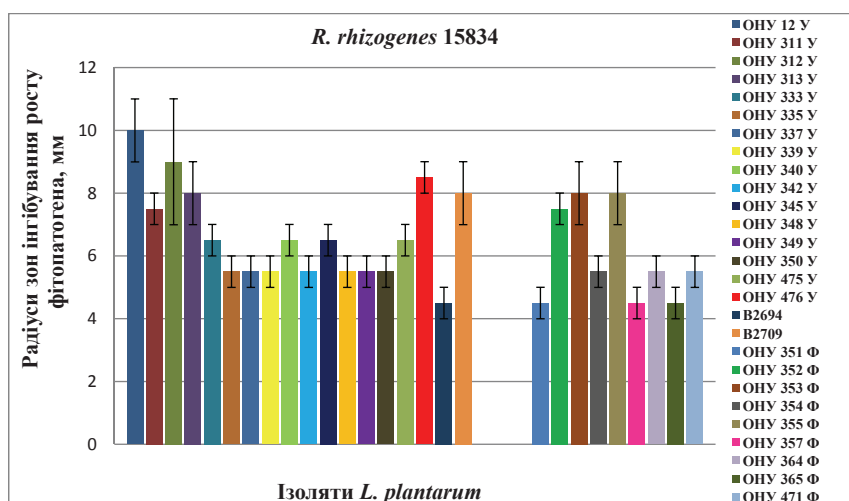


Рис. 5. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. rhizogenes* 15834

Fig. 5. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against the phytopathogen *R. rhizogenes* 15834

Найбільш активними антагоністами проти *E. carotovora* були ізоляти *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ312, ОНУ313, ОНУ476 (У), колекційний штам В2709, а також ізоляти ОНУ352, ОНУ353, ОНУ355 та ОНУ364 (Ф) (рис. 6). Ці ізоляти (33,3% від загальної кількості) утворювали зони пригнічення фітопатогена з радіусами 7,5–8,5 мм. Отримані результати узгоджуються з даними Mounesh та ін., 2013, де антибактеріальна активність ізолятів МКБ проти *E. carotovora* subsp. *carotovora* була протестована методом агарових лунок, та з 40 ізолятів 8 показали значні зони інгібування росту [6]. Visser та ін., 1992, показали високу чутливість *E. carotovora* до молочнокислих бактерій, коли навіть при конкуренції з патогенами, за умов, повністю сприятливих для останніх, молочнокислі бактерії ефективно пригнічували фітопатогени [10]. Антагоністична активність лактобактерій проти *E. carotovora* *in vitro* показана також в роботі Trias та ін., 2008, де відмічено, що продукування перекису водню було ефективним проти цієї бактерії [9], а також в роботах Василюк та ін., 2014 [2].

Решта ізолятів *L. plantarum* (66,6%) в наших експериментах проявили більш низьку антагоністичну активність з радіусами зон пригнічення 4,5–6,5 мм. *R. solanacearum* – небезпечний фітопатоген, який є карантинним об'єктом із високим ризиком поширення та занесення на нові території [3].

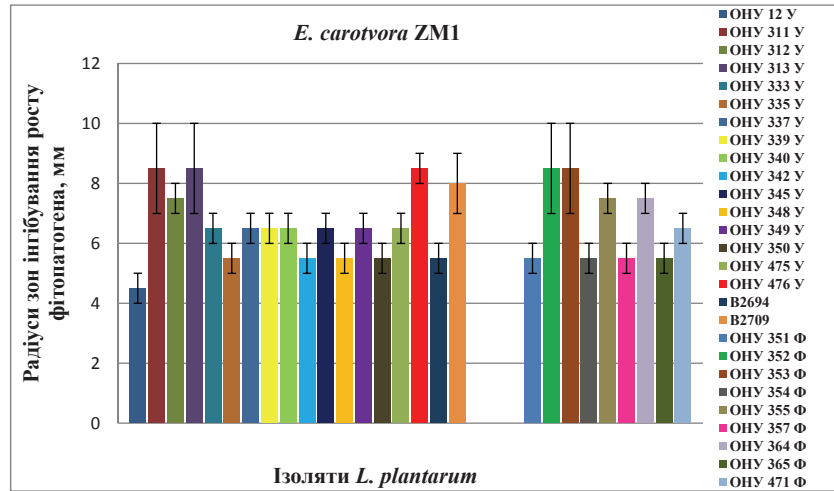


Рис. 6. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *E. carotovora* ZM1

Fig. 6. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against the phytopathogen *E. carotovora* ZM1

В нашому дослідженні проти штаму фітопатогена *R. solanacearum* B-1109 UCM найбільшу активність проявили ізоляти *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ313 (У), референс-штам В2709, та ОНУ352, ОНУ353, ОНУ364 (Ф) (рис. 7). Радіуси зон пригнічення склали 9–10 мм (рис. 7).

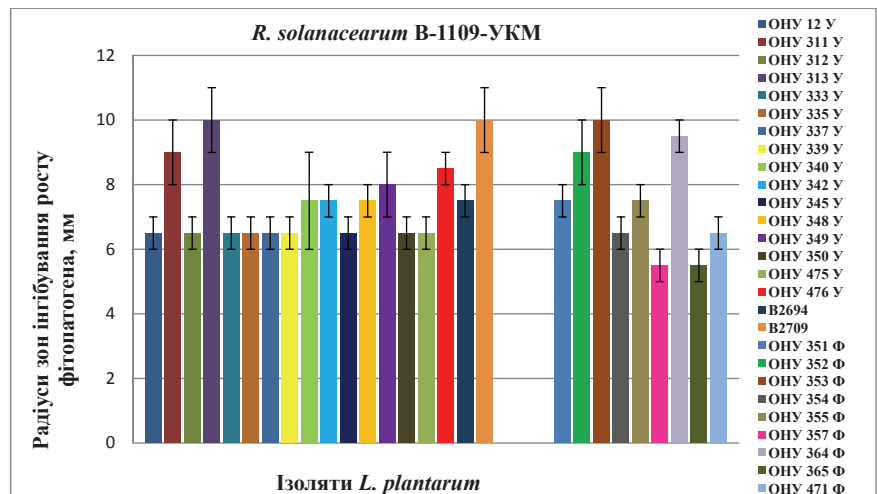


Fig. 7. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolates against the phytopathogen *R. solanacearum* B-1109-UCM

Решта ізолятів показали більш високе пригнічення порівняно з іншими індикаторами фітопатогенів, використаних в роботі, утворюючи зони інгібування *R. solanacearum* 5,5–8,5 мм. Два ізоляти *L. plantarum* ОНУ 357 та ОНУ365



були найменш активні проти даного індикатору, утворюючи зони пригнічення з радіусом 5,5 мм.

У більшості випадків ізоляти лактобацил з Франції продемонстрували більш високу антагоністичну активність, ніж ізоляти з України, проти фітопатогенів при дослідженні методом агарових лунок (табл. 1).

Таблиця 1

Частка (%) штамів *L. plantarum* з високою антагоністичною активністю проти фітопатогенів (метод агарових лунок)

Table 1

The number of *L. plantarum* isolates with high antagonistic activity against phytopathogens tested by agar well diffusion assay

Походження ізоляту	Кількість ізолятів	Частка штамів з високою антагоністичною активністю, %						
		C58	MR1	UA6	379	15834	ZM1	B1109УКМ
Україна	16	18,7	25,0	25,0	31,2	31,2	25,0	18,7
Франція	9	33,3	33,3	22,2	33,3	33,3	44,4	33,3

Примітка: C58 – *Rhizobium radiobacter* C58, MR1 – *Rhizobium radiobacter*, UA6 – *Rhizobium radiobacter*, 379 – *R. vitis*, 15834 – *R. rhizogenes*, ZM1 – *Erwinia carotovora*, B-1109-УКМ – *Ralstonia solanacearum*.

Найбільшу активність проти *R. radiobacter* C58 на експлантах моркви зі 100% інгібування фітопатогена проявили *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, ОНУ313, ОНУ337 (У) та ОНУ355, ОНУ356 (Ф) (рис. 8).

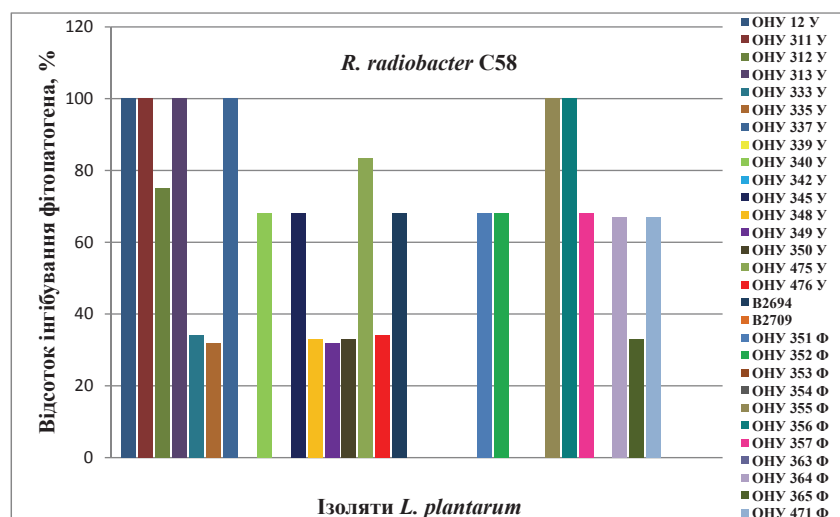


Рис. 8. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. radiobacter* C58 на експлантах моркви

Fig. 8. Antagonistic activity of isolates of *L. plantarum* against the phytopathogen *R. radiobacter* C58 on carrot explants



Ці дані узгоджуються з результатами *Limanska* та ін., 2015, згідно з якими МКБ зменшували кількість експлантів моркви з галами та інтенсивність проявів захворювання [5]. Результати високої антагоністичної активності на експлантах моркви ізолятів *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, ОНУ313 та ОНУ355 співпадають з високою активністю цих штамів, перевіреною методом агарових лунок. Ізоляти з високою антагоністичною активністю (100% пригнічення) склали 20,6% від загальної кількості перевірених штамів *L. plantarum*. Середню активність (від 67 до 83,5% пригнічення) продемонстрували 10 ізолятів (34,4%), тоді як низьке пригнічення фітопатогена (32–34%) було характерним для 7 (24,1%) ізолятів *L. plantarum*. Решта ізолятів лактобацил (20,6%) не виявили антагоністичної активності проти *R. radiobacter* C58 на експлантах моркви.

Проти *E. carotovora* ZM1 на експлантах моркви найвищу антагоністичну активність продемонстрували 11 ізолятів (37,9%) *L. plantarum*: ОНУ12, ОНУ312, ОНУ313, ОНУ333, ОНУ335, ОНУ337, ОНУ340, ОНУ349 (У), ОНУ356, ОНУ357, ОНУ365 (Ф) (рис. 9). Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* ОНУ312 та ОНУ313 узгоджується з результатами перевірки методом агарових лунок.

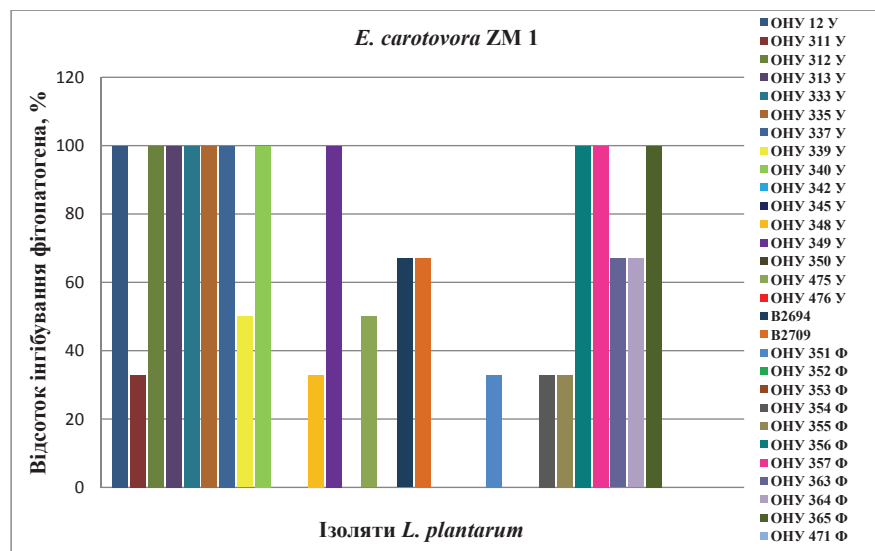


Рис. 9. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *E. carotovora* ZM1 на експлантах моркви

Fig. 9. Antagonistic activity of isolates of *L. plantarum* against the phytopathogen *E. carotovora* ZM1 on carrot explants

Серед решти використаних в роботі *L. plantarum*, 6 ізолятів (20,6%) показали середню активність проти цього фітопатогена (50–67% пригнічення).

Сумісне зараження рослин каланхое сумішню ізолятів *L. plantarum* з фітопатогеном *R. radiobacter* C58 показало значне пригнічення проявів симптомів захворювання (рис. 10). Симптомами захворювання корончатих галів, що ви-



кликається *R. radiobacter*; є утворення пухлин на стеблах та коренях інфікованих рослин, що призводить до дефіциту постачання поживних речовин та води [5]. Найбільшу активність проти цього фітопатогена виявили у ізолятів *L. plantarum* ОНУ12, ОНУ311, ОНУ313, ОНУ333, ОНУ335, ОНУ339 (У), В2694, В2709, ОНУ351, ОНУ354, ОНУ355, ОНУ357, ОНУ364, ОНУ365, ОНУ471 (Ф). Ці ізоляти повністю пригнічували фітопатоген та склали 51,7% від загальної кількості використаних в роботі *L. plantarum*.

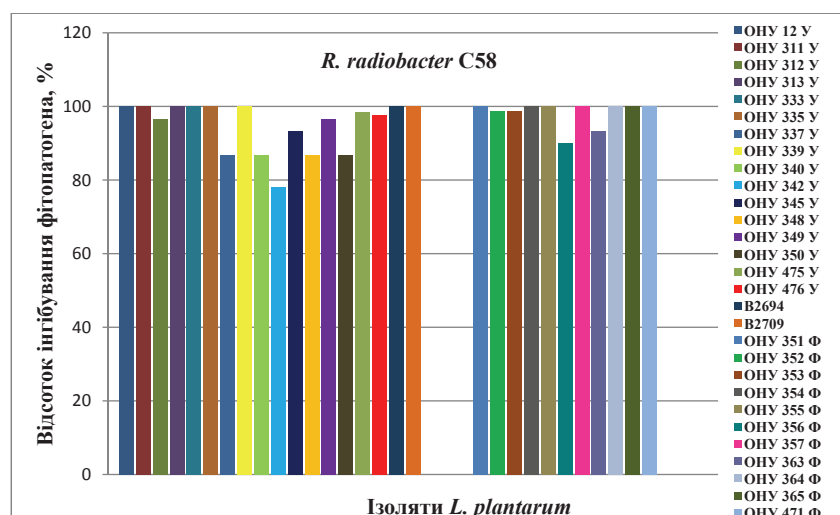


Рис. 10. Антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. radiobacter* C58 на моделі *K. daigremontiana* Mill

Fig. 10. Antagonistic activity of *L. plantarum* isolated against the phytopathogen *R. radiobacter* C58 on the model of *Kalanchoe daigremontiana* Mill

Висока антагоністична активність *L. plantarum* проти *R. radiobacter* C58 *in vivo* на каланхое узгоджується з результатами Limanska та ін., 2015. Решта ізолятів лактобацил в нашому дослідженні продемонстрували більш низький рівень пригнічення фітопатогена від 78% (*L. plantarum* ОНУ342) до 98,8% (*L. plantarum* ОНУ352, ОНУ353). Ці дані узгоджуються з результатами роботи Limanska та ін., 2014, де за одночасного введення культур лактобацил та їх метаболітів та інокуляції *K. daigremontiana* фітопатогеном *R. radiobacter* C58, утворення пухлин інгібувалося у більшості варіантів обробки [4]. При порівнянні антагоністичної активності та рН фільтратів ізолятів лактобацил не було виявлено певної залежності, що узгоджується з роботою Limanska та ін., 2015, в якій при однаковому рН різні штами також показали різні рівні пригнічення *in vivo* [5].

Загалом, ізоляти *L. plantarum*, виділені в Україні, показали більш високий антагонізм проти вибраних тест-штамів фітопатогенних бактерій на експлантах моркви (табл. 2). Так, 25% ізолятів з України повністю пригнічували *R. radiobacter* та 50% інгібували 100% *E. carotovora*, тоді як 18,1% та 27,2% ізолятів з такими властивостями зустрічались серед штамів, виділених у Франції.

**Частка штамів *L. plantarum*, що викликали
повне інгібування фітопатогенів на каланхое та на експлантах моркви**

Table 2

**The number of *L. plantarum* isolates caused
the complete inhibition of phytopathogens on kalanchoe and carrot explants**

Походження ізоляту	Кількість ізолятів	Частка штамів з високою антагоністичною активністю, %		
		на експлантах моркви		на каланхое
		C58	ZM1	C58
Україна	16	25,0	50,0	37,5
Франція	11	18,1	27,2	63,6

Примітка: C58 – *Rhizobium radiobacter* C58; ZM1 – *Erwinia carotovora*.

При перевірці антагонізму *in vivo* на каланхое, навпаки, більша кількість ізолятів із Франції (63,6%) проявили 100% пригнічення фітопатогена *R. radiobacter* порівняно з ізолятами з України (37,5%). Ці результати можуть вказувати на те, що рівень антагоністичної активності молочнокислих бактерій може залежати як від походження ізолятів, так і від використаної в роботі тест-системи для перевірки антагонізму.

Отже, усі досліджені штами *L. plantarum* проявили антагоністичну активність проти фітопатогенних бактерій при перевірці методом агарових лунок, але рівень антагонізму відрізнявся в залежності від ізоляту лактобацил, його походження, штаму фітопатогена та використаної в роботі тест-системи. За використання всіх тест-систем не спостерігали значної залежності між рН фільтратів та рівнем антагоністичної активності. Найбільш активними антагоністами у більшості використаних тест-систем були ізоляти *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ313, ОНУ476, ОНУ312 і ОНУ12 з України та ОНУ352, ОНУ353 і ОНУ355 з Франції.

Планується проведення подальших досліджень для виявлення хімічної природи антагоністичних речовин та механізму пригнічення фітопатогенних бактерій найбільш активними штамами лактобацил.



А.Г. Мерлич, Н.В. Лиманская

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: (0482) 68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛЯТОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ УКРАИНЫ И ФРАНЦИИ, ПРОТИВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Цель. Исследование антагонистической активности изолятов *L. plantarum* из разных географических регионов против фитопатогенных бактерий и отбор наиболее активных изолятов для разработки биологических препаратов для защиты растений. *Методы.* Антагонистическая активность *L. plantarum* была исследована *in vitro* при помощи метода агаровых лунок и *in vivo* путем инокуляции эксплантов моркови и заражения растений каланхое. *Результаты.* Показана антагонистическая активность исследованных молочнокислых бактерий против фитопатогенов как *in vitro*, так и *in vivo*. Установлено, что в случае всех использованных тест-систем не наблюдалось значительной зависимости между рН культуральной жидкости и уровнем антагонистической активности. *Выводы.* Уровень антагонизма *L. plantarum* против фитопатогенов отличался в зависимости от изолята лактобацилл, его происхождения, штамма фитопатогена и использованной в работе тест-системы. Наиболее активными антагонистами в большинстве использованных тест-систем были изоляты *L. plantarum* ОНУ311, ОНУ313, ОНУ476, ОНУ312 и ОНУ12 из Украины и ОНУ352, ОНУ353 и ОНУ355 из Франции.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, фитопатогенные бактерии, антагонистическая активность.

A.G. Merlich, N.V. Limanska

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, tel.: (0482) 68 79 64; e-mail: andriymerlich@gmail.com

ANTAGONISTIC ACTIVITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*, ISOLATED FROM PLANT SOURCES OF UKRAINE AND FRANCE, AGAINST PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

Summary

Aim. Study of antagonistic activity of *L. plantarum* isolates from different geographical regions against phytopathogenic bacteria and selection of the most active isolates for development of biological preparations for plant protection. *Methods.* Antagonistic activity of *L. plantarum* was studied *in vitro* by agar well diffusion assay, and *in vivo* by inoculation of carrot explants and infection of kalanchoe plants. *Results.* Antagonistic activity of the studied lactic acid bacteria against phytopathogens was found



both *in vitro* and *in vivo*. No relation was found in pH of cultural liquid and level of antagonistic activity in case of all test-systems. **Conclusion.** The level of antagonism of *L. plantarum* against phytopathogens varied depending on the isolate of lactobacilli, its origin, strain of phytopathogen and test-system. The most active antagonists in the majority of used test-systems were the isolates *L. plantarum* ONU311, ONU313, ONU476, ONU312 and ONU12 from Ukraine and ONU352, ONU353 and ONU355 from France.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, phytopathogenic bacteria, antagonistic activity.

Список використаної літератури

Булеца Н.М., Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Патица В.П. Чутливість фітопатогенних бактерій до стрептоміцину за дії пестицидів // Мікробіологічний журнал. – 2015. – т. 77, №6. – С. 62 – 69.

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.

Грицай Р.В., Броварська О.С., Житкевич Н.В., Варбанець Л.Д. Серологічна характеристика ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* // Мікробіологічний журнал. – 2012. – т. 74, №5. – С. 16–21.

Limanska N.V., Korotaeva N.V., Yamborko G.V., Ivanytsia V.O. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* // Microbiology and Biotechnology. – 2014. – №1. – P. 8–18.

Limanska N., Korotaeva N., Biscola V., Ivanytsia T., Merlich A., Franco B.D.G.M., Chobert J.M., Ivanytsia V., Haertle T. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Pathology and Microbiology. – 2015. – Vol. 6, №8: doi: 10.4172/2157-7471.1000292

Mounesh N.V., Santhosh G.P., Mahadevaswamy and Vendan K.T. Antagonism of lactic acid bacteria against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from rhizosphere, plant and fruits of tomato // National seminar on Probiotics in Sustainable Food Production: Current Status and Future Prospects. – 2013. – P. 355–363.

Murthy K. N., 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. – №1, V. 18. – P. 60–65.

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(4). – P. 802–808.

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.

Visser R., Holzapfel W. H. Lactic Acid Bacteria in the Control of Plant Pathogens. The Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria in Health & Disease. – London and New York: Elsevier Applied Science, 1992. – Vol. 1. – 193–210 p.



Visser R., Holzapfel 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.

References

Buleca NM, Bucenko LM, Pasichnyk LA, Patyka VP Sensitivity of phytopathogenic bacteria to streptomycin under the action of pesticides. *Journal of Microbiology*. 2015, 77, 6, 62 – 69 (In Ukrainian).

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, 3, 24 – 30 (In Ukrainian).

Grycai RV, Brovarska OS, Zhytkevych NV, Varbanets LD Serological characteristic of lipopolysaccharides of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Microbiology*. 2012, 74, 5, 16 – 21 (In Ukrainian).

Limanska NV, Korotaeva NV, Yamborko GV, Ivanytsia VO Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter*. *Microbiology and Biotechnology*. 2014, 1, 8 – 18.

Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A, Franco BDGM, Chobert GM, Ivanytsia V, Haertlé T. Study of potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Pathology & Microbiology*. 2015, 6, 8: doi: 10.4172/2157-7471.1000292.

Mounesh NV, Santhosh GP, Mahadevaswamy, Vendan KT Antagonism of lactic acid bacteria against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from rhizosphere, plant and fruits of tomato. *National seminar on Probiotics in Sustainable Food Production: Current Status and Future Prospects*. 2013, 355 – 363.

Murthy KN, Malini M, Savitha J, Srinivas C Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *Pest Menagement in Horticultural Ecosystems*. 2012, 1, 18, 60 – 65.

Sumathi V, Reetha D Screening of Lactic Acid Bacteria for their Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2012, 3(4), 802 – 808.

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.

Visser R, Holzapfel WH Lactic Acid Bacteria in the Control of Plant Pathogens. *Elsevier Applied Science*. 1992, 1, 193 – 210.

Visser R, Holzapfel WH, Bezuidenhout JJ, Kotzé JM Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986, 52, 3, 552 – 555.

Стаття надійшла до редакції 07.12.2016 р.



УДК 579.62+578.76

О.О. Нечипуренко, Д.В. Древаль, Д.Д. Провозін, І.О. Собко

ООО «Центр Ветеринарної Діагностики»,
вул. Академіка Лебедева 1, Київ, Україна, 03143
тел.: 067 413 29 17, e-mail: histology@cvd.com.ua

АДЕНОВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ, ЯК ОДНА З МОЖЛИВИХ ПРИЧИН ЖИРОВОГО ГЕПАТОЗУ У ОДНОДЕННИХ КУРЧАТ

Мета. Дослідити причетність аденовірусної інфекції до розвитку жирової дистрофії печінки у одноденних курчат. **Методи.** Стан внутрішніх органів птиці оцінювали за результатами патологоанатомічного розтину, кількість вітаміну А у печінці курчат визначали фотоколориметрично. Оцінку мікроскопічних змін у внутрішніх органах та наявність специфічних для аденовірусної інфекції ознак встановлювали з використанням гістологічного дослідження. Фарбування тканин здійснювали за стандартною методикою розчинами еозину та гематоксиліну. **Результати.** У печінці 23-х одноденних курчат виявлено жирову дистрофію гепатоцитів. Кількість вітаміну А у печінці досліджуваних зразків коливалася у межах 10,0–20,4 мкг/г. Наявність бактеріальної інфекції у батьківського поголів'я пояснює факт, що у 22 % досліджуваних курчат виділено *E. coli*. За результатами гістологічного аналізу у печінці та нирках батьківського стада курей виявлено внутрішньоядерні базофільні тільця-включення, що свідчить про інфікування птиці аденовірусом та можливість його трансваріальної передачі. **Висновки.** Інфікування батьківського стада аденовірусною інфекцією, незважаючи на збалансованість раціону за вітамінами, спричинює жирову дистрофію гепатоцитів та зниження концентрації вітаміну А у печінці одноденних курчат у 1,4–2,8 рази порівняно з нормою.

Ключові слова: жирова дистрофія гепатоцитів, вітамін А, аденовірусна інфекція.

Жировий гепатоз у добових курчат є розповсюдженою проблемою серед багатьох господарств України. Головними причинами цієї патології вважають порушення температурного режиму під час інкубації (перегрів), нестачу вітаміну А, біотину, незбалансованість раціону батьківського поголів'я за поживними речовинами (ліпідами, вуглеводами, протеїнами), вплив мікотоксинів та неорганічних гепатотоксинів [1]. Однак, зазвичай не враховують причетність інфекційних патологій батьківського поголів'я, а саме, ураження аденовірусами [2, 3].

Аденовіруси є поширеними інфекційними агентами у птахівництві. Вони здатні реплікуватися у епітеліальних клітинах організму, не викликаючи помітних клінічних ознак, і можуть слугувати вторинними чинниками патологіч-



ного стану [1]. В той же час, деякі аденовіруси, наприклад, вірус геморагічного ентериту індиків та бронхіту перепелів викликають летальні захворювання [4].

Розрізняють три роди аденовірусів (*Aviadenovirus*, *Siadenovirus*, *Atadenovirus*), серед яких саме віруси з першої групи спричиняють інклюзійний гепатит (синдром жирового переродження печінки), гідроперикардит, ерозії у шлунку й до того ж здатні передаватися трансваріально [1, 3, 5].

З огляду на вищевикладене, метою роботи було встановити причетність аденовірусної інфекції до розвитку синдрому жирового переродження печінки у одноденних курчат.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були одноденні курчата кросу «Н&N Браун Нік» (n=23) та клінічно-здорові птиці з батьківського поголів'я віком 300–360 днів (n = 6), яких було отримано з однієї з птахофабрик Київської області.

Аналіз патолого-морфологічного стану, відібраних для дослідження тварин, проводили у лабораторії патанатомії ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики». Для цього здійснювали евтаназію птиці хлороформом, розтин трупів, опис та фотографування патологічних змін органів.

З печінки, жовткового мішка одноденних курчат та печінки, серця, селезінки курей віком 300–360 днів, попередньо знезаразивши поверхню органів розжареним шпателем, у асептичних умовах, висівали зразки у триптон-соевий бульйон (HiMedia, Індія) і культивували за температури 37 °C упродовж 18–24 години. Бактерії з бульйону пересівали на диференційно-діагностичні середовища Мак Конкі та манітол-сольовий агар (HiMedia, Індія). Для отримання чистої культури використовували агар Колумбія з 5 % кров'ю барана (HiMedia, Індія). Ідентифікацію виділених ізолятів бактерій проводили з використанням АРІ тестів (bioMérieux, Франція) [6].

Для гістологічного аналізу у одноденних курчат відбирали трахею, легені, печінку, нирки, шлунок, селезінку, підшлункову залозу, серце, кишківник, мозок, а у дорослої птиці – до того ж яйцевід і периферійні нерви. Відібраний матеріал фіксували швидким методом у 10 % розчині формаліну, проводили через розчини спиртів, ксилолу та розплавленого парафіну. Потім органи заливали рідким парафіном і виготовляли зрізи, які висушували і фарбували за стандартною методикою розчинами еозину та гематоксиліну [7]. Гістологічні дослідження проводили з використанням обладнання Microm та Zeiss у лабораторії гістології ТОВ «Центр Ветеринарної Діагностики».

Кількість вітаміну А у печінці птиці визначали фотоколориметрично. Для цього 0,1 г печінки розтирали з безводним Na₂SO₄ та хлороформом, до отриманого екстракту додавали ефірат трифториду бору (індикатор). Оптичну густина екстракту вимірювали через 30 с та 60 с за довжини хвилі 610 нм. Кількість вітаміну А (мкг/г печінки) розраховували за формулою [8, 9]:

$$X = \frac{(E1 - E2) \times 100 \times Y}{Y1 \times M},$$



де E1 – оптична густина екстракту через 30 с; E2 – оптична густина екстракту через 60 с; Y – загальний об’єм екстракту; Y1 – об’єм екстракту взятого для аналізу; M – маса наважки.

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($X_{\text{сер}}$), середню квадратичну похибку ($S_{x \text{ сер}}$) за кількості повторів дослідів $n = 6$ та рівнях значимості 0,05.

Результати дослідження

Оцінку стану внутрішніх органів проводили за результатами патолого-анатомічного дослідження. У 23-х одноденних курчат виявлено дряблість іктеричність печінки, ознаки жирової дистрофії. Також детектовано гідроперикардит, у 5-х зразків жовточний мішок був жовто-зеленого кольору з каламутним вмістом. Виявлені патолого-анатомічні зміни вказують на порушення обмінних процесів й можливу причетність бактеріальної інфекції до патологічного стану.

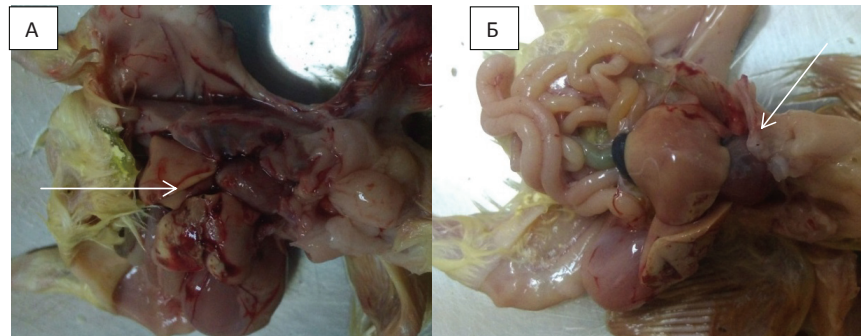


Рис. 1. Патолого-анатомічні зміни у одноденних курчат:
А, Б – набряк, ознаки жирової дистрофії печінки

Fig. 1. Autopsy changes of 1 day-old chickens: A, B – edema, fatty liver

Для виключення причетності бактеріальної інфекції до патології печінки було проведено висів зі зразків на живильні середовища, у результаті чого з жовткового мішка та печінки 8 з 23 курчат виділено 9 ізолятів бактерій, що ідентифіковані за фізіолого-біохімічними властивостями як *Escherichia coli* ($n=5$), *Enterococcus faecalis* ($n = 1$), *Proteus spp* ($n = 1$), *Staphylococcus aureus* ($n = 1$) та *Pseudomonas spp.* ($n = 1$) (табл. 1).

Виділені культури можуть викликати загибель добових курчат [10], однак дані з приводу їх участі у розвитку жирового гепатозу у літературі відсутні. Наявність бактеріальної інфекції у добових курчат ймовірно пов’язана з недоліками менеджменту та біобезпеки на господарстві.

Гістологічне дослідження є одним з основних методів діагностики у ветеринарії, оскільки на основі специфічних мікроскопічних змін дає можливість встановити причетність інфекційних та неінфекційних чинників патологічного стану, звзвити спектр можливих патологій, а також оптимізувати відбір матеріалу для молекулярно-біологічних досліджень.

Таблиця 1

Наявність бактеріальної інфекції у одноденних курчат

Table 1

Presence of bacterial infection in 1 day-old chickens

Виділені ізоляти бактерій	Зразки											
	Печінка						Жовтковий мішок					
	№1	№4	№9	№12	№13	№21	№1	№4	№9	№13	№15	№22
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Proteus spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

З огляду на це, нами було проведено гістологічний аналіз внутрішніх органів курчат, внаслідок чого у печінці виявлено некроз та жирову дистрофію гепатоцитів різного ступеня (рис. 2). Структура трахеї, легень, нирок, шлунку, кишечника та мозку була збережена, патоморфологічних змін не зареєстровано.

За даними літератури дистрофічні зміни, виявлені у печінці могли виникнути внаслідок нестачі біотину, вітаміну А, впливу афлатоксину, порушення температурного режиму під час інкубації (підвищена температура), незбалансованості раціону батьківського стада, а також аденовірусної інфекції. [1].

Для оцінки ступеня метаболічного порушення визначено кількість вітаміну А у печінці курчат й встановлено, що його кількість у печінці усіх досліджуваних зразків була меншою за норму у 1,4–2,8 разів й коливалася у межах 10,0–20,4 мкг/г печінки. Однак, з анамнезу відомо, що батьківське поголів'я годували вітамінними високоенергетичними кормами «Мультигейн», що виключає проблеми пов'язані з незбалансованістю раціону за вітамінами та поживними речовинами, інтоксикації. До того ж температурний режим під час інкубації порушено не було. Отже, синдром жирового переродження печінки курчат, а також нестача вітаміну А викликані патологією батьківського поголів'я.

Для виключення причетності патологій батьківського стада до жирового переродження печінки одноденних курчат проведено патологоанатомічний розтин 6 курей. Серед патолого-анатомічних змін в усіх досліджуваних тварин детектовано набряк та ознаки жирового переродження печінки, набряк нирок, гідроперикардит. Крім того виявлено незначне потовщення залозистого шлунку та катаральний ентерит тонкого кишечника. Макроскопічних ознак характерних для ураження вірусними захворювання з тропністю до респіраторного тракту та нервової системи не зареєстровано [1].



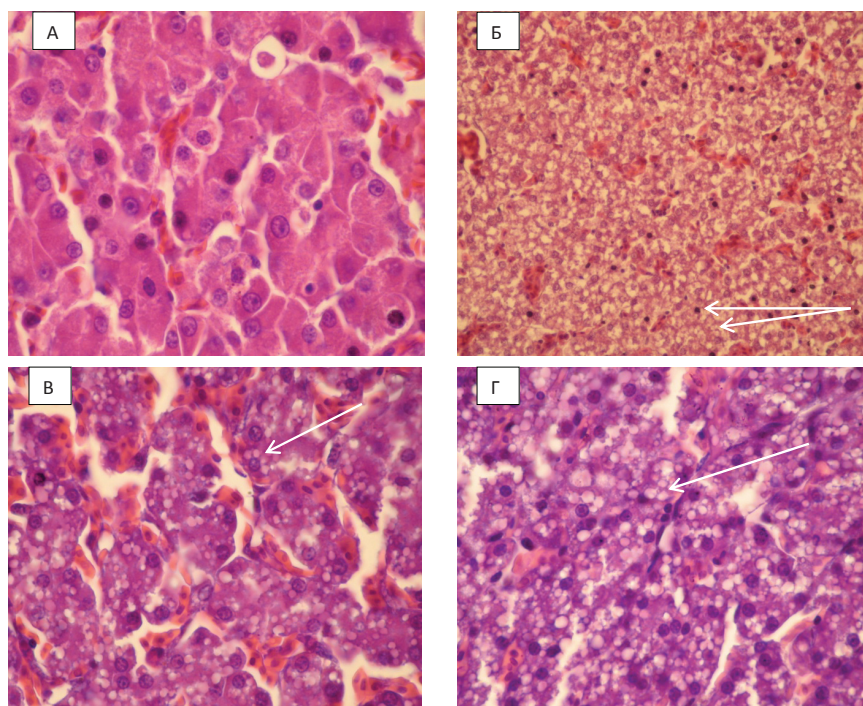


Рис. 2. Мікроскопічна будова печінки курчат (забарвлення гематоксилином та еозином, збільшення $\times 1000, 200, 400$):

A – норма, Б, В, Г – жирова дистрофія гепатоцитів.

Fig. 2. Microscopic structure of 1 day old chicken's liver (hematoxylin and eosin staining, magnification $\times 1000, 200, 400$):

A – normal liver; B, C, D – fatty dystrophy of hepatocytes.

З огляду на виявлені патанатомічні зміни проведено гістологічний аналіз тканин внутрішніх органів. Встановлено, що у печінці усіх зразків виявлено жирове переродження гепатоцитів, внутрішньоядерні базофільні тільця-включення та поодинокі ділянки з незначними лімфоцитарно-макрофагальними інфільтратами, у нирках та шлунках трьох тварин – округлення епітелію ниркових каналців та фундальних залоз, внутрішньоядерні базофільні включення. Відповідні патогістологічні зміни є специфічними для ураження аденовірусами з роду *Aviadenovirus* (рис. 3).

Механізм патогенезу аденовірусної інфекції у печінці базується на тому, що вірус, реплікуючись в ядрі епітеліальних клітин, пригнічує транспорт мРНК клітини-господаря у цитоплазму, що призводить до зниження синтезу протеїнів, і як наслідок, порушення гомеостазу та дистрофії/некрозу гепатоцитів [11]. Розвиток жирової дистрофії пов'язаний з тим, що відбувається пригнічення синтезу ліпопротеїнів низької щільності та β -окислення жирних кислот, через пригнічення транспорту ацил-КоА у мітохондрії. Зазначені процеси спричинюють накопичення пулу ацил-КоА та триацилгліцеролів у цитозолі гепатоцитів [12]. Зважаючи на наявність метаболічних порушень у дорослої

птиці, спричинених аденовірусною інфекцією, в процесі формування ембріонів можуть відбуватися аномалії розвитку, викликані активацією диференціації преадипоцитів та експресії ССАТ/енхансер-зв'язувального протеїну β , що відповідає за адипогенез [13].

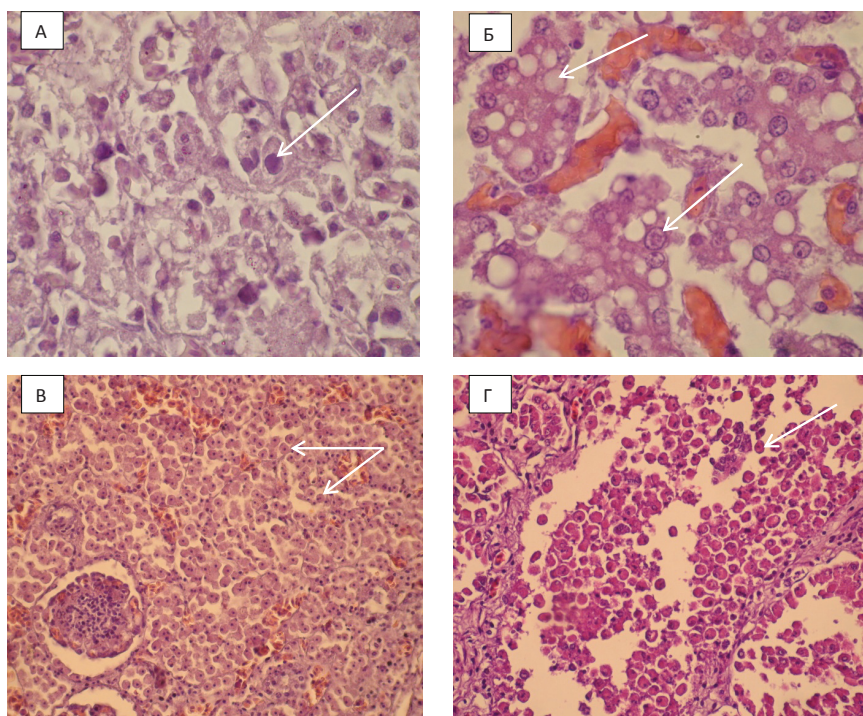


Рис. 3. Мікроскопічна структура печінки (А, Б), нирки (В) та шлунку (Г) курей з батьківського стада (забарвлення гематоксином та еозином, збільшення $\times 1000, 200, 400$): А,Б – жирова дистрофія гепатоцитів, внутрішньоядерні базофільні тільця-включення; В – округлення епітеліальних клітин, внутрішньоядерні базофільні тільця-включення; Г – округлення епітеліальних клітин.

Fig. 3. Microscopic structure of liver (A, B), kidneys © and gizzard (D) of hens from breeder stock (hematoxylin and eosin staining, magnification $\times 1000, 200, 400$): A, B – fatty dystrophy of hepatocytes, intranuclear basophilic inclusion bodies; C – rounding of epithelial cells, intranuclear basophilic inclusion bodies; G – rounding of epithelial cells.

Окрім патогістологічних змін у нирках, печінці та шлунку, у серці 2-х зразків візуалізовано ділянки розриву, порушення анастомозу кардіоміоцитів та крововиливи, у підшлунковій залозі – лімфоцитарно-макрофагальні інфільтрати (рис. 4). Присутність вищевказаних мікроскопічних змін узгоджується з даними отриманими у роботі Sharma S. [11] щодо патологій індукованих аденовірусною інфекцією.

Наявність патології серця під час аденовірусної інфекції корелює з ураженням печінки і зниженням синтезу протеїнів, що викликає зменшення колоїдного

осмотичного тиску плазми, руйнацію стінок судин у серці, підвищення їх проникності, внутрішньосудинного тиску та, як наслідок, – тампонаду органу [11].

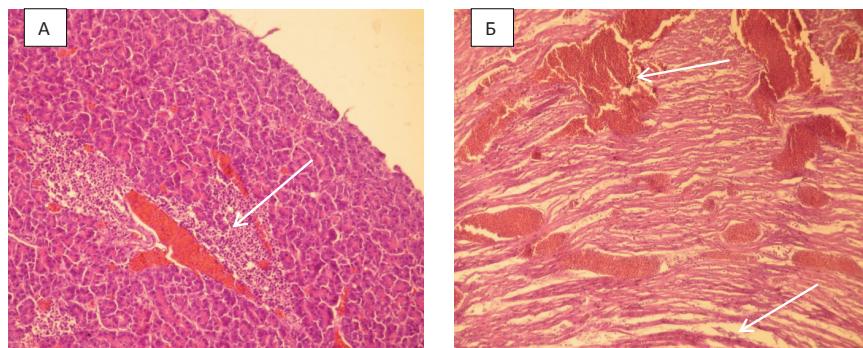


Рис. 4. Мікроскопічна будова підшлункової залози (А) та серця (Б) курей інфікованих аденовірусом (забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення $\times 200$): А – лімфоцитарно-макрофагальна інфільтрація; Б – крововиливи, розриви та порушення анастомозу кардіоміоцитів.

Fig. 4. Microscopic structure of pancreas (A) and heart (B) of hens infected with adenovirus (hematoxylin and eosin staining, magnification $\times 200$): A – lymphocytic-macrophage infiltration; B – hemorrhages, cardiomyocytes disturbance.

Необхідно відмітити, що у яйцеховодах досліджуваних зразків не виявлено жодних патогістологічних змін, що свідчить про відсутність ураження птиці аденовірусом з 3-ї групи (синдром зниження яйценосності), однак не виключає трансваріальну передачу аденовірусів 1-ї групи. Крім того, за результатами бактеріологічного дослідження не виділено бактерій з роду *Salmonella*. З печінки та серця двох курей ізольовано лише патогенні штами *E. coli*, що є вторинним чинником патологічного стану і не здатні призводити до розвитку жирового переродження печінки у одноденних курчат. Слід зазначити, що виділені бактерії *E. coli* з органів батьківського поголів'я ймовірно контамінують поверхню яйця, в результаті чого й може відбуватися інфікування одноденних курчат. Це пояснює факт, що у 22% з досліджуваних курчат виділено *E. coli*.

Таким чином, встановлено відсутність причетності нестачі біотину, вітаміну А, впливу афлатоксину, бактеріальних токсинів, порушення температурного режиму під час інкубації (підвищена температура) та незбалансованості раціону батьківського стада до патології печінки досліджуваних одноденних курчат. Визначено, що ураження батьківського поголів'я аденовірусом з першої групи може спричинювати жирову дистрофію гепатоцитів та зменшення кількості вітаміну А у 1,4–2,8 рази в печінці одноденних курчат порівняно з нормою.

А.А. Нечипуренко, Д.В. Древаль, Д.В. Провозин, И.А. Собко

ООО «Центр Ветеринарной Диагностики»,
ул. Паисия Кайсарова, 15А, Киев, Украина, 03022
тел.: 067 413 29 17, e-mail: histology@cvd.com.ua

АДЕНОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ, КАК ОДНА ИЗ ВОЗМОЖНЫХ ПРИЧИН ЖИРОВОГО ГЕПАТОЗА У ОДНОДНЕВНЫХ ЦЫПЛЯТ

Реферат

Цель. Исследовать роль аденовирусной инфекции в развитии жировой болезни печени у однодневных цыплят. **Методы.** Состояние внутренних органов птицы оценивали по результатам патолого-анатомического вскрытия, количество витамина А в печени цыплят определяли фотоколориметрически. Оценку микроскопических изменений в печени и наличие аденовирусной инфекции определяли гистологическим методом исследования. Окраску тканей проводили по стандартной методике растворами эозина и гематоксилина. **Результаты.** В печени 23 однодневных цыплят выявлено жировую дистрофию гепатоцитов. Количество витамина А в печени исследованных образцов варьировалось в пределах 10,0–20,4 мкг/г. Наличие бактериальной инфекции у родительского поголовья объясняет факт, что у 22% исследуемых однодневных цыплят выделено *E. coli*. По результатам гистологического анализа в печени и почках родительского стада курей выявлено внутридерные базофильные тельца-включения, что свидетельствует о инфицировании птицы аденовирусом и возможность его трансвариальной передачи. **Выводы.** Инфицирование родительского стада аденовирусной инфекцией, не смотря на сбалансированность рациона по витаминам, вызывает жировую дистрофию гепатоцитов и снижение концентрации витамина А в печени однодневных цыплят в 1,4–2,8 раза по сравнению с нормой. **Ключевые слова:** жировая дистрофия гепатоцитов, витамин А, аденовирусная инфекция.

O. Nechypurenko, D. Dreval, D. Provozin, I. Sobko

«Center of Veterinary Diagnostics»
15A, Str. Paisija Kaisarova, Kiev, Ukraine, 03022
tel.: 067 413 29 17, e-mail: histology@cvd.com.ua

ADENOVIRUS INFECTION AS ONE OF POSSIBLE CAUSES OF FATTY HEPATOSIS IN ONE DAY-OLD CHICKENS

Summary

Aim. To investigate the role of adenovirus infection in the development of fatty liver disease in one day-old chicks. **Methods.** The condition of the internal organs of poultry assessed by autopsy, the amount of vitamin A in the liver of chickens determined photocolourimetry. Microscopic evaluation of changes in the liver and the presence of adenovirus infection were determined by histologic examination. The staining of the tissues was performed by a standard technique with hematoxylin and eosin solutions. **Results.** In the liver, of 23-th day-old chicks were revealed fatty degeneration of



hepatocytes. The amount of vitamin A in the liver of investigated samples varied in the range of 10.0–20.4 mg / g. The presence of a bacterial infection in breeder explains the fact that from 22% of the investigated day-old chicks was isolated *E. coli*. According to the results of the histological analysis of the liver and kidneys breeder hens were detected basophilic intranuclear inclusion bodies, which indicate the presence of adenovirus infection and its possible transovarial transmission. **Conclusion.** Infection of breeder by adenovirus, despite the balanced diet with vitamins, causing fatty degeneration of hepatocytes and decrease the concentration of vitamin A in the liver of one day-old chicks in 1.4–2.8 times compared with the norm.

Keywords: fatty degeneration of hepatocytes, vitamin A, adenoviral infection.

Список використаної літератури

1. *Disease of poultry* / ed. by Saif Y.M. et. al. [12th edition]. – Oxford : Blackwell Publishing, 2008. – 1409 p.
2. Hafez M.H. Avian Adenoviruses infections with special attention to inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome and egg drop syndrome // *Pakistan veterinary journal*. – 2011. – Vol. 31. – P. 85–92.
3. Zhao J., Zhong Q., Zhao Y. Pathogenicity and complete genome characterization of fowl Adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1–14.
4. Sharma J.M. Hemorrhagic enteritis of turkeys. // *Vet. Immuno. Immunop.* – 1991. – Vol. 30. – P. 67– 71.
5. Ono M., Okuda Y., Yazawa S. Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens // *Vet. Pathology*. – 2003. – Vol. 40. – P. 294–303.
6. Edinger R.C. Supplementary rapid biochemical test panel for the API 20 E bacterial identification system / P.C. Migneault, F.S. Nolte // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1985. – Vol. 22. – P. 1063–1065.
7. Горальський Л.П., Хомич В.Т., Кононський О.І. Основи гістологічної техніки у нормі та при патології. – Житомир.: Полісся, 2005. – 288 с.
8. *Биохимические методы контроля метаболизма в органах и тканях птиц и их витаминной обеспеченности* / разраб. П.Ф. Сурай, И.А. Ионов; Госагропром УССР, Южное отделение ВАСХНИЛ, Украинский научно-исследовательский институт птицеводства. – Харьков, 1990. – 138 с.
9. *Комбікорми, премікси, вітамінні препарати, продукція птахівництва. Методи визначення вітамінів А, Е, В2 та каротиноїдів: ДСТУ ISO 4687-1:2006.* — [Чинний від 2006—11—07]. — К. : Держспоживстандарт України, 2007. — 81 с. — (Національні стандарти України).
10. Nasrin S., Islam M. A., Khatun M. Characterization of bacteria associated with omphalitis in chicks // *The Bangladesh Veterinarian*. – 2012. – Vol. 29. – P. 63–68.
11. Sharma S., Asrani R. K., Singh G. Outbreak of hydropericardium syndrome associated with ascites and liver rupture in caged broilers // *Veterinary Research International*. – 2014. – Vol. 2. – P. 33-45.



12. Dowman J. K., Tomlinson J.W., Newsome P.N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease // *An International Journal of Medicine*. – 2009. – Vol. 103. – P. 71 – 83.

13. Ponterio E., Gnessi L. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview // *Viruses*. – 2015. – Vol. 7. – P. 3719 – 3740.

References

1. Saif YM. Disease of poultry. Oxford : Blackwell Publishing, 2008. 1409 p.
2. Hafez MH. Avian Adenoviruses infections with special attention to inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome and egg drop syndrome. *Pakistan veterinary journal*. 2011;(31):85–92.
3. Zhao J, Zhong Q, Zhao Y. Pathogenicity and complete genome characterization of fowl Adenoviruses isolated from chickens associated with inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in China. *PLoS One*. 2015; (10):1–14.
4. Sharma JM. Hemorrhagic enteritis of turkeys. *Vet. Immuno. Immunop.* 1991; (30):67– 71.
5. Ono M, Okuda Y, Yazawa S. Adenoviral gizzard erosion in commercial broiler chickens. *Vet. Pathology*. 2003;(40):294–303.
6. Edinger RC, Migneault PC, Nolte FS. Supplementary rapid biochemical test panel for the API 20 E bacterial identification system. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985;(22):1063–1065.
7. Goralskii LP. The basis of histological technique in norm and pathology. Zhitomir : Polissia, 2005. 288 p.
8. Surai PF, Ionov IA. Biochemical methods in control of metabolism in organs and tissues of poultry and their vitamin availability. Kharkiv : Hosagroprom the USSR, 1990. 138 p.
9. Fodder, premixes, vitamins, poultry industry. Methods for determination of vitamins A, E, B2 and carotenoids: GOST ISO 4687-1:2006 from 07.11.2006. Kyiv : State Committee of Ukraine, 2007. 81 p.
10. Nasrin S, Islam M, Khatun M. Characterization of bacteria associated with omphalitis in chicks. *The Bangladesh Veterinarian*. 2012;(29):63–68.
11. Sharma S, Asrani RK, Singh G. Outbreak of hydropericardium syndrome associated with ascites and liver rupture in caged broilers. *Veterinary Research International*. 2014;(2):33–45.
12. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *An International Journal of Medicine*. 2009;(103):71–83.
13. Ponterio E, Gnessi L. Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses*. 2015;(7):3719–3740.

Стаття надійшла до редакції 09.11.2016 р.



Н.А. Ямборко, Н.О. Леонова, Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, тел.: +38 (044) 526 34 87,
e-mail: yamborkon@gmail.com

СИНТЕЗ ФИТОГОРМОНОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

*Хлорорганические пестициды ингибируют рост растительности в местах загрязнения. Применение для биоремедиации микроорганизмов-деструкторов, синтезирующих фитогормоны является перспективным, однако практически не изученным. Цель. Исследовать способность эффективных штаммов-деструкторов гексахлорциклогексана (ГХЦГ) синтезировать фитогормональные соединения для стимулирования роста растений в зоне загрязнения. Методы. Микробиологические, хроматографические, статистические. Результаты. Почвенные микроорганизмы-деструкторы хлорорганических соединений *Pseudomonas putida* ИМВ В-7289, *P. putida* УКМ В-398, *Bacillus megaterium* ИМВ В-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ В-7288 синтезируют и продуцируют в среду культивирования широкий спектр фитогормонов: цитокининов, ауксинов, гибберелловой и абсцизовой кислот. Качественный и количественный состав синтезируемых микроорганизмами фитогормонов характеризуется штаммовыми отличиями. *P. putida* УКМ В-398 является наиболее активным продуцентом внеклеточной гибберелловой кислоты, ауксинов и цитокининов. Выводы. Штамм *P. putida* УКМ В-398 представляет интерес как перспективный компонент микробного препарата и может быть использован в комплексе с эффективными деструкторами ГХЦГ *B. megaterium* ИМВ В-7287 и *P. putida* ИМВ В-7289.*

Ключевые слова: микробная деструкция, ГХЦГ, фитогормоны, ремедиация.

В связи со всё увеличивающимся влиянием на окружающую среду и здоровье человека токсических химически синтезированных соединений, в последнее время возрастает интерес к экологически безопасным способам их биодетоксикации, направленным на улучшение общего состояния почвы. Основная цель этих мероприятий – биоремедиация загрязнённых территорий, а также создание благоприятных условий для роста растений. Биотехнологии ремедиации загрязнённых почв с использованием полифункциональных микробных препаратов признаны в настоящее время наиболее перспективными [1]. Важным преимуществом биологических препаратов является отсутствие отрицательного влияния на окружающую среду. Известно, что одним из положительных свойств почвенных микроорганизмов является их способность синтезировать



фитогормоны, стимулирующие рост и развитие растений. Использование биопрепаратов, содержащих фитогормоны микробного происхождения в растениеводстве перспективно ввиду простоты и сравнительной дешевизны получения, а также высокого сродства к растительной клетке и способности легко связываться и катаболизироваться [2]. Бактерии, относящиеся к группе PGPB (plant-growth-promoting bacteria), представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, известны как продуценты фитогормонов [3]. Отмечено стабилизирующее действие PGP-бактерий на структуру и функционирование аборигенного микробного сообщества лесной почвы в ризосфере сосны посевной [4].

Несмотря на то, что способность микроорганизмов синтезировать фитогормоны изучается довольно давно, в доступной нам литературе мы не нашли сведений о синтезе этих соединений бактериями-деструкторами пестицидов. Ранее нами были селекционированы эффективные штаммы, относящиеся к родам *Bacillus*, *Stenotrophomonas* и *Pseudomonas* [5], способные разлагать хлорорганические соединения. Представляло интерес изучить синтез этими штаммами фитогормональных веществ, влияющих как на рост и развитие растений, так и на стабилизацию природных микробных сообществ почв на загрязнённых территориях.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования были штаммы эффективных микроорганизмов-деструкторов хлорорганических соединений, селекционированные в отделе общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины: *P. putida* ИМВ В-7289, *B. megaterium* ИМВ В-7289, *S. maltophilia* ИМВ В-7288, *P. putida* УКМ В-398. Согласно проведённым ранее исследованиям, активность деструкции комплекса изомеров гексахлорциклогексана (4,8 мг/л) составляла (% от исходного содержания) штаммом *S. maltophilia* ИМВ В-7288 – 30,7–73,2, *P. putida* УКМ В-398 – 31,1–76,6, *P. putida* ИМВ В-7289 – 47,3–78,9, *B. megaterium* ИМВ В-7168 – 63,4–86,7 [5].

Для определения активности синтеза фитогормонов культивирование микроорганизмов проводили во флаконах объемом 500 мл в 100 мл жидкой питательной среды Менкиной [5] на качалке (220 об/мин) при температуре 26–28 °С в течение 48 ч. В качестве инокулянта использовали жидкие культуры *P. putida* ИМВ В-7289, *B. megaterium* ИМВ В-7289, *St. maltophilia* ИМВ В-7288, *P. putida* УКМ В-398 в экспоненциальной фазе роста (36 ч) в количестве 5% от объёма питательной среды. Культуральные жидкости указанных штаммов исследовали в начале стационарной фазы роста (48 ч). Биомассу клеток отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 15000 g и +4 °С и дважды отмывали от питательной среды физиологическим раствором. Полученную биомассу и супернатант культуральной жидкости использовали для качественного и количественного определения фитогормонов. Из биомассы фитогормоны извлекали низкотемпературной этанольной экстракцией при -18 °С (для осаждения экзополисахаридов) с дальнейшим концентрированием. Из супернатанта



культуральной жидкости фитогормоны выделяли путем перераспределения в двух несмешивающихся между собой фазах. Экстракцию фитогормонов из культуральной жидкости бактерий проводили трижды в распределительных воронках этиловым эфиром уксусной кислоты (в соотношении 1:1). Перед экстракцией рН культуральной жидкости доводили до 2,8 с помощью 0,1 н HCl. Этилацетатную фракцию упаривали на роторном испарителе (HEIDOLPH Laborporta 4000 efficient, Германия) и перерастворяли в аликвоте 96 %-го этанола. В дальнейшем этанольный экстракт очищали последовательным хроматографированием на пластинках с оксидом кремния «Merck № 105554» (Германия) в разных системах растворителей: хлороформ ($R_f = 0$), аммиак 12,5 % ($R_f = 1$), а также этилацетат : уксусная кислота (19 : 1) ($R_f = 0,7...0,9$). После очистки зоны, совпадающие по R_f с нанесенными ранее стандартами ауксинов и абсцизовой кислоты (АБК), снимали с пластинок и элюировали в течение 24 ч этилацетатом. Элюат повторно хроматографировали на пластинках с оксидом кремния «Merck № 105554» (Германия) в системе растворителей хлороформ : этилацетат : уксусная кислота (100 : 100 : 1). Количественное определение фитогормонов осуществляли на сканирующем спектроденситометре «Camag TLC Scanner» (Швейцария). Дальнейшее концентрирование и очистку экстрактов проводили методом препаративно-накопительной тонкослойной хроматографии. Качественное и количественное определение ауксинов, цитокининов и АБК проводили методом спектроденситометрической тонкослойной хроматографии [6]. Количество внутриклеточных и внеклеточных фитогормонов выражали в мкг на 1 г абсолютно сухой биомассы (АСБ) продуцента.

Результаты и их обсуждение

В супернатантах культуральных жидкостей микроорганизмов-деструкторов были выявлены внеклеточные фитогормоны разных классов, качественный и количественный состав которых был индивидуальным у каждого штамма микроорганизмов. Все штаммы синтезировали преимущественно индолилуксусную кислоту (ИУК), некоторые – АБК, в то же время индол-3-карбоксихальдегид, индол-3-гидразид уксусной кислоты были выявлены в следовых количествах (табл. 1).

Среди исследуемых штаммов-деструкторов самым активным продуцентом ИУК и индол-3-карбоксихальдегида и АБК оказался *P. putida* УКМ В-398 – содержание этих фитогормонов в супернатанте соответственно составляло 9,9, –3,5 и 0,9 мкг/г АСБ. Штамм *S. maltophilia* ИМВ В-7288 был единственным, который продуцировал в среду культивирования индол-3-гидразид уксусной кислоты (2,6 мкг/г АСБ). Из исследованных фитогормонов *B. megaterium* ИМВ В-7287 продуцировал в культуральную жидкость только ИУК – 5,9 мкг/г АСБ, а другие ауксины и АБК были выявлены в следовых количествах (табл. 1).

Также исследовали содержание цитокининов, продуцируемых в культуральную жидкость (внеклеточные), и в биомассе (внутриклеточные) микроорганизмов. Максимальное количество внеклеточных цитокининов (зеатина и зеатинрибозида) синтезировал *P. putida* УКМ В-398 – 133,9 и 189,5 мкг/г АСБ



соответственно, что превышало содержание фитогормонов в супернатанте культуральной жидкости других исследуемых штаммов в 8,3–166,7 раза.

Таблица 1

Содержание ауксинов и абсцизовой кислоты в супернатантах культуральных жидкостей микроорганизмов-деструкторов, мкг/г АСБ

Table 1

The content of auxin and abscisic acid in the supernatants of microorganisms- destructors, , µg/g ASB

Штамм	Индолилуксусная кислота	Индол-3-карбокс альдегид	Индол-3-гидразид уксусной кислоты	Абсцизовая кислота
<i>B. megaterium</i> ИМВ В-7287	5,9	сл.	сл.	сл.
<i>P. putida</i> ИМВ В-7289	3,7	0,2	сл.	сл.
<i>P. putida</i> УКМ В-398	9,9	3,5	сл.	0,9
<i>S.maltophilia</i> ИМВ В-7288	0,9	сл.	2,6	сл.

($p \leq 0.05$), $n=3$

Примечание: «сл.»- следы

Note: «сл.»- trace amounts

В то же время синтез у *P. putida* УКМ В-398 внутриклеточных зеатина и зеатинрибозида было в 1,2–19,4 и в 13,0–16,4 раза соответственно меньше по сравнению с другими штаммами (табл. 2). У *B. megaterium* ИМВ В-7287 содержание внеклеточного и внутриклеточного зеатинрибозида было одинаковым, а внутриклеточного зеатина (в биомассе) достигало 17,5 мкг/г АСБ и превышало его содержание в биомассе других исследуемых культур в 3,5–19,0 раз (табл. 2). Наибольшее количество зеатинрибозида было выявлено в биомассе *S. maltophilia* ИМВ В-7288 – 11,5 мкг/г АСБ, что превышало в 1,4 раза его содержание в биомассе других исследуемых штаммов в 1,2–16,4 раза. Содержание внутриклеточных зеатина и зеатинрибозида у микроорганизмов обусловлено их синтезом внутри клетки и рибозилированием – превращением в транспортную форму – зеатинрибозид. Именно в виде рибозилированной формы зеатин активно транспортируется за пределы клеток в культуральную жидкость и может использоваться растением [2]. Это подтверждается высоким содержанием внеклеточного зеатинрибозида у штаммов *P. putida* ИМВ В-7289, *P. putida* УКМ В-398 и *S. maltophilia* ИМВ В-7288 (табл. 2) и низким его содержанием в биомассе.



Синтез внеклеточных и внутриклеточных цитокининов
микроорганизмами-деструкторами, мкг/г АСБThe synthesis of the extracellular and intracellular cytokinins by
microorganisms-destructors, µg/g ASB

Штамм	Зеатин		Зеатинрибозид		Изопентенил аденозин рибо- зилирован.	Изопентенил аденин
	1	2	1	2	1	2
<i>B. megaterium</i> ИМВ В-7287	0.01	17.5	9.2	9.3	0,1	0,8
<i>P. putida</i> ИМВ В-7289	8.7	1.1	16.3	9.1	6,1	7,7
<i>P. putida</i> УКМ В-398	133.9	0.9	189.5	0.7	8,4	-
<i>S. maltophilia</i> ИМВВ-7288	0.8	5.1	22.8	11.5	-	-

Примечание: «-» – не выявлено; ($p \leq 0.05$), $n=3$

1-внеклеточный фитогормон (в супернатанте);

2- внутриклеточный фитогормон (в биомассе).

Note: «-» – not found; ($p \leq 0.05$), $n=3$

1-extracellular phytohormone (supernatant);

2- intracellular plant hormone (biomass).

P. putida ИМВ В-7289 содержание зеатина в супернатанте культуральной жидкости превышало его содержание в клетках в 7,9, а у штамма *P. putida* УКМ В-398 – 148,8 раз. Таким образом, штаммы-деструкторы в большинстве своем выводят за пределы клеток синтезированные зеатин и зеатинрибозид.

Кроме зеатина и зеатинрибозид в культуральных жидкостях исследуемых микроорганизмов были выявлены и другие цитокинины, а именно, изопентениладенозин рибозилированный и изопентениладенин. Так, в супернатанте культуральной жидкости *P. putida* УКМ В-398 было выявлено наибольшее количество изопентениладенозина рибозилированного – 8,42 мкг/г АСБ, а штамм *P. putida* ИМВ В-7289 синтезировал максимальное количество внеклеточного изопентениладенина – 7,7 мкг/г АСБ. У штаммов *B. megaterium* ИМВ В-7287 и *S. maltophilia* ИМВ В-7288 указанные цитокинины определялись в незначительных или следовых количествах (табл. 2).

Биосинтетический потенциал исследуемых штаммов микроорганизмов характеризовался также способностью синтезировать гибберелловую кислоту и ИУК. Штамм *P. putida* УКМ В-398 синтезировал наибольшее количество внеклеточной ИУК – 9,9 мкг/г АСБ, *B. megaterium* ИМВ В-7287 продуцировал ИУК 5,5 мкг/г АСБ; у остальных штаммов наблюдали низкий уровень син-



теза данного фитогормона. Содержание гибберелловой кислоты в биомассе штаммов-деструкторов было различным: максимальное – 4,7 мкг/г у *P. putida* УКМ В-398, минимальное – 3,0 мкг/г АСБ у *S. maltophilia* ИМВ В-7288 (табл.3). Важно отметить, что содержание гибберелловой кислоты в культуральных жидкостях исследуемых штаммов (за исключением *B. megaterium* ИМВ В-7287) было выше по сравнению с её содержанием в биомассе, а именно, у *P. putida* ИМВ В-7289 – в 197,2 раза, у *S. maltophilia* ИМВ В-7288 – в 155 раз, у *P. putida* УКМ В-398 – в 206 раз.

Таблица 3

**Синтез гибберелловой кислоты
микроорганизмами-деструкторами, мкг/г АСБ**

Table 3

**The synthesis of gibberellic acid
by microorganism-destroyers, µg/g of ASB**

Штамм	Гибберелловая кислота	
	в биомассе	в супернатанте культуральной жидкости
<i>B. megaterium</i> ИМВ В-7287	4,6	не выявлено
<i>P. putida</i> ИМВ В-7289	3,6	709,9
<i>S. maltophilia</i> ИМВ В-7288	3,0	466,3
<i>P. putida</i> УКМ В-398	4,7	968,1

($p \leq 0.05$), n=3

Известно, что почвенные ризосферные микроорганизмы, относящиеся к RGP-бактериям, формируют растительно-микробные взаимоотношения по принципам мутуализма, обеспечивая растения комплексом биологически активных веществ, в том числе и фитогормонов. Продукция ростстимулирующих веществ выгодна микроорганизмам, поскольку при этом возрастает выделение корневых растительных экссудатов, обеспечивающих питание и самих микроорганизмов [7]. Для RGPB характерна способность оптимизировать гормональную систему растений, стимулируя также их рост, в отличие от патогенных микроорганизмов, синтезирующих избыточное количество фитогормонов и нарушающих рост и развитие растений, приводя к возникновению целого ряда заболеваний [8]. Симбиотические, ассоциированные с растениями клубеньковые бактерии, согласно “ауксиновой” гипотезе инфицирования, проникают в ткани корней благодаря синтезу ИУК. Общеизвестна также способность ауксинов стимулировать прорастание семян, ветвление и рост корней в длину за счёт растяжения клеток, а также повышать устойчивость к стрессовым факторам [7].



Исследуемый штамм-деструктор *P. putida* УКМ В-398 продуцировал ИУК в количестве 9,9 мкг/г АСБ, а *B. megaterium* ИМВ В-7287 – 5,9 мкг/г АСБ, что сопоставимо с синтезом ауксинов ризобиями, например, *Bradyrhizobium japonicum* УКМ-В 6018 – на уровне 8,9 мкг/г АСБ [9]. Бактериальные ауксины стимулируют процесс формирования корневых волосков так же эффективно, как и ауксины растительного происхождения [10]. Исследуемые нами почвенные микроорганизмы-деструкторы не являются ассоциативными, в связи с этим для формирования мутуалистического взаимодействия с растениями им необходим достаточный потенциал синтеза экзометаболитов фитогормональной природы и ауксинов в первую очередь [11]. Известно также позитивное влияние ауксинов, синтезируемых *B. megaterium*, на формирование корневых волосков и корневой системы в целом у *Arabidopsis thaliana* [3]. Интродукция ауксинсинтезирующих бактерий в ризосферу *Triticum aestivum* L. повышала содержание этих гормонов в растениях [12].

Способность продуцировать абсцизовую кислоту (АБК) также обнаружена у ряда представителей RGPB [13]. Большинство учёных до недавнего времени считали, что АБК не относится к фитогормонам стимулирующего действия. Хотя механизм прямого действия этого фитогормона на рост растений ещё не до конца выяснен и АБК известна, в основном, как фитогормон-ингибитор, в настоящее время однозначно доказана его роль в нормализации водного обмена растений. Так АБК индуцирует закрытие устьиц в условиях засухи, а также активирует работу водных каналов в клеточных мембранах, что облегчает приток воды из корней к надземной части растения [10]. Таким образом АБК, синтезируемая микроорганизмами в ризосфере растений, может выступать для них важным регулирующим фактором.

Согласно полученным данным только в культуральной жидкости *P. putida* УКМ В-398 была выявлена АБК в количестве 0,9 мкг/г АСБ, что значительно ниже количества синтезированных ауксинов. Подобная закономерность, по данным Драговоца И.В. с соавторами [9], характерна и для целого ряда штаммов ризобий – синтез внеклеточных фитогормонов стимулирующего действия (цитокенинов и ауксинов) был значительно выше (в 20–430 раз), чем синтез АБК.

Изучение внеклеточных цитокининов в составе культуральных жидкостей штаммов-деструкторов показало, что в большей или меньшей степени исследуемые микроорганизмы синтезировали зеатин и/или зеатинрибозид; их максимальное содержание выявляли в культуральной жидкости *P. putida* 9 – 133,9 и 189,5 мкг/г АСБ соответственно. Способность продуцировать цитокинины обнаружена у меньшего количества видов и штаммов RGPB по сравнению с продуцентами ауксинов [13]. Полученные нами результаты подтверждают эти сведения и объясняют факт сравнительно низкого содержания зеатина и следовых количеств изопентениладенозина рибозилированного и изопентениладенина в составе культуральных жидкостей *S. maltophilia* ИМВ В-7288 и *B. megaterium* ИМВ В-7287. В культуральной жидкости *P. putida* ИМВ В-7289 присутствовали все исследуемые цитокинины приблизительно в равных



количествах (табл. 2, 3). Известно, что рибозилирование цитокининов у растений обеспечивает инактивацию их фитогормональных свойств их активность снижается или полностью исчезает, при этом они приобретают возможность их транспорта через клеточные мембраны. Отщепление фрагмента рибозы от молекулы цитокинина означает конец транспортирования и включение активной фитогормональной функции цитокининов [2]. По данным Кудояровой Г.Р. с соавторами [8], присутствие в ризосфере цитокининов, синтезированных РГРВ *B. subtilis*, достоверно активировало накопление биомассы побегов и корней у растений латука.

Нами было исследовано также внутриклеточное содержание фитогормонов основных классов для оценки общего биосинтетического потенциала культур-деструкторов. Так, максимальное количество зеатина было выявлено в биомассе *B. megaterium* ИМВ В-7287, а максимальное содержание зеатинрибозида – в биомассе штаммов *P. putida* ИМВ В-7289 и *S. maltophilia* ИМВ В-7288.

В отличие от цитокининов активность синтеза ИУК оказалась низкой у исследуемых штаммов. Содержание гибберелловой кислоты в микробной биомассе было достаточно высоким: наибольшее – 4,7 мкг/г у *P. putida* 9, а наименьшее – 3,0 мкг/г АСБ у *S. maltophilia* ИМВ В-7288. Для РГРВ, а именно представителей родов *Pseudomonas* и *Stenotrophomonas* синтез гибберелловой кислоты является весьма характерным. Гиббереллины микробного происхождения также как и гиббереллины растений выступают посредниками взаимодействия между клеточными метаболитами и другими фитогормонами [14], потому их интерактивная роль чрезвычайно важна для сбалансированного функционирования всех систем растительной клетки. Но механизмы синтеза гиббереллинов чувствительны к присутствию ксенобиотиков; было установлено, что гербицид паклобутразол (монохлорсодержащий триазол, 0,025%-ный раствор) приводил к уменьшению содержания свободных гиббереллинов и абсцизовой кислоты в листьях растений сахарной свеклы, рапса посевного [15]. Применение PGR-бактерий, продуцирующих фитогормоны, перспективно для растений на загрязнённых пестицидами территориях, поскольку известно, что пестициды в большинстве случаев снижают способность растений синтезировать фитогормоны.

Проведённые исследования свидетельствуют о том, что синтез микроорганизмами фитогормонов является штаммовой характеристикой. Это чётко прослеживается на примере *P. putida* УКМ В-398 и *P. putida* ИМВ В-7289, принадлежащих к одному виду.

Из всех исследованных культур, *P. putida* УКМ В-398 был наиболее активным продуцентом экзогенных легкодоступных для растений ауксинов и цитокининов, он представляет интерес как перспективный компонент комплексного микробного препарата для ремедиации загрязнённых территорий. Штамм может использоваться в комплексе с такими эффективными деструкторами как *B. megaterium* ИМВ В-7287 и *P. putida* ИМВ В-7289, которые про-



явили більш низку здатність синтезувати досліджувані фітогормони. В комплексному препараті штамки будуть взаємно доповнювати одна одну для ефективного розкладання хлорорганічних забруднень і стимулювання росту і розвитку рослин на забруднених територіях.

Выражаем благодарность за сотрудничество д.б.н. Драговозу Игорю Владимировичу.

N.A. Yamborko, N.O. Leonova, G.O. Iutynska

Institute of Microbiology and Virology ASU, 154, Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 34 87, e-mail: yamborkon@gmail.com

THE SYNTHESIS OF PHYTOHORMONES BY SOIL MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF ORGANOCHLORINES

Summary

Organochlorine pesticides inhibit the plant growth in the pollution soils. The application of microorganisms-destroyers synthesizing plant hormones is promising to bioremediation, but is little studied. Aim. To research the ability of effective strain-destroyers of hexachlorocyclohexane (HCH) for synthesizing phytohormonal compounds to stimulate the plant growth in the contaminated areas. **Methods.** Microbiological, chromatographic, statistical research methods. **Results.** Soil microorganisms-destroyers of organochlorines *Pseudomonas putida* IMV B-7289, *P. putida* UKM B-398, *Bacillus megaterium* IMV B-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288 have synthesized and have produced in the nutrient medium a wide spectrum of plant hormones: cytokinin, auxin, gibberellic and abscisic acid. The qualitative and quantitative composition of the plant hormones synthesized by microorganisms of strains is characterized by differences among the studied strains. *P. putida* UKM B-398 is the most active producer of extracellular gibberellic acid, auxin and cytokinin. **Conclusions.** The strain *P. putida* UCM B-398 is interesting as a promising microbial component of biopreparation and may be used in combination with effective destroyers of HCH *B. megaterium* IMV B-7287, and *P. putida* IMV B-7289.

Key words: microbial degradation, HCH, plant hormones, remediation.

Н.А. Ямборко, Н.О. Леонова, Г.О. Іутинська

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, тел.: +38 (044) 526 34 87,
e-mail: yamborkon@gmail.com

СИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ ҐРУНТОВИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ ХЛОРООРГАНІЧНИХ СПОЛУК

Реферат

Хлороорганічні пестициди інгібують ріст рослинності в місцях забруднення. Застосування для біоремедіації мікроорганізмів-деструкторів, здатних син-



тезувати фітогормони є перспективним але практично не вивченим. **Мета.** Дослідити здатність ефективних штамів-деструкторів гексахлорциклогексану (ГХЦГ) синтезувати фітогормональні сполуки для стимулювання росту рослин в зоні забруднення. **Методи.** Мікробіологічні, хроматографічні, статистичні. **Результати.** Ґрунтові мікроорганізми-деструктори хлорорганічних сполук *Pseudomonas putida* ИМВ В-7289, *P. putida* УКМ В-398, *Bacillus megaterium* ИМВ В-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ В-7288 синтезують і продукують в середовище культивування широкий спектр фітогормонів: цитокінінів, ауксинів, гібереллової і абсцизової кислот. Якісний і кількісний склад синтезованих мікроорганізмами фітогормонів характеризується штамовими відмінностями. *P. putida* УКМ В-398 є найбільш активним продуцентом позаклітинної гібереллової кислоти, ауксинів і цитокінінів. **Висновки.** Штам *P. putida* УКМ В-398 має значення як перспективний компонент мікробного препарату і може бути використаний в комплексі з ефективними деструкторами ГХЦГ *B. megaterium* ИМВ В-7287 і *P. putida* ИМВ В-7289.

Ключові слова: мікробна деструкція, ГХЦГ, фітогормони, ремедіація.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Phillips Theresa M., Seech Alan G., Hung Lee, Trevors Jack T. Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms // Biodegradation. – 2005, V. 16, Issue 4, – P. 363–392.
2. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиология растений. –2002. – Т. 49, № 4. – С. 626–640.
3. López-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderon E., Velásquez-Becerra C., Farias-Rodriguez R., Macías-Rodriguez L.I., Valencia-Cantero E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana* // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2007. –V. 20, № 2. –P. 207–217.
4. Shishido M., Chanway C.P. Forest soil community responses to plant growth-promoting rhizobacteria and spruce seedlings // Biol Fertil Soils. – 1998. –V. 26. –P. 179–186.
5. Ямборко Н.А., Пиндрус А.А. Токсическое и мутагенное действие гексахлорциклогексана и продуктов его микробной деструкции на микробный ценоз почвы // Микробиол. журн. – 2011. –Т. 73, № 6. – С. 56–63.
6. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1987. – 19, № 2. – С. 210–215.
7. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – 42, № 2. – С. 133–143.



8. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев И.К. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Известия Уфимского научного центра РАН. –2011. – №3–4. –С. 5–16.
9. Драгозов И.В., Леонова Н.О., Іутинская Г.А. Синтез фитогормонов штаммами *Bradyrhizobium japonicum* различной симбиотической эффективности // Микробиол. Журн. – 2011. – 73, № 4. – С. 29–35.
10. Wittenmayer L., Wolfgang Merbach W. Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes // Plant Nutr. Soil Sci. –2005. –V. 168. –P. 531–540.
11. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. 2007. V. 31. – P. 425–448.
12. Ali B., Sabri A.N., Ljung K., Hasnain S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. // Letters in Applied Microbiology. –2009.–V. 48. – P. 542–547.
13. Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // Annual Applied Biology. – 2010. – V. 157. – P. 361–379.
14. Bottini R., Cassan F., Piccoli P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase // Appl Microbiol Biotechnol. –2004. –V. 65. –P. 497–503.
15. Шевчук О.А., Кур'ята В.Г. Вплив паклобутразолу на активність гіберелінів і вміст різних форм абсцизової кислоти у листках цукрового буряка // Вісник Харківського національного аграрного університету. –Серія Біологія, 2007, – Вип. 1 (10), –С. 71–75.

Referenses

1. Phillips TM., Seech AG, Lee H., Trevors JT Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms. Biodegradation. 2005; 16 (4): 363–392.
2. Kulaeva ON, Kuznetsov VV Recent advances and perspectives in the study of cytokinins. Plant Physiology. 2002; 49 (4): 626-640.
3. López-Bucio J., Campos-Cuevas JC., Hernández-Calderon E., Velásquez-Becerra C., Farias-Rodriguez R., Macías-Rodriguez LI., Valencia-Cantero E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 2007;20(2): 207–217.
4. Shishido M., Chanway CP. Forest soil community responses to plant growth-promoting rhizobacteria and spruce seedlings. Biol Fertil Soils. 1998; (26):179–186.
5. Yamborko NA, Pindrus AA The toxic and mutagenic effects of hexachlorocyclohexane and its products of microbial degradation to the soil microbial cenosis. Microbiol. J. 2011; 73 (6):56-63.
6. Savinskiy SV, Kofman IS, Kofanov VI, Stasevskaya IL Methodological approaches to the determination of plant hormones using spektrodensitometric TLC // Physiology and biochem. of cultivated plants. 1987; 19 (2): 210-215.



7. *Tsavkelova EA, Klimova SY, Cherdyntseva TA, Netrusov AI* The microorganisms-producers of plant growth stimulants and their practical application. *J. Appl. Biochemistry and Microbiology*.2006; 42 (2): P. 133-143
8. *Kudoyarova GR, Kurdish IK, Melent'ev IK* Production of phytohormones by soil and rhizosphere bacteria as a factor stimulating the plants growth. *Proceedings of the Ufa Scientific Center of Russian Academy of Sciences*. 2011;(3-4):5-16.
9. *Dragovoz IV, Leonova NO, Iutynska GA*. The synthesis of phytohormones by strains *Bradyrhizobium japonicum* different symbiotic efficiency. *Microbiol. J*. 2011;73 (4):29-35.
10. *Wittenmayer L., Wolfgang Merbach W*. Plant responses to drought and phosphorus deficiency:contribution of phytohormones in root-related processes. *Plant Nutr. Soil Sci*. 2005; (168): 531–540.
11. *Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R*. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganismplant signaling. *FEMS Microbiol. Rev*. 2007;(31): 425–448.
12. *Ali B., Sabri AN., Ljung K., Hasnain S*. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum L*. *Letters in Applied Microbiology*.2009; (48): 542–547.
13. *Dodd IC., Zinovkina NY., Safronova VI., Belimov AA*. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annual Applied Biology*. 2010; (157): 361–379.
14. *Bottini R., Cassan F., Piccoli P*. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; (65): 497–503.
15. *Shevchuk AA, Kur'yata VG* The impact of paklobutrazol on gibberellin activity and content of different forms of abscisic acid in the leaves of sugar beet // *Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Biology Series*. 2007; 1(10): 71-75.

Стаття надійшла до редакції 23.11.2016 р.

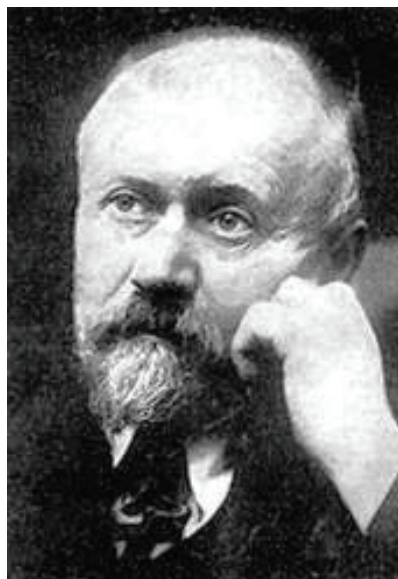


УДК: 579:923 Заболотний (477.74)

В.О. Кузнєцов

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: (050) 165 69 99, e-mail: cuznetsov@meta.ua

**ОДЕСЬКИЙ ПЕРІОД ЖИТТЯ ТА НАУКОВОЇ
ДІЯЛЬНОСТІ АКАДЕМІКА Д.К. ЗАБОЛОТНОГО
(28.12.1866 – 15.12.1929)**



На підставі вивчення архівних матеріалів Інституту архівознавства НБУ імені В.І. Вернадського АН України, Державного архіву Одеської області, особистих архівів викладачів Одеського університету та літературних джерел розглянуто основні події у науково-педагогічній діяльності Д.К. Заболотного, що пов'язані з його перебуванням у м. Одесі у різні роки.

Ключові слова: історія, мікробіологія, Заболотний, Одеський університет.



Данило Кирилович Заболотний – український мікробіолог і епідеміолог, академік АН СРСР (з 1929), академік АН УРСР (з 1922), її президент у 1928–1929 рр., випускник Одеського (Новоросійського) національного університету (1891) [2].

Треба відзначити, що на сьогоднішній день не існує точної дати народження Д.К. Заболотного. Услід за «Большой Советской Энциклопедией» усі автори другої половини ХХ століття наводили дату – 16 (28) грудня 1866 р., але у документах Імператорського Новоросійського університету (ІНУ) скрізь фігурує інша дата народження Д.К. Заболотного – 02 (14) січня 1867 р. Автори «Биографического словаря» (2003) В.А. Волков та М.А. Куликова, посилаючись на рукописну автобіографію Заболотного Д.К., що зберігається в РДВІА (Ф. 316. Оп. 41. Спр. 284. Арк. 6), наводять третю дату – 01 (13) січня 1867 р. [1, с. 186].

Усе життя Д. К. Заболотного тісно пов'язане з Одесою. Перший одеський період у житті Д.К. Заболотного налічує 11 років, з моменту, коли він у 1880 р. переїхав до свого дядька Михайла Мироновича Сауляка-Савицького і вступив до п'ятого класу Рішельєвської класичної гімназії, і до закінчення навчання в ІНУ. До університету Д.К. Заболотного зараховано у серпні 1885 р. Вступ до ІНУ на природниче відділення був швидше за все не випадковим, бо саме це відділення закінчив у 1874 р. М.М. Сауляк-Савицький [16, с. ХХІХ].

У «Списках студентів і сторонніх слухачів Імператорського Новоросійського університету в першому півріччі 1885–1886 н.р.» на природничому відділенні фізико-математичного факультету серед інших студентів під № 9 знаходимо – “Заболотний Данило”. У списках за 1886–1887 н.р. інформація більш повна: “№8 – Заболотний Данило Кирилович, християнин, православний, дата народження – 2 січня 1867 р., місце народження – Подільська губернія” [25, с. 28; 26, с. 40].

На той час на природничому відділенні фізико-математичного факультету читали лекції такі видатні вчені як П.М. Бучинський, О.А. Веріго, В.В. Заленський, Ф.М. Каменський, О.О. Ковалевський, П.А. Спіро, М.О. Умов та ін. Деякі дослідники, невірно трактуючи вислів Д.К. Заболотного в “Життєписі” [8], роблять висновок, що він слухав лекції І.І. Мечникова і Л.С. Ценковського. На превеликий жаль, у період його навчання вони вже не працювали в університеті. Л.С. Ценковський покинув Одесу ще у 1871 р., а що до І.І. Мечникова, Д.К. Заболотний пригадував: “Коли я був учнем гімназії, то пам'ятаю, як учитель природознавства реального училища (де природознавство викладалося краще) говорив, що в університеті нам буде викладати І.І. Мечников (...). На жаль, І.І. Мечникова в Університеті я вже не застав, – він був зайнятий на Бактеріологічній Станції” [11, с. 20].

До речі, перше особисте їх знайомство відбулося тільки у 1893 році в Києві, коли І.І. Мечников завітав на кафедру патології до професора В.В. Підвисоцького і той представив свого молодого талановитого учня. Професор І.І. Мечников запросив Д.К. Заболотного на стажування до Пастерівського інституту, але той відмовився, посилаючись на те, що у рідному Поділлі панувала епідемія дифтерії і він повинен допомогти місцевим лікарям. До Пастерівського інституту





Д.К. Заболотний студент ІНУ
в м. Одесі

Д.К. Заболотний потрапив тільки у 1898 році. У той час Данило Кирилович був уже відомим ученим. У лабораторіях Пастерівського інституту він проводив експерименти з чуми і прослухав курс лекцій з мікробіологічної техніки [4].

Д.К. Заболотний починає навчання в університеті у дуже непрості часи. Він так пригадував свої перші роки навчання: «Починаючи з 1885 року в університетах було введено новий статут 1883 року, і скасована їх автономія. Молодь хвилювалася, збиралися на сходки, переривалася звичайна робота» [9, с. 6]. Д.К. Заболотний не залишався осторонь цих подій і повністю занурився у них. Але молодий питливий розум шукав інтелектуального задоволення, і багато часу студент приділяв науковій роботі.

Данило Кирилович багато часу приділяє позааудиторним заняттям у лабораторіях О.О. Ковалевського та О.А. Веріго. Очевидно, що саме ці дві особистості найбільше вплинули на молодого Д.К. Заболотного і залучили його до наукової роботи, якій він залишився відданим до останнього подиху.

Д.К. Заболотний пригадував, що «...ніде не почувався так добре, як в аудиторії О.О. Ковалевського» [7, с. 22]. Він захопився дослідженнями над філоксерою, яким присвячував навіть свої канікули [24].

Спогади Д.К. Заболотного надають можливість відчувати творчу атмосферу, яку створював О.О. Ковалевський навколо себе: «Для своїх наукових досліджень О.О. щоденно приходив до своєї університетської лабораторії (...). Тут під його керівництвом працювали [П.М.] Бучинський, [Я.М.] Лебединський, [М.М.] Шульгін, [І.М.] Відгальм, [С.М.] Морін і відомий у подальшому бактеріолог [В.А.] Хавкін, який вивчав у ті часи механізм руху у інфузорій» [7, с. 22].

Багато уваги приділяв роботі зі студентами талановитий учень професора О.О. Ковалевського – доцент кафедри зоології В.М. Рєпяхов. Василь Михайлович щиро зустрічав студентів, створював всі умови для роботи і знайомив з дивовижним світом мікроскопічних тварин. Очевидно, з цього юнацького захоплення і виросла у подальшому перша наукова робота Д.К. Заболотного «О свеченні живих організмів» [23]. Д.К. Заболотний узагальнив дані попередників і довів, що причини світіння лиманів і моря мають різне походження. Про це він зробив наукову доповідь «О светящихся организмах» на засіданні Новоросійського товариства природознавців: [22, с. 5].

Другим улюбленим для студентів місцем на природничому відділенні була лабораторія професора А.О. Веріго, який приділяв велику увагу дослідженням прикладного характеру. Досліджуючи процес грязеутворення в лиманах з точки зору фізичної хімії, він робить висновок про неможливість його протікання без



участі мікроорганізмів. Для перевірки цього припущення він вперше в Новоросійському університеті проводить мікробіологічні експерименти, до яких залучає всіх бажаючих студентів [19].

Та плідна навчальна і наукова робота Д.К. Заболотного була перервана арештом і відрахуванням його з університету 21 листопада 1889 р. як «призвідника безладів». Майже три місяці просидів він у камері-одиночці № 35 Одеської в'язниці. Йому загрожувало заслання, і тільки виявлена у нього тяжка хвороба (гострий поліартрит) спасла його від Сибіру [6].

У своїй автобіографії Д.К. Заболотний пише: «В університетському житті не все йшло гладко. Після однієї зі студентських сходок, що виражала протест проти масового звільнення найбільш активних студентів, прийшлося і мені порвати з університетом. Втративши можливість наукової роботи, я знайшов притулок у заснованій невдовзі перед цим І.І. Мечниковим Бактеріологічній станції. Тут розпочалась моя наукова робота у галузі вивчення мікроорганізмів снігу, лиманної води (описано новий вид інфузорій, які світяться), у подальшому холери»[9, с. 6].

Станція знаходилася у спеціально найнятому приміщенні по вул. Гульовій, 4 (нині вул. Льва Толстого, 4). Разом з Пастерівськими щепленнями тут досліджувались чума і сибірська виразка рогатої худоби. Крім цього проводились дослідження з дифтерії, тифу, холери, сухоти, малярії, вивчалися причини епізоотій серед птахів. Станція вела велику просвітницьку діяльність, влаштувала курси лекцій для земських лікарів і вперше у Росії організувала практичні заняття з бактеріології, які проводив Я.Ю. Бардах .

Не переривались зв'язки Д.К. Заболотного і з університетським професором О.А. Веріго. Бактеріологічна станція сумісно з його лабораторією проводила дослідження з проблем мікробіології Чорного моря і лиманів. Періодично ці питання розглядались на засіданнях Бальнеологічного товариства. На одному з них зробив доповідь Д.К. Заболотний.

“125 засідання (23 березня 1891 р.)

(...). Все засідання після того було присвячено доповіді г. Заболотного “О фосфорисценции соляных лиманов” (Повідомлення не надано до друку)” [23]. Ця робота була надрукована пізніше на сторінках “Южнорусской медицинской газеты” [10].

З великою повагою і вдячністю завжди пригадував Д.К. Заболотний роки, які провів він на станції: «Станція була тоді єдиним живим центром, де бився пульс істинної дослідницької наукової думки і серед нас, студентської молоді, було дуже багато бажаючих туди потрапити працювати. (...) Станція приваблювала увагу студентства, і нам було приємно там бувати» [11, с. 20].

Йому була надана можливість випробувати свої сили у різних галузях наукових досліджень, але він зупинив свою увагу на медичній мікробіології, тому перед ним постала необхідність набуття медичної освіти.

Тут, на станції Д.К. Заболотний знайомиться з Анастасією Михайлівною Турчановською, яка працювала на посаді фельдшера, і невдовзі вони обвінча-



лися. Але подружнє життя було недовгим, після смерті від пневмонії первістка (1890 р.) вони розсталися.

Після багатьох поневірянь та прохань у 1891 р. Д.К. Заболотний отримав дозвіл скласти екстерном державні іспити за університетський курс. Він одержує диплом I ступеню, і вирушає до Києва для продовження освіти, де вступає на третій курс медичного факультету університету Святого Володимира.

У цьому ж році він одружується з Людмилою Владиславівною Радецькою. Це був цивільний брак, так як за церковними законами офіційно оформити розлучення з першою дружиною було неможливо.

З від'їздом до Києва завершився перший період перебування Д.К. Заболотного в Одесі.

У 1892 році у Д.К. Заболотного народжується і немовлям помирає від кишкової інфекції другий син. Більше рідних дітей у Заболотних не було, але

Данило Кирилович усиновив 13 дітей. Першим 1911-го року взяв 6-річного Ян Гуя з Маньчжурії. Всі його родичі померли від чуми. Вчений відправив малого до дружини в Петербург. Коли сам приїхав туди, то оформив хлопцеві документи на ім'я Ян Гуй Заболотний. Інших дітей брав із рідного села Чоботарки або його околиць [18].

У 1894 році Д.К. Заболотний закінчив університет і, отримавши ступінь лікаря, був обраний молодшим асистентом кафедри загальної патології. В 1894–1895 рр. працював епідеміологом в Проскуріві на Поділлі, організував бактеріологічну лабораторію, боровся з холерою, дифтерією, встановив роль питної води в розповсюдженні холери.

На деякий час Д.К. Заболотний приїздив до Одеси під час боротьби з епідемією бубонної чуми у 1910 р., коли завдяки його активній та цілеспрямованій організаційній діяльності вдалося уникнути серйозних наслідків для життєдіяльності великого портового міста.

Другий недовготривалий період, коли Д.К. Заболотний жив і працював у м. Одесі, нараховує три роки – 1920–1923.

Україна з 1917 року була охоплена вогнем громадянської війни. Одеса декілька разів захоплювалася різними військами. 7 лютого 1920 року Червона армія остаточно зайняла місто. Одеса була охоплена висипнотифозною епідемією. З жовтня 1919 по липень 1920 року було зареєстровано 22810 захворювань. У зв'язку з цим влада утворила надзвичайну комісію – “Чрезсыптіф”, перед якою було поставлено невідкладне завдання: ліквідувати захворювання. Одеський лікар Г.С. Маткульський писав, що в першу чергу “Чрезсыптіф”: “... вимушений був створити спеціальний транспортний апарат з вивозу трупів, і за короткий час він вилучив з закладів і деяких медичних установ більше 1500 трупів” [17, с. 5]. Щоб опанувати ситуацією було вирішено запросити на допомогу місцевим лікарям Д.К. Заболотного. І хворий Данило Кирилович терміново вирушив до Одеси, куди прибув 15 лютого 1920 р. Зупинився він, як завжди, у свого учителя Я.Ю. Бардаха, син якого О.Я. Бардах писав: “У двадцять років у нас декілька років жив Д.К. Заболотний. Квартира перетворилася на центр



з боротьби з епідемією. Тут часто бували [В.К.] Стефанський, [Л.В.] Громашевський та ін.

У ті роки життя у місті завмирало рано. Вечори батько і Д.К. Заболотний проводили у бесідах. Вони обговорювали питання боротьби з епідемією, наукові проблеми, наукові новини, які уривками доходили до міста. Пригадували давнину” [3, с. 11].

Лікар Л.О. Севастьянов пригадував: “Данило Кирилович запам’ятався мені у зимовій Одесі 1920 р. серед снігових заметів. Худий, зі впалими щоками, блискучими очима, Данило Кирилович був у довгій старій шинелі з витертим коміром и тримав туго набитий чимось портфель” [24, с. 198].

У найскладніших умовах, разом з постійною діагностичною роботою, Д.К. Заболотний продовжує наукову роботу по вивченню носіїв інфекції. Разом з колегами вони шукають збудника, вивчають етіологію і імунологію висипного тифу. Професор С.М. Щасний пригадував: “Важкі роки голоду, розрухи, народного мору, коли поряд з хімікалями, ватою, склом і фуражем для коней, кроликів і свинок треба було вишукувати, у буквальному розумінні слова, хліб для співробітників, проте ні на один день не зупинили ні в одному з відділень роботи Станції” [27, с. 13].

У цих неймовірно важких обставинах Д.К. Заболотний за допомогою Я.Ю. Бардаха і В.В. Вороніна починають видавати «Праці наукової комісії з висипного тифу», і в 1920–1921 рр. виходить два випуски “Одесского сборника по сыпному тифу”.

Усвідомлюючи роль санітарної освіти у боротьбі з інфекційними хворобами, Д.К. Заболотний працює і над створенням в Одесі першого в країні Будинку санітарної просвіти, який було відкрито у 1921 році. Пізніше Данило Кирилович пригадував: “Напівголодний художник намалював портрет Пастера, стіни ми розписали плакатами, лозунгами, прикрасили розмашисто виготовленими таблицями...” [12, с. 4].

У квітні 1920 року Одеський народний університет (таку назву мав університет з 1919 р.) було розформовано як застарілу буржуазну форму освіти. Медичний факультет об’єднався з Вищими жіночими медичними курсами, і був заснований Медичний інститут Вищої школи Одеси. В січні 1921 р. йому надано назву Медичної академії, а у листопаді того ж року перейменовано в Одеський медичний інститут [21]. 18 лютого 1921 р. наказом №5 по Відділу реформ вищої школи Одеського губпрофобра професор Д.К. Заболотний призначається ректором цього навчального закладу [6].

Д.К. Заболотний одразу ж звернувся до Наркомпросу України з пропозицією заснувати при вузі самостійну кафедру епідеміології. Восени того ж року вона була відкрита. 10 грудня 1920 р, спеціальним рішенням Губвузу Одеси для розміщення кафедри епідеміології було передано приміщення колишніх Вищих жіночих медичних курсів. Д.К. Заболотний склав для кафедри навчальний план і програми з нових курсів, підготував план першого вітчизняного посібника з епідеміології. Не втратили і донині свого значення розділи цього посібника про



холеру, чуму, кишкові інфекції, що були написані на підставі багаточисельних спостережень автора [5].

За період роботи в Одеському медичному інституті Д.К. Заболотний створив наукову епідеміологічну школу, яка внесла великий доробок у розвиток науки. Представники цієї школи (Л.В. Громашевський, М.М. Соловійов та ін.) сформулювали основні принципові положення, що стали теоретичним підґрунтям епідеміології [20].

До останніх днів життя Д.К. Заболотний підтримував зв'язок з Одеським університетом і вболівав за стан розвитку тут загальної мікробіології і продовження славетних традицій своїх учителів І.І. Мечникова та Я.Ю. Бардаха. В архіві Інституту архівознавства АН України нами знайдено лист Д.К. Заболотного до ректора Одеського інституту народної освіти Т.М. Внукова, який датовано 24 червня 1929 р.:

"Дорогий Т. М. [Внуков] !

Розвиток секції і катедри мікробіології, зв'язаний з пам'яттю І.І. Мечникова і Я.Ю. Бардаха, основоположників цієї доктрини в Союзі –

найкраще можна забезпечити призначивши керівником одного з найвидатніших молодих співробітників катедри тов. [Л.Й.] Рубенчика, наукові праці якого дають йому право проводити і виконувати з успіхом сучасні завдання" [14].

Цей лист не залишився поза увагою тодішніх керівників освіти. Л.Й. Рубенчика було призначено завідувачем мікробіологічного сектору Одеського науково-дослідного зоолого-біологічного інституту, професором кафедри технології в Одеському інституті зерна і муки. Він продовжив кращі наукові традиції засновників одеської мікробіологічної школи [15].

Значну допомогу, як видатний організатор науки та талановитий педагог, академік Д.К. Заболотний надавав керівництву губернського відділу народної освіти Одеського губвиконкому. Данило Кирилович наполегливо працював у другому комітеті Губнаробразу, який охоплював діяльність вищих навчальних закладів та наукових установ. Академік Д.К. Заболотний приділяв максимум уваги переоснащенню та переобладнанню їх професійної діяльності на сучасному рівні [13].

У травні 1923 р. Д.К. Заболотний виїжджає до Страсбургу та Парижу на святкування сторіччя з дня народження Л. Пастера. Після повернення до Одеси у перших числах вересня розпочинає читати лекції, але вже 15 вересня передає кафедру епідеміології – асистенту Л.В. Громашевському. Кафедрою бактеріології він продовжує керувати до повідомлення, що йому доручено заснування ще однієї – третьої в його педагогічній практиці – кафедри мікробіології, епідеміології та вчення про дезінфекцію у Військово-медичній академії у Петрограді, яку він очолив 12 травня 1924 р.

Таким чином, майже 20 років життя та науково-педагогічної діяльності Д.К. Заболотного тісно пов'язані з м. Одесою. Тут пройшли роки його навчання та становлення як особистості та вченого.



Великий вплив на формування науково-мікробіологічних поглядів Д.К. Заболотного справили видатні вчені Одеського (Новоросійського) університету О.А. Веріго, О.О. Ковалевський, І.І. Мечников, Я.Ю. Бардах.

Д.К. Заболотний до кінця свого життя не поривав зв'язків з Alma Mater і піклувався про продовження славетних мікробіологічних традицій в Одеському університеті, які були започатковані його видатними учителями.

Великий доробок вніс Д.К. Заболотний до формування і становлення науки та вищої освіти взагалі і, зокрема, медичної мікробіології. Саме в Одесі у 20-30-ті роки ХХ ст. він заснував першу самостійну кафедру епідеміології і створив міцну епідеміологічну наукову школу в Одеському медичному інституті, першим ректором якого був.

В. А. Кузнецов

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: (050) 165 69 99, e-mail: cuznetsov@meta.ua

ОДЕССКИЙ ПЕРИОД ЖИЗНИ И НАУЧНОЙ ДЕТЕЛЬНОСТИ АКАДЕМИКА Д.К. ЗАБОЛОТНОГО (28.12.1866 – 15.12.1929)

Реферат

На основе изучения архивных материалов Института архивоведения НБУ имени В.И. Вернадского АН Украины, Государственного архива Одесской области, личных архивов преподавателей Одесского университета и литературных источников рассмотрены основные события в научно-педагогической деятельности Д.К. Заболотного, которые связаны с его пребыванием в г. Одессе в разные годы.

Ключевые слова: история, микробиология, Заболотный, Одесский университет.

V.A. Kuznetsov

Odesa National Mechnykov University
2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: (050) 165 69 99, e-mail: cuznetsov@meta.ua

ODESA PERIOD OF ACADEMICIAN D.K. ZABOLOTNY (28.12.1866 – 15.12.1929) LIFE AND SCIENTIFIC ACTIVITY

Summary

The main developments of scientific and pedagogical activity of D.K. Zabolotny connected with the years of his living in Odesa in different time have been investigated on the basis of studying the archives materials of Institute Archivistics NLU name after V.I. Vernadsky AS of Ukraine, National Archive Odesa region, individual teachers' in last archives of Odesa University and literature.

Key words: history, Microbiology, Zabolotny, Odesa University.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волков В.А., Куликова М.В. Российская профессура. XVIII начало XX вв. Биологические и медико-биологические науки. Биографический словарь. – СПб.; РХГИ, 2003. – 544 с.
2. Бабий Т.П., Коханова Л.Л., Костюк Г.Г. и др. Биологи. Биографический справочник – К.: Наукова думка, 1984. – 816 с.
3. Бардах А.Я. Воспоминания. Б.Д. Рукопис. Оригінал // Архив семьи Я.Ю. Бардаха. – 14 с.
4. Билай В.И. Даниил Кирилович Заболотный. – К.: Наукова думка, 1987. – 83 с.
5. Васильев К.Г., Чуев П.Н., Васильев К.К. Очерки истории высшей медицинской школы в Одессе. – Одесса, 1999. – 240 с.
6. Держархів Одеської обл. Ф.1395. – Оп. 1. – Од. зб. 11.
7. Заболотный Д.К. Академик А.О. Ковалевский (к 25-летию со дня его кончины) // Природа. – 1926. – № 7/8. – С. 20–26.
8. Заболотный Д.К. Життєпис // Вибрані праці. – К.: Наук. Думка, 1969. – С. 3–5.
9. Заболотный Д.К. Автобиография // Билай В.И. Даниил Кирилович Заболотный. – К.: Наукова думка, 1987. – С. 2–4.
10. Заболотный Д.К. О фосфорисценции одесских лиманов // Южнорус. мед. газ. – 1892. – № 7. – С. 78–80.
11. Заболотный Д.К. Основоположники Одесской бактериологической станции: Речь в торжественном заседании Научной конференции Института 12.09.1926 г. // Отчет Одесского государственного санитарно-бактериологического института им. И.И. Мечникова за 1925-1926 гг. – Одесса, 1927. – С. 19–21.
12. Заболотный Д.К. На саносвітній ниві // Шлях до здоров'я. – 1921. – № 2. – С. 4–5.
13. Історія Одеси / Колектив авторів. Голов. ред. В.Н. Станко. – Одеса: Друк, 2002. – 558 с.
14. Лист Президента ВУАН Д.К. Заболотного до ректора Одеського ІНО Т.М. Внукова. Автограф. Інститут архівознавства АН України. – Ф. 156. – Оп. – 1. – Спр. 49. – Л. 1а.
15. Личный листок по учету кадров Рубенчика Льва Иосифовича. Институт архівознавства НБУ імені В.І. Вернадського. Ф. – № 156, Оп. – 1, Спр. – 33, Л.л. – 1–2.
16. Маркевич А.И. Двадцатипятилетие Императорского Новороссийского университета: Ист. зап. и акад. списки. – Одеса: «Эконом.» тип., 1890. – 734+ХС с.
17. Матульский Г.С. Некоторые данные из эпидемиологии сыпного тифа в г. Одессе за 1918-1920 гг. // Одесский сборник по сыпному тифу / Под. ред. Д.К. Заболотного, В.В. Воронина, Я.Ю. Бардаха. – Вып. 2. – Одесса: Всеукр. гос. изд-во, 1921. – С. 1–7.
18. Мацелюх Б.П. Сторінки особової справи Д.К. Заболотного (до 80-річчя з дня смерті) // Мікробіологічний журнал – 2009. – Т. 71. – № 6. – С. 67.



19. Меликов П. Александр Андреевич Вериги // Журн. рус. физико-хим. общества. – 1905. – Т. 37. – Вып. 5. – С. 469–475.
20. *Одеський* медуніверситет. 1900–2000 / І.Л. Бабій, Ю.І. Бажора, В.М. Запорожан та ін.; За редакцією В.М. Запорожана. – Одеса: Изд-во Одеського мед. ун-та., 2000. – 324 с.
21. *Одесский* университет за 75 лет (1865-1940) / Отв. ред. К.П. Добролюбский. – Одесса, 1940. – 195 с.
22. *Отчет* о деятельности Новороссийского Общества Естествоиспытателей за 1890 г.
23. *Отчеты* о деятельности Одесского бальнеологического общества. Вып. IV. С октября 1887 г. по январь 1891 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. – Одесса: Русск. типогр. Исаковича, 1892.
24. *Пицык Н.Е.* Даниил Кириллович Заболотный: 1866–1929. – М.: Наука, 1988. – 303 с.
25. *Список* студентов и посторонних слушателей ИНУ в первом полугодии 1885-1886 учебного года. – Одеса: Типогр. «Одесского вестника», 1885.
26. *Список* студентов и посторонних слушателей ИНУ во втором полугодии 1886-1887 учебного года. – Одеса: Типогр. «Одесского вестника», 1887.
27. *Щастный С.М.* Одесский бактериологический институт за 40 лет // Отчет Одесского государственного санитарно-бактериологического института им. И.И. Мечникова за 1925-1926 гг. – Одесса, 1927. – С. 5–16.

Referens

1. Volkov VA, Kulykova MV Rossyyskaya professura. XVIII – nachalo XX vv. Byolohycheskye y medyko-byolohycheskye nauky. Byohrafychesky slovar'. – SPb.; RKhNY, 2003.- 544 s.
2. Babyu TP, Kokhanova LL, Kostyuk H.H. y dr. Byolohy. Byohrafychesky spravochnyk – K.: Naukova dumka, 1984. – 816 s.
3. Bardakh A Ya Vospomynaniya. B.D. Rukopys. Oryhinal // Arkhyv sem'yu Ya.Yu. Bardakha. -14 s.
4. Bylay VY. Danyyl Kyrylovych Zabolotnyy. – K.: Naukova dumka, 1987. – 83 s.
5. Vasyl'ev KH., Chuev PN., Vasyl'ev KK. Ocherky ystoriyy vysshey medytynskoy shkoly v Odesse. – Odessa, 1999. – 240 s.
6. Derzharkhiv Odes'koy obl. F.1395. – Op. 1. – Od. zb.- 11.
7. Zabolotnyy DK. Akademyk AO. Kovalevskyy (k 25-letyyu so dnya eho konchyny) // Pryroda. – 1926. – #7/8. – S. 20-26.
8. Zabolotnyy DK. Zhyttyepys // Vybrani pratsi. – K.: Nauk. Dumka, 1969. – S. 3-5.
9. Zabolotnyy DK. Avtobyohrafiya // Bylay VY. Danyyl Kyrylovych Zabolotnyy. – K.: Naukova dumka, 1987. – S. 2-4.
10. Zabolotnyy DK. O fosforystsensyy odesskykh lymanov// Yuzhnorus. med. haz. – 1892. – #7. – S. 78-80.
11. Zabolotnyy DK. Osnovopolozhnyky Odesskoy bakteryolohycheskoy stantsyy: Rech' v torzhestvennom zasedanny Nauchnoy konferentsyy Ynstytuta 12.09.1926 h.



// Otchet Odesskoho hosudarstvennoho sanytarno-bakteryolohycheskoho ynstytuta ym. Y.Y. Mechnykova za 1925-1926 hh. – Odessa, 1927. – S. 19-21.

12. Zabolotnyy DK. Na sanosvitniy nyvi // Shlyakh do zdorov'ya. – 1921. – #2. – S. 4-5.

13. Istoriya Odesy / Kolektyv avtoriv. Holov. red. V.N. Stanko. – Odesa: Druk, 2002. – 558 s.

14. Lyst Prezydenta VUAN DK. Zabolotnoho do rektora Odes'koho INO TM. Vnukova. Avtohaf. Instytut arkhivoznavstva AN Ukrayiny. – F. 156. – Op. – 1. – Spr. 49. – L. 1a.

15. Lychnyy lystok po uchetu kadrov Rubenchyka L'va Yosyfovycha. Instytut arkhivoznavstva NBU imeni V.I. Vernads'koho. F.- #156, Op. – 1, Spr. – 33, L.1. -1-2.

16. Markevych AY. Dvadsatypyatiletye Ymperatorskoho Novorossyyskoho unyversyteta: Yst. zap. y akad. spysky. – Odesa: «Эконом.» typ., 1890. – 734+KhS s.

17. Matul'skyi HS. Nekotorye dannye yz epydemyolohyy synnoho tyfa v h. Odesse za 1918-1920 hh. // Odesskyi sbornyk po synnomu tyfu / Pod. red. DK Zabolotnoho, VV Voronyna, YaYu Bardakha. – Vyp. 2. – Odessa: Vseukr. hos. yzd-vo, 1921. – S. 1-7.

18. Matselyukh BP Storinky osobovoyi spravy DK. Zabolotnoho (do 80-richchya z dnya smerti) // Mikrobiol. zhurn., 2009, T. 71, # 6 – S. 67.

19. Melykov P. Aleksandr Andreevych Veryho // Zhurn. rus. fyzyko-khym. obshchestva. – 1905. – T. 37. – Vyp. 5. – S. 469–475.

20. Odes'kyi meduniversitytet. 1900-2000 / I.L. Babiy, Yu.I. Bazhora, VM. Zaporozhan ta in.; Za redaktsiyeyu VM. Zaporozhana. – Odesa: Yzd-vo Odes'koho med. un-ta., 2000. – 324 s.

21. Odesskyi unyversytet za 75 let (1865-1940) / Otv. red. K.P. Dobrolyubskyy. – Odessa, 1940. – 195 s.

22. Otchet o deyatel'nosti Novorossyyskoho Obshchestva Estestvoispytateley za 1890 h.

23. Otchety o deyatel'nosti Odesskoho bal'neolohycheskoho obshchestva. Vyp. IV. S oktyabrya 1887 h. po yanvar' 1891 h. / Pod red. d-ra M. Pohrebynskoho. – Odessa: Russk. typohr. Ysakovycha, 1892.

24. Pytsyk N.E. Danyyl Kyrrylowych Zabolotnyy: 1866-1929. – M.: Nauka, 1988. – 303 s.

25. Spysok studentov y postoronnykh slushateley YNU v pervom poluhodyy 1885-1886 uchebnogo hoda. – Odesa: Typohr. «Odesskoho vestnyka», 1885.

26. Spysok studentov y postoronnykh slushateley YNU vo vtorom poluhodyy 1886-1887 uchebnogo hoda. – Odesa: Typohr. «Odesskoho vestnyka», 1887.

27. Shchastnyy SM. Odesskyi bakteryolohycheskyi ynstytut za 40 let // Otchet Odesskoho hosudarstvennoho sanytarno-bakteryolohycheskoho ynstytuta ym. Y.Y. Mechnykova za 1925-1926 hh. – Odessa, 1927. – S. 5-16.

Стаття надійшла до редакції 08.12.2016 р.



**ХІІ МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА
КОНФЕРЕНЦІЯ daROSTIM 2016 «БІОТЕХНОЛОГІЯ
ДЛЯ АГРАРНОГО ВИРОБНИЦТВА ТА ЗАХИСТУ
ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА»**

Україна, м. Одеса, 7–10 вересня 2016

ХІІ Міжнародна науково-практична конференція daRostim 2016 «Біотехнологія для аграрного виробництва та захисту природного середовища» була організована Інститутом прикладної біотехнології ФРН та Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова і пройшла в м. Одесі (Україна) з 7 по 10 вересня 2016 року.

Захід відбувся за участю Товариства мікробіологів України, Спільки біологів та біотехнологів Одеси та за підтримки Міністерства освіти і науки України.

До початку роботи конференції було сформовано програму та видано збірник матеріалів конференції, який включив 93 доповіді на 245 сторінках. У роботі конференції взяли участь більше 150 вчених та підприємців з України, Німеччини, Польщі, Казахстану, Білорусі, Молдови, Словаччини та Росії.

Ректор Одеського національного університету імені І.І. Мечникова професор Коваль І.М., голова оргкомітету конференції професор Іваниця В.О., директор Інституту прикладної біотехнології з ФРН професор Новік Вольфганг, експерт з питань кооперації в області наукових досліджень за завданням Федерального міністерства освіти та наукових досліджень Німеччини Еріх Бістрікер, інші члени наукового оргкомітету конференції у присутності журналістів, офіційних представників урочисто оголосили про відкриття заходу.

В ході роботи конференції було заслухано 6 пленарних, 36 усних та представлено 46 стендових доповідей за основними секціями:

1. Біотехнології в аграрному виробництві
2. Природні та штучні сполуки як регулятори росту та захисту рослин
3. Біотехнології для захисту природного середовища та знешкодження промислових відходів
4. Мікроорганізми та їх роль в природних екосистемах.

Протягом трьох робочих днів конференції учасники запропонували свої варіанти вирішення проблем, пов'язаних з розвитком аграрного виробництва, ремедіацією і захистом природного середовища, утилізацією відходів; обговорили можливості застосування мікробних препаратів, природних та штучних сполук для захисту та стимуляції росту рослин; обговорили роль мікроорганізмів в природних екосистемах, а також фундаментальні питання взаємовідносин мікроорганізмів та рослин.

Великий інтерес викликали пленарна доповідь члена-кореспондента НАНУ проф. Іутинської Г.О., присвячена стратегії створення багатофункціональних



біопрепаратів нового покоління, пленарна доповідь професора з ФРН Новіка В. на тему росту продуктивності рослинництва при обробці дослідних полів Німеччини комбінованими фітопрепаратами, секційні доповіді групи вчених з Республіки Беларусь про прикладні результати дії розроблених бактеріальних препаратів як стимуляторів росту і для захисту рослин, доповіді дослідників зі «Львівської політехніки» про застосування біотехнологій у фармації, вчених з Одеського національного університету імені І.І. Мечникова про використання біотехнологічних методів для рішення екологічних проблем і багато іншого.

Доповідь експерта з питань кооперації в області наукових досліджень з Німеччини Еріха Бістрікера розкрила великі можливості і показала постійно зростаючий інтерес до кооперації наукових досліджень в галузі біотехнологій між Україною та країнами Євросоюзу.

Конференція мала науково-практичний характер. У процесі насиченої конструктивної роботи учасники обмінялися досвідом, знайшли нових партнерів, виробили спільні концепції для подальшого науково-технічного співробітництва, розширення бізнесу та спільних наукових досліджень.

Учасниками конференції було відзначено високий рівень фундаментальних і прикладних досліджень, представлених у доповідях, а також активну участь у роботі конференції та зростаючий інтерес до наукових проблем молодих вчених України, Білорусі, Молдови і ін..

Більш докладнішу інформацію читайте на офіційному сайті заходу: <http://biosconf2016.onu.edu.ua>.

Блайда І. А.



Шановні автори!

До правил оформлення рукописів статей внесено зміни, які будуть діяти з 2016 року. До розгляду редколегія буде приймати рукописи оформлені належним чином за вимогами журналу.

Внесення змін до оформлення списку використаних джерел продиктовано вимогами міжнародних наукометричних баз, для ідентифікації авторів, визначення індекса цитування авторів.

«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, біосенсиори, діагностикуми, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

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

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

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють 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 додаються реферати українською, російською та англійською мовами.

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 англійськомовних 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 вказати 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 абревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

- 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).
 - Молекулярну масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.
 - При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
 - Активність ферментів виражають в мкмольх 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 ммольх/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 посилань літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англомовні 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.

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

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

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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.

Klochkov 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, Djourmanski 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, Lukyanenko 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 В. Г. Вітвицька

Підписано до друку 21.12.2016 р. Формат 70x100/16.

Ум.-друк. арк. 10,32. Тираж 100 пр.

Зам. № 1526.

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