

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 3 рази на рік з 2019 року
Засновано у липні 2006 року

№ 3(47)
2019

Одеса
ОНУ
2019

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

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В. О. Іваниця (Одеса, Україна)
ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т. О. Філіпова (Одеса, Україна)
ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т. В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ
А. Анадон (Мадрид, Іспанія), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпро, Україна),
Б. М. Галкін (Одеса, Україна), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Г. О. Іутинська (Київ, Україна),
Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н. К. Коваленко (Київ, Україна), І. К. Курдіш (Київ, Україна),
І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), І. І. Панчук (Чернівці, Україна),
М. В. Пагика (Київ, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна),
Л. Ф. Суходуб (Суми, Україна), Ф. І. Товкач (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія).

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

**Відповідно до наказу МОН України № 1301 від 15.10.2019 р.
входить до Переліку наукових фахових видань України (категорія «Б»).**

Видання реферується та індексується в наукометричних базах даних: «Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.urau.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Research Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

Завідувач редакцією Н. Г. Юргелайтіс
Редактори: Л. Б. Котлярова, І. В. Райко
Адреса редакції:
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2019

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

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), G. O. Iutyńska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina), I. I. Panchuk (Chernivtsi, Ukraine), M. V. Patyka (Kyiv, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine), L. F. Sukhodub (Sumy, Ukraine) F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine),

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

According to the order of the Ministry of Education and Science of Ukraine № 1301 from 15.10.2019 it is included in the List of scientific professional editions of Ukraine (category "B").

The edition is referenced and indexed in the scientific metric databases: «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List, Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals, Scientific Periodicals of Ukraine (journal.uran.ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google Scholar, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Research Bib, e-LIBRARY, IBI Factor

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

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

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

© Odesa National Mechnykov
University, 2019

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Л.А. Коломієць, Д.М. Ложко, В.М. Заєць, О.Ю. Чуніхін, Н.В. Гордовська, О.І. Корнелюк ВПЛИВ ДЕКСТРАНУ 70 НА АГРЕГАЦІЮ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II	6
О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, С.Л. Міресь, К.М. Лисова ВПЛИВ НІКОТИНОЇЛГІДРАЗОНІВ І КОМПЛЕКСІВ ГЕРМАНІЮ ТА СТАНУМУ НА ЇХ ОСНОВІ НА РІСТ ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ	19
О.О. Авксентьєва ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ <i>ALOE VERA</i> НА МОРФОГЕНЕТИЧНІ РЕАКЦІЇ ЗА МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ДЕКОРАТИВНИХ СУКУЛЕНТІВ	34
М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, М.С. Джура, Л.М. Стрезєва, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> ЗА ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ АНАЛОГІВ 2-ГЕПТИЛ-3-ГІДРОКСИ-4-ХІНОЛОНУ	47
Н.Ю. Васильєва, І.В. Страшнова, М.А. Васильєв, І.П. Метеліцина СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>LACTOBACILLUS</i> , ІЗОЛЬОВАНИХ З ЧОРНОМОРСЬКИХ ГУБОК, ДО АНТИБІОТИКІВ І ВАЖКИХ МЕТАЛІВ	58
Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця, І.П. Конуп, О.Г. Горшкова, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, М.М. Чабан ОЧИЩЕННЯ ВОДИ ВІД ФЕНОЛУ БАКТЕРІЯМИ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i> , ІММОБІЛІЗОВАНИМИ НА ПРИРОДНИХ І СИНТЕТИЧНИХ НОСІЯХ	78
Н.І. Теслюк, І. Аврамович УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ АДАПТАЦІЇ МІКРОКЛОНІВ <i>PAULOWNIA TOMENTOSA</i> ДО УМОВ <i>IN VIVO</i> З ВИКОРИСТАННЯМ БАКТЕРІЙ <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ONU 500	92
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	103

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

L.A. Kolomiets, D.M. Lozhko, V.M. Zayets, A.Yu. Chunihin, N.V. Gordovska, A.I. Kornelyuk INFLUENCE OF THE DEXTRAN 70 ON AGGREGATION ANTITUMOR CYTOKINE EMAP II	6
O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, S.L. Mipros, K.M. Lysova INFLUENCE OF NICOTINOYLHYDRAZONES AND GE(IV) AND SN(IV) COMPLEXES BASED ON THEM ON THE GROWTH OF \ PHYTOPATHOGENIC FUNGI	19
O.O. Avksentieva INVESTIGATION OF <i>ALOE VERA</i> EXTRACT EFFECT ON MORPHOGENETIC REACTIONS DURING MICROCLONAL PROPAGATION OF ORNAMENTAL SUCCULENTS	34
M.B. Galkin, S.V. Vodzinsky, M.S. Dzhura, L.M. Strezeva, B.M. Galkin T.O. Filipova BIOFILM FORMATION BY <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> STRAINS IN PRESENCE OF SIGNAL QUINOLON SYNTHETIC ANALOGUES	47
N.Yu. Vasylieva, I.V. Strashnova, M.A. Vasyliiev, I.P. Metelitsyna RESISTANCE OF <i>LACTOBACILLUS</i> STRAINS ISOLATED FROM THE BLACK SEA SPONGES TO ANTIBIOTICS AND HEAVY METAL	58
T.V. Gudzenko, V.O. Ivanytsia, P. Konup, O.G. Gorshkova, O.V. Voliuvach, T.O. Belyaeva, M.M. Chaban PURIFICATION OF WATER FROM PHENOL BY BACTERIA OF THE GENUS <i>PSEUDOMONAS</i> IMMOBILIZED ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS	78
N. Tesliuk, I. Avramovych IMPROVING OF ADAPTATION METHODS OF PAVLOWNIYA TOMENTOSA MICROCLONES TO CONDITIONS <i>IN VIVO</i> WITH USE OF BACTERIA <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> ONU50	92
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	103

УДК 579.222:577.217

**Л.А. Коломієць¹, Д.М. Ложко¹, В.М. Заєць¹, О.Ю. Чуніхін²,
Н.В. Гордовська^{1,3}, О.І. Корнелюк¹**¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143,
тел.: +38(044) 526 11 69, +38(044) 200 03 56²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, Київ, 01030,³Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ВПЛИВ ДЕКСТРАНУ 70 НА АГРЕГАЦІЮ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II

Мета. Визначення впливу температури на агрегаційні властивості рекомбінантного цитокіна ЕМАР II (ендотеліальний моноцит, що активує поліпептид II) та його комплексу з поліукридом декстраном 70 в розчині. **Методи.** Бактеріальна експресія рекомбінантного білка, метал-хелатувальна афінна хроматографія, динамічне розсіювання світла, моделювання просторової структури. **Результати.** Досліджені агрегаційні властивості рекомбінантного цитокіна ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 і встановлені розміри комплексу методом динамічного розсіювання світла. Показана стабілізація цитокіна ЕМАР II декстраном 70 при підвищенні температури в межах від 20 °С до 55 °С. За допомогою комп'ютерного моделювання молекулярного докінгу запропоновані можливі механізми агрегації цитокіну ЕМАР II та його стабілізації декстраном 70. **Висновки.** Отримані результати свідчать, що протиухлинний рекомбінантний цитокін ЕМАР II утворює білкові агрегати при підвищенні температури. Стабільність цитокіна ЕМАР II в розчині підвищується в результаті взаємодії з декстраном 70. Стабілізація структури ЕМАР II в комплексі розширює можливості досліджень протиухлинних властивостей цього цитокіна та його практичного використання.

Ключові слова: цитокін ЕМАР II, декстран 70, агрегація, молекулярний докінг, *E. coli* BL21(DE3)pLysE.

Терапевтичні засоби на основі білків стають все більш важливим класом фармацевтичних препаратів, які мають низку переваг перед загальноживаними лікарськими препаратами. Слід зазначити, що фармацевтичні препарати на основі білків проявляють більшу специфічність щодо мішеней та меншу токсичність. Білкові терапевтичні засоби використовуються в широкому спектрі медичних застосувань, включаючи гормональну терапію, онкологію, аутоімунні порушення, а також як протиінфекційні агенти [1, 2]. Одним із складних аспектів фармацевтичної розробки терапевтичних засобів на основі білків є значна лабільність їхньої структури, що робить цей клас препаратів дуже сприйнятливим до деградації під час виробництва, зберігання та введення в організм в якості лікарських препаратів [3]. В зв'язку з цим проблемі

© Л.А. Коломієць, Д.М. Ложко, В.М. Заєць, О.Ю. Чуніхін, Н.В. Гордовська, О.І. Корнелюк, 2019



агрегації як важливому аспекту цілісності лікарських препаратів приділяється особлива увага.

При виробництві білкових терапевтичних засобів агрегація білків може виникати як в процесі експресії та очистки білків, так і в процесі зберігання таких ліків. Агрегати білків можуть викликати імуногенну реакцію у пацієнтів та призводити до значного зниження ефективності лікарських засобів. Саме тому агрегація білків вважається одним із найважливіших аспектів якості при розробці та оцінці біопрепаратів. При порушенні нативної структури білки втрачають функціональну активність, стають менш стабільними, а також підвищується їх здатність до агрегації, що може призвести до широкого спектру патологічних станів як клітин, так і організму в цілому [4, 5].

Найбільш ефективним засобом боротьби з агрегацією білків є використання лігандів, які запобігають утворенню білкових агрегатів. Ці допоміжні речовини широко використовують під час виробництва, очистки та приготування лікарських форм різних медичних препаратів [6].

Ендотеліальний моноцит, що активує поліпептид II (ЕМАР II) — цитокін, який проявляє протипухлинну та протизапальну активність, бере участь в ангіогенезі, ембріогенезі та деяких патологічних процесах, індукує апоптоз клітин ендотелію [7, 8]. Експресія ЕМАР II в тканинах підвищується при їх пошкодженні, що пов'язано з участю ЕМАР II в реакціях запалення: його здатністю залучати нейтрофіли в місце пошкодження, підвищувати чутливість тканин до фактора некрозу пухлин (ФНП) та індукувати апоптоз клітин [9–11].

Метою даної роботи було дослідження агрегаційних властивостей та розмірів рекомбінантного цитокіну ЕМАР II та його комплексу з поліцукридом декстраном 70 для подальшого впровадження в практику та проведення доклінічних досліджень.

Матеріали і методи

Для отримання протипухлинного цитокіна ЕМАР II в роботі використовували штам-продуцент рекомбінантного білка *E. coli* BL21(DE3)pLysE ("Stratagene", США), трансформований плазмідною конструкцією pET30a-ЕМАР II. Експресуюча конструкція pET30a-ЕМАР II була створена на базі вектору pET-30a(+) ("Novagen", США) і містила клоновану кДНК гену ЕМАР II під контролем промотора фага Т7. Селективним маркером плазміди є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцину. Плазмідну ДНК виділяли за допомогою Gene JET Plasmid Miniprep Kit фірми "Thermo Scientific". Концентрацію плазмідної ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000 ("Thermo Scientific", Литва).

Всі процедури з трансформації плазмідної конструкції pET30a-ЕМАР II в компетентні клітини *E. coli* та аналіз плазмід проводили методом електрофорезу в 0,7–1% агарозному гелі згідно [12].

Вирощування культури *E. coli* BL21(DE3)pLysE та індукцію експресії рекомбінантного ЕМАР II в бактеріальній культурі проводили в середовищі Лурія-Бертані (LB) (5 г дріжджового екстракту, 10 г триптон, 10 г NaCl на



1л) згідно [13]. Оптичну густину культури (OG_{600}) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм. Для індукції синтезу рекомбінантних білків до бактеріальної культури додавали індуктор експресії ППТГ (ізопропіл- β -тіоґалактопіранозид, “Sigma”, США) до кінцевої концентрації 1,25 мМ.

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту бактеріальних клітин після їх лізису за допомогою ультразвукового дезінтегратора методом метал-хелатувальної хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, Germany) [13]. Аналіз бактеріального білка проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12% гелі [12], використовуючи суміш маркерних білків (Thermo Scientific, Литва). Гелі забарвлювали Coomassie blue R-250. Концентрацію очищеного рекомбінантного білка ЕМАР II визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнт екстинкції $8730 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при довжині хвилі 280 нм. Оскільки синтезовані у векторі рЕТ30а білки містять в своїй N-кінцевій амінокислотній послідовності кодований вектором 6His-tag, для його відщеплення від ЕМАР II використовували ентерокіназу за стандартною методикою виробника (New England Biolabs) та рекомбінантний цитокін додатково очищали на колонці з Ni-NTA агарозою. Високий ступінь чистоти отриманих препаратів рекомбінантного ЕМАР II було показано раніше [14].

Нанокмпозитний препарат ЕМАР II з декстраном 70 було створено згідно запатентованої корисної моделі [15]. Декстран 70 (“Біотика АТ”, Словаччина) розчиняли у аліквоті білка в 50 мМ Na-фосфатному буфері, рН 7,5 з 150 мМ NaCl та перемішували при кімнатній температурі протягом 2 год.

Для дослідження використовували ЕМАР II в концентрації 0,6 мг/мл (6,87 мкМ) та декстран 70 в концентрації 50 мг/мл (7,1 мМ). Стехіометрія зв'язування декстрану 70 з цитокіном становила близько 1:1. Стехіометрія зв'язування (n) та константа зв'язування (K_d) були обчислені програмою OriginPro 8.0 згідно наведеного нижче рівняння:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_a) + n \log([\beta - L]),$$

де F_0 та F – інтенсивність флуоресценції білка при максимальній довжині хвилі в присутності ліганду та без нього відповідно, K_a – константа асоціації, а n – стехіометрія комплексу. Числові значення досліджуваних величин були отримані за допомогою функції *Analysis* \rightarrow *Fitting* \rightarrow *Fit Linear*. Рівняння отримано в результаті обчислень

$$y = a + bx, \text{ де } y \text{ та } x \text{ відповідають виразам } \log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) \text{ та } \log([\beta - L]),$$

в той час як a та b – $\log(K_a)$ та n відповідно.

Вимірювання світлорозсіювання проводили на лазерному кореляційному спектрометрі “ZetaSizer-3” обладнаному He-Ne лазером ЛГН-111 (P = 25 мВт, $\lambda = 633 \text{ нм}$) з діапазоном вимірювання приладу від 1 нм до 20 мкм.



Реєстрацію та статистичне опрацювання лазерного випромінювання, розсіяного від розчину ЕМАР II та його комплексу з декстраном-70, проводили 5-разово протягом 60 с в діапазоні температур від +20 °С до +55 °С під кутом розсіювання 90°.

Отримані результати вимірювань обробляли за допомогою сервісної комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.61.

Моделювання взаємодії між просторовими структурами ЕМАР II проводили за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 [16] та SymmDock [17]. Візуалізацію, аналіз просторової структури та розрахунок радіусу гірації здійснювали у програмному забезпеченні UCSF Chimera [18]. Моделювання комплексу ЕМАР II з декстраном 70 здійснювали за допомогою програми AutoDock Vina [19]. Для проведення докінгу використано просторову структуру ЕМАР II, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (PDB ID: 1EUJ).

Результати та їх обговорення

Дослідження проводили на високоочищеному препараті рекомбінантного цитокіна ЕМАР II.

На початковому етапі роботи була проведена оцінка розміру поліцукриду декстрану 70 у розчині при кімнатній температурі методом динамічного розсіювання світла. Аналіз даних показав, що гідродинамічний діаметр полімерного вуглеводу знаходиться в діапазоні 0,4–4 нм. Наші дослідження по утворенню комплексу декстрану 70 з цитокіном при різних концентраціях полімеру показали, що стехіометрія зв'язування декстрану з ЕМАР II становить близько 1:1. Раніше нами було показано, що комплекс ЕМАР II з декстраном 70 зберігає функціональну цитокінову активність [9]. Всі проведені в роботі дослідження по агрегації були проведені для цього комплексу.

Температурне плавлення рекомбінантного ЕМАР II та його комплексу з декстраном 70 вивчали в діапазоні температур 20–55 °С. Досліджуваний інтервал температур відповідає на наш погляд граничним температурним умовам використання та збереження білкових лікарських препаратів.

Аналіз спектрів ЕМАР II показав, що при кімнатній температурі в розчині білка присутні значні за розмірами осередки розсіювання світла з розмірами 20–40 нм, що, ймовірно, зумовлено процесом утворення агрегатів білка різного розміру, оскільки теоретично розрахований комп'ютерним методом діаметр одної молекули ЕМАР II становить близько 3 нм. При подальшому підвищенні температури спостерігається плавлення білка, що супроводжується постійним зростанням розмірів агрегатів під впливом температури (рис. 1).

Наступним кроком було дослідження розмірів комплексу ЕМАР II з декстраном 70 у розчині при різних температурах. З графіка на Рис.1 видно, що розміри комплексу ЕМАР II–декстран 70 при зростанні температури значно відрізняються від розмірів білка ЕМАР II. При підвищенні температури відбувається значне підвищення гідродинамічного діаметру часток вільного цитокіна у розчині. В той же час з підвищенням температури розмір частинок комплексу ЕМАР II–декстран 70 не змінюються і така тенденція зберігається



до температури 55 °С. Ці дані свідчать про те, що комплекс ЕМАР II– декстран 70 досить стабільний і не руйнується при високих температурах, а також що поліцукрид декстран 70 стабілізує білкову глобулу ЕМАР II та перешкоджає процесу агрегації.

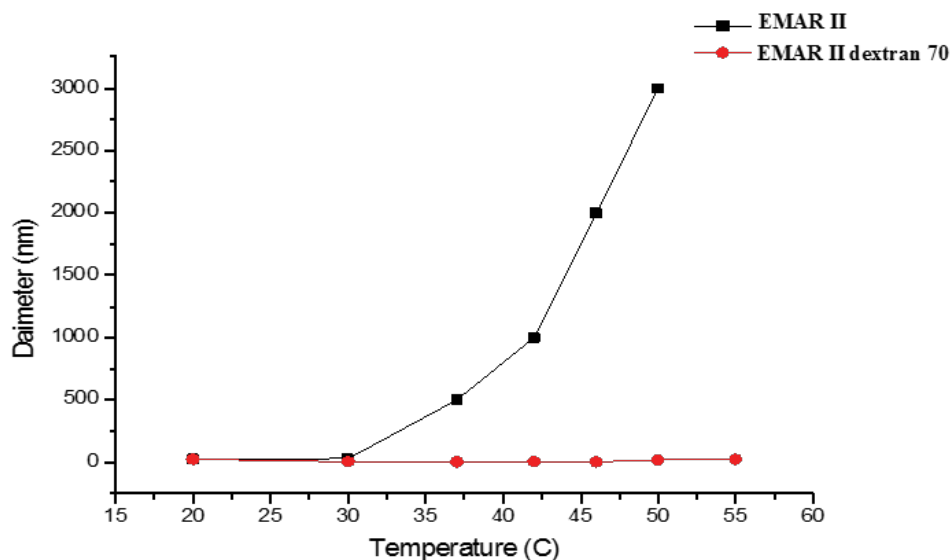


Рис. 1. Розміри білка ЕМАР II (1) та комплексу ЕМАР II з декстраном 70 (2) у розчині за різних температур

Fig. 1. Dimensions of EMAR II protein (1) and EMAR II complex with dextran 70 (2) in solution at different temperatures

Щоб з'ясувати природу формування агрегатів білка ЕМАР II проводили комп'ютерне моделювання взаємодії між окремими мономерами білка за допомогою веб-серверів для макромолекулярного докінга Cluspro 2.0 та SymmDock. Для комп'ютерного моделювання було використано просторову структуру ЕМАР II, визначену методом рентгеноструктурного аналізу (Protein Data Bank код 1EUJ). Амінокислотна послідовність цитокіна ЕМАР II представлена на Рис. 2.

Аналіз просторових структур виявив, що одну з ключових ролей у формуванні контакту між різними молекулами ЕМАР II відіграє неструктурована петля $^{34}\text{DVGEIAPR}^{41}$ молекули білка (в амінокислотній послідовності ЕМАР II виділена), яка при взаємодії з іншою молекулою білка блокує гідрофобну триптофанову “кишеню” на його поверхні (рис. 3).

Взаємодія між неструктурованою петлею і амінокислотним оточенням триптофанового залишка має гідрофобний характер, що може забезпечувати достатній рівень енергії зв'язування між ними, а просторова структура петлі $^{34}\text{DVGEIAPR}^{41}$ відповідає формі триптофанової “кишені”. Завдяки цьому результати моделювання комплексів ЕМАР II обома веб-серверами є практично ідентичними (рис. 4, 5). Таким чином, аналіз отриманих результатів свідчить, що ймовірним початковим механізмом утворення агрегатів ЕМАР II у розчині при підвищених температурах є гідрофобна взаємодія між молекулами білка.



10 20 30 40 50 60
 SKPIDVSRLD LRIGCIITAR KHPDADSLYV EEVDVGEIAP RTVVVSGLVNH VPLEQMQRNM
 70 80 90 100 110 120
 VILLCNLKPA KMRGVLSQAM VMCASSPEKI EILAPPNGSV PGDRITFDAF PGEPDKELNP
 130 140 150 160 166
KKKIWEEQIQP DLHTNDECVA TYKGVPFVEVK GKGVCRAQTM SNSGIK

Рис. 2. Амінокислотна послідовність ЕМАР II. Неструктурована ділянка ³⁴DVGEIAPR⁴¹ та амінокислотні залишки, що входять до триптофаної "кишені" виділені курсивом та підкреслені

Fig. 2. Amino acid sequence of EMAP II. The unstructured ³⁴DVGEIAPR⁴¹ region and the amino acid residues included in the tryptophan pocket are italicized and underlined

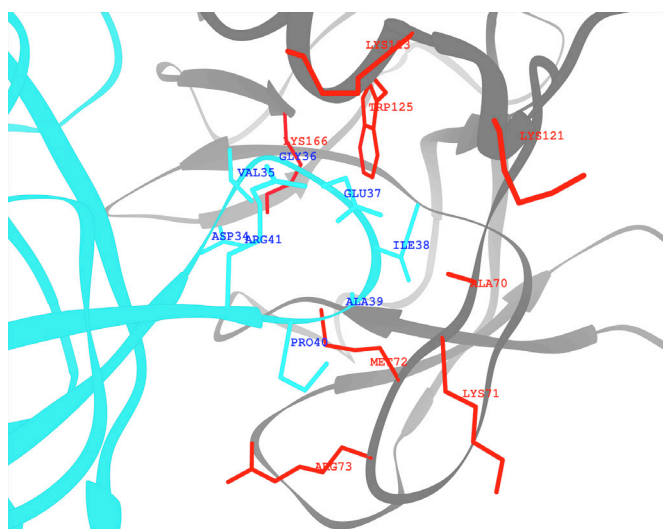


Рис. 3. Формування молекулярних контактів між молекулами ЕМАР II в процесі утворення агрегатів білка. На одній молекулі ЕМАР II зображена неструктурована петля ³⁴DVGEIAPR⁴¹ (виділена синім кольором), а на іншій молекулі ЕМАР II зображені амінокислотні залишки (виділені червоним кольором), що входять до триптофаної "кишені"

Fig. 3. Formation of molecular contacts between EMAP II molecules during the formation of protein aggregates. One EMAP II molecule shows an unstructured loop ³⁴DVGEIAPR⁴¹ (highlighted in blue) and the other EMAP II molecule shows amino acid residues (highlighted in red) that belong to the tryptophan "pocket"

Для з'ясування механізму стабілізації протипухлинного препарату ЕМАР II декстраном 70 проводили комп'ютерний докінг поліцукриду з цитокіном за допомогою програми AutoDock Vina (рис. 6). Отримані результати по докінгу та моделюванню утворення агрегатів ЕМАР II вказують на те, що можливий механізм перешкоджання агрегації ЕМАР II декстраном 70 полягає у зв'язуванні поліцукриду з неструктурованою петлею ³⁴DVGEIAPR⁴¹ та гідрофобною триптофаною "кишенею" в структурі білка. Згідно моделей у зв'язуванні декстрана 70 з ЕМАР II залучені такі залишки, як Arg12,

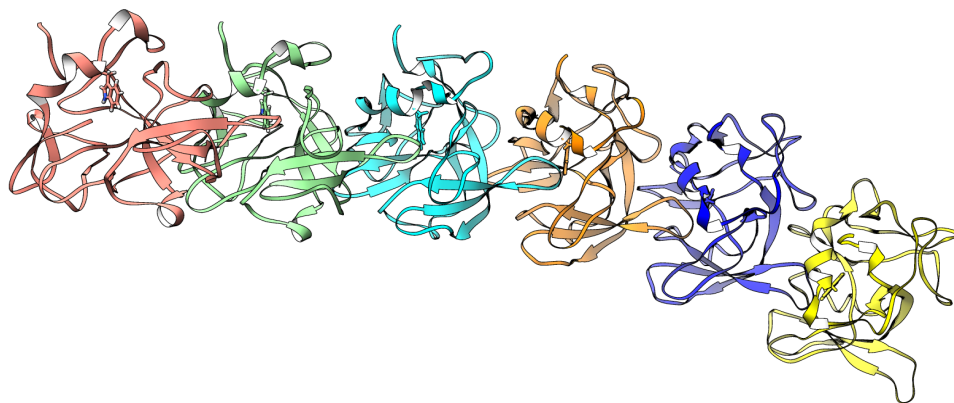


Рис. 4. Модель просторової структури агрегатів EMAP II, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу окремих молекул EMAP II за допомогою веб-сервера Cluspro 2.0. Різними кольорами виділені молекули EMAP II, які взаємодіють між собою, утворюючи агрегат

Fig. 4. Model of the spatial structure of EMAP II aggregates resulting from macromolecular docking of individual EMAP II molecules via the Cluspro 2.0 web server. EMAP II molecules interacted with each other to form an aggregate are distinguished by different colors

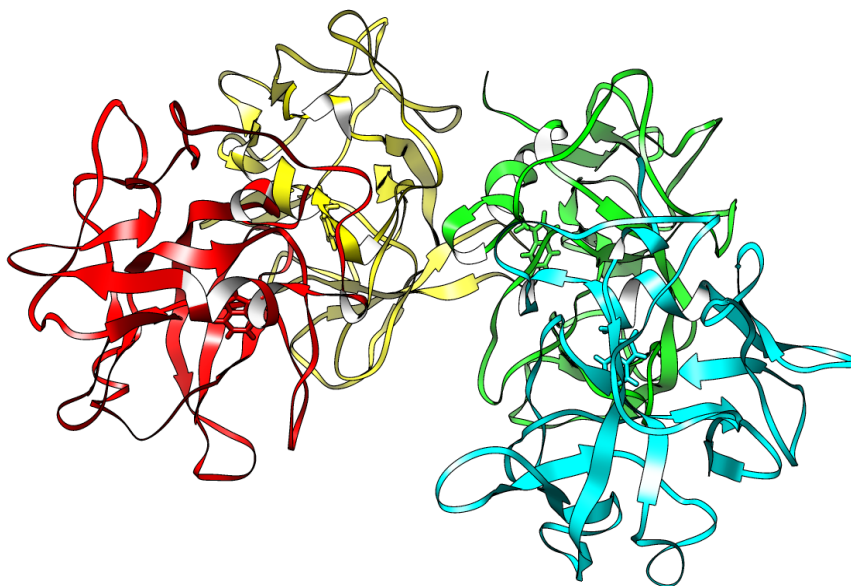


Рис. 5. Модель просторової структури агрегатів молекул EMAP II, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу двох молекул EMAP II за допомогою веб-сервера SymmDock. Різними кольорами виділені молекули EMAP II, які взаємодіють між собою, утворюючи агрегат

Fig. 5. Model of the spatial structure of the aggregates of EMAP II molecules resulting from macromolecular docking of two EMAP II molecules using the SymmDock web server. EMAP II molecules interacted with each other to form an aggregate are distinguished by different colors

Gly36, Glu37, Ile38, Arg41, Lys68, Lys71, Met72, Arg73, Leu76, Lys116, Asn119, Lys121, Lys123, Trp125, Lys166 (рис. 6).

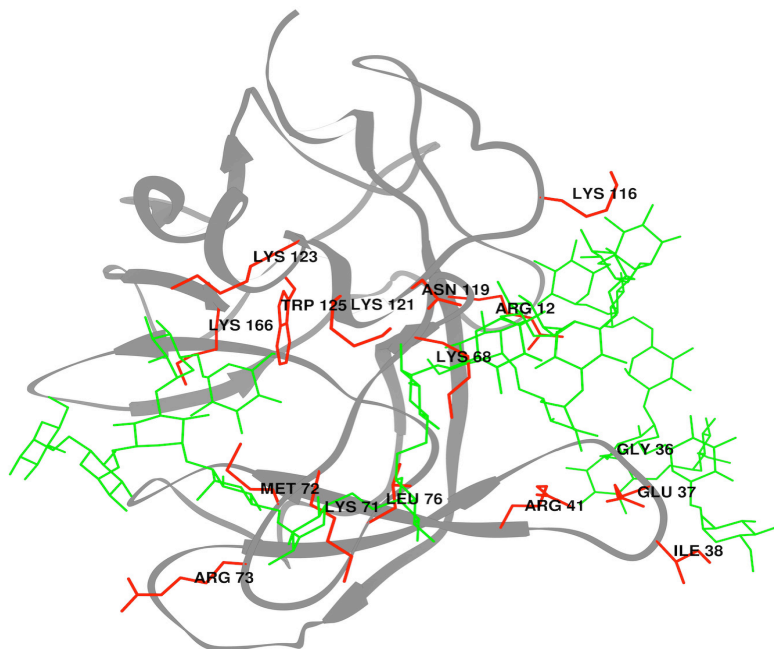


Рис. 6. Модель просторової структури комплексу ЕМАР II–декстран 70, отриманої в результаті макромолекулярного докінгу молекул ЕМАР II та декстрану 70 за допомогою програми AutoDock Vina. Залишки білка, які зв’язуються з поліцукридом виділені червоним кольором, а декстран 70 – зеленим

Fig. 6. Model of the spatial structure of the EMAP II – dextran 70 complex obtained by macromolecular docking of EMAP II molecules and dextran 70 using AutoDock Vina. The protein residues that bound to the polysaccharide are highlighted in red and dextran 70 in green

Отже, згідно даних комп’ютерного моделювання структури комплексу ЕМАР II з поліцукридом окремі молекули декстрану 70 блокують потенційні сайти на поверхні білка, відповідальні за утворення агрегатів ЕМАР II. Результати по моделюванню узгоджуються з експериментальними даними по термостабілізації комплексу, отриманими методом динамічного світлорозсіювання.

В результаті дослідження впливу температури на агрегаційні властивості протираковинного цитокіну ЕМАР II та створено термостабільний комплекс білка з декстраном 70 зі зниженою агрегацією. Термостабільність комплексу відкриває перспективи для подальшого використання ЕМАР II в фармакологічних дослідженнях як нового потенційного протираковинного препарату.

Л.А. Коломієць¹, Д.М. Ложко¹, В.Н. Заец¹, А.Ю. Чуніхін²,
Н.В. Гордовська^{1,3}, А.И. Корнелюк¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143,
тел.: +38 (044) 526 11 69, +38 (044) 200 03 56

²Институт биохимии им. О. В. Палладина НАН Украины,
ул. Леонтовича, 9, 01030, Киев,

³Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01601, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ДЕКСТРАНА 70 НА АГРЕГАЦИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА ЕМАР II

Реферат

Цель. Определение влияния температуры на агрегационные свойства рекомбинантного цитокина ЕМАР II (эндотелиальный моноцит активирующий полипептид II) и его комплекса с полисахаридом декстраном 70 в растворе. **Методы.** Бактериальная экспрессия рекомбинантного белка, металл-хелатирующая афинная хроматография, динамическое рассеяние света, моделирование пространственной структуры. **Результаты.** Исследованы агрегационные свойства рекомбинантного цитокина ЕМАР II и его комплекса с декстраном 70 и установлены размеры комплекса методом динамического рассеивания света. Показана стабилизация цитокина ЕМАР II декстраном 70 при повышении температуры в пределах от 20 °С до 55 °С. С помощью компьютерного моделирования молекулярного докинга предложены возможные механизмы агрегации цитокина ЕМАР II и его стабилизации декстраном 70. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют, что противоопухолевый рекомбинантный цитокин ЕМАР II образует белковые агрегаты при повышении температуры. Стабильность структуры ЕМАР II в комплексе расширяет возможности исследований противоопухолевых свойств этого цитокина и его практического использования.

Ключевые слова: цитокин ЕМАР II, декстран 70, агрегация, молекулярный докинг, *E. coli* BL21(DE3) pLysE.



L.A. Kolomiets¹, D.M. Lozhko¹, V.M. Zayets¹,
A.Yu. Chunihin², N.V. Gordovska³, A.I. Kornelyuk¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
03143 Kyiv, 150, Zabolotnogo str., Ukraine, +38 (044) 526 11 69

²Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, 9, Leontovicha St., Kyiv, 01030,
Ukraine, +38 (044) 234 59 74

³Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrska str., Ukraine, 01601,
Kyiv, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

INFLUENCE OF THE DEXTRAN 70 ON AGGREGATION ANTITUMOR CYTOKINE EMAP II

Summary

Aim. Determination of the effect of temperature on the aggregation properties of the recombinant cytokine EMAP II (endothelial monocyte activating polypeptide II) and its complex with polysaccharide dextran 70 in solution. **Methods.** Bacterial expression of recombinant protein, metal-chelated affinity chromatography, dynamic light scattering, spatial structure modeling. **Results.** The aggregation properties of the recombinant cytokine EMAP II and its complex with the dextran 70 were studied and the complex dimensions were determined by dynamic light scattering. The stabilization of the cytokine EMAP II with the dextran 70 was shown with increasing temperature in the range from 20 to 55° C. Using computer modelling of molecular docking, possible mechanisms for the aggregation of EMAP II cytokine and its stabilization with the dextran 70 were proposed. **Conclusions.** The results obtained indicate that the antitumor recombinant cytokine EMAP II forms protein aggregates with increasing temperature. The stability of the EMAP II structure in the complex expands the possibilities of studying the antitumor properties of this cytokine and its practical use.

Key words: cytokine EMAP II, dextran 70, aggregation, molecular docking, *E. coli* BL21(DE3) pLysE.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2015, – 93. – P. 52–79.
2. Pesarrodona M., Jauset T., Díaz-Riascos Z.V. et al. Antitumoral proteins to breast cancer by local administration of functional inclusion bodies // *Adv. Sci.* – 2019. – 6, №18. doi: 10.1002/advs.201900849.
3. Chaudhuri R., Cheng Y., Middaugh C.R., Volkin D.B. High-Throughput Biophysical Analysis of Protein Therapeutics to Examine Interrelationships Between Aggregate Formation and Conformational Stability // *AAPS J.* – 2013. – 16, № 1. – P. 48–64.
4. Bond M.D., Panek M.E., Zhang Z., Wang D., Mehndiratta P., Zhao H., Volkin D.B. Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method With Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – 99, № 6. – P. 2582–2597.
5. Wuchner K., Büchler J., Spycher R., Dalmonte P., Volkin, D.B. Develop-



ment of a Microflow Digital Imaging Assay to Characterize Protein Particulates During Storage of a High Concentration IgG1 Monoclonal Antibody Formulation // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – 99, №8. – P. 3343–3361.

6. *Wu F., Zhou Z., Su J., Wei L., Yuan W., Jin T.* Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins // *Nanoscale Res. Let.* – 2013. – 8, № 1. 197. doi: 10.1186/1556-276X-8-197.

7. *Reznikov A, Chaykovskaya L, Polyakova L, Kornelyuk A.* Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // *Exp. Oncol.* – 2007. – 29. – P. 267–71.

8. *Lal C.V., Schwarz M.A.* Vascular Mediators in Chronic Lung Disease of Infancy: Role of Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (EMAP II) Birth Defects Res. – 2014. 100, № 1. – P. 180–188.

9. *Kolomiets-Babenko L.A., Bohorad-Kobelska O.S., Kovalchuk N.L., Spivak M. Ja., Kornelyuk A.I.* Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon // *Biotech. Acta.* – 2016. – 9, № 5. – P. 18–23.

10. *Berger A.C., Alexander H.R., Wu P.C.* et al. Tumor necrosis factor receptor I (p53) is upregulated on endothelial cell by exposure to the tumor derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II) // *Cytokine.* – 2000. – 12, № . – P. 992–1000.

11. *Kwon H.-S., Park M.C., Kim D.G., Cho K., Park Y.W., Han, J.M., Kim.* Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1/p43 // *Journal of Cell Science.* – 2012. – 125, № 19. – P. 4620–4629.

12. *Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. – New York: C.S.H.L. Press, 1989.

13. *Бабенко Л.А., Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І.* Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ в клітинах *E.coli* BL21(DE3)pLysE // *Мікр.Біотех.* – 2010. – № 3. – С. 21–31.

14. *Д.М. Ложко, І.Ю. Жуков, О.І. Корнелюк.* Бактеріальна експресія та мічення ізотопами ¹³C/¹⁵N цитокіну ЕМАР ІІ для структурних досліджень методом ЯМР-спектроскопії // *Віопол. Cell.* – 2011. – 27, № 4. – P. 273–278.

15. *Корнелюк О.І., Бабенко Л.А., Козлов О.В.* Нанокompatитний протипухлинний препарат. Патент № 64374. Опубліковано 10.11.2011, Бюл. N 21.

16. *Comeau S.R., Gatchell D.W., Vajda S., Camacho C.J.* ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes // *Bioinformatics.* – 2004. – 20, № 1. – P. 45–50.

17. *Schneidman-Duhovny D., Inbar Y., Nussinov R., Wolfson H.J.* PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking // *Nucl. Acids Res.* – 2005. – 1, № 33 (Web Server Issue). – P. W363–W367.

18. *Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E.* UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis // *J. Comput. Chem.* – 2004. – 25, № 13. – P. 1605–1612.

19. *Trott O, Olson A.J.* AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comp. Chem.* – 2010. – 31, № 2. – P. 455–461.



References

1. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015; (93):52 – 79.
2. Pesarrodona M, Jauset T, Díaz-Riascos ZV. et al. Antitumoral proteins to breast cancer by local administration of functional inclusion bodies. *Adv. Sci.* 2019;(18). doi: 10.1002/advs.201900849.
3. Chaudhuri R, Cheng Y, Middaugh CR, Volkin DB. High-Throughput Biophysical Analysis of Protein Therapeutics to Examine Interrelationships Between Aggregate Formation and Conformational Stability. *AAPS J.* 2013; (1): 48 – 64.
4. Bond MD, Panek ME, Zhang Z, Wang D, Mehndiratta P, Zhao H, Volkin DB. Evaluation of a Dual-Wavelength Size Exclusion HPLC Method With Improved Sensitivity to Detect Protein Aggregates and Its Use to Better Characterize Degradation Pathways of an IgG1 Monoclonal Antibody. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99(6):2582 – 2597.
5. Wuchner K, Büchler J, Spycher R, Dalmonte P, Volkin DB. Development of a Microflow Digital Imaging Assay to Characterize Protein Particulates During Storage of a High Concentration IgG1 Monoclonal Antibody Formulation. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99(8): 3343 – 3361.
6. Wu F, Zhou Z, Su J, Wei L, Yuan W, Jin T. Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins. *Nanoscale Res. Lett.* 2013; 8(1): 197. doi: 10.1186/1556-276X-8-197.
7. Reznikov A, Chaykovskaya L, Polyakova L, Kornelyuk A. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model. *Exp. Oncol.* 2007; (29): 267 – 71.
8. Lal CV, Schwarz MA. Vascular Mediators in Chronic Lung Disease of Infancy: Role of Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II (EMAP II). *Birth Defects Res.* 2014; 100(1): 180 – 188.
9. Kolomiets-Babenko LA, Bohorad-Kobelska OS, Kovalchuk NL, Spivak MJa, Kornelyuk AI. Nanocomposite Complex EMAP II Influence on Tumor Necrosis Factor and Interferon. *Biotech. Acta.* 2016; 9(5): 18 – 23.
10. Berger AC, Alexander HR, Wu PC et al. Tumor necrosis factor receptor I (p53) is upregulated on endothelial cell by exposure to the tumor derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP II). *Cytokine.* 2000; (12): 992 – 1000.
11. Kwon HS, Park MC, Kim DG, Cho K, Park YW, Han JM. Identification of CD23 as a functional receptor for the proinflammatory cytokine AIMP1/p43. *Journal of Cell Science.* 2012; 125(19): 4620 – 4629.
12. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York: C.S.H.L. Press; 1989; 2nd ed.
13. Babenko LA, Skorobogatov OYu, Dubrovskiy OL, Kornelyuk AI. Optimization bacterial expression of the antitumor cytokine EMAP II in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells. *Microb.Biotech.* 2010; (3):21 – 31.
14. Lozhko DM, Zhukov IYu, Kornelyuk AI. Bacterial expression and isotope labeling of ¹³C/¹⁵N cytokine EMAP II for structural studies by NMR spectroscopy. *Biopol. Cell.* 2011; 27(4):273 – 278.



15. Nanocomposite anticancer drug. Kornelyuk A.I., Babenko L.A., Kozlov A.V. – № 64374. Opubl.10.11.2011 Byul. N 21.

16. Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 2004; 20(1): 45 – 50.

17. Schneidman-Duhovny D, Inbar Y, Nussinov R, Wolfson HJ. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. *Nucl. Acids Res.* 2005; 1(33) (Web Server Issue): W363 – W367.

18. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin T.E. UCSF Chimera-A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 2004; 25(13): 1605 – 1612.

19. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comp. Chem.* 2010; 31(2): 455 – 461.

Стаття надійшла до редакції 05.11.2019 р.



УДК 632.9

О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, С.Л. Міресь, К.М. Лисова

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

ВПЛИВ НІКОТИНОЇЛГІДРАЗОНІВ І КОМПЛЕКСІВ ГЕРМАНІЮ ТА СТАНУМУ НА ЇХ ОСНОВІ НА РІСТ ФІТОПАТОГЕННИХ ГРИБІВ

Мета. Дослідження впливу нікотиніолгідразонів з різною будовою молекули та комплексів $Ge(IV)$ та $Sn(IV)$ на їх основі на ріст фітопатогенних грибів. **Методи.** У роботі використано нікотиніолгідразон 2-гідрокси-1-нафтальдегіду та нікотиніолгідразон 2-гідроксибензальдегіду та відповідні комплекси $Ge(IV)$ та $Sn(IV)$. Антифунгальну активність досліджуваних речовин щодо фітопатогенних грибів *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. F11, *Botrytis cinerea* Pers. F12, *Pyrenophora teres* Drechsler F13, *Fusarium graminearum* Schwabe F14, *Ceratorhiza cerealis* (E.P. Høeften) R.T. Moore F15, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary F16 визначали на щільному середовищі, вимірюючи діаметр грибних колоній на 3, 7 до 10 добу, а також методом серійних розведень у бульйоні Сабуро (діапазон концентрації від 25 до 100 мкМ). **Результати.** Визначення діаметру грибних колоній показало, що досліджені сполуки у концентрації 25 мкМ здатні суттєво знижувати швидкість росту патогенів (на 17–54% від контролю). У бульйоні Сабуро виявлено порушення розвитку міцелію за присутності гідразонів та комплексів металів у концентраціях 25, 50 та 100 мкМ. Найбільшу чутливість зареєстровано у патогена *S. cerealis* F15, ріст якого значно (від 31,8 до 54,6%) пригнічувався усіма сполуками у концентрації 25 мкМ, а також *S. sclerotiorum* (5 сполуками) та *A. alternata* – 4 сполуками з шести. Комплекси гідразонів зі станумом та германієм виявляли вищу активність та ширший антифунгальний спектр порівняно з гідразонами, на основі яких вони синтезовані. **Висновок.** Досліджені гідразони та комплекси $Ge(IV)$ та $Sn(IV)$ на їх основі пригнічують ріст фітопатогенних грибів, що належать як до аскоміцетів (*Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*), так і до базидіоміцетів (*Ceratorhiza cerealis*).

Ключові слова: фітопатогенні гриби, гідразони, нікотинова кислота, германій, станум.

Рослинництво – одна з найбільш прибуткових галузей сільського господарства України. Негативний вплив шкідників та хвороб призводить до щорічних втрат урожаю [3, 6].

Епіфітотії, що спричиняють фітопатогенні гриби, є найголовнішою перешкодою на шляху ефективного рослинництва. Вони призводять до зниження продуктивності і величезних економічних збитків [10]. Отже, розробка методів захисту від шкідливих організмів є невід'ємною складовою частиною сучасних технологій вирощування сільськогосподарських культур.

© О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, С.Л. Міресь, К.М. Лисова, 2019



У сучасному землеробстві перевагу віддають біологічному методу боротьби зі шкідниками, тим не менш, хімічні засоби захисту рослин досі не втратили актуальності внаслідок своєї універсальності та досить високої ефективності [5].

За останні роки в хімічному методі захисту рослин відбулися істотні зміни. Майже повністю змінився асортимент пестицидів, які застосовувалися до 1990 року. Сучасні препарати менш персистентні й токсичні для людини і теплокровних тварин. На один-два порядки зменшилися норми їх витрати. Але проблема невідповідності більшості фунгіцидних препаратів вимогам токсиколого-гігієнічної оцінки залишається [6]. Крім того, серйозну проблему становить поступовий розвиток резистентності до антифунгальних препаратів, що спонукає до пошуку нових активних речовин [11, 12].

Низкою авторів показано антифунгальну дію деяких представників численної групи біологічно активних сполук – гідразонів – на патогенні для людини дріжджоподібні гриби та збудників хвороб рослин [8, 11, 13, 14]. На сьогодні розроблено велику кількість методів отримання гідразонів, що відкриває можливості для практично необмеженої модифікації їх молекул.

Метою даної роботи було дослідження впливу нікотиноїлгідразонів з різною будовою молекули та комплексів Ge(IV) та Sn(IV) на їх основі на ріст фітопатогенних грибів.

Матеріали і методи

Досліджено активність шести сполук: двох гідразонів, будову яких наведено на рис. 1 та 2, двох відповідних комплексів Ge(IV) та двох комплексів Sn(IV) на їх основі.

Нікотиноїлгідразон 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (H_2Nnf – сполука I) та нікотиноїлгідразон 2-гідроксибензальдегіду (H_2Ns – сполука IV) отримано реакцією конденсації гідразиду нікотинової кислоти з відповідними альдегідами за загальною методикою [2]. Комплекси Ge(IV) і Sn(IV) складу $[Ge(Nnf)_2]$ та $[Ge(Ns)_2]$ (сполуки II та V відповідно) та $[SnCl_3(Nnf \cdot H)]$ $[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (сполуки III та VI відповідно) вперше синтезовано на кафедрі загальної хімії Одеського національного університету імені І.І. Мечникова Н.В. Шматковою за оригінальними методиками взаємодією $GeCl_4$ та $SnCl_4$ з H_2Nnf та H_2Ns [4]. Будову досліджуваних сполук наведено на рис. 1 та 2.

Отримані сполуки охарактеризовано з використанням фізико-хімічних методів дослідження: ІЧ- та ПМР-спектроскопія, мас-спектрометрія, електропровідність, термогравіметрія, рентгеноструктурний аналіз [4]. Антифунгальну активність досліджуваних сполук визначали по відношенню до культур фітопатогенних грибів: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. F11, *Botrytis cinerea* Pers. F12, *Pyrenophora teres* Drechsler F13, *Fusarium graminearum* Schwabe F14, *Ceratorhiza cerealis* (E.P. Høven) R.T. Moore F15, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary F16.

Ріст фітопатогенів за присутності досліджуваних сполук оцінювали у два етапи. На першому етапі сполуки додавали до агару Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенськ) та спостерігали за розвитком колоній грибів, вимірюючи діаметр колонії протягом 10 діб. На другому етапі оцінювали розвиток міце-



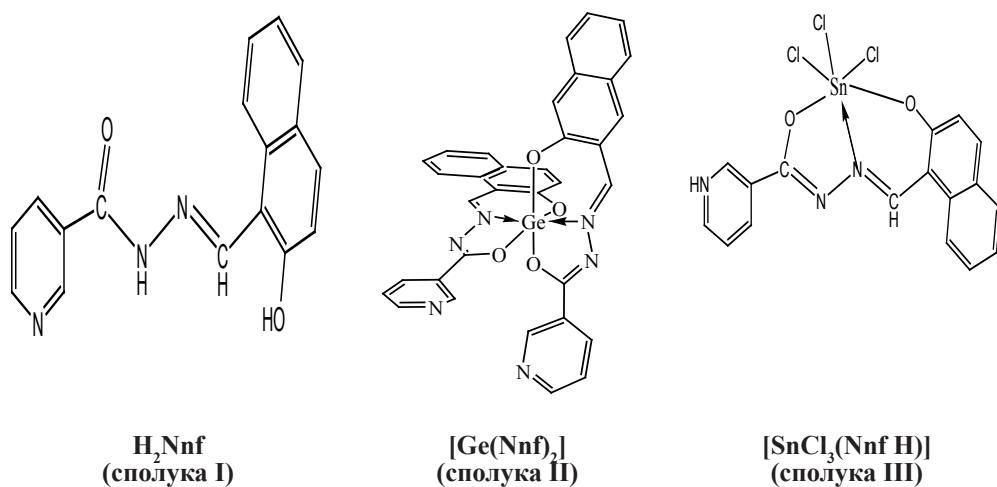


Рис. 1. Будова нікотинοїлгїдразону 2-гїдрокси-1-нафтальдегїду та вїдповїдних комплексїв Ge(IV) і Sn(IV)

Fig. 1. Molecule structure of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde nicotinoylhydrazone and corresponding complexes of Ge(IV) and Sn(IV)

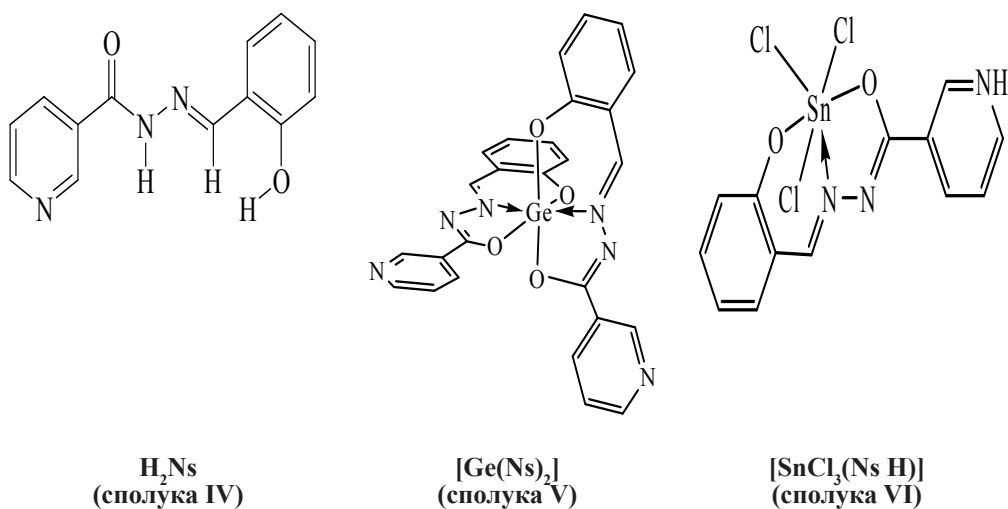


Рис. 2. Будова нікотинοїлгїдразону 2-гїдроксибензальдегїду та вїдповїдних комплексїв германїю(IV) і стануму(IV)

Fig. 2. Molecule structure of 2-hydroxybenzaldehyde nicotinoylhydrazone and corresponding complexes of Ge(IV) and Sn(IV)

лію у бульйоні Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенськ), в якому попередньо готували розведення гідразонів та комплексів.

Для дослідження росту фітопатогенів на щільному середовищі готували робочі розчини гідразонів, розчиняючи їх наважки в диметилсульфоксиді. Отримані розчини змішували з розплавленим стерильним агаром Сабуро таким чином, щоб кінцева концентрація досліджуваних сполук становила 25 мкМ, та розливали в чашки Петрі. Для отримання інокуляту культури фітопатогенів засівали в бульйон Сабуро, інкубували протягом 5 діб при 28 °С, висівали на поверхню агару Сабуро та інкубували протягом наступних 5 діб. У день постановки досліду в середовищі, що містило досліджувані сполуки, стерильним пробковим свердлом вирізали блоки діаметром 12 мм. З газону-інокуляту вирізали блоки аналогічного діаметру та розміщували в чашках з гідразонами таким чином, щоб у кожній окремій чашці опинилося 6 різних патогенів. Для кожної досліджуваної сполуки ставили 3 повтори. Як контроль використовували культури, вирощені на агарі Сабуро, що не містив гідразонів та комплексів. Інкубацію проводили в термостаті при температурі 28 °С протягом 10 діб. Облік результатів проводили на 3, 7 і 10 день, вимірюючи діаметр колоній фітопатогенів.

На другому етапі досліджували вплив гідразонів та комплексів на ріст фітопатогенів в рідкому середовищі Сабуро методом розведень. Робочі розчини досліджуваних сполук розводили бульйоном Сабуро таким чином, щоб отримати кінцеву концентрацію 25 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ. Отримані розчини розливали в пробірки по 1 мл та стерилізували автоклавуванням при 121 °С протягом 15 хв. Як інокулят використовували суспензію інфекційних структур (шматочки міцелію, конідії) у фізіологічному розчині щільністю 0,5 од. МакФарланда. Концентрація колонієутворювальних одиниць (КУО) в 1 мл інокулюму становила $2,5 \times 10^6 - 10^7$ [1]. У пробірки з середовищем вносили 20 мкл інокуляту, інкубували протягом 3 днів при 28 °С. Облік результатів проводили на 3 добу, характеризували ріст колонії гриба в товщі та на поверхні середовища порівняно з контролем. Як контроль використовували культури, вирощені в бульйоні Сабуро, що не містив гідразонів та комплексів. Оцінку інтенсивності росту гриба в рідкому середовищі здійснювали за параметрами: наявність росту міцелію на поверхні середовища, наявність росту міцелію в товщі середовища, наявність росту міцелію на дні пробірки.

Ступінь розвитку міцелію оцінювали за чотирибальною системою: «-» – ріст міцелію відсутній, «+» – слабкий ріст, «++» – фрагменти міцелію, «+++» – суцільний ріст.

Статистичну значущість відмінностей визначали за непараметричним критерієм Мана-Уїтні, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значущості не менше 95% ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення

Динаміку росту фітопатогенів на щільному середовищі Сабуро за присутності досліджених сполук представлено в табл. 1 та на рис. 3, А–F. Найбільшу чутливість до впливу нікотиніолгідразонів та комплексів Ge(IV) та



Sn(IV) на їх основі показали *A. alternata* F11, *C. cerealis* F15 та *S. sclerotiorum* F16.

Так, ріст *A. alternata* F11 найбільше пригнічував комплекс Ge(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду, комплекс Sn(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідроксибензальдегіду, комплекс Ge(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідроксибензальдегіду та комплекс Sn(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (сполуки II, VI, V, III відповідно, у порядку спадання активності) (рис. 3, А, табл. 1). При цьому колонії збудника дещо збільшувалися в розмірах на 7 добу порівняно з третім, але подальшого росту колонії не відбувалося, тобто, пригнічувальний ефект зберігався. На 3 добу затримка росту колоній склала від 21,4 до 38,1% порівняно з контролем, на 7 добу – 22,7–31,8%, на 10 добу 29,2–37,5% від контролю.

C. cerealis F15 проявив чутливість до усіх сполук (пригнічення росту від 31 до 54%), при цьому нікотиніолгідразон 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (I) та комплекс Ge(IV) на його основі (II) повністю пригнічували ріст гриба (рис. 3, Е, табл. 1).

У *S. sclerotiorum* F16 виявлено чутливість до п'яти досліджуваних сполук. При цьому колонії патогена істотно відставали у рості від контролю, однак їх розростання тривало протягом періоду дослідження, що свідчить про поступову адаптацію гриба (рис. 3, D, табл. 1).

Суттєве пригнічення росту *B. cinerea* F12 спостерігали лише за дії нікотиніолгідразону 2-гідрокси-1-нафтальдегіду та нікотиніолгідразону 2-гідроксибензальдегіду (сполуки I та IV) (рис. 3, В, табл. 1). Ріст колонії патогена пригнічувався в середньому на 19–25%. При цьому колонії збільшувалися у розмірах протягом періоду спостереження, але відставали від контролю.

Розвиток колонії *D. teres* F13 уповільнювався на 17–22% комплексом Sn(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (III) та комплексом Ge(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідроксибензальдегіду (V) (рис. 3, С, табл. 1), при цьому присутність комплексу III повністю припиняла розвиток колоній.

F. graminearum F14 виявився чутливим лише до дії комплексу Sn(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (III) (затримка росту складала 16–23%, відставання у рості збільшувалося з часом) (рис. 3, D, табл. 1).

Найширший спектр активності визначено у комплексі Sn(IV) на основі нікотиніолгідразону 2-гідрокси-1-нафтальдегіду (сполука III) та комплексу Ge(IV) з нікотиніолгідразоном 2-гідроксибензальдегіду (сполука V), що проявляли антифунгальну активність щодо чотирьох з шести фітопатогенів (табл. 2).

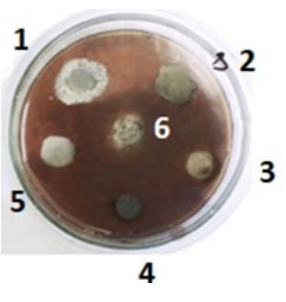
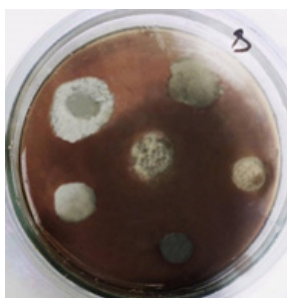
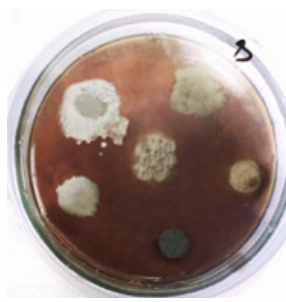



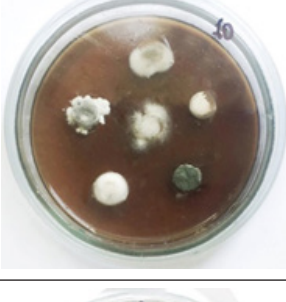





У рідкому середовищі пригнічувальна активність гідразонів та комплексів щодо фітопатогенів зберігалася (табл. 3). У таблиці наведені мінімальні концентрації, за яких спостерігали максимальний ефект. Найчастіше це проявлялося в пригніченні росту міцелію в товщі середовища або у відсутності росту на поверхні. У контрольних пробірках при цьому спостерігали розвиток міцелію як на поверхні, так і рівномірно по всьому об'єму середовища. Повного пригнічення росту грибів досліджуваними сполуками в обраному діапазоні концентрацій не спостерігали. Винятком є лише *B. cinerea*, розвиток якого повністю припинявся нікотиніолгідразоном 2-гідрокси-1-нафтальдегіду

Таблиця 1

Динаміка росту фітопатогенів на середовищі Сабуро

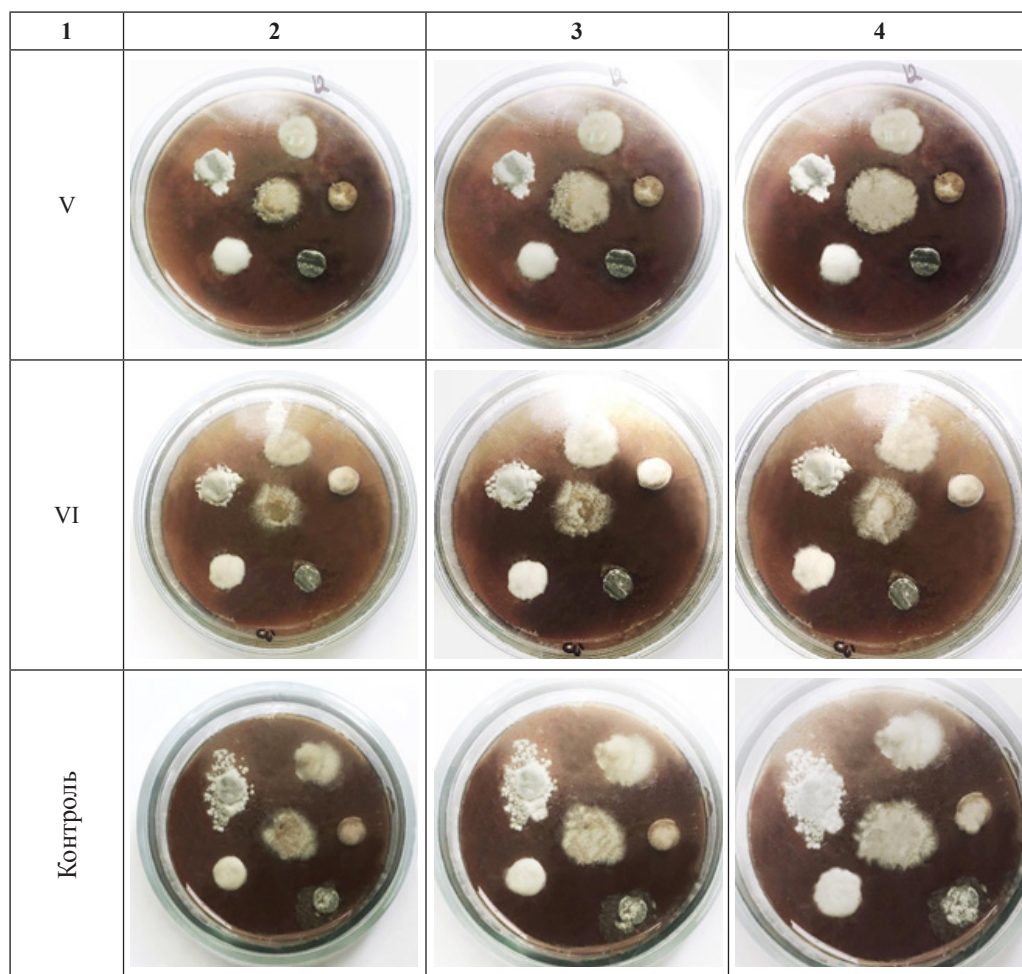
Table 1

Dynamics of the growth phytopathogens on Sabouraud medium

Номер сполуки	3 доба	7 доба	10 доба
1	2	3	4
I			
II			
III			
IV			



Продовження таблиці



Примітка: 1 – *Alternaria alternata* F11, 2 – *Botrytis cinerea* F12, 3 – *Pyrenophora teres* F13, 4 – *Fusarium graminearum* F14, 5 – *Ceratorhiza cerealis* F15, 6 – *Sclerotinia sclerotiorum* F16.
 Note: 1 – *Alternaria alternata* F11, 2 – *Botrytis cinerea* F12, 3 – *Pyrenophora teres* F13, 4 – *Fusarium graminearum* F14, 5 – *Ceratorhiza cerealis* F15, 6 – *Sclerotinia sclerotiorum* F16.

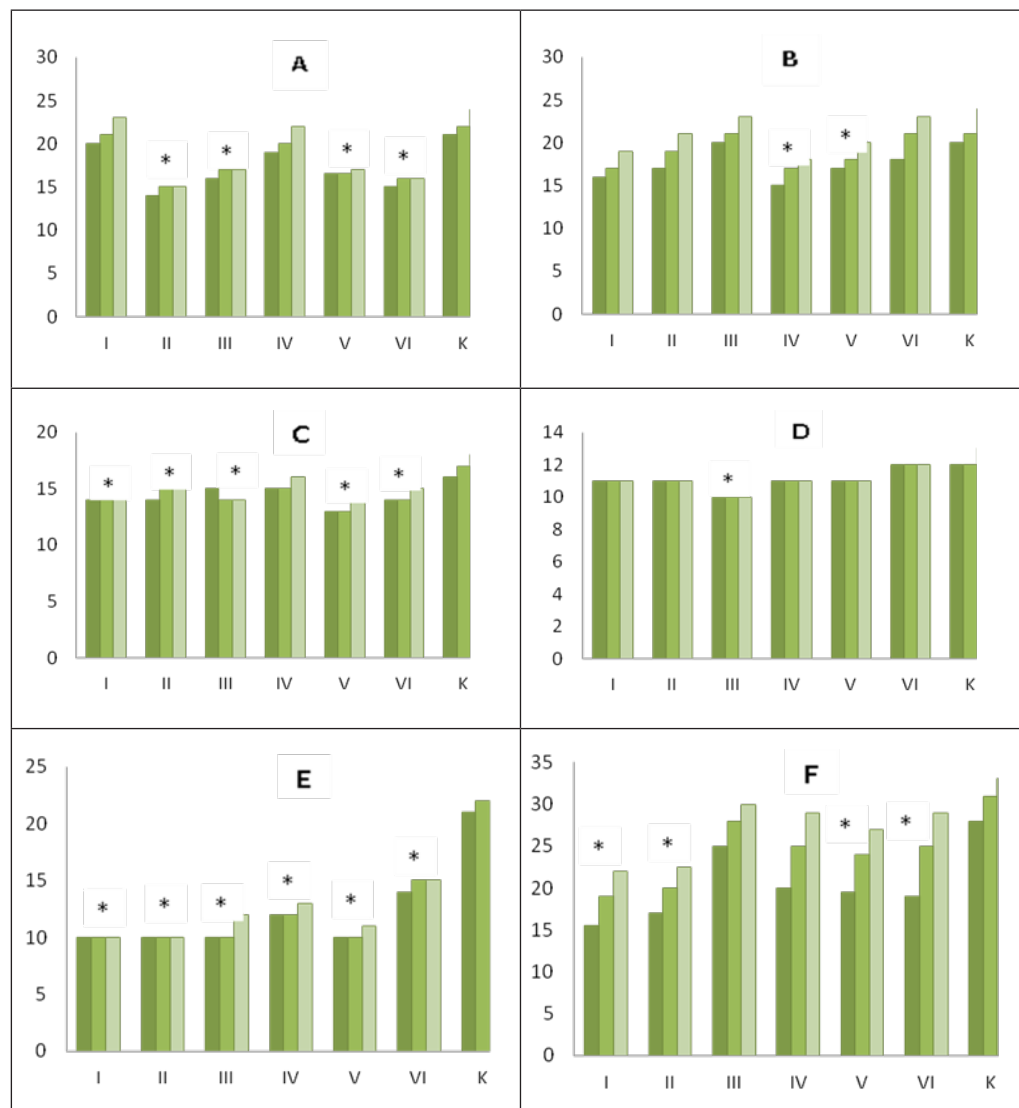


Рис. 3. Динаміка росту колоній фітопатогенів на середовищі Сабуро за присутності нікотинойлідразонів та комплексів

Примітка: А – *Alternaria alternata* F11, В – *Botrytis cinerea* F12, С – *Pyrenophora teres* F13, D – *Fusarium graminearum* F14, E – *Ceratorhiza cerealis* F15, F – *Sclerotinia sclerotiorum* F16; вісь x: I–VI – шифр сполуки, К – контроль; вісь y: діаметр колонії, мм;
 ■ – 3 доба, ■ – 7 доба, ■ – 10 доба,
 * – відмінність вірогідна порівняно з контролем (p<0,05)

Fig. 3. Dynamics of the growth phytopathogens on Sabouraud agar at the presence of nicotinoylhydrazones and complexes

Note: A – *Alternaria alternata* F11, B – *Botrytis cinerea* F12, C – *Pyrenophora teres* F13, D – *Fusarium graminearum* F14, E – *Ceratorhiza cerealis* F15, F – *Sclerotinia sclerotiorum* F16; x-axis – I–VI – compound number, K – control; y-axis: colony diameter, mm;
 ■ – day 3, ■ – day 7; ■ – day 10,
 * – differences are significant in comparison with control (p<0,05)



Таблиця 2

Максимальний пригнічувальний ефект досліджених сполук щодо фітопатогенів
Table 2
Maximum inhibitory effect of studied compounds on phytopathogens

Сполука	Фітопатоген					
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>P. teres</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>C. cerealis</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
I	0	20,8%	0	0	54,6%	44,6%
II	38,1%	0	0	0	54,6%	39,3%
III	29,2%	0	22,2%	23,1%	54,6%	0
IV	0	25,0%	0	0	45,5%	28,6%
V	29,2%	0	23,5%	0	52,4%	33,9%
VI	33,3%	0	0	0	38,1%	32,1%

(сполука I) в концентрації 50 мкМ. Отже, мінімальні інгібувальні концентрації для більшості досліджуваних речовин в обраному діапазоні концентрацій визначено не було. Тим не менш, у більшості випадків спостерігали дозозалежне підсилення ефекту.

В. Коçуіğit-Каумакçюğлу зі співавт. [9] встановлено здатність гідразид-гідразонів пригнічувати ріст фітопатогенних грибів *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis viticola* та *Phomopsis obscurans*. Представники роду *Botrytis*, використані в цих дослідженнях, чутливості не проявляли. У наших дослідженнях виявлено помірну пригнічувальну дію двох сполук щодо *B. cinerea* та однієї – щодо *F. graminearum*.

J. Wu зі співавт. [14] вивчено активність похідних піразолкарбоксаміду, які містили гідразонний фрагмент, щодо *Giberella zeaе*, *Fusarium oxysporum*, *Cytospora mandshurica* та встановлено високу активність щодо *G. zeaе* і незначну щодо решти фітопатогенів.

Дослідження біологічної активності, зокрема, антифунгальної, сполук, що за своєю будовою належать до гідразонів, є досить численними з огляду на практично необмежені можливості створення молекул з гідразонним фрагментом [13]. Однак сучасні дані стосовно дії саме нікотинοїлгідразонів на фітопатогенні гриби відсутні. Отже, активність цих сполук та комплексів Германію та Стануму на їх основі виявлено вперше. У цілому, отримані нами дані підтверджують цінність гідразонів як потенційних фунгіцидів нового покоління.

Таким чином, гідразони, синтезовані на основі нікотинової кислоти, здатні пригнічувати ріст фітопатогенних грибів *A. alternata* (на 21,4–38,1% залежно від будови сполуки), *S. sclerotiorum* (на 9,5–44,6%), *C. cerealis* (на 31,8–54,5%).

Максимальну чутливість до дії використаних сполук проявив штам *C. cerealis*, ріст якого пригнічувався усіма дослідженими сполуками на щільному середовищі.

Нікотинοїлгідразон 2-гідрокси-1-нафтальдегіду та нікотинοїлгідразон 2-гідроксибензальдегіду проявили однаковий спектр антифунгальної актив-









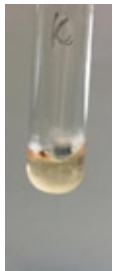




Таблиця 3

Вплив гідразонів та комплексів Ge(IV) і Sn(IV) на їх основі на ріст міцелію фітопатогенних грибів у бульйоні Сабуро


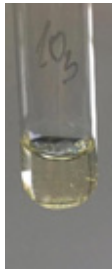



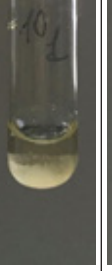

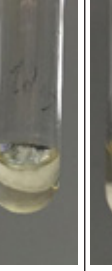
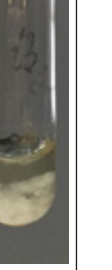


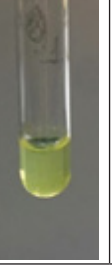



Table 3

Influence of hydrazones and complexes of Ge (IV) i Sn(IV) based on them on the growth of mycelium of phytopathogenic fungi in Sabouraud broth

Патоген	Варіант дослідю						
	Контроль	I	II	III	IV	V	VI
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Alternaria Alternata</i> F11	+++ / +++ * 	н/а	+ / +++ (25 мкМ)** 	+ / +++ (25 мкМ) 	н/а	+ / +++ (100 мкМ) 	+ / +++ (50 мкМ) 
<i>Botrytis cinerea</i> F12	+++ / +++ 	- / - (50 мкМ) 	н/а	н/а	+ / + (25 мкМ) 	н/а	н/а
<i>Drechslera teres</i> F13	+++ / +++ 	н/а	н/а	+ / - (100 мкМ) 	н/а	+ / - (25 мкМ) 	н/а



Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Fusarium graminearum</i> F14	+++/- 	н/а	н/а	+/- (25 мкМ) 	н/а	н/а	н/а
<i>Rhizoctonia cerealis</i> F15	+++/ 	+/- (50 мкМ) 	++/ (100 мкМ) 	+/- (100 мкМ) 	++/ (25 мкМ) 	+/- (25 мкМ) 	+/- (50 мкМ) 
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> F16	+++/ 	++/ (50 мкМ) 	+/- (100 мкМ) 	н/а	++/ (100 мкМ) 	++/ (50 мкМ) 	+/- (50 мкМ) 

Примітка: * – ріст у товщі середовища/ріст на поверхні середовища, ** – концентрація сполуки.

Note: * – growth in the medium column/growth on the medium surface, ** – compound concentration.

ності, пригнічуючи ріст *B. cinerea* (максимальне пригнічення 20,8% та 25,0% відповідно), *C. cerealis* (54,6 та 45,5%) та *S. sclerotiorum* (44,6 та 28,6%). Активність нікотиніолгідрозону 2-гідрокси-1-нафтальдегіду була вищою, ніж у другого гідрозону, щодо останніх двох збудників.

Утворення Станумом та Германієм комплексів з дослідженими гідрозонами призводило до підвищення антифунгальної активності щодо *A. alternata* та *P. teres*. У двох випадках також відбувалося розширення спектру активності, однак однозначної залежності від природи атому металу не встановлено.



О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, С.Л. Мірсь, К.М. Лисова

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

ВЛИЯНИЕ НИКОТИНОИЛГИДРАЗОНОВ И КОМПЛЕКСОВ ГЕРМАНИЯ И ОЛОВА НА ИХ ОСНОВЕ НА РОСТ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Реферат

Цель. Исследование влияния никотиноилгидразонов с разным строением молекулы и комплексов $Ge(IV)$ и $Sn(IV)$ на их основе на рост фитопатогенных грибов. **Методы.** В работе использованы никотиноилгидразон 2-гидрокси-1-нафталъдегида и никотиноилгидразон 2-гидроксибензальдегида и соответствующие комплексы $Ge(IV)$ и $Sn(IV)$. Антифунгальную активность исследуемых соединений в отношении фитопатогенных грибов *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. F11, *Botrytis cinerea* Pers. F12, *Pyrenophora teres* Drechsler F13, *Fusarium graminearum* Schwabe F14, *Ceratorhiza cerealis* (E.P. Høeuen) R.T. Moore F15, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary F16 определяли на плотной среде Сабуро, измеряя диаметр грибных колоний на 3, 7 и 10 сутки культивирования, а также методом серийных разведений в бульоне Сабуро (диапазон концентраций от 25 до 100 мкМ). **Результаты.** Определение диаметра грибных колоний показало, что исследованные соединения в концентрации 25 мкМ способны вызывать существенное снижение скорости прироста патогенов (на 17–54% по сравнению с контролем). В бульоне Сабуро выявлено нарушение развития мицелия в присутствии гидразонов и комплексов металлов в концентрациях 25, 50 и 100 мкМ. Наибольшая чувствительность зарегистрирована у патогена *C. cerealis* F15, рост которого значительно (от 31,8 до 54,6%) подавлялся всеми соединениями в концентрации 25 мкМ, а также *S. sclerotiorum* (5 соединениями) и *A. alternata* – 4 веществами из шести. Комплексы гидразонов с оловом и германием проявляли более высокую активность и более широкий антифунгальный спектр по сравнению с гидразонами, на основе которых они синтезированы. **Вывод.** Исследованные гидразоны и комплексы $Ge(IV)$ и $Sn(IV)$ на их основе подавляют рост фитопатогенных грибов, которые относятся как к аскомицетам (*Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*), так и к базидиомицетам (*Ceratorhiza cerealis*).

Ключевые слова: фитопатогенные грибы, гидразоны, никотиновая кислота, германий, станум.



O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, S.L. Mipros, K.M. Lysova

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

INFLUENCE OF NICOTINOYLHYDRAZONES AND Ge(IV) AND Sn(IV) COMPLEXES BASED ON THEM ON THE GROWTH OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Summary

Aim. To evaluate the influence of nicotinoylhydrazones with different molecule structure and complexes of Ge(IV) and Sn(IV) based on them on the growth of phytopathogenic fungi. **Methods.** 2-hydroxy-1-naphthaldehyde nicotinoylhydrazone and 2-hydroxybenzaldehyde nicotinoylhydrazone and corresponding complexes of Ge(IV) and Sn(IV) were used in the study. Antifungal activity of studied compounds towards phytopathogenic fungi *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. F11, *Botrytis cinerea* Pers. F12, *Pyrenophora teres* Drechsler F13, *Fusarium graminearum* Schwabe F14, *Ceratorhiza cerealis* (E.P. Høeuen) R.T. Moore F15, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary F16 was evaluated by measurement of fungal colony diameter on the 3rd, 7th and 10th day of cultivation, and also by serial dilution method in Sabouraud broth (range of concentrations – from 25 to 100 μ M).

Results. Evaluation of fungal colony diameters demonstrated that studied compounds at the concentration 25 μ M were able to cause significant decrease (by 17–54% compared to control) of growth of pathogen colonies. Also, mycelium development disorders were observed in Sabouraud broth at the presence of 15, 50 and 100 μ M of hydrazones and metal-complexes. The most susceptible was *C. cerealis* F15, which growth was significantly (from 31.8 to 54.6%) inhibited by all the compounds at the concentration 25 μ M, and also *S. sclerotiorum* (5 compounds) and *A. alternata* – 4 of 6 compounds. The complexes of hydrazones with tin and germanium showed more significant activity and wider antifungal spectrum compared to hydrazones they are based on. **Conclusion.** Studied hydrazones and based on them complexes of Ge(IV) and Sn(IV) inhibit the growth of phytopathogenic fungi which belong to both ascomycetes (*Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*) and basidiomycetes (*Ceratorhiza cerealis*).

Key words: phytopathogenic fungi, hydrazones, nicotinic acid, germanium, stannum.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабаянц О.В.* Основы селекции и методология оценок устойчивости пшеницы к возбудителям болезней / О.В. Бабаянц, Л.Т. Бабаянц. – Одесса: ВМВ, 2014. – 401 с.
2. *Вейганд-Хильгетаг.* Методы эксперимента в органической химии: Пер. с нем. – М.: Химия, 1968. – 944 с.
3. *Власюк О.С.* Гальмуюча дія фунгіцидів на проростання спор грибів *Cercospora beticola* Sacc. та *Alternaria alternata* Keissl. // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2014. – Вип. 19. – С. 61–67.
4. *Сейфуллина И.И., Шматкова Н.В.* Новый этап в развитии координационной химии ароил-(пиридиноил) гидразонов замещенных бенз-(-1-нафт) альдегидов // Вісник ОНУ. – 2008. – Том 13, вип. 1. – С. 1–26.



5. *Стратегія і тактика захисту рослин* / За ред. В.П. Федоренка – в 3-х т. – Т. 2. // К.: Альфа-стевія, 2012. – 503 с.

6. *Швартау В.В., Зозуля О.Л., Михальська Л.М., Санін О.Ю.* Фузаріози культурних рослин: монографія. – К.: Логос. – 2016. – 164 с.

7. *Bordagaray A., García-Arrona R., Millan E.* Development and application of a screening method for triazole fungicide determination in liquid and fruit samples using solid-phase microextraction and HPLC–DAD // *Analogy Methods*. – 2013. – Vol. 5. – P. 2565–2571.

8. *Casanova B.B., Muniz M.N., de Oliveira T.* Synthesis and biological evaluation of hydrazone derivatives as antifungal agents // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20. – P. 9229–9241.

9. *Koçyiğit-Kaymakçioğlu B., Oruç-Emre E.E., Ünsalan S. et al.* Synthesis and biological activity of hydrazide-hydrazones and their corresponding 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles // *Med Chem Res*. – 2012. – Vol. 21. – P. 3499–3508.

10. *Lemańczyk G., Kwaśna H.* Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat // *European Journal of Plant Pathology*. – 2013. – Vol. 135, Is. 1. – P. 187–200.

11. *Leplat J., Friberg H., Abid M., Steinberg C.* Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2012. – Vol. 33, Is. 1. – P. 97–111.

12. *Leroux P., Gredt M., Walker A.S., Panon M.L.* Evolution of resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides in French vineyards // *Pest Management Science*. – 2013. – Vol. 69, Is. 6. – P. 667–678.

13. *Singh M., Raghav N.* Biological activities of hydrazones: a review // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. – 2011. – Vol. 3, Is. 4. – P. 26–32.

14. *Wu J., Wang J., Hu D.* Synthesis and antifungal activity of novel pyrazolecarboxamide derivatives containing a hydrazone moiety // *Chemistry Central Journal*. – 2012. – Vol. 6. – P. 51–67.

References

1. Babayants OV, Babayants LT. Basic selection and methodology of evaluation of wheat resistance to pathogens. Odessa.: BMB, 2014; 401.

2. Veygand-Hilgetag. Methods of experiment in organic chemistry: Trans. from German. M.: Himiya, 1968; 944. [In Russian].

3. Vlasyuk OS. Inhibitory effect fungicides on germination of spores of the fungi *Cercospora beticola* Sacc. and *Alternaria alternata* Keissl // *Agricultural Microbiology*. 2014; 19: 61-67. [In Ukrainian].

4. Seyfullina II, Shmatkova NV. New stage in the development of coordination chemistry of aroyl-(pyridinoyl) hydrazones of substituted benz(-1-naft) aldehydes. *ONU Herald*. 2008; 13(1): 1-26. [In Russian].

5. The strategy and tactics of plant defence / Ed. by V.P. Fedorenka – in 3 V. – V. 2. K.: Al`fa-steviya, 2012: 503. [In Ukrainian].

6. Shvartau VV, Zozulya OL, My`xal`s`ka LM, Sanin OYu. Fusarioses of crops: monograph. K.: Logos, 2016: 164 [In Ukrainian].



7. Bordagaray A, García-Arrona R, Millan E. Development and application of a screening method for triazole fungicide determination in liquid and fruit samples using solid-phase microextraction and HPLC-DAD. *Analogy Methods*. 2013; 5:P. 2565-2571.
8. Casanova BB, Muniz MN, de Oliveira T. Synthesis and biological evaluation of hydrazone derivatives as antifungal agents. *Molecules*. 2015; 20: 9229-9241.
9. Koçyiğit-Kaymakçioğlu B., Oruç-Emre EE, Ünsalan S et al. Synthesis and biological activity of hydrazide-hydrazones and their corresponding 3-acetyl-2,5-disubstituted-2,3-dihydro-1,3,4-oxadiazoles. *Med Chem Res*. 2012. 21: 3499-3508.
10. Lemańczyk G, Kwaśna H. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat. *European Journal of Plant Pathology*. 2013; 135(1): 187-200.
11. Leplat J, Friberg H, Abid M, Steinberg C. Survival of *Fusarium graminearum*, the causal agent of Fusarium head blight. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2012; 33(1): 97-111.
12. Leroux P, Gredt M, Walker AS, Panon ML. Evolution of resistance of *Botrytis cinerea* to fungicides in French vineyards. *Pest Management Science*. 2013; 69(6): 667-678.
13. Singh M, Raghav N. Biological activities of hydrazones: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011; 3(4): 26-32.
14. Wu J, Wang J, Hu D. Synthesis and antifungal activity of novel pyrazolecarboxamide derivatives containing a hydrazone moiety. *Chemistry Central Journal*. 2012; 6: 51-67.

Стаття надійшла до редакції 25.11.2019 р.



О.О. Авксентьева

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна,
e-mail: avksentyeva@karazin.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕКСТРАКТУ *ALOE VERA* НА МОРФОГЕНЕТИЧНІ РЕАКЦІЇ ЗА МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РОЗМНОЖЕННЯ ДЕКОРАТИВНИХ СУКУЛЕНТІВ

Мета. Метою роботи було з'ясувати вплив екстракту *Aloe vera* на ефективність введення в культуру *in vitro* та морфогенетичні реакції за умов мікроклонального розмноження представників декоративних сукулентів. **Методи.** В роботі використовували стандартні біотехнологічні методи мікроклонального розмноження шляхом індукції адвентивного гомогенезу. Вихідний матеріал відбирали з рослин-донорів декоративних сукулентів – *Crassula ovata* “Hobbit” (Mill), *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.), *Natiara salicornioides* і *Schlumbergera truncata*. Як експланти використовували висічки зрілих листків, які після поверхневої поетапної стерилізації культивували на регенераційному середовищі Мурасиге-Скуга (МС) з додаванням синтетичних регуляторів росту – 6-бензиламінопурину (БАП) цитокінінового типу дії та α -нафтилоцтової кислоти (НОК) ауксинової дії. В контрольному варіанті регенераційне середовище (РС) за складом містило половинний набір макро- та мікроелементів та синтетичні фітогормони – $\frac{1}{2}$ МС + 3,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК, а в дослідному варіанті в живильне середовище вносили екстракт *Aloe vera* у співвідношенні 1:100. Досліджували ефективність стерилізації та утворення мериклонів за введення в культуру *in vitro* та швидкість і ефективність різноманітних морфогенетичних реакцій: калусогенез, гомогенез та ризогенез. **Результати.** За результатами досліджень встановлено, що екстракт *Aloe vera* у складі живильного середовища не впливає на ефективність стерилізації листових експлантів у досліджуваних представників декоративних сукулентів. Морфогенетичний потенціал листових експлантів реалізується шляхом розвитку процесів калусогенезу протягом першого тижня культивування та інтенсивного адвентивного гомогенезу через 6–8 тижнів культивування. Інтенсивний ризогенез показаний тільки для листових експлантів – *Schlumbergera truncata*. Екстракт *Aloe vera* у складі живильного середовища стимулює ефективність процесу гомогенезу, в 1,3–2,3 рази збільшує кількість мериклонів на одному експланті та на 7–8 діб прискорює швидкість процесу. Досліджувані декоративні сукуленти різняться за ефективністю мікроклонального розмноження – максимальні показники у *Crassula ovata* “Hobbit” (Mill) та *Natiara salicornioides*, мінімальні – у *Kalanchoe blossfeldiana*. **Висновки.** Екстракт *Aloe vera* у складі живильного середовища для мікроклонального розмноження декоративних сукулентів проявляє стимулювальний ефект і може бути запропонований як ефективний біостимулятор для збільшення



коефіцієнту розмноження досліджуваних культур.

Ключові слова: екстракт *Aloe vera*, декоративні сукуленти, мікроклональне розмноження, морфогенетичні реакції.

Методи рослинних культур *in vitro* широко використовують у сучасних фітобіотехнологіях – в тому числі для мікроклонального розмноження рослин [5,7]. Оптимізація складу живильних середовищ для спрямування різноманітних шляхів морфогенезу та підвищення його ефективності в умовах культури *in vitro* є актуальним завданням фітобіотехнології.

В наш час в світі інтенсивно розвивається декоративне квітникарство: озеленення міст, проектування «зелених дахів», «зелених шпалер» та ін., де як рослинний матеріал широко використовують декоративні сукуленти. В зв'язку з цим є потреба отримання достатньої кількості посадкового матеріалу для робіт з озеленення. Для цього необхідно розробляти більш ефективні протоколи мікроклонального розмноження рослин, що можна робити, використовуючи різноманітні біодобавки у складі живильного середовища за культивування *in vitro*.

Як біологічні добавки до складу живильних середовищ для введення в культуру *in vitro* використовують різноманітні рослинні екстракти: кокосове молоко, витяжки із зернівок кукурудзи у молочній стиглості, ендосперму гіркокаштану та ін. [6, 7, 10].

Екстракт *Aloe vera* – це біогенний стимулятор поліфункціональної дії, який має адаптогенну та загальнотонізуючу дію на тваринний організм [13]. На сьогоднішній день *Aloe vera* широко використовується у медицині, біотехнологіях, парфумерії, косметології та ін. [3, 13, 14]. Екстракт *Aloe vera* представляє собою суміш багатьох біологічно активних речовин – антраглікозидів, похідних смолистих речовин, ферментів, замінних і незамінних амінокислот, вітамінів (група В, холін, фолієва кислота, бета-каротин, вітаміни А, С, Е), мінералів – кальцій, калій, натрій, магній, цинк, мідь, хром, фосфор, саліцилової кислоти, поліцукридів, фітонцидів [13].

Відомо також, що сік *Aloe vera* позитивно впливає на рослинний організм – стимулює проростання насіння, процеси ризогенезу, нарощування вегетативної біомаси, регенерацію рослинних клітин, запобігає швидкому старінню, а також пригнічує ріст бактерій [11, 12, 15].

Однак, відомості щодо використання як біодобавку у складі живильного середовища екстракту *Aloe vera* в культурі *in vitro* є малочисельними та фрагментарними. Дослідження впливу екстракту листя *Aloe vera* на ріст гібридної осики показало позитивний вплив на висоту і вагу рослини, кількість пагонів, листя та коріння, довжину кореня, та приживаність акліматизованих рослин в теплиці [15]. Використання екстракту алое для оптимізації мікроклонального розмноження кісточкових культур призводило до скорочення термінів розмноження та підвищення коефіцієнтів розмноження [9].

Виходячи з вищесказаного метою роботи було з'ясувати вплив екстракту *Aloe vera* на ефективність введення в культуру *in vitro* та морфогенетичні реакції за умов мікроклонального розмноження представників декоративних сукулентів.



Матеріали та методи

Дослідження проводилися в лабораторії «Морфогенез вищих рослин *in vitro*» на кафедрі фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів біологічного факультету Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна.

Як рослинний матеріал використовували рослини декоративних сукулентів – *Crassula ovata* “Hobbit” (Mill), *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.), *Hatiora salicornioides* та *Schlumbergera truncata*.

Екстракт алое виготовляли зі зрілих, сформованих листків, які попередньо витримували 10 діб за температури 4–6 °С (для стимуляції біосинтезу біологічно активних речовин), потім рослинний матеріал гомогенізували, готували водну витяжку з додаванням 0,7% розчину NaCl та фільтрували (Муравьев И.А., 1980). Готовий екстракт стерилізували шляхом переривчастої стерилізації та вносили у регенераційне середовище (РС) ½ МС + 3,0 БАП мг/л + 0,5 мг/л НОК у співвідношенні 1:100.

Як експланти використовували сформовані (зрілі) листки рослин сукулентів по 5–10 з вихідної рослини. Експланти розміром 1,5×2 см, ступінчато стерилізували за протоколом: 5 хв у мильному розчині → 1 хв 70% спирт → 20 хв у 15-ному % розчині комерційного препарату «Білізна» → 3 рази по 5 хв у стерильній воді [1]. Стерильні експланти переносили у чашки Петрі по 5–12 на кожну в залежності від виду сукулента та розміру листка. Культивували по 2–3 чашки кожного варіанту на регенераційному середовищі з додаванням екстракту (дослідний варіант) та без екстракту алое (контрольний варіант) за 16-годинного фотоперіоду, освітленості 1,5 клк, температури 22/18 °С (день/ніч) протягом 1,5–2 місяці, проводячи пасажі (за необхідністю) протягом експерименту.

У дослідах визначали: ефективність стерилізації (% неінфікованих експлантів), ефективність введення в культуру – динаміку утворення мериклонів на 28, 42 та 56-ту добу культивування (у відсотках та кількості мериклонів на експланті штук/експлант); морфогенетичні реакції: калусогенез, гемогенез та ризогенез – їх швидкість та ефективність. Ефективність процесів розраховували як відношення кількості експлантів, що утворили морфогенні структури, до загальної їх кількості, виражену у відсотках. Швидкість процесів – кількість діб від пасажу до початку морфогенної реакції на експланті.

Проведено 2 біологічні серії експериментів. У таблицях наведені середні значення показників та їх стандартне відхилення. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням програмного пакету Microsoft Excel 2007 методом оцінки значущості різниці середніх по варіантах. Істотність відмінностей між варіантами визначали з використанням t-критерія Ст'юдента при $P \leq 0,05$ [2].

Результати та обговорення

Результати показали (табл. 1), що ефективність стерилізації для листових експлантів *C. ovata* складала 100%, для *K. blossfeldiana* – від 91 до 98%, для *H. salicornioides* – 100%, для *S. truncata* від 89 до 95% неінфікованих експлантів. Високий рівень виходу стерильних експлантів для представників декоративних сукулентів також показаний іншими дослідниками [6, 8]. Мож-



ливо це пов'язано з особливостями анатомічної будови їх листків. У сукулентів багато адаптацій для захисту від випарування – восковий шар, кутикула та інші структури, що є також механічним бар'єром для проникнення в тканини мікроорганізмів.

Додавання екстракту *Aloe vera* до складу живильного середовища дещо знижувало показники ефективності стерилізації у *K. blossfeldiana* і *S. truncata* (табл. 1) – що, можливо, пов'язано з біологічними особливостями цих видів за біохімічним складом листків. В цілому, вплив екстракту *Aloe vera* на показник – ефективність стерилізації для досліджуваних представників декоративних сукулентів проявлявся неістотно.

Наступним етапом дослідження було вивчення впливу екстракту *Aloe vera* на ефективність введення в культуру *in vitro* – динаміку утворення мериклонів у представників декоративних сукулентів.

Результати показали (табл. 1, рис. Д, Е), що максимальна кількість мериклонів серед досліджуваних сукулентів характерна для *C. ovata* – 24–32 шт./екс. та *H. salicornioides* – 15–23 шт./екс. за культивування, як в контрольному варіанті, так і в дослідному – з додаванням екстракту алое.

Для сукулентів *K. blossfeldiana* та *S. truncata* показана значно менша кількість морфогенних структур на експланті 3–7 і 5–9, відповідно. Отже коефіцієнт мікроклонального розмноження для цих культур є нижчим. Додавання екстракту *Aloe vera* до живильного середовища значно підвищувало кількість утворених мериклонів на одному експланті – тобто стимулювався етап «власне розмноження» – основний етап мікроклонального розмноження представників декоративних сукулентів.

В ході експериментів показано, що *C. ovata* та *H. salicornioides* максимально швидко утворюють мериклони – вже на 42 добу культивування ефективність у цих культур становить 100% (табл. 1). *S. truncata* повільніше та поступово збільшує ефективність досліджуваного процесу. Найповільніше розвивається досліджуваний процес у *K. blossfeldiana* – тільки через 56 діб культивування на експлантах починають з'являтися мериклони. Вплив екстракту *Aloe vera* у складі живильного середовища стимулює ефективність утворення мериклонів у всіх досліджуваних представників декоративних сукулентів.

За результатами дослідів показано, що максимальне утворення меристематичних клонів, як і максимально ефективна стерилізація, характерна для *C. ovata* “Hobbit” та *H. salicornioides* – становить 100% як у контрольному варіанті, так і при додаванні екстракту алое у складі живильного середовища. За введення в культуру *in vitro* *S. truncata* – наприкінці експерименту ефективність процесу в контрольному варіанті складала 90%, в дослідному (+ алое) – 100%. Для *K. blossfeldiana* встановлені мінімальні значення показника утворення мериклонів – 35% в контролі та 67% в досліді. Контрольним живильним середовищем для всіх культур було регенераційне середовище такого складу – ½ МС + 3мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК. Можливо, що для *K. blossfeldiana* такий склад не є ефективним, тому ця культура проявляє такий низький показник утворення мериклонів.

Таблиця 1
Table 1

Вплив екстракту *Aloe vera* на ефективність введення в культуру *in vitro* представників декоративних сукулентів
The effect of *Aloe vera* extract on the efficiency of *in vitro* introduction of the representatives of ornamental succulents

Сукулент, вид	Варіант	Стерильність, %	Динаміка утворення мериклонів					
			28 дб		42 доби		56 дб	
			ефективність %	шт/експ	ефективність %	шт/експ	ефективність %	шт/експ
<i>Crassula ovata</i> "Hobbit"	PC**	100,0±1,0	33,0±1,5	5,1±0,3	100,0±1,0	17,0±0,8	100,0±1,0	24,6±1,2
	PC+Aloe vera	100,0±1,0	55,0±2,6*	11,2±0,5*	100,0±1,0	29,3±1,5*	100,0±1,0	32,3±1,6*
<i>Kalanchoe</i> <i>blossfeldiana</i>	PC	98,0±1,0	0	0	0	0	35,0±1,8	3,1±0,2
	PC+Aloe vera	91,0±1,0	0	0	0	0	67,0±3,5*	7,2±0,3*
<i>Hatiora</i> <i>salicornioides</i>	PC	100,0±1,0	12,0±0,1	2,1±0,1	100,0±1,5	9,3±0,5	100,0±1,0	15,0±0,8
	PC+Aloe vera	100,0±1,0	25,0±1,3*	5,1±0,3*	100,0±1,0	14,0±0,7*	100,0±1,0	23,2±1,2*
<i>Schlumbergera</i> <i>truncata</i>	PC	95,0±1,0	33,0±1,5	1,1±0,1	50,0±2,5	2,2±0,1	90,0±1,5	5,1±0,3
	PC+Aloe vera	89,0±1,0	50,0±2,1*	2,4±0,1*	77,0±3,8*	7,3±0,4*	100,0±1,0*	9,0±0,5*

Примітки : 1 *) – відмінності істотні при $P \leq 0,05$;

2 **) – PC регенераційне середовище – 1/2 MS + 3,0 БАП мг/л + 0,5 мг/л НОК

Notes: 1 *) – the differences are significant at $P \leq 0,05$;

2 **) – RM regeneration medium – 1/2 MS + 3.0 BAP mg / l + 0.5 mg / l NAA



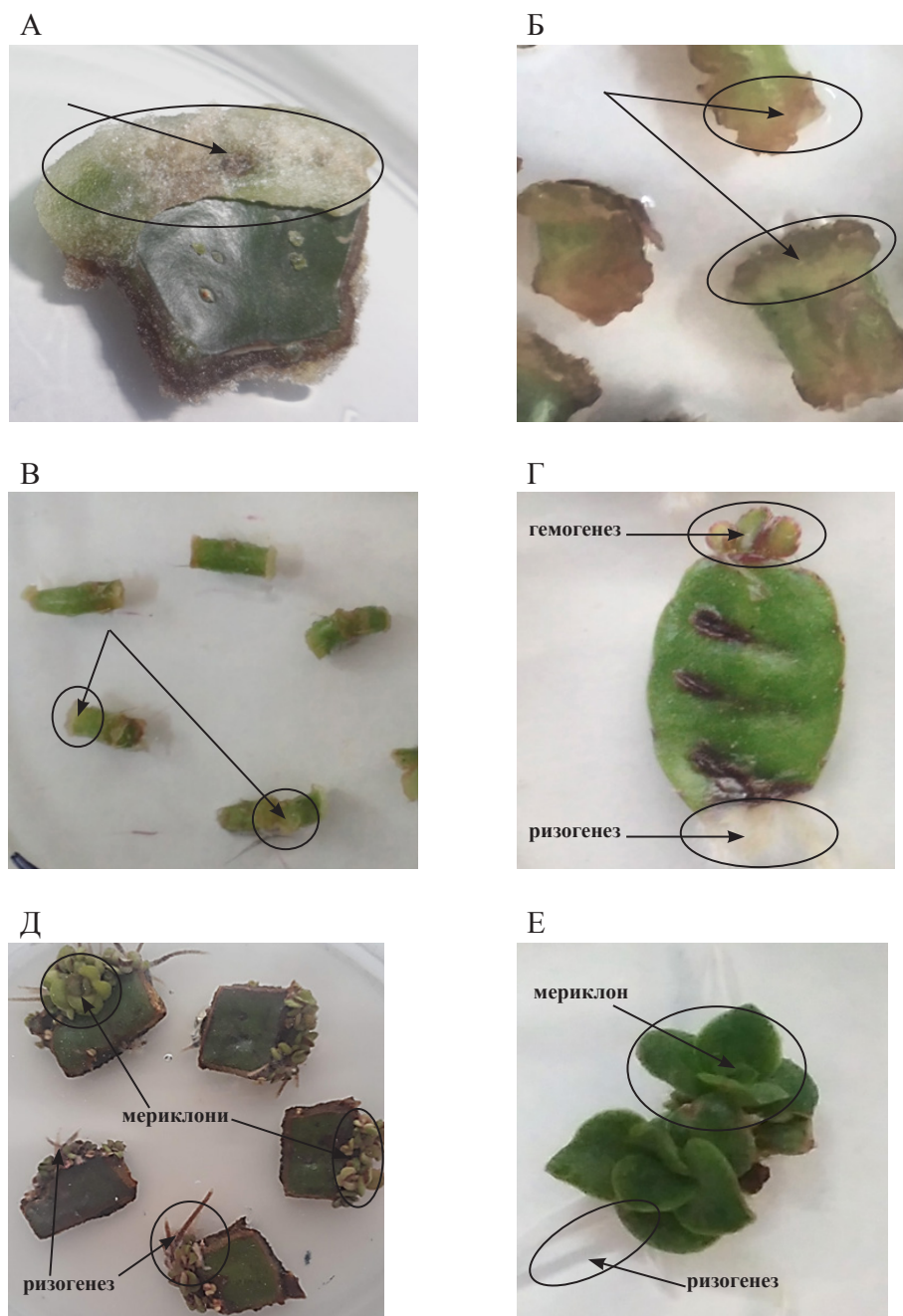


Рис. Морфогенетичні реакції декоративних сукулентів

А, Б, В – інтенсивний калусогенез (А – *Kalanchoe blossfeldiana*; Б – *Crassula ovata* "Hobbit", В – *Hatiora salicornioides*); Г, Д, Е – гемогенез, ризогенез, утворення мериклонів (Г – *Schlumbergera truncata*, Д, Е – *Crassula ovata* "Hobbit")

Fig. Morphogenetic reactions of ornamental succulents

А, Б, В – intensive callusogenesis (А – *Kalanchoe blossfeldiana*; Б – *Crassula ovata* "Hobbit", В – *Hatiora salicornioides*); Г, Д, Е – gemogenesis, rhizogenesis, mericlone formation (Г – *Schlumbergera truncata*, Д, Е – *Crassula ovata* "Hobbit")

Треба зауважити, що за мінімальних показників ефективності утворення мериклонів додавання до складу живильного середовища екстракту *Aloe vera* значно стимулює цей процес – у *S. truncata* на 10–27%, а у *K. blossfeldiana* – майже у два рази з 35% до 67%.

Отже стимулювальний вплив екстракту *Aloe vera* у складі живильного середовища встановлений для тих культур, які демонструють нижчі показники ефективності утворення мериклонів за контрольних умов. Вірогідно, це пов'язано з їх біологічними особливостями.

Морфогенетичні реакції в культурі *in vitro* можуть відбуватися різноманітними шляхами: утворення калусу – калусогенез, утворення меристематичних клонів – гомогенез, утворення коренів – ризогенез [1,4].

Результати вивчення калусогенезу показали (табл. 2, рис. А–В), що на експлантах *C. ovata* “Hobbit”, *H. salicornioides* і *S. truncata* практично з однаковою швидкістю утворювалося по 100% калусів як у контролі, так і за додавання екстракту *Aloe vera*. На експлантах *K. blossfeldiana* цей процес був повільнішим і значно менш ефективним. На регенераційному середовищі (РС) утворювалося 75% калусів, а за додавання екстракту *Aloe vera* – 83%. Тобто екстракт стимулював калусогенез тільки у *K. blossfeldiana*.

Дослідження гомогенезу показало (табл. 2, рис. Г–Е), що найшвидше він відбувався у *C. ovata* “Hobbit”, дещо повільніше у *H. salicornioides* за обох варіантів досліду. Хоча додавання екстракту *Aloe vera* прискорювало гомогенез у обох видів на 6–7 днів. У *K. blossfeldiana* і *S. truncata* швидкість гомогенезу була практично однаковою, але меншою ніж у інших видів, як на РС, так і з додаванням екстракту алое. Разом з тим ефективність гомогенезу у *K. blossfeldiana* була найнижчою серед усіх досліджених видів – 35% на РС і 67% з додаванням екстракту, проти 90–100% у інших видів (табл. 2).

Додавання екстракту алое не змінювало ефективність гомогенезу у *C. ovata* “Hobbit”, *H. salicornioides*, дещо підвищувало її у *S. truncata* і зумовлювало майже подвійне зростання у *K. blossfeldiana* (табл. 2).

Результати дослідження ризогенезу, показали (рис. Г–Е), що найшвидше він проявився у *S. truncata* – вже на 21–28 добу культивування, пізніше та з однаковою швидкістю у *C. ovata* “Hobbit” та *H. salicornioides* за обох варіантів досліду. Водночас у *K. blossfeldiana* ризогенез був відсутнім до завершення експерименту (табл. 2). Показники ефективності ризогенезу були значно нижчими ніж ефективність гомогенезу у *C. ovata* “Hobbit” та *H. Salicornioides* та майже однаковими у *S. truncata*.

Додавання екстракту алое підвищувало ефективність ризогенезу і особливо сильно – майже втричі у *H. salicornioides*.

Отже, стимулювальний ефект екстракту *Aloe vera* на морфогенетичні процеси *in vitro* проявляється у досліджених видів сукулентів. Однак він до певної міри є видоспецифічним.

Екстракт *Aloe vera* у складі живильного середовища не впливає на перший етап введення в культуру *in vitro* – ефективність стерилізації листових експлантів у досліджуваних представників декоративних сукулентів

За умов культивування на регенераційному середовищі $\frac{1}{2}$ МС + 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК морфогенетичний потенціал листових експлантів реа-



Таблиця 2

Вплив екстракту *Aloe vera* на прояв морфогенетичних реакцій за мікроклонального розмноження представників декоративних сукулентів

Table 2

Influence of *Aloe vera* extract on the manifestation of morphogenetic reactions microclonal propagation of the representatives of ornamental succulents

Сукулент, вид	Варіант	Калусогенез		Гемогенез		Ризогенез	
		ефективність, %	швидкість, діб	ефективність, %	швидкість, діб	ефективність, %	швидкість, діб
<i>Crassula ovata</i> "Hobbit"	PC**	100,0±1,0	5,0±1,0	100,0±1,0	42,0±2,0	23,0±1,2	49,0±2,0
	PC+Aloe vera	100,0±1,0	5,0±1,0	100,0±1,0	35,0±1,0*	56,0±2,8*	56,0±3,0*
<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>	PC	75,0±3,7	7,0±1,0	35,0±1,7	56,0±2,0	-	-
	PC+Aloe vera	83,0±4,8*	8,0±2,0	67,0±3,4	53,0±2,0	-	-
<i>Hatiora salicornioides</i>	PC	100,0±1,0	7,0±1,0	100,0±1,0	49,0±2,0	13,0±0,6	49,0±2,0
	PC+Aloe vera	100,0±1,0	7,0±1,0	100,0±1,0	42,0±2,0*	38,0±1,9*	56,0±2,0*
<i>Schlumbergera truncata</i>	PC	100,0±1,0	7,0±1,0	90,0±1,5	56,0±2,0	85,0±4,0	28,0±1,0
	PC+Aloe vera	100,0±1,0	7,0±1,0	100,0±1,0*	48,0±1,0*	100,0±1,0*	21,0±1,0*

Примітки : 1 *) – відмінності істотні при $P \leq 0,05$;

2 **) – PC регенераційне середовище – 1/2 MS + 3,0 БАП мг/л + 0,5 мг/л НОК

Notes: 1 *) – the differences are significant at $P \leq 0,05$;

2 **) – RM regeneration medium – 1/2 MS + 3.0 BAP mg / l + 0.5 mg / l NAA

лізується шляхом розвитку процесів калусогенезу протягом 1-го тижня культивування та інтенсивного адвентивного гомогенезу через 6–8 тижнів культивування. Інтенсивний ризогенез показаний тільки для листових експлантів *S. truncata*.

Ефективність утворення мериклонів – основного етапу мікроклонального розмноження рослин – максимальна у представників *C. ovata* “Hobbit” та *H. salicornioides*, мінімальна – у *K. blossfeldiana*. Екстракт *Aloe vera* у складі живильного середовища стимулює ефективність і на 7–8 діб прискорює швидкість цього процесу та в 1,3–2,3 рази збільшує кількість мериклонів на одному експланті.

Екстракт *Aloe vera* у складі живильного середовища для мікроклонального розмноження декоративних сукулентів проявляє стимулювальний ефект і може бути запропонований як ефективний біостимулятор для збільшення коефіцієнту розмноження досліджуваних культур.

О.А. Авксентьева

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, Харьков, 61022, Украина,
e-mail: avksentyeva@karazin.ua

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА *ALOE VERA* НА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ ДЕКОРАТИВНЫХ СУККУЛЕНТОВ

Реферат

Цель. Целью работы было выяснить влияние экстракта *Aloe vera* на эффективность введения в культуру *in vitro* и морфогенетические реакции в условиях микроклонального размножения представителей декоративных сукулентов. **Методы.** В работе использовали стандартные биотехнологические методы микроклонального размножения путем индукции адвентивного гомогенеза. Исходный материал отбирали у растений-доноров декоративных сукулентов – *Crassula ovata* “Hobbit” (Mill), *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.), *Natiora salicornioides* и *Schlumbergera truncata*. В качестве эксплантов использовали высадки зрелых листьев, которые после поверхностной поэтапной стерилизации культивировали на регенерационной среде Мура-сиге-Скуга (МС) с добавлением синтетических регуляторов роста – 6-бензиламинопурина (БАП) цитокининового типа действия и α -нафтилуксусной кислоты (НОК) ауксинового действия. В контрольном варианте регенерационная среда (РС) по составу содержала половинный набор макро- и микроэлементов и синтетические фитогормоны – 1/2 МС + 3,0 мг/л БАП + 0,5 мг/л НОК, а в опытном варианте в питательную среду вносили экстракт *Aloe vera* в соотношении 1:100. Исследовали эффективность стерилизации и образования мериклонов при введении в культуру *in vitro*, скорость и эффективность различных морфогенетических реакций: калусогенез, гомогенез и ризогенез. **Результаты.** В ходе проведенных исследований установлено, что экстракт *Aloe vera* в составе питательной среды не влияет на эффективность стерилизации листовых эксплантов у исследуемых представите-



лей декоративных суккулентов. Морфогенетический потенциал листовых экплантов реализуется путем развития процессов каллусогенеза течение первой недели культивирования и интенсивного адвентивного геммогенеза через 6–8 недель культивирования. Интенсивный ризогенез показан только для листовых экплантов *Schlumbergera truncata*. Экстракт *Aloe vera* в составе питательной среды стимулирует эффективность процесса геммогенеза, в 1,3–2,3 раза увеличивает количество меристематических клонов на одном экпланте и на 7–8 суток ускоряет скорость процесса. Исследуемые декоративные суккуленты различаются по эффективности микроклонального размножения – максимальные показатели у *Crassula ovata* "Hobbit" (Mill) и *Hatiora salicornioides*, минимальные – у *Kalanchoe blossfeldiana*. **Выводы.** Экстракт *Aloe vera* в составе питательной среды для микроклонального размножения декоративных суккулентов проявляет стимулирующий эффект и может быть использован как эффективный биостимулятор для увеличения коэффициента размножения исследуемых культур.

Ключевые слова: экстракт *Aloe vera*, декоративные суккуленты, микроклональное размножения, морфогенетические реакции.

O.O. Avksentieva

V. N. Karazin Kharkiv National University,
4, sq. Freedom, Kharkiv, 61022, Ukraine,
e-mail: avksentyeva@karazin.ua

INVESTIGATION OF *ALOE VERA* EXTRACT EFFECT ON MORPHOGENETIC REACTIONS DURING MICROCLONAL PROPAGATION OF ORNAMENTAL SUCCULENTS

Summary

Aim. The aim of the work was to elucidate the effect of *Aloe vera* extract on the efficiency of *in vitro* introduction into the culture and morphogenetic reactions under the conditions of microclonal propagation of the representatives of ornamental succulents. **Methods.** The work used standard biotechnological methods of microclonal propagation by induction of adventitious shoot formation. The source material was selected from donor plants of decorative succulents – *Crassula ovata* "Hobbit" (Mill), *Kalanchoe blossfeldiana* (Poelln.), *Hatiora salicornioides* and *Schlumbergera truncata*. As explants, die cuts of mature leaves were used, which, after surface phased sterilization, were cultivated on Murasige-Skoog (MS) regeneration medium with the addition of synthetic growth regulators, 6-benzylaminopurine (BAP) of cytokinin type of action and α -naphthylacetic acid (NAA) of auxin action. In the control variant, the regeneration medium (RS) in its composition contained a half set of macro- and microelements and synthetic phytohormones – $\frac{1}{2}$ MS + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, and in the experimental version, *Aloe vera* extract was added to the nutrient medium 1:100 ratio. The efficiency of sterilization and the formation of mericlones for introduction into culture and the speed and efficiency of various morphogenetic reactions: callus formation, shoot formation, and root formation were studied. **Results.** According to the results of the research, it was found that in the composition of the nutrient medium *Aloe vera*



extract does not affect the efficiency of sterilization of leaf explants in the studied representatives of ornamental succulents. The morphogenetic potential of leaf explants is realized through the development of callus formation process during the first week of cultivation and intensive adventitious shoot formation after 6–8 weeks of cultivation. Intensive root formation is indicated only for leaf explants *Schlumbergera truncata*. *Aloe vera* extract in the nutrient medium stimulates the efficiency of the shoot formation process, increases the number of meristematic clones on one explant by 1.3–2.3 times and accelerates the process speed by 7–8 days. The studied decorative succulents differ in the efficiency of microclonal propagation – the maximum values are for *Crassula ovata* "Hobbit" (Mill) and *Hatiora salicornioides*, the minimum are for *Kalanchoe blossfeldiana*. **Conclusions.** *Aloe vera* extract in the composition of the nutrient medium for microclonal propagation of ornamental succulents exhibits a stimulating effect and can be offered as an effective biostimulator for increasing the propagation coefficient of the studied cultures.

Key words: *Aloe vera* extract, ornamental succulents, microclonal propagation, morphogenetic reactions.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авксентьєва О. О., Шулік В. В. Біотехнологія вищих рослин: культура *in vitro*. – Х. : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2017. – 90 с.
2. Атраментова Л. А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии: учебник. – Горловка: Ліхтар, 2008. – 248 с.
3. Дроботюк К.О., Романишина Т.О., Прокопенко В.С. Особливості застосування екстракту алое у технології культивування герпесвірусів // Науковий вісник ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. – 2017. – Т. 19, № 82. – С. 3–7.
4. Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643–664.
5. Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур // Сборник научных трудов ГНБС. – Т. 138, 2014. – С. 57–101.
6. Ишмуратова М.М. Влияние экстрактов родиолы розовой на развитие эксплантов родиолы розовой и ирмельской в культуре *in vitro* // Биотехнология. – 2002. № 6. – С. 52–56.
7. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.
8. Наниева Л.Б. Получение и цитологический анализ каллусной культуры отточков *in vitro* // Аграрный вест. Урала. – 2013. – Вып. 10(116). – С. 15–17.
9. Патент России 1680021. Питательная среда для микроклонального размножения косточковых культур / Фардзинова И.М.; №2045891 заявл. 06.08.1992; опубл. 20.10.1995. Бюл. 4.
10. Шумихин С.А. Оптимизация питательной среды при микроклональном размножении георгины культурной // Вестник Пермского университета. Серия биология. – 2005. – Вып. 5. – С. 59–63.
11. Ahmed S. K., Hammam K.A., Amer A A. Effect of biofertilization and some plant extracts on the growth, yield and chemical constituents of basil plants // Journal Plant Production Mansoura Univ. – 2014. – № 5. – P. 23–31.



12. Fadia El Sherif. Aloe vera leaf extract as a potential growth enhancer for populus trees grown under *in vitro* conditions // American Journal of Plant Biology. 2017. –Vol. 2(4). – P. 101–105.

13. Hamman H J. Composition and applications of Aloe vera leaf // Molecules. – 2008. – Vol. 13 (8). – P. 1599–616.

14. Nordqvist C. Nine health benefits and medical uses of Aloe vera // Medical News Today. – 2017. – P. 34–46.

15. Padmaja C. K., Kowsalya B., Seethalakshmi C. Efficacy of Aloe vera leaf powder as biostimulant in enhancing the growth and yield of Lady's Finger (*Abelmoschus esculentus* L.) // Research on Crops. – 2007. Vol. 8. – P. 456–461.

References

1. Avksentieva OO, Shulik VV. Higher plant biotechnology: *in vitro* culture. – Kh.: VN Karazin KhNU, 2017. 90 p. (in Ukrainian)

2. Atramentova LA, Utevskaja OM. Statistical methods in biology: a textbook. Horlovka: Likhtar, 2008. 248 p. (in Russian)

3. Drobotiuk KO, Romanyshyna TO, Prokopenko V.S Features of application of aloe extract in the technology of cultivation of herpes viruses. Scientific Messenger LNUVMB, 2017. 19(82): -3-7 (in Ukrainian) doi:10.15421/nvlvet8201

Zhuravlev YuN, Omelko AM. Plant morphogenesis *in vitro*. Russian journal of plant physiology. 2008. 55 (5) : 643–664 (in Russian)

5. Ivanova NN, Mitrofanova IV, Mitrofanova OV. Methodological principles of clonal micropropagation of some decorative cultures. Works of the state Nikita botanical garden. 2014. 138:57-101 (in Russian)

6. Ishmuratova MM. The influence of *Rhodiola rosea* extracts on the development of explants of *Rhodiola rosea* and *Iremel* *in vitro*. Biotechnology. 2002. 6 :52–56 (in Russian).

7. Kushnir HP, Sarnatska VV. Microclonal reproduction of plants. Theory and Practice. K: Naukova dumka, 2005. 270 p. (in Ukrainian)

8. Nanieva LB. Obtaining and cytological analysis of callus culture of stone-crops *in vitro*. Agrarian Bulletin of the Urals. 2013. 10(116):15-17 (in Russian)

9. Patent Russian 1680021. Nutrient medium for microclonal propagation of stone fruits / Fardzinova IM. №2045891 decl. 06.08.1992; publ 20.10.1995. Bull. №4 (in Russian)

10. Shumihin SA. Optimization of the culture medium during microclonal propagation of cultural dahlias. Bulletin of Perm University. Biology. 2005. 5:59–63 (in Russian).

11. Ahmed SK, Hammam KA, Amer AA. Effect of biofertilization and some plant extracts on the growth, yield and chemical constituents of basil plants. Journal Plant Production Mansoura Univ. 2014. 5:23-31. doi: 10.21608/jpp.2014.53504

12. Fadia El Sherif Aloe vera leaf extract as a potential growth enhancer for populus trees grown under *in vitro* conditions. American Journal of Plant Biology. 2017. 2(4):101-105. doi: 10.11648/j.ajpb.20170203.13

13. Hamman HJ. Composition and applications of Aloe vera leaf. Gel. Molecules. 2008. 13 (8):1599-616. doi: 10.3390 / molecules13081599



14. Nordqvist C. Nine health benefits and medical uses of Aloe vera. *Medical News Today*. 2017: 34-46.
15. Padmaja CK, Kowsalya B, Seethalakshmi C. Efficacy of Aloe vera leaf powder as biostimulant in enhancing the growth and yield of Lady's Finger (*Abelmoschus esculentus* L.). *Research on Crops*. 2007. (8): 456-461.

Стаття надійшла до редакції 21.10.2019 р.



**М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, М.С. Джура, Л.М. Стрезєва,
Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: kgalkin@onu.edu.ua

ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ШТАМАМИ *SALMONELLA ENTERITIDIS* ЗА ПРИСУТНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ АНАЛОГІВ 2-ГЕПТИЛ-3-ГІДРОКСИ-4-ХІНОЛОНУ

Мета роботи – дослідити формування біоплівки клітинами *S. enteritidis* за впливу оригінальних похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS) з різною довжиною алкільного ланцюга. **Методи.** Клітини тест штамів інкубували у 96-лункових планшетах за присутності 20, 40 та 80 мкМ досліджуваних сполук. Сполуки були поділені на дві групи – зі скороченою та подовженою відносно PQS довжиною алкільного ланцюга. Вміст планктонних клітин визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм. Формування біоплівки оцінювали за допомогою CV-тесту (crystal violet-тесту) спектрофотометрично при довжині хвилі 592 нм. **Результати.** Отримані результати показали що аналоги PQS зі скороченою довжиною алкільного ланцюга, у більшості випадків знижують вміст планктонних клітин, тоді як похідні з подовженим алкільним ланцюгом виявили тенденцію до стимулювання планктонної культури. PQS і його синтетичні аналоги зі скороченою довжиною алкільного ланцюга або не впливали, або помірно стимулювали формування біоплівки тест-штамами *S. enteritidis*. На противагу цьому похідні з подовженим алкільним ланцюгом достовірно знижували масу біоплівки на 50–70% у порівнянні з контролем. **Висновок.** Показано, що аналоги сигнального хінолону *Pseudomonas aeruginosa* з подовженим алкільним ланцюгом є ефективними пригнічувачами утворення біоплівок різними штамами *S. enteritidis*.

Ключові слова: 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон (PQS), синтетичні аналоги PQS, *S. enteritidis*, біоплівки.

Salmonella enterica – внутрішньоклітинний грамнегативний збудник, який заражає різних господарів, і включає понад 2500 сероварів. Одним з таких, що найчастіше пов'язані з інфекціями людини, є серовар *Salmonella enteritidis*. Сальмонела може викликати захворювання у домашніх тварин, тяжкість яких може коливатися у широкому діапазоні: від безсимптомної форми до діареї, ентериту та, навіть, до системного синдрому, і спричиняти величезні економічні втрати у свинарстві та птахівництві. Важливою для поширення сальмонельозів є здатність збудника до утворення біоплівки, оскільки бактерії в її складі стійкі до антибіотиків, дезінфікувальних засобів, хіміч-

© М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, М.С. Джура, Л.М. Стрезєва, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, 2019



них, фізичних та механічних чинників [6]. Нещодавно було показано, що у разі спільного культивування *Salmonella enteritidis* з *Pseudomonas aeruginosa* кількість сальмонел у складі біоплівки є достовірно меншою у порівнянні з моновидовою біоплівкою [8]. Скоріше за все, вплив псевдомонад опосередковується якимись регуляторними молекулами, зокрема аутоіндукторами, що контролюють формування біоплівок. Одним з кандидатів на цю роль може бути сигнальний хінолон.

2-Гептил-3-гідрокси-4-хінолон, що носить назву PQS (**P**seudomonas **Q**uinolon **S**ignal) [13], є однією з найбільш вивчених сигнальних молекул серед бактерій. Ця сполука є унікальною для *Pseudomonas aeruginosa*, у якій вона грає роль регулятора однієї з трьох ланок системи міжклітинної комунікації – quorum sensing (QS). Ця система у *P. aeruginosa* побудована за принципом аутоіндукції та складається з трьох пов'язаних між собою ланок: *las*-, *rhl*- та *pqs*-, в кожній з яких використовується своя сигнальна молекула [7, 9]. Саме регулятором ланки *pqs*- і є 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон. Загалом ця молекула грає величезну роль у функціонуванні клітин *P. aeruginosa*, регулюючи роботу всіх ланок системи QS [7], синтез вторинних метаболітів, таких як рамноліпіди та феназинові пігменти [5], та, навіть, використовується як зброя у конкурентній боротьбі з іншими видами мікроорганізмів [14].

У зв'язку з тим, що молекула 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону має з одного боку великий потенціал для хімічних модифікацій, а з іншого, її синтез не є надто складним, синтетичні аналоги цієї сполуки з різними замісниками [12] є досить перспективними для створення на їх основі нових антимікробних препаратів. Існують чисельні публікації, які вказують на значну ефективність похідних PQS як модуляторів формування біоплівки та роботи системи QS *P. aeruginosa* [1, 3, 12]. Однак, сьогодні практично не існує інформації щодо впливу таких сполук на інші грамнегативні та грампозитивні бактерії.

Таким чином, метою даної роботи, було дослідити формування біоплівок клітинами *S. enteritidis* за впливу оригінальних похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS) з різною довжиною алкільного ланцюга.

Матеріали та методи

У роботі було досліджено синтетичні похідні 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону з різною довжиною алкільного ланцюга. Сполуки були синтезовані у Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за методикою [11]. Структурні формули досліджених сполук наведені у табл.

В роботі були використані штами *Salmonella enteritidis* ONU 262, ONU 465 та ONU 466 з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Штами культивували на м'ясо-пептоному агарі при 37 °С та зберігали при 4 °С.

Усі експерименти проводили на рідкому середовищі LB з таким складом (г/л): пептон – 15,0; дріжджовий екстракт – 10,0; хлорид натрію – 5,0.

Визначення маси біоплівки та кількості планктонних клітин проводили за культивування у 96-лункових плоскодонних планшетах Nuclon. У дослідні лунки додавали по 4 мкл розчинів досліджуваних сполук у димети-

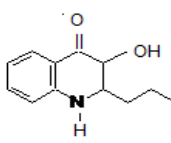
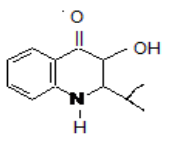
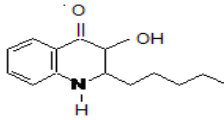
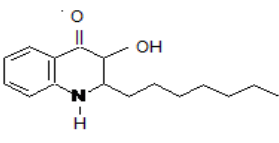
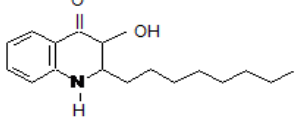
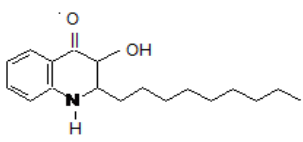
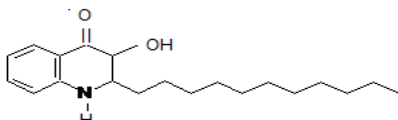


Таблиця 1

Структурні формули та хімічні назви похідних 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону, що використовувалися у дослідженні

Table 1

Structure formula and chemical names of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon derivatives, used in this study

Назва сполуки	Структурна формула
2-пропіл-3-гідрокси-4-хінолон, C3Q	
2-ізопропіл-3-гідрокси-4-хінолон, iC3Q	
2-пентил-3-гідрокси-4-хінолон, C5Q	
2-гептил-гідрокси-4-хінолон, PQS	
2-октил-3-гідрокси-4-хінолон, C8Q	
2-ноніл-3-гідрокси-4-хінолон, C9Q	
2-ундодеканоїл-3-гідрокси-4-хінолон, C11Q	

лсульфоксиді (ДМСО) до кінцевих концентрацій 20, 40 та 80 мкМ, 20 мкл суспензій клітин тест-штамів *S. enteritidis* (10^3 КУО/мл) та 180 мкл середовища LB. У контрольні лунки замість сполук додавали 4 мкл ДМСО. Планшети інкубували при 37 °С впродовж 24 годин.

Кількість клітин у планктоні оцінювали спектрофотометрично при довжині хвилі 600 нм.



Після ретельного відмивання лунок планшетів від неприкріплених клітин біоплівки фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв, висушували і забарвлювали 1% розчином кристалічного фіолетового. Через 15 хвилин барвник видаляли, лунки промивали і після висушування додавали по 200 мкл лізувального розчину, що містив 0,1 М NaOH і 1% додецилсульфату натрію. Оптичну густину вимірювали при довжині хвилі 592 нм [4].

Спектрофотометричні вимірювання здійснювали на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad, Hungary).

Усі експерименти проводили у 3-х незалежних дослідах з 8 повторами у кожному. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S\bar{X}$). Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].

Результати та їх обговорення

На першому етапі роботи було досліджено вплив похідних PQS на планктонні культури тест-штамів *S. enteritidis* Одержані дані (рис. 1 А–В) показали, що PQS та його аналоги С3Q і С5Q знижують кількість планктонних клітин *S. enteritidis* 262, і *S. enteritidis* 465 у 1,6–6 разів. При цьому чутливішим до цих сполук виявився штам *S. enteritidis* 465. Сполука іС3Q, яка має розгалужений алкільний радикал, не чинила впливу на цей показник. На вміст клітин у планктоні *S. enteritidis* 466 впливав лише сигнальний хінолон, який знижував їх кількість на 23% незалежно від концентрації. Аналоги зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга не змінювали вміст клітин у планктоні (рис. 1В).

Дані щодо активності похідних з більшою ніж у PQS довжиною алкільного ланцюга наведені на рис. 2.

Встановлено, що усі три сполуки цієї групи – С8Q, С9Q, С11Q, на відміну від PQS і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга, суттєвих змін не викликали. Лише у концентрації 80 мкМ сполуки С8Q і С9Q достовірно зменшували вміст планктонних клітин у штамів *S. enteritidis* 262, і *S. enteritidis* 465.

У деяких випадках за дії сполук С8Q, С9Q, С11Q спостерігалось зростання кількості планктонних клітин, але воно не було достовірним (рис. 2 А, Б, В).

Визначення впливу досліджених сполук на утворення біоплівки *S. enteritidis* 262, 465 і 466 показало, що PQS та його синтетичні похідні С3Q, іС3Q і С5Q різним чином змінюють цей показник у досліджуваних штамів (рис. 3). Так, у разі *S. enteritidis* 262 за концентрацій цих сполук 20 і 40 мкМ спостерігається тенденція до зменшення маси біоплівок, а за концентрації 80 мкМ – її достовірне зниження на 35–40%.



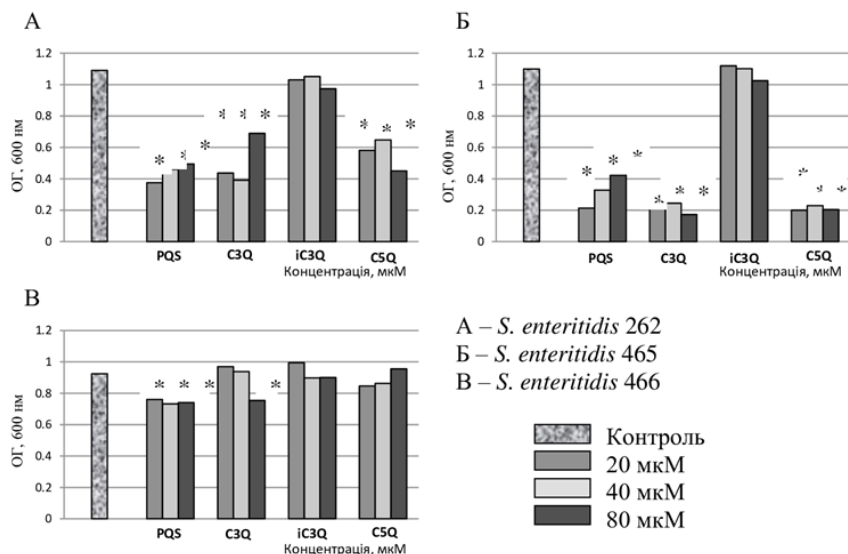


Рис. 1. Вплив синтетичних аналогів PQS зі скороченою довжиною алкільного ланцюга на вміст планктонних клітин тест-штамів *S. enteritidis*
 Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Effect of PQS and its synthetic analogs with shortened alkyl chain on *S. enteritidis* test-strains planktonic cells content
 Note: * – the differences were significant in comparison with control

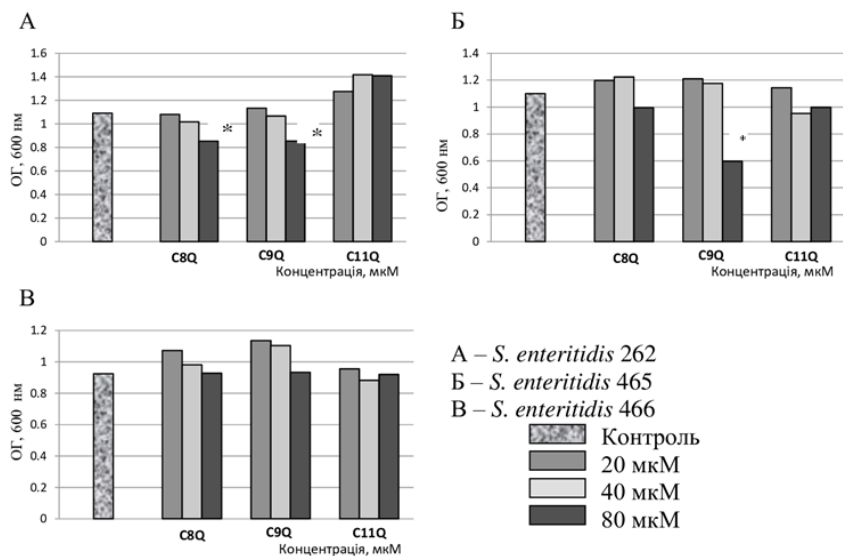


Рис. 2. Вплив синтетичних аналогів PQS з подовженим алкільним ланцюгом на вміст планктонних клітин тест-штамів *S. enteritidis*
 Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. Effect of synthetic analogs of PQS with extended alkyl chain on *S. enteritidis* test-strains planktonic cells content
 Note: * – the differences were significant in comparison with control

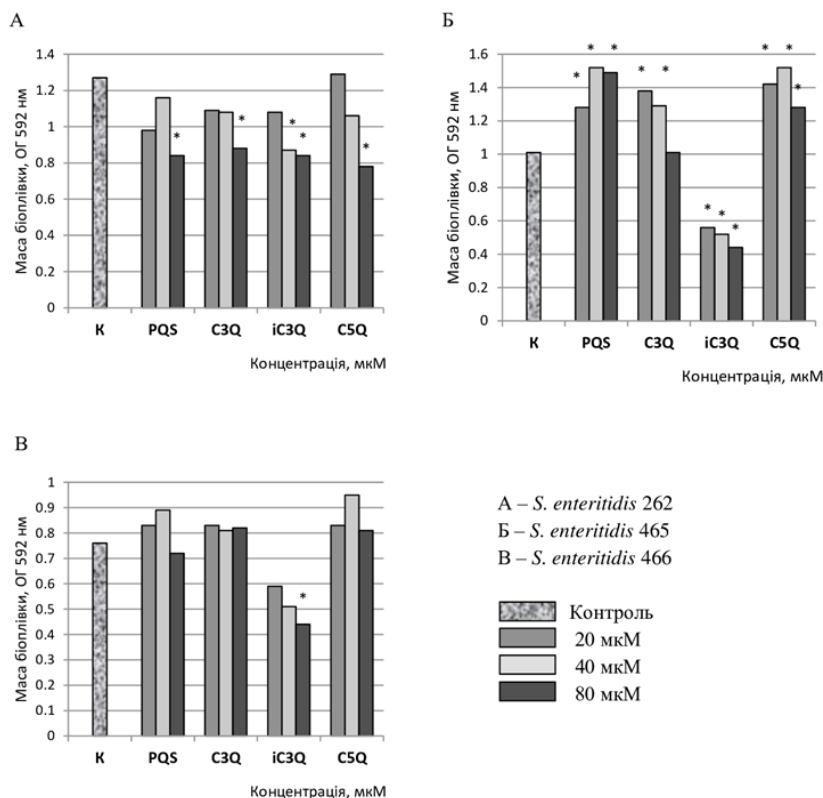


Рис. 3. Вплив PQS та його синтетичних аналогів з скороченою довжиною алкільного ланцюга на формування біоплівки тест-штамами *S. enteritidis*
 Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 3. Effect of PQS and its synthetic analogs with extended alkyl chain action on *S. enteritidis* test-strains biofilm formation

Note: * – the differences were significant in comparison with control

Протилежна спрямованість дії PQS, С3Q і С5Q зареєстрована для штаму *S. enteritidis* 465 (рис. 3Б). За їх присутності у середовищі культивування формування біоплівок було найефективнішим, а маса зростала на 20–50%. У той же час, іС3Q сповільнював цей процес і маса утворених біоплівок складала лише 40–55% від контролю. Співставлення змін кількості планктонних клітин і маси біоплівок даного штаму за присутності PQS та його аналогів зі зниженою довжиною алкільного замісника свідчить про різноспрямований характер їх впливу на дані показники.

Аналоги сигнального хінолону С8Q, С9Q і С11Q, навпаки, чинили однострамовану дію на формування біоплівок усіма штамами (рис. 4 А, Б, В).

Найбільший пригнічувальний ефект спостерігався у разі *S. enteritidis* 262 і *S. enteritidis* 465. Сполуки С8Q і С9Q знижували масу біоплівок цих штамів у 2,8–3 рази. Вплив С11Q був дещо слабкішим і маса сформованих за його присутності біоплівок складала 50–60% від контрольного рівня (рис. 4 А, Б).

Штам *S. enteritidis* 466, як і в інших випадках (рис. 2), виявився більш стійким до впливу аналогів зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга. За



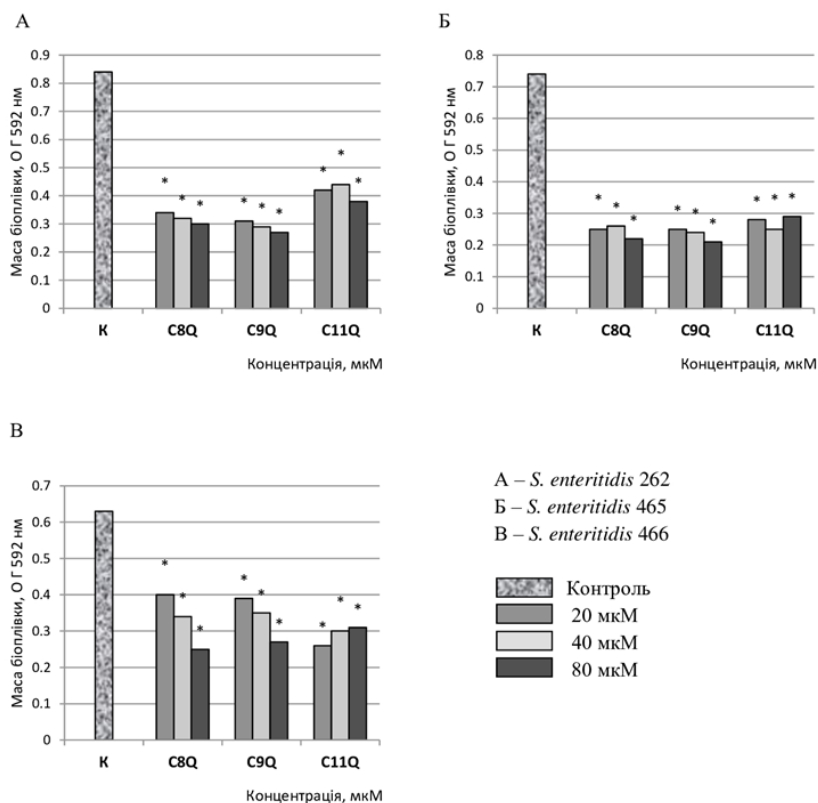


Рис. 4. Вплив PQS та його синтетичних аналогів з подовженим алкільним ланцюгом на формування біоплівки тест-штамами *S. enteritidis*
 Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 4. Effect of synthetic analogs of PQS with extended alkyl chain on *S. enteritidis* test-strains biofilm formation
 Note: * – the differences were significant in comparison with control

присутності С8Q, С9Q і С11Q маса біоплівок була меншою у 1,5–2,5 разів.

Підсумовуючи одержані результати, можна зробити висновок про перспективність створення на основі аналогів PQS зі збільшеною довжиною алкільного ланцюга нових антимікробних засобів з антибіоплівковими властивостями. Зокрема, відомо, що сальмонели здатні утворювати біоплівки на поверхні жовчних каменів і завдяки цьому тривалий час зберігається загроза розвитку гострого сальмонельозу [10]. Здатність PQS і його аналогів зі зменшеною довжиною алкільного ланцюга стимулювати утворення біоплівки штамом *S. enteritidis* 466 може бути використана для створення на його основі родентицидних препаратів. З цієї точки зору представляє інтерес дослідження впливу даних сполук на утворення біоплівки штамом *Salmonella enteritidis* var. Issatchenko, на основі якого виготовляється препарат «Бактороденцид-М».

Таким чином, показано, що аналоги сигнального хінолону *Pseudomonas aeruginosa* з подовженим алкільним ланцюгом є ефективними пригнічувачами утворення біоплівок бактеріями різних штамів *S. enteritidis*.

**Н.Б. Галкин, С.В. Водзинский, М.С. Джура, Л.М. Стрезева,
Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова**

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

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ ШТАММАМИ *SALMONELLA ENTERITIDIS* В ПРИСУТСТВИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ СИГНАЛЬНОГО ХИНОЛОНА

Реферат

Цель работы – изучить формирование биопленки клетками *S. enteritidis* под влиянием оригинальных производных 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолона (PQS) с разной длиной алкильной цепи. **Методы.** Клетки тест штаммов инкубировали в 96-луночных планшетах в присутствии 20, 40 и 80 мкм исследуемых соединений. Соединения были разделены на две группы: с укороченной и удлиненной относительно PQS алкильной цепью. Содержание планктонных клеток определяли спектрофотометрически при длине волны 600 нм. Формирование биопленки оценивали с помощью CV-теста (crystal violet-теста) спектрофотометрически при длине волны 592 нм. **Результаты.** Полученные результаты показали, что аналоги PQS с укороченной длиной алкильной цепи в большинстве случаев снижали содержание планктонных клеток, тогда как производные с удлиненной алкильной цепью показали тенденцию к стимулированию планктонной культуры. PQS и его синтетические аналоги с укороченной длиной алкильной цепи либо не влияли, либо умеренно стимулировали формирование биопленки тест-штаммами *S. enteritidis*. В противоположность этому производные с удлиненной алкильной цепью достоверно снижали массу биопленки на 50–70% по сравнению с контролем. **Выводы.** Показано, что аналоги сигнального хинолона *Pseudomonas aeruginosa* с удлиненной алкильной цепью являются эффективными ингибиторами образования биопленок разными штаммами *S. enteritidis*.

Ключевые слова: 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (PQS), синтетические аналоги PQS, *S. enteritidis*, биопленки.

**M.B. Galkin, S.V. Vodzinsky, M.S. Dzhura, L.M. Strezeva,
B.M. Galkin T.O. Filipova**

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

BIOFILM FORMATION BY *SALMONELLA ENTERITIDIS* STRAINS IN PRESENCE OF SIGNAL QUINOLON SYNTHETIC ANALOGUES

Summary

Aim. Study of the biofilm formation of *S. enteritidis* in presence of original derivatives of 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon with different length of alkyl chain.



Methods. Test strain cells were incubated in 96-well plates in presence 20, 40 and 80 μM of discovered compounds. The compounds were divided into two groups – with shortened length of alkyl chain then in PQS, and with extended length of alkyl chain then in PQS. Planktonic culture growth was determined spectrophotometrically on the wave length 600 nm. Biofilm formation was studied by CV-test (crystal violet-test) spectrophotometrically on the wave length 592 nm. **Results.** Obtained results showed that in presence of the PQS analogs with shortened length of alkyl chain decreased content of planktonic cells in most cases. In the same time PQS analogues with extended length of alkyl chain stimulated planktonic cells accumulation. PQS and its analogues with shortened length of alkyl chain were not active, or moderately stimulate biofilm formation of *S. enteritidis* test-strains. In the other hand, PQS analogues with extended alkyl chain significantly decrease *S. enteritidis* biofilm mass approximately by 50–70% and higher compare the control. **Conclusions.** It was shown that analogues of *Pseudomonas aeruginosa* signal quinolone with the extended alkyl chain are the effective inhibitors of biofilm formation by different strains of *S. enteritidis*.

Key words: 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS), PQS synthetic analogs, *S. enteritidis*, biofilms.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галкін М.Б., Водзінський С.В., Стрезєва Л.М., Джура М.А., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Формування біоплівки штамами *Pseudomonas aeruginosa* з різним рівнем внутрішньоклітинного цикло-ди-ГМФ за присутності синтетичних аналогів сигнального хінолону // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 42. – С. 26–38.
2. Ланач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2001. – 260 с.
3. Мухлис Абедалабас, Галкин Н.Б., Семенец А.С., Филиппова Т.О. Образование биоплёнки и синтез рамнолипидов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 в присутствии сигнального хинолона и его синтетических аналогов // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 22. – С. 32–40.
4. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. et al. Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices // J. clin. microbiol. 1985. – V. 22. – № 6. – P. 996–1006.
5. Dietrich L.E.P., Price-Whelan A., Petersen A., et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa* // Molecular Microbiology. – 2006. – V. 61. – P. 1308–1320.
6. Marin C., Hernandez A., Lainez M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants // Poult. Sci. – 2009. – V. 88. – P. 424–431.
7. McKnight S.L., Iglewski B H., Pesci E C. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of Bacteriology. – 2000. – V. 182. – P. 2702–2708.
8. Pang X., Yuk H.-G. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the sanitizer sensitivity of *Salmonella enteritidis* biofilm cells in chicken juice // Food Control.



– 2017. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.012.

9. Pesci E. C., Iglewski B. H. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing // Trends Microbiol. – 1997. – Vol. 5. – P. 132–134.

10. Prouty A.M., Schwesinger W.H., Gunn J.S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. // Infect Immun. – 2002. – V. 70. – P. 2640–2649.

11. Somanathan R., Smith K.M. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids // J. heterocycl. Chem. – 1981. – V. 18, № 6. – P. 1077–1079.

12. Soukarieh F., Oton E.V., Dubern J-F., et al. In silico and in vitro-guided identification of inhibitors of alkylquinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Molecules. – 2018. – V. 23. – P. 257–272.

13. Welch M., Hodgkinson J.T., Gross J., et al. Ligand binding kinetics of the quorum sensing regulator PqsR // Biochemistry. – 2013. – V. 52. – P. 4433–4438.

14. Zaborina O., Lepine F., Gaoping Xiao, et al. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa* // PLoS pathogens. – 2007. – V. 3. – № 3. – P. 1–15.

References

1. Galkin MB, Vodzinsky SV, Strezeva LM, Dzhura MA, Galkin BM, Filipova TO. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* strains with different level of the intracellular C-DI-GMP in presence of signal quinolon synthetic analogs. Microbiology and Biotechnology. 2018;42(2):26-38. (in Ukrainian)

2. Lapach CN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metodi v mediko-biologicheskikh issledovaniyach s ispolsovaniem Excel. – K.: Morion. – 2001. – 260 p. (in Russian)

3. Muchlis Abedalabas, Galkin NB, Semenets AS., Filipova TO. Biofilm formation and rhamnolipids biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 in presence of signal quinolon and its synthetic analogs. Microbiology and Biotechnology. 2013;22(2):32-40 (in Ukrainian)

4. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. J. clin. microbiol. 1985;22(6):996–1006

5. Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. 2006;6:1308–1320. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x

6. Marin C, Hernandez A, Lainez M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. Poult Sci. 2009;88:424–431.

7. McKnight S L, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact.2000;182:2702–2708.

8. Pang X. & Yuk H.-G., Effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the sanitizer sensitivity of *Salmonella Enteritidis* biofilm cells in chicken juice. Food Control (2017), doi: 10.1016/j.foodcont.2017.11.012.



9. Pesci EC, Iglewski BH. The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. Trends Microbiol. 1997;5:132-134. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01008-1

10. Prouty AM, Schwesinger WH, Gunn JS. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. *Infect Immun*. 2002,70:2640–2649.

11. Somanathan R, Smith KM. Synthesis of some 2-alkyl-4-quinolone and 2-alkyl-4-methoxyquinoline alkaloids J. heterocycl. Chem. 1981;18(6):1077-1079. doi: 10.1002/jhet.5570180603

12. Soukariéh F, Oton EV, Dubern J-F, et al. In Silico and in Vitro-Guided Identification of Inhibitors of Alkylquinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*. 2018;23:257-272. doi: 10.3390/molecules23020257

13. Welch M, Hodgkinson JT, Gross J, et al. Ligand binding kinetics of the quorum sensing regulator PqsR. *Biochemistry*. 2013;52:4433–4438. doi: 10.1021/bi400315s

14. Zaborina O, Lepine F, Gaoping Xiao, et al. Dynorphin activates quorum sensing quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*. 2007;3(3):1-15. doi:10.1371/journal.ppat.0030035

Стаття надійшла до редакції 28.11.2019 р.



**Н.Ю. Васильєва, І.В. Страшнова, М.А. Васильєв,
І.П. Метеліцина**

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

СТІЙКІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*, ІЗОЛЬОВАНИХ З ЧОРНОМОРСЬКИХ ГУБОК, ДО АНТИБІОТИКІВ І ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Метою роботи є визначення ступеня стійкості до антибіотиків і важких металів молочнокислих бактерій, виділених з чорноморських губок роду *Haliclona* sp. *Методи*. Класичні мікробіологічні методи використовували для вивчення культуральних і біохімічних характеристик ізольованих штамів, що за сукупними показниками дозволило віднести ізольовані штами до роду *Lactobacillus*. Ідентифікацію до виду здійснювали за спектром жирних кислот з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock методом газової хроматографії. На підставі отриманих результатів штами ідентифікували до видів *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus parabuchneri* і *Lactobacillus bif fermentans*. Стійкість до важких металів визначали методом реплік, а резистентність до антибіотиків – диско-дифузійним методом. Графічне опрацювання даних проводили за програмою Microsoft Excel та R 3.4.0. *Результати*. За результатами дослідження показано, що більшість штамів молочнокислих бактерій були стійкими до канаміцину (95,2%), цефалексину (71,4%), цефазоліну (57,1%), левофлоксацину (71,4%), бензилпеніциліну (85,7%), оксациліну (76,2%), фугарину (76,2%). Серед штамів, які володіли множинною резистентністю, були *L. bif fermentans* 8a, *L. bif fermentans* 10₂, *L. bif fermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b} і *L. bif fermentans* 38_{2a}. Штами *L. bif fermentans* 8a, *L. parabuchneri* 10₁, *L. parabuchneri* 15_{2a}, *L. bif fermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b}, *L. vaccinostercus* 22₁ володіли резистентністю до нікелю, цинку та кобальту в концентрації 10 мМ, 10 мМ і 5 мМ, відповідно. Штами *L. bif fermentans* 15_{1b} і *L. parabuchneri* 25₂ володіли резистентністю до міді, кадмію і ртуті. *Висновки*. На основі отриманих даних показано, що більшість досліджених чорноморських штамів молочнокислих бактерій, ізольованих з губок володіють природною резистентністю до антибіотиків та важких металів.

Ключові слова: Чорне море, *Haliclona* sp., *Lactobacillus*, резистентність, антибіотики, важкі метали.

Молочнокислі бактерії активно використовуються для створення корисних і потенційно безпечних для здоров'я людини продуктів харчування. Однак у зв'язку з поширенням ринку пробіотиків виникла проблема мікробної стійкості до лікарських препаратів у даної групи мікроорганізмів.

Оскільки пробіотичні бактерії додаються в різні види продуктів, вони є



потенційним джерелом поширення генів стійкості до антибіотиків і хоча більшість продуктів харчування, які асоційовані з молочнокислими бактеріями, набули статусу «Generally Regarded As Safe» (GRAS), потенційний ризик для здоров'я через перенесення генів стійкості до антибіотиків від штамів молочнокислих бактерій до бактерій резидентної мікробіоти шлунково-кишкового тракту людини і, отже, до патогенних бактерій, зберігається.

Без сумніву, механізми поширення набутої стійкості до антибіотиків з'явилися задовго до використання антибіотиків. Придбаними детермінантами стійкості, в першу чергу, володіли продуценти антибіотиків, які мають механізм захисту від своїх же антимікробних метаболітів, а найбільш активні генетичні чинники стійкості кодуються в плазмідах, транспозонах і хромосомах, що полегшило горизонтальний перенос і забезпечило широке поширення чинників стійкості між мікроорганізмами.

Раніше вважалося, що збільшення резистентності до антибіотиків було наслідком широкого застосування антибіотиків в терапії та сільському господарстві [18, 21], однак зараз існує думка, що резистентність до антибіотиків виникає не лише від неправильного або надмірного використання антибіотиків [6, 9, 19]. Так, багатьма дослідниками показано, що стійкість до антибіотиків може також формуватися під впливом забруднення важкими металами [19, 24, 28].

Наприклад, було показано, що існує колінеарність між концентрацією в навколишньому середовищі металів (алюмінію, міді, марганцю, нікелю, ванадію і цинку) і рівнем експресії таких генів як *bla*CTX, *bla*OXA, *bla*TEM, *tet4series*, *tetM*, *tetW*, *sul1andsul2* [19, 24].

Amanpreet et al. [5] повідомили, що кадмій і цинк можуть стимулювати спільний відбір на стійкість до метициліну у *S. aureus* за допомогою горизонтального переносу плазмід, що містять гени, як для стійкості до метициліну, так і до металів (*mec* і *czr*).

Швидше за все, можна вважати, що мікробні популяції реагують на стрес, викликаний присутністю токсичних речовин, розвитком систем самозахисту, а навколишнє середовище діє як біореактор, що містить генетичні ознаки стійкості і хімічні стресори [4, 5, 7, 8].

Метою даного дослідження було визначення стійкості до антибіотиків і важких металів молочнокислих бактерій виділених з чорноморських губок роду *Haliclona* sp.

Матеріали та методи

Бактерії були ізольовані з морських губок *Haliclona* sp. (Order Narposclerida, Demospongiae), зібраних за допомогою легководолазного обладнання на глибині 5–6 м в Одеській затоці Чорного моря (Малий Фонтан) на відстані 300–400 м від берега у вересні 2017 року.

Зразки губок транспортували до лабораторії у контейнері об'ємом 10 л з морською водою протягом до 3 год. Отримані зразки тричі промивали морською водою, яку попередньо автоклаували, для відділення сміття і неасоційованих мікроорганізмів. Потім поверхню губки стерилізували швидким промиванням 70% етанолом і негайно занурювали в автоклавовану морську



воду. Для безпосереднього виділення асоційованих мікроорганізмів з губок, зразки кожної губки витягували з води, поміщали в стерильну чашку Петрі і стерильними ножицями поділяли на рівні фрагменти. Отримані фрагменти губки (приблизно 1 г) гомогенізували механічним способом в 5,0 мл стерильного сольового розчину (3% NaCl в дистильованій воді). Гомогенат серійно розводили, починаючи з 100 мкл гомогенату в 900 мкл стерильної води до отримання остаточного розведення 10^{-4} від початкової концентрації. Потім 100 мкл кожного розведення висівали на щільне середовище MRS для виділення молочнокислих бактерій. Культивування проводили в термостаті при температурі $37,0 \pm 0,5$ °C протягом 48–72 год. Виділені бактеріальні колонії відбирали і знову пересівали на середовище MRS до отримання чистих культур.

Ідентифікацію до роду проводили на підставі основних морфологічних, культуральних і біохімічних тестів [2]. Видову ідентифікацію штамів проводили за складом жирних кислот клітинних ліпідів з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) з капілярною колонкою ULTRA-2 (25мм × 0,2 мм × 0,33мкм) і полум'яно-йонізаційним детектором [1].

Резистентність до йонів важких металів вивчали до солей міді ($\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), кадмію ($\text{CdSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), кобальту ($\text{CoSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), цинку ($\text{ZnSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$), нікелю ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) і ртуті ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) (дослід) і без них (контроль). В досліді використовували концентрації – 100 mM, 10 mM, 5mM, 1 mM, 0,5 mM і 0,01M, що додавали до середовища MRS.

Для визначення мінімальної пригнічувальної концентрації (МПК) використовували метод реплік, що дозволило отримати ідентичні відбитки колоній на чашках Петрі з різними концентраціями металів.

Для визначення рівня резистентності до антибіотиків серед ізолятів використовували диско-дифузійний метод. Досліджували антибіотики, які входили до груп макролідів, аміноглікозидів, цефалоспоринів, хінолонів, пеніцилінів, амфеніколів, тетрациклінів та рифампіцинів (концентрація антибіотика у дисках наведена у таблиці 1). За розміром зони пригнічення росту (мм) всі штами поділяють на чутливі, проміжні і стійкі до даного антибіотика, згідно з рекомендацією EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [14].

Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю $p < 0,05$.

Графічне опрацювання даних проводили за програмою Microsoft Excel та R 3.4.0.

Результати та їх обговорення

За результатами дослідження вивчені штами були віднесені до *Lactobacillus vaccinoferus*, *Lactobacillus parabuchneri* і *Lactobacillus bifementans*. На підставі отриманих даних побудована дендрограма для візуалізації ступеня спорідненості між штамами (рис. 1) на підставі складу жирних кислот клітинних ліпідів. Отримані результати свідчать, що незважаючи



на деяку варіабельність у складі жирних кислот, при зведенні даних отримано підтвердження високого рівня подібності між штамами, які при ідентифікації були віднесені до одного виду.

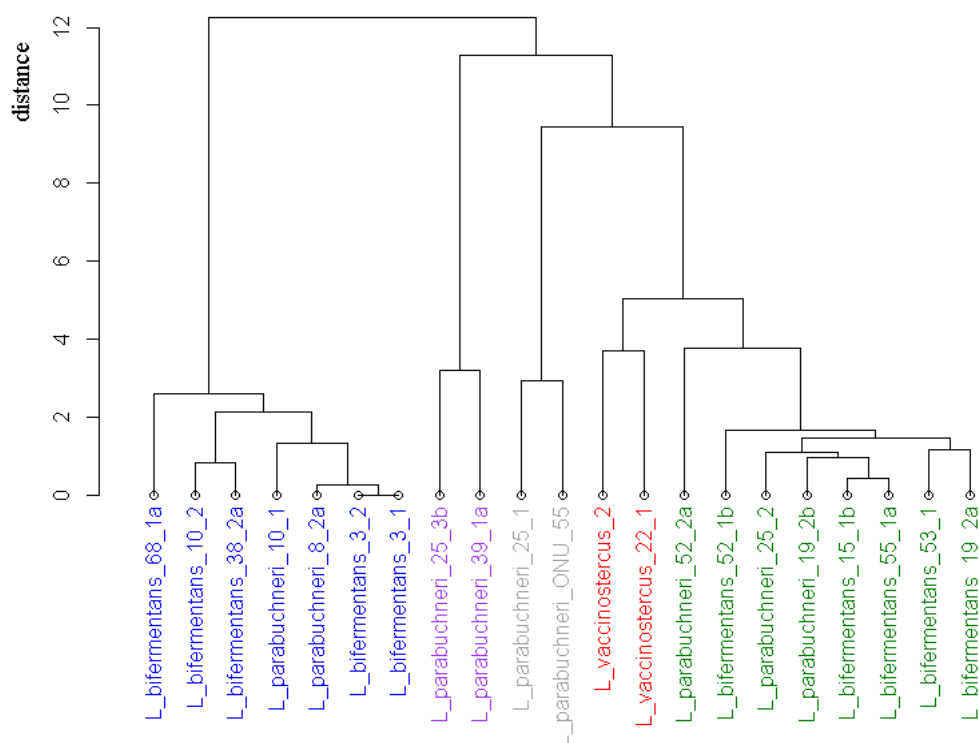


Рис. 1. Дендрограма спорідненості штамів *Lactobacillus*, ізольованих з губок *Haliclona* sp., за складом жирних кислот клітинних ліпідів

Fig. 1. Relationship dendrograma of studied *Lactobacillus* strains isolated from *Haliclona* sp. sponges based on the fatty acid composition of cell lipids

Проведені дослідження показали, що більшість молочнокислих бактерій стійкі до одного або кількох антибіотиків, причому багато штамів продемонструвало властивість множинної стійкості до антибіотиків. У таблиці 1 наведено зведені показники стійкості молочнокислих бактерій до антибіотиків, на підставі визначення рівня природної резистентності [14].

Як видно даних з табл. 1, майже усі штами молочнокислих бактерій стійкі до канаміцину (аміноглікозиди), який використовують в основному при лікуванні кишкових інфекцій, тому стійкість пробіотичних культур до цього антибіотика досить важлива. Чутливим до канаміцину виявився штам *L. parabuchneri* 52_{2b}. До іншого аміноглікозиду – стрептоміцину, були стійкими 23,8% досліджених штамів (табл. 1). Серед найбільш чутливих до цього антибіотика виявилися штами *L. bifermentans* 3₂, *L. bifermentans* 52_{2a} і *L. parabuchneri* 52_{2b}. Отримані дані узгоджуються з результатами інших дослідників, які показали, високу стійкість лактобацил до аміноглікозидних антибіотиків [10, 13], що може бути пов'язано з низькою проникністю аміноглікозидів через мембрани лактобацил.

Таблиця 1

Інтерпретація значень діаметрів зон затримки росту при визначенні чутливості лактобацил до антибіотиків
диско-дифузійним методом

Table 1

Interpretation of the diameters of the growth inhibition zones in determining the sensitivity of lactobacilli to antibiotics
by the disk-diffuse method

Група антибіотиків	Антибіотик	Вміст антибіотика в диску (мкг)	Діаметр зон пригнічення росту (мм) згідно EUCAST [14]				% штамів		
			стійкі	проміжні	чутливі	стійкі	проміжні	чутливі	
Макроліди	Кларитромідин	15	≤10	11-20	≥21	0,0	47,6	52,4	
	Азитромідин	15	≤13	14-17	≥18	9,5	57,1	33,3	
	Еритромідин	15	≤13	14-22	≥23	0,0	80,9	19,1	
Аміноглікозиди	Стрептомідин	300	≤14	15-19	≥20	23,8	61,9	14,3	
	Нетилміцин	10	≤12	13-15	≥15	0,0	42,9	57,1	
	Канаміцин	30	≤10	11-20	≥21	95,2	0,0	4,8	
	Цефалексін	5	≤19	20-24	≥25	71,4	19,1	9,5	
Цефалоспорины	Цефіксим	5	≤15	16-18	≥19	47,6	28,6	23,8	
	Цефазолін	30	≤16	17-21	≥22	57,1	14,3	28,6	
	Левовфлоксацин	5	≤19	20-24	≥25	71,4	23,8	4,8	
Фторхінолони III покоління	Ампіцилін	2	≤10	11-20	≥21	4,8	28,6	71,4	
	Бензилпеніцилін I БД	1	≤16	17-21	≥22	85,7	4,8	9,5	
Нітрофурани	Оксацілін	1	≤8	9-13	≥14	76,2	9,5	14,3	
	Фурагін	100	≤17	18-22	≥23	76,2	9,5	14,3	
Амфеніколи	Левоміцетин (хлорамфенікол)	30	≤11	12-17	≥18	9,5	28,6	61,9	
	Тетрациклін	30	≤14	15-18	≥19	23,8	71,4	4,8	
Рифампіцини	Рифампіцин	5	≤15	16-20	≥21	19,1	47,6	33,3	



Інша ситуація спостерігається при дослідженні стійкості молочнокислих бактерій до нетилміцину (57,1% чутливих штамів), який також належить до групи аміноглікозидів. Найбільшу чутливість (> 20,0 мм) проявили штами *L. bif fermentans* 3₁, *L. parabuchneri* 52_{2b} і *L. bif fermentans* 15_{1b}. Інші штами були меш чутливими (табл. 2).

Згідно М. Danielsen і А. Wind [13] бактерії роду *Lactobacillus*, зазвичай, чутливі до пригнічувачів біосинтезу білка (крім деяких аміноглікозидів, як було показано раніше). Отримані нами результати перегукуються з даними інших дослідників [10].

Серед макролідів найбільшу бактеріостатичну активність мали кларитроміцин і еритроміцин, до яких стійких штамів молочнокислих бактерій не було виявлено (табл. 1 і 2). До азитроміцину стійкими виявилися лише штами *L. bif fermentans* 19_{2a} і *L. parabuchneri* 19_{2b}, що склало 9,5% усіх досліджених штамів (табл. 1 і 2).

Серед досліджених штамів стійкими до левоміцетину були лише 9,5% (*L. bif fermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b}). Можливим поясненням щодо отриманих даних може бути те, що при ефективності відносно багатьох грампозитивних і грамотришечних бактерій, та штамів бактерій, які є стійкими до пеніциліну, стрептоміцину, сульфаніламідів, левоміцетин слабо активний відносно кислотостійких бактерій.

До тетрацикліну стійкими були 23,8% штамів, серед яких *L. bif fermentans* 3₂, *L. bif fermentans* 8a, *L. bif fermentans* 15_{1b}, *L. parabuchneri* 25₂, *L. bif fermentans* 38_{2a} (табл. 1 і 2).

Наявність стійких штамів можна пояснити широким розповсюдженням завдяки горизонтальному переносу генів стійкості до хлорамфеніколу (catA, cat), еритроміцину (erm(B), erm(B)-1, erm(C) і тетрацикліну (tet(M), tet(K), tet(W)) [16, 17].

До рифампіцину стійкими виявилися 19,0% усіх досліджених штамів, серед яких *L. parabuchneri* 10₁, *L. bif fermentans* 10₂, *L. bif fermentans* 19_{2a} і *L. parabuchneri* 19_{2b} (табл. 1 і 2). Найбільшу стійкість досліджені штами проявили до групи цефалоспоринов. Так, до цефалексину стійкими були 71,4% досліджених штамів молочнокислих бактерій, до цефіксиму – 47,6% штамів, а до цефазоліну – 51,1% досліджених штамів молочнокислих бактерій (табл. 1 і 2).

Стійкими до левофлоксацину (група хінолонів) виявилися 71,4% штамів. Оскільки даний антибіотик активний проти низки умовно-патогенних мікроорганізмів, то його призначають при інфекціях нижніх дихальних шляхів, ЛОР-органів, сечовивідних шляхів і нирок, та при туберкульозі і хронічному простатиті, що і може слугувати причиною виникнення настільки високого рівня стійкості до цього препарату у молочнокислих бактерій, які мешкають у Чорному морі.

До антибіотиків групи пеніцилінів досліджені штами демонстрували різну стійкість. Так до бензилпеніциліну стійкими були 85,7% штамів, до ампіциліну – лише 4,7% усіх досліджених штамів, а до оксациліну стійкими виявилися 76,1% штамів (табл. 1 і 2). Отримані дані досить цікаві, бо взагалі відомо, що усі препарати групи пеніцилінів володіють високою антибактеріальною



Таблиця 2

Розподіл штамів *Lactobacillus*, ізольованих з губок *Haliclona* sp.,
за рівнем стійкості до антибіотиків

Table 2

Distribution by antibiotic resistance level of *Lactobacillus* strains isolated
from *Haliclona* sp. sponges

Антибіотик	Стійкі	Чутливі	Проміжні
1	2	3	4
Кларитроміцин	Немає	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermantans</i> 3 ₂ <i>L. bifermantans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermantans</i> 10 ₂ <i>L. bifermantans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermantans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b}	<i>L. bifermantans</i> 3 ₁ <i>L. bifermantans</i> 8a <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. bifermantans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermantans</i> 53 ₁ <i>L. bifermantans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermantans</i> 68 _{1a}
Азитроміцин	<i>L. bifermantans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermantans</i> 3 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermantans</i> 10 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. bifermantans</i> 55 _{1a}	<i>L. bifermantans</i> 3 ₂ <i>L. bifermantans</i> 8a <i>L. bifermantans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermantans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermantans</i> 53 ₁ <i>L. bifermantans</i> 68 _{1a}
Еритроміцин	Немає	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermantans</i> 3 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. bifermantans</i> 53 ₁	<i>L. bifermantans</i> 3 ₂ <i>L. bifermantans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermantans</i> 10 ₂ <i>L. bifermantans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermantans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermantans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermantans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermantans</i> 68 _{1a}
Стрептоміцин	<i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermantans</i> 38 _{2a}	<i>L. bifermantans</i> 3 ₂ <i>L. bifermantans</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermantans</i> 3 ₁ <i>L. bifermantans</i> 8a <i>L. bifermantans</i> 10 ₂



Продовження таблиці

1	2	3	4
			<i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}
Нетилміцин	Немає	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}	<i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁
Канаміцин	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}	<i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	Немає
Цефалексин	<i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a}	<i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a}



Продовження таблиці

1	2	3	4
	<i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}		
Цефіксим	<i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a}	<i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}
Цефазолін	<i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a}
Левовфлоксацин	<i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a}	<i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}
Ампіцилін	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁	<i>L. bifermentans</i> 19 _{2a}	<i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a}



Продовження таблиці

1	2	3	4
	<i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}		
Бензилпеніцилін	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}	<i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b}
Оксацилін	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂	<i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}
Фурагін	<i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b}
Левоміцетин (хлорамфенікол)	<i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁	<i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a}



Продовження таблиці

1	2	3	4
		<i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}
Тетрациклін	<i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a}	<i>L. bifermentans</i> 53 ₁	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 <i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b} <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}
Рифампіцин	<i>L. parabuchneri</i> 10 ₁ <i>L. bifermentans</i> 10 ₂ <i>L. bifermentans</i> 19 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 19 _{2b}	<i>L. vaccinostercus</i> 2 <i>L. bifermentans</i> 3 ₁ <i>L. bifermentans</i> 3 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 25 _{3b} <i>L. bifermentans</i> 38 _{2a} <i>L. parabuchneri</i> 39 _{1a} <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2b}	<i>L. bifermentans</i> 8a <i>L. bifermentans</i> 15 _{1b} <i>L. parabuchneri</i> 15 _{2a} <i>L. vaccinostercus</i> 22 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₁ <i>L. parabuchneri</i> 25 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 48 ₂ <i>L. parabuchneri</i> 52 _{2a} <i>L. bifermentans</i> 53 ₁ <i>L. bifermentans</i> 55 _{1a} <i>L. bifermentans</i> 68 _{1a}

активністю, однак до них досить швидко виробляється «імунітет» за рахунок ферменту пеніцилінази. В даному випадку отримані дані збігаються з результатами інших дослідників [17] і рівень резистентності, скоріш за все, залежать від присутності таких факторів, як гени blaZ, bla і mecA, що визначають стійкість до ампіциліну у молочнокислих бактерій [5, 17], або стійкість виникає за рахунок точкових мутацій в генах, що кодують білки, які зв'язують пеніцилін [26].

До дії фурагіну стійкими були 76,1% штамів молочнокислих бактерій. Чутливими виявилися штами *L. vaccinostercus* 2, *L. bifermentans* 15_{1b} і *L. parabuchneri* 52_{2b} (табл. 1 і 2).

Як видно з наведених даних, більшість штамів досліджених молочнокислих бактерій, ізольованих з морських губок, володіють множинною резистентністю до антибіотиків. У більшості випадків вони були стійкі до канаміцину, цефалексину, цефазоліну, цефіксиму, фурагіну і бензилпеніциліну.



Також деякі штами додатково стійкі до левофлоксацину, левоміцетину, ампіциліну, рифампіцину або тетрацикліну.

Серед досліджених штамів до максимальної кількості антибіотиків (від 7 до 9) були резистентними *L. bif fermentans* 8_a, *L. bif fermentans* 10₂, *L. bif fermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b} і *L. bif fermentans* 38_{2a}. До меншої кількості антибіотиків (від 5 до 7) мали множинну резистентність *L. bif fermentans* 3₂, *L. parabuchneri* 10₁, *L. bif fermentans* 15_{1b}, *L. vacciностercus* 22₁, *L. parabuchneri* 25₁, *L. parabuchneri* 25₂, *L. parabuchneri* 52_{2a}, *L. bif fermentans* 53₁, *L. bif fermentans* 55_{1a} і *L. bif fermentans* 68_{1a}.

При опису взаємодії металів з мікроорганізмами слід враховувати, що в багатьох випадках метали (наприклад, Cu, Fe, Mo, Mg), які є кофакторами ферментів необхідні для росту мікроорганізмів. Однак межа між поняттям «життєво необхідний» і токсичний в даному випадку залежить від концентрації металу. Мікроорганізми розробили кілька способів нівелювання загрози в разі надмірності металу в середовищі, які включають в себе відтік йонів металів, комплексоутворення, відновлення металів, причому досить часто ці способи активні і щодо деяких антибіотиків [5].

При дослідженні стійкості чорноморських лактобацил до важких металів було показано, що солі нікелю, цинку та кобальту майже не впливали на ріст цих бактерій.

Так, більшість штамів *Lactobacillus* були резистентними до нікелю ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$) при МІК 5 мМ впродовж 24 годин інкубації на щільному середовищі MRS. Кількість штамів, що були життєздатними при цій концентрації нітрату нікелю, досягала 57,1%. При концентрації $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 10 мМ частка штамів, що демонстрували гарний ріст на щільному середовищі, складала 33,3% (рис. 2). Найбільш чутливими до дії нітрату нікелю виявилися штами *L. vacciностercus* 2 і *L. bif fermentans* 3₂ (рис. 3).

В присутності солі цинку ($\text{ZnSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$) на 24 годину культивування 57,1% штамів росли при концентрації 10 мМ для. В присутності 5 мМ сульфату цинку росло 28,5% штамів. 14,5% штамів були більш чутливими до дії $\text{ZnSO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$ і росли в присутності 1 мМ солі цинку (рис. 2). Найбільш чутливими до дії сульфату цинку виявилися штами *L. parabuchneri* 25_{3b} і *L. parabuchneri* 39_{1a} (рис. 3).

На середовищі, до якого додавали сульфат кобальту ($\text{CoSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) в концентрації 5 мМ, після 24 год культивування виросло 76,1% усіх досліджених штамів молочнокислих бактерій. При концентрації 1 мМ сульфата кобальту виросло 23,8% штамів, серед яких штами *L. vacciностercus* 2, *L. bif fermentans* 3₁, *L. bif fermentans* 3₂, *L. parabuchneri* 25₁ і *L. parabuchneri* 48₂ (рис. 3).

Найбільш різноманітно досліджені штами реагували на присутність сульфату міді ($\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) у середовищі. Так, більшість штамів (57,1%) росли при концентрації 0,5 мМ, 14,2% штамів росли при концентрації 1 мМ і 23,8% росли при 5 мМ (рис. 3).

При внесенні у середовище MRS сульфата кадмію ($\text{CdSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) спостерігали ріст мінімальної кількості штамів (14,2%) при концентрації солі 0,1 мМ (рис. 2). Найбільш резистентними до дії кадмію виявилися штами *L. bif fermentans* 15_{1b}, *L. parabuchneri* 25₁ і *L. parabuchneri* 25₂ (рис. 3).



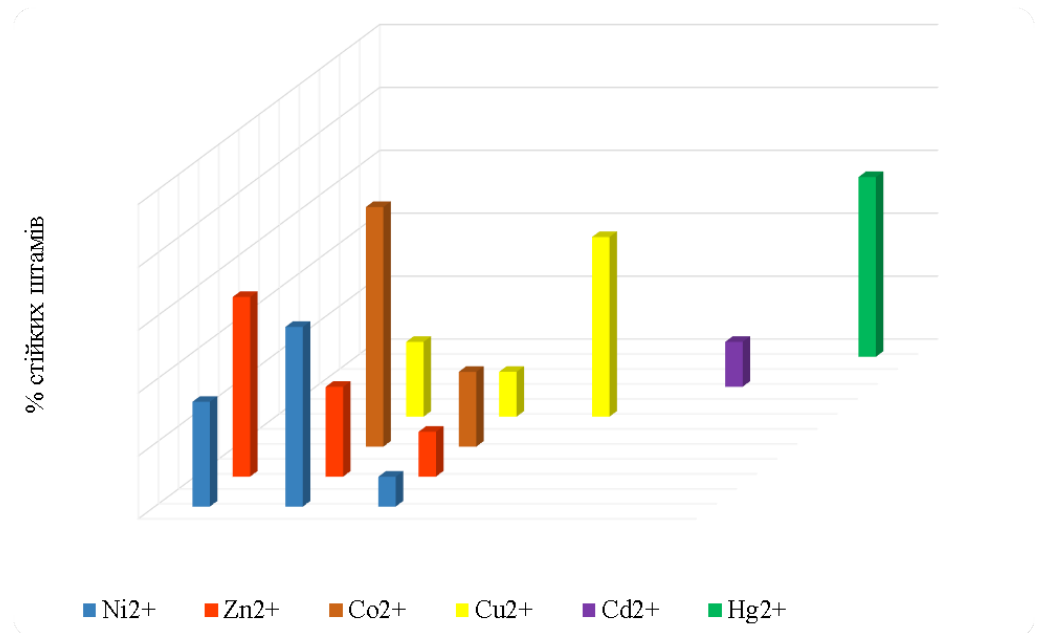


Рис. 2. Частка стійких штамів молочнокислих бактерій до різних концентрацій важких металів

Fig. 2. Proportion of lactic acid bacteria strains resistant to different concentrations of heavy metals

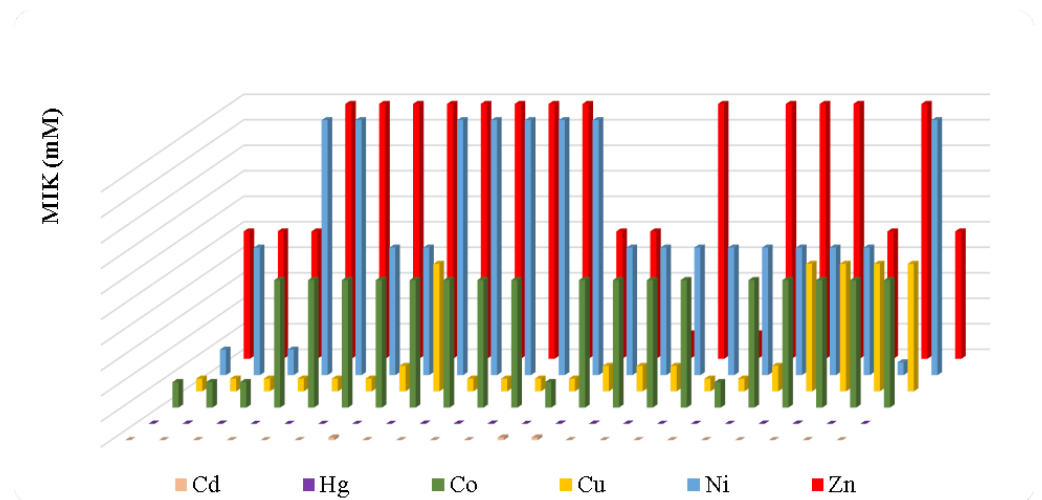


Рис. 3. Індивідуальна чутливість штамів *Lactobacillus*, ізольованих з губок *Haliclona* sp., до дії важких металів

Fig. 3. Sensitivity of individual *Lactobacillus* strains isolated from *Haliclona* sp. sponges to heavy metals action



До нітрату ртуті в концентрації 0,01 мМ були стійкими 57,1% усіх досліджених штамів молочнокислих бактерій (рис. 2 і 3).

Аналізуючи резистентність штамів молочнокислих бактерій до важких металів можна відзначити, що вони діляться на дві групи. До першої входять штами, які є стійкими до нікелю, цинку та кобальту. До другої групи входять штами які є стійкими до кадмію і ртуті. До першої групи відносяться: *L. bif fermentans* 8a, *L. parabuchneri* 10₁, *L. parabuchneri* 15_{2a}, *L. bif fermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b}, *L. vaccinosertus* 22₁, до другої групи – *L. bif fermentans* 15_{1b} і *L. parabuchneri* 25₂. Саме ці штами також були стійкими до міді (рис. 3).

Слід відмітити, що для більшості штамів, які мали резистентність до важких металів показана висока множинна резистентність до антибіотиків.

В результаті проведених досліджень показано, що штами молочнокислих бактерій, ізольовані з чорноморських губок, за своїми спектрами стійкості до антибіотиків не у всіх випадках співпадають з даними літератури, щодо молочнокислих бактерій, ізольованих з більш звичних джерел – кисломолочних та ферментованих продуктів.

Так, відомо, що штами молочнокислих бактерій чутливі до бензилпеніциліну, еритроміцину, хлорамфеніколу і тетрацикліну [3, 11, 12]. Однак, досліджені чорноморські штами виявилися стійкими до бензилпеніциліну і показали проміжну стійкість до еритроміцину і тетрацикліну (табл. 1). Рівень резистентності до хлорамфеніколу чорноморських штамів відповідає даним літератури [3, 11, 12, 25].

Рівень стійкості досліджуваних штамів молочнокислих бактерій до аміноглікозидів (табл. 1) збігається з іншими дослідженнями по стійкості штамів *Lactobacillus*, ізольованих з молочнокислих продуктів харчування, до цієї групи антибіотиків [13, 16, 27].

Відповідно, згідно з даними літератури [10, 11, 17, 22] бактерії з ферментованих продуктів харчування, шлунково-кишкового тракту людини високочутливі до рифампіцину, а бактерії, ізольовані з чорноморських губок, показали проміжний рівень чутливості до цього антибіотика (табл. 1).

При порівнянні літературних і власних даних по стійкості молочнокислих бактерій до β-лактамів було підтверджено, що молочнокислі бактерії більш стійкі до ампіциліну ніж до бензилпеніциліну [20, 23]. Поясненням цього явища може слугувати виникнення точкових мутацій в генах, що кодують білки, які зв'язують пеніцилін [26], або присутності таких чинників як гени *blaZ*, *bla* і *mecA* [5, 17]. Одночасно було показано, що штами молочнокислих бактерій, ізольовані з чорноморських губок, виявилися більш стійкими до дії цефалоспоринів (табл. 1), що не співпадає з даними літератури [15, 16].

Аналізуючи результати стійкості досліджених штамів до солей важких металів показано, що вони були більш стійкими до дії солей важких металів, ніж штами, які були ізольовані з продуктів харчування і описані в літературі [5]. Так, більшість чорноморських штамів зберігали життєздатність при концентрації солей важких металів від 10 мМ до 0,5 мМ (рис. 1 і 2), в той час як наведені в літературі дані [5] свідчать, що більшість молочнокислих бактерій здатна рости при концентрації від 0,07 мМ до 0,6 мМ в залежності від солі

металу. Мінімальна пригнічувальна концентрація співпадала тільки для солі кадмію – 0,1 мМ (рис. 1 і 2).

Таким чином, в результаті наших досліджень показано, що штами молочнокислих бактерій, ізолювані з чорноморських губок, були стійкими до аміноглікозидів, деяких β-лактамів, цефалоспоринів і солей важких металів (зокрема міді, нікелю, цинку, кобальту).

**Н.Ю. Васильева, И.В. Страшнова, М.А. Васильев,
И.П. Метелицина**

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

УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ЧЕРНОМОРСКИХ ГУБОК К АНТИБИОТИКАМ И ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

*Целью работы является определение степени устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам молочнокислых бактерий, выделенных из черноморских губок рода *Haliclona* sp. Методы. Классические микробиологические методы использовали для изучения культуральных и биохимических характеристик изолированных штаммов, что по совокупным показателям позволило отнести изолированные штаммы к роду *Lactobacillus*. Видовую принадлежность осуществляли на основании анализа спектра жирных кислот методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA). На основании полученных результатов штаммы идентифицировали как *Lactobacillus vaccinostercus*, *Lactobacillus parabuchneri* и *Lactobacillus bifermentans*. Устойчивость к тяжелым металлам определяли методом реплик, а резистентность к антибиотикам - диско-диффузным методом. Графическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel и R 3.4.0. **Результаты.** По результатам исследований показано, что большинство штаммов молочнокислых бактерий были устойчивыми к канамицину (95,2%), цефалексину (71,4%), цефазолину (57,1%), левофлоксацину (71,4%), бензилпенициллину (85,7%), оксациллину (76,2%), фузарину (76,2%). Среди штаммов, которые обладали резистентностью к нескольким антибиотикам были *L. bifermentans* 8_a, *L. bifermentans* 10_b, *L. bifermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b} и *L. bifermentans* триста восемьдесят второй. Штаммы *L. bifermentans* 8a, *L. parabuchneri* 10_b, *L. parabuchneri* 15_{2a}, *L. bifermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b}, *L. vaccinostercus* 22₁ характеризовались резистентностью к никелю, цинку и кобальту в концентрации 10 мМ, 10 мМ и 5 мМ соответственно. Штаммы *L. bifermentans* 15_{1b} и *L. parabuchneri* 25₂ обладали резистентностью к меди, кадмию и ртути. **Выводы.** На основании полученных данных показано, что большинство исследованных черноморских штаммов молочнокислых бактерий, выделенных из губок обладают естественной резистентностью к антибиотикам и тяжелым металлам.*

Ключевые слова: Черное море, *Haliclona* sp., *Lactobacillus*, резистентность, антибиотики, тяжелые металлы.



N.Yu. Vasylieva, I.V. Strashnova, M.A. Vasyliiev,

I.P. Metelitsyna

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

RESISTANCE OF *LACTOBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM THE BLACK SEA SPONGES TO ANTIBIOTICS AND HEAVY METAL

Summary

The aim of this work was determining the degree of resistance to antibiotics and heavy metals of lactic acid bacteria isolated from the Black Sea sponges of the genus *Haliclona* sp. **Methods.** The classical microbiological methods were used to study the cultural and biochemical characteristics of the isolated strains. According to the total obtained indices, the isolated strains were assigned to the genus *Lactobacillus*. Identification to the species was carried out by the spectrum of fatty acids using an automatic microorganism identification system MIDI Sherlock by gas chromatography. Based on the obtained results, the strains were identified as *Lactobacillus vaccinofermentans*, *Lactobacillus parabuchneri* and *Lactobacillus biferafermentans*. To determine resistance to heavy metals, the replica method was used, and to determine antibiotic resistance, it was used disco-diffuse method. **Results.** According to the results of the study, it was shown that most strains of lactic acid bacteria were resistant to kanamycin (95.2%), cephalixin (71.4%), cefazolin (57.1%), levofloxacin (71.4%), benzylpenicillin (85.7%), oxacillin (76.2%), fugarin (76.2%). Among the strains resistant to several antibiotics there were *L. biferafermentans* 8a, *L. biferafermentans* 10₂, *L. biferafermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b} i *L. biferafermentans* 38_{2a}. The strains of *L. biferafermentans* 8a, *L. parabuchneri* 10₂, *L. parabuchneri* 15_{2a}, *L. biferafermentans* 19_{2a}, *L. parabuchneri* 19_{2b}, *L. vaccinofermentans* 22₁ were resistant to nickel, zinc and cobalt at concentration of 10 mM, 10 mM and 5 mM, respectively. The strains of *L. biferafermentans* 15_{1b} and *L. parabuchneri* 25₂ were resistant to copper, cadmium and mercury. **Conclusions.** Based on the obtained data, it was shown that most of the lactic acid bacteria strains that were isolated from the Black Sea sponges of the genus *Haliclona* sp. were resistant to antibiotics and heavy metals.

Key words: *Lactobacillus*, resistance, antibiotics, heavy metals.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика и ідентифікація штаму *Vacillus* sp. ONU14 з ентомопатогенною активністю// Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 6–13.
2. Хоулт Дж., Круг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи. –Изд: Мир,1997. – 800 с.
3. Abriouel H., Casado Muñoz M.D.C., Lavilla Lerma L., Pérez Montoro B., et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. //Food Res Int. – 2015. – Vol. 78. – P. 465–481.
4. Alonso A., Sanchez P., Martinez J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes.// Environ Microbiol . – 2001. – Vol. 3. – P. 1–9.



5. Amanpreet K. Sidhu, Gauri J. Metkar, Sweta P. Nandurikar, Sucheta N. Patil. An investigation on metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strains isolated from two different drinking water sources // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2015. – Vol. 4, No. 2. – P. 305–313.

6. Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V. Co-selection of antibiotic and metal resistance // *Trends Microbiol.* – 2006. – Vol. 14. – P. 176–182.

7. Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes // *Nature.* – 2004. – Vol. 427. – P. 72–74.

8. Berendock T.U., Manaia C.M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – Vol. 13. – P. 310–317.

9. Berg J., Thorsen M.K., Holm P.E., Jensen J., Nybroe O., Brandt K.K. Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay // *Environ Sci Technol.* – 2010. – Vol. 44. – P. 8724–8728.

10. Botina S.G., Poluektova E.U., Glazova A.A., Zakharevich N.V., Koroban N.V., et al. Antibiotic resistance of potential probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* from human gastrointestinal microbiome // *Microbiology.* – 2011. – Vol. 80. – P. 175–183.

11. Campedelli I., Mathur H., Salvetti E. Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. // *Applied and Environmental Microbiology* / – 2019. – Vol. 85, No. 1. – Article number: e01738-18

12. Casado Munos M. C., Benomar N., Lerma L.L., Gálvez A., et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process // *Int J Food Microbiol.* – 2014. – Vol. 172. – P. 110–118.

13. Danielsen M., Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents // *Int J Food Microbiol.* – 2003. – Vol. 82, No. 1. – P. 1–11.

14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms. <http://217.70.33.99/eucast2/> (28 February 2007, date last accessed).

15. Goldstein E.J.C., Tyrrell K.L., Citron D.M. *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities // *Clin Infect Dis.* – 2015. – Vol. 60. – P. 98–107.

16. Gueimonde M., Sanchez B., de Los Reyes-Gavilón C., Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria // *Front Microbiol.* – 2013. – Vol. 4. – Article number: 202.

17. Guo H., Pan L., Li L., Lu J., Kwok L., Menghe B., Zhang H., Zhang W. Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products // *J Food Sci.* – 2017. – Vol. 82. – P. 724–730.

18. Huerta B., Marti E., Gros M., López P., Pompêo M., Armengol J., et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs // *Sci. Total Environ.* – 2013. – Vol. 456–457. – P. 161–170.



19. Knapp C. W., Callan A. C., Aitken B., Shearn R., Koenders A., Hinwood A. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2017. – Vol. 24. – P. 2484–2494.

20. Lavanya B., Sowmiya S., Balaji S., Muthuvelan B. Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. // *Br J Dairy Sci.* – 2011. – Vol. 2. – P. 5–10.

21. Levy S. B., Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. // *Nat. Med. Suppl.* – 2004. – Vol. 10. – P. 122–129.

22. Liu C., Zhang Z.Y., Dong K., Yuan J.P., Guo X.K. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. // *Biomed Environ Sci.* – 2009. – Vol. 22. – P. 401–412.

23. Pan L., Hu X., Wang X. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. // *Food Control.* – 2011. – Vol. 22. – P. 1316–1321.

24. Pruden A., Pei R., Storteboom H., Carlson K.H. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. // *Environ. Sci. Technol.* – 2006. – Vol. 40. – P. 7445–7450.

25. Puphan K., Sornplang P., Uriyapongson S., Navanukraw C. Screening of lactic acid bacteria as potential probiotics in beef cattle. // *Pakistan Journal of Nutrition.* – 2015. – Vol. 14, No. 8. – P. 474–479.

26. Rosander A., Connolly E., Roos S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. // *Appl Environ Microbiol.* – 2008. – Vol. 74. – P. 6032–6040.

27. Sornplang P., Leelavatch V., Sukon P., Yowarach S. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from a fermented fish product, plachom. // *Res J Microbiol.* – 2011. – Vol. 6. – P. 898–903.

28. Tan L., Li L., Ashbolt N., Wang X., Cui Y., Zhu X., et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. // *Sci. Total Environ.* – 2018. – Vol. 621. – P. 1176–1184.

References

1. Ostapchuk AM. Molecular-biological characteristics and identification of *Bacillus* sp. ONU14 strain with entomopathogenic activity // *Microbiology&Biotechnology.* 2015; Vol. 1:6–13

http://nbuv.gov.ua/UJRN/MiB_2015_1_4

2. Hout J, Krieg N, Snit P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Ed: Mir, 1997. – 800 p.

3. Abriouel H, Casado Muñoz MDC, Lavilla Lerma L, Pérez Montoro B, et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Res Int.* 2015; 78: 465–481. DOI:10.1016/j.foodres.2015.09.016

4. Alonso A, Sanchez P, Martinez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol.* 2001; 3:1–9. DOI:10.1046/j.1462-2920.2001.00161.x

5. Amanpreet K Sidhu, Gauri J Metkar, Sweta P Nandurikar, Sucheta N Patil.



An investigation on metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strains isolated from two different drinking water sources. *Int.J.Curr.Microbiol. App.Sci.* 2015; 4(2): 305 – 313

6. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.* 2006; 14:176–182 DOI:10.1016/j.tim.2006.02.006

7. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature.* 2004; 427: 72–74 <https://doi.org/10.1038/nature02241>

8. Berendock TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbio.* 2015; 13:310–317 DOI:10.1038/nrmicro3439

9. Berg J, Thorsen MK, Holm PE, Jensen J, Nybroe O, Brandt KK. Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. *Environ Sci Technol.* 2010; 44:8724–8728 DOI:10.1021/es101798r

10. Botina SG, Poluektova EU, Glazova AA, Zakharevich NV, Koroban NV, et al. Antibiotic resistance of potential probiotic bacteria of the genus *Lactobacillus* from human gastrointestinal microbiome. *Microbiology.* –2011; 80: 175–183. DOI:<https://doi.org/10.1134/S0026261711020032>

11. Campedelli I, Mathur H, Salvetti E. Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology.* 2019;85(1): e01738-18 DOI:10.1128/AEM.01738-18

12. Casado Munos MC, Benomar N, Lerma LL, Gálvez A, et al. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Alorña table olives throughout fermentation process. *Int J Food Microbiol.* 2014; 172: 110–118. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.025

13. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 2003; 82(1): 1–11. DOI:10.1016/s0168-1605(02)00254-4

14. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antimicrobial Wild Type Distributions of Microorganisms. <http://217.70.33.99/eucast2/> (28 February 2007, date last accessed).

15. Goldstein EJC., Tyrrell KL, Citron DM. *Lactobacillus* species: Taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis.* 2015; 60: 98 – 107. DOI: 10.1093/cid/civ072

16. Gueimonde M, Sonchez B, de Los Reyes-Gavilón C, Margolles A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.* 2013; 4: Article number: 202. DOI:10.3389/fmicb.2013.00202

17. Guo XC, Liu S, Wang Z, Zhang XX, Li M, Wu B. Metagenomic profiles and antibiotic resistance genes in gut microbiota of mice exposed to arsenic and iron. *Chemosphere.* 2014; 112: 1–8. DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.03.068

18. Huerta B, Marti E, Gros M, López P, Pompêo M, Armengol J, et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. *Sci. Total Environ.* 2013; 456-457: 161–170. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.03.071



19. Knapp CW, A. Callan C, Aitken B, Shearn R. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. *Environ Sci Pollut Res.* 2017; 24:2484–2494 DOI 10.1007/s11356-016-7997-y

20. Lavanya B, Sowmiya S, Balaji S, Muthuvelan B. Screening and characterization of lactic acid bacteria from fermented milk. *Br J Dairy Sci.* 2011; 2: 5–10. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.02.011

21. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med. Suppl.* 2004; 10: 122–129. DOI: 10.1038/nm1145

22. Liu C, Zhang ZY, Dong K, Yuan JP, Guo XK. 2009. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. *Biomed Environ Sci* 22:401–412. doi:10.1016/S0895-3988(10)60018-9

23. Pan L, Hu X, Wang X. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. *Food Control.* 2011; 22: 1316–1321. DOI:10.1016/j.foodcont.2011.02.006.

24. Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40: 7445–7450. DOI: 10.1021/es060413l

25. Puphan K, Sornplang P, Uriyapongson S, Navanukraw C. Screening of lactic acid bacteria as potential probiotics in beef cattle. *Pakistan Journal of Nutrition.* 2015; 14(8): 474-479. DOI: 10.3923/pjn.2015.474.479

26. Rosander A, Connolly E, Roos S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74: 6032–6040. DOI:10.1128/AEM.00991-08

27. Sornplang P, Leelavatch V, Sukon P, Yowarach S. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from a fermented fish product, plachom. *Res J Microbiol.* 2011; 6:898–903. DOI:10.3923/jm.2011.898.903.

28. Tan L, Li L, Ashbolt N, Wang X, Cui Y, Zhu X, et al. Arctic antibiotic resistance gene contamination, a result of anthropogenic activities and natural origin. *Sci. Total Environ.* 2018; 621:1176–1184. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.110

Стаття надійшла до редакції 10.12.2019 р.



УДК 579.695

Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця, І.П. Конуп, О.Г. Горшкова,
О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, М.М. ЧабанОдеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна;
тел.: 068-259-33-08, e-mail: tgudzenko@ukr.net**ОЧИЩЕННЯ ВОДИ ВІД ФЕНОЛУ БАКТЕРІЯМИ
РОДУ *PSEUDOMONAS*, ІММОБІЛІЗОВАНИМИ НА
ПРИРОДНИХ І СИНТЕТИЧНИХ НОСІЯХ**

Мета. Оптимізація процесу очищення води від фенолу з використанням бактерій роду *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329), іммобілізованих на природних і синтетичних носіях. **Методи.** Концентрацію фенолу у воді визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантипірину. Для очищення води від фенолу (з концентрацією 200 мг/л) використано непатогенні окремі штами бактерій *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327, іммобілізовані на носіях різної природи (цеоліт, мушлі мідій, річковий пісок, керамічні кільця, активоване вугілля, верховий торф, синтетичний носій типу «ВІЯ»). **Результати.** Експериментально підтверджено, що адгезія клітин штамів бактерій *P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 до цеоліту, річкового піску (що практично не сорбують фенол) сприяла ефективній біодеструкції фенолу на 96–100% (залежно від обраного штаму бактерій). Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки (протягом 11 діб) іммобілізованими на цеоліті клітинами штаму *P. fluorescens* ONU328 або штаму *P. maltophilia* ONU329 зменшувалася з 200 мг/л до 8,0±0,95 мг/л (ступінь очищення води від фенолу (α)–96%) і до 2,0±0,14 мг/л (α = 99%) – у разі використання іммобілізованих клітин штаму *P. serasia* ONU327. Встановлено, що при використанні іммобілізованих на піску річковому мікроорганізмів-деструкторів залишкова концентрація фенолу у воді на 11 добу обробки складала 6,0±0,55 мг/л (α =97%) і 2,0±0,14 мг/л (α = 99%) – відповідно для штамів *P. maltophilia* ONU329 і *P. fluorescens* ONU328; та сягала рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК= 0,001 мг/л) – у разі іммобілізованих (на піску річковому) клітин штаму *P. serasia* ONU327. Експериментально виявлено, що прискорення очищення води від фенолу відбувалося за умови використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328) іммобілізованих на керамічних трубках і волокнистій насадці типу «ВІЯ». Протягом 5-ти діб експозиції ступінь очищення води від фенолу іммобілізованими на волокнистій насадці типу «ВІЯ» мікроорганізмами-деструкторами з урахуванням поправки на контроль (нативний немодифікований сорбент «ВІЯ») сягав 97% – за дії дії штаму *P. serasia* ONU327; та 99% – за дії штаму *P. fluorescens* ONU328. **Висновок.** Для прискореного очищення води від фенолу (протягом 5 діб) на 97–99% рекомендовано використовувати штами бактерій *P. serasia* ONU327 і *P. fluorescens* ONU328, іммобілізовані на во-



локнистій насадці типу "ВІЯ". Повне знефенолення води спостерігається за її обробки штамами бактерій *P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, окремо іммобілізованих на активованому вугіллі, річковому піску (для штаму *P. serasia* ONU327) та мушлях мідії (для штаму *P. fluorescens* ONU328) відповідно.

Ключові слова: очищення води, фенол, сорбенти, іммобілізовані бактерії роду *Pseudomonas*.

Біосфера володіє певним потенціалом самоочищення від токсичних сполук, але ці можливості не безмежні. З метою запобігання екологічній катастрофі заходи щодо захисту навколишнього середовища від зростаючого забруднення різними хімічними сполуками, зокрема фенольними, повинні постійно посилюватися [7]. Поряд з нафтопродуктами, циклічними органічними сполуками і деякими важкими металами, найнебезпечнішими є фенольні сполуки. Фенол і його похідні є одними з пріоритетних забруднювачів навколишнього середовища у зв'язку з їх токсичністю, здатністю накопичуватися в навколишньому середовищі та стійкістю. Фенол має мутагенну і канцерогенну дію, тобто здатність накопичуватися в організмі людини. Крім цього, потрапляючи у водойми, фенол різко погіршує загальний санітарний стан, негативно впливаючи на живі організми не тільки своєю високою токсичністю, а й значною зміною порушуючи режим споживання біогенних елементів і розчинених газів [3]. Джерелами надходження фенолів у природні водні об'єкти є побутові стоки та стоки медичних закладів, підприємств нафтохімічного комплексу та промислових підприємств, зокрема хіміко-фармацевтичного підприємства [2]. Відомо, що процеси самоочищення водойм від фенолу протікають повільно і можливі лише при концентрації фенолу менше 75 мг/дм³ [11].

Здійснення заходів щодо захисту навколишнього середовища від різних поллютантів, зокрема від високотоксичного фенолу, може йти різними шляхами. Найбільш ефективним з них є комплекс заходів, спрямованих на запобігання (зменшення або повне припинення) їх попадання в об'єкти навколишнього середовища. Це може бути досягнуто шляхом постійного вдосконалення технологічних процесів, переходом на сучасні безвідходні технології. Серед усіх методів дуже часто неможливо виділити фізико-хімічні та біологічні окремо, оскільки для підвищення ефективності їх постійно комбінують [7]. Екологічно доцільними є біоремедіація об'єктів навколишнього середовища і біологічна очистка стічних вод, які засновані на використанні штамів мікроорганізмів, здатних руйнувати органічні сполуки, зокрема фенол [13]. Для біоремедіації мікроорганізми-деструктори частіше застосовуються у вигляді бактеріальних препаратів, що містять вільні мікробні клітини; для очищення сильно забруднених стічних вод, в тому числі що містять фенольні сполуки, їх використовують в іммобілізованому стані [4, 10]. Це пов'язано з тим, що очищення стічних вод прикріпленою біомасою порівняно з виваженою вільною біомасою є більш стійким до коливань рН середовища, впливу температури та інших несприятливих факторів. Крім того, використання іммобілізованих мікроорганізмів в локальних очисних спорудах дозволяє стабілізувати склад



мікрофлори, знизити її вимивання з біореакторів з рідиною, що очищується, а також створити більш компактні проточні біореактори.

З огляду на вищевикладене, питання глибокого біотехнологічного очищення води від високотоксичного поллютанту – фенолу іммобілізованими непатогенними мікроорганізмами-деструкторами досі залишається актуальним.

Мета даної роботи – оптимізація процесу очищення води від фенолу з використанням бактерій роду *Pseudomonas* (*P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329), іммобілізованих на природних і синтетичних носіях.

Матеріали та методи

В роботі використані біохімічно-активні щодо фенолу штами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. ceracia* ONU327 (виділений із ґрунту), *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (виділені з морської води), що зберігаються в колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Підготовка бактерій-деструкторів фенолу для інокуляції носіїв. Для інокуляції носіїв біохімічно-активні щодо фенолу штами бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 вирощували на чашках Петрі на м'ясо-пептонному агарі (МПА) протягом доби. Бактеріальні маси методом зливу переносили в колби Ерленмаєйр (ємністю 1 л). Попередньо в ці колби вносили 500 мл живильного середовища М9 складу (г/л): Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 1; NaCl – 0,5; пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; глюкоза – 2. Попередньо глюкозу стерилізували при 0,5 атм і потім добавляли в живильне середовище М9.

Бактерії культивували протягом 2-х діб до досягнення густини 10^9 КУО/мл. Оптичну густину клітинної суспензії визначали на приладі ФЕК з довжиною хвилі 540 нм, кількість клітин визначали за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від концентрації бактеріальних клітин.

Підготовка носіїв для іммобілізації бактерій-деструкторів фенолу. Для закріплення клітин використовували сорбційний метод іммобілізації псевдомонад на твердих носіях. Отримані за допомогою флуоресцентного мікроскопа Carl Zeiss зображення свідчили про те, що іммобілізація бактерій роду *Pseudomonas* призводила до утворення біоплівки на носіях різної природи.

Для іммобілізації клітин бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 – деструкторів фенолу використовували носії різної природи однакового об'єму: цеоліт – 57 г; мушлі мідій – 43 г; пісок – 93 г; керамічні трубки – 44,2 г; активоване вугілля – 13 г; торф верховий – 7,5 г; синтетичний носій типу «ВІЯ» ТУ995990 (люб'язно наданий професором, д.б.н., Гвоздяком П.І. [4, 15]) – 2,3 г. Вибір носіїв зумовлений їх доступністю, дешевизною та необхідною питомою площею поверхні, що є важливим технологічним параметром для створення на їх поверхні біоплівки.

Для експериментів використовували цеоліт розміром гранул 0,3–0,7 см; мушлі мідій з розміром пластин 0,5–1,0 см; розмір гранул активованого вугілля 3–4 мм; розміри керамічних трубок діаметр 8 мм, довжина 10 мм, товщина



стінок 1,5 мм.

Цеоліт, мушлі мідій і річковий пісок попередньо відмивали від дрібно-дисперсної фази. Додатково мушлі мідій для випалювання органічної фази піддавали обробці високою температурою – 250–300 °С протягом 0,5 год. Неорганічні носії (цеоліт, мушлі мідій, пісок, активоване вугілля, кільця керамічні) стерилізували в сухожаровній шафі за $t=180$ °С; торф і синтетичний носій типу “ВІЯ” стерилізували в автоклаві при 1 атм протягом 30 хвил.

Отриманими стерильними носіями заповнювали стерильні флакони, ємністю 0,5 л. У кожен з флаконів вносили рівні об'єми (50 мл) носіїв. Після цього в ці флакони заливали по 50 мл інокуляту, відібраних бактерій-деструкторів роду *Pseudomonas*. Інокуляцію проводили в термостатованому шуторі (70 об / хв при температурі 28 °С) протягом 2-х діб. Після проведення інокуляції залишки суспензії бактерій акуратно зливали і інокульовані носії тричі промивали середовищем М9 (використовували тільки мінеральний компонент середовища складу (г/л): Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 1; NaCl – 0,5–2). Мікроскопія носіїв виявляло їх біообростання, товщина біоплівки 0,5–1 мм. Потім в кожен з флаконів додавали по 50 мл мінерального середовища М9, що містило 200 мг/л фенолу.

Визначення концентрації фенолу у контрольних і дослідних пробах до і після очищення. Ефективність процесу очищення води нативними сорбентами (контроль) і бактеріями роду *Pseudomonas*-деструкторами, іммобілізованими на різних носіях, оцінювали за ступенем очищення води від фенолу (α ,%), що розраховували за рівнянням:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \times 100\%, \quad (1)$$

де C_0 і C – концентрації фенолу у воді до (200 мг/л) та після обробки. Концентрацію фенолу у контрольних і дослідних пробах до і після очищення визначали фотоколориметричним методом, заснованим на утворенні забарвлених сполук фенолу з 4-аміноантипірином за присутності гексаціаноферату (III) при $\text{pH}=10,0 \pm 0,2$ [8].

Проводили окремі серії досліджень (5 серій випробувань, $n=5$). Опрацювання даних здійснювали з використанням програми «Microsoft Office Excel 2003». Достовірність відмінностей між середніми значеннями залишкової концентрації фенолу у воді визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення

В попередніх наших роботах було встановлено здатність штамів бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 окиснювати фенол. Експериментально підтверджено, що за дії окремих штамів мікроорганізмів у кількості $7,5 \times 10^5$ КУО/мл протягом 18–22 діб (залежно від штаму) відбувається повне знефенолення водних розчинів [5, 6, 14]. Аналогічну високу ефективність знефенолення стічних вод коксохімічних заводів шляхом використання фенол-деструктивних мікроорганізмів підтверджено Путиліною Н.Т. та іншими авторами [7, 9].

Здатність бактерій роду *Pseudomonas* (*P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329) окиснювати фенол дозволила нам підібрати



для іммобілізації клітин цих бактерій-деструкторів фенолу різні сорбенти для прискорення очищення води за умов отримання високих результатів. Для цього нами було досліджено сорбційну здатність деяких легкодоступних дешевих матеріалів і можливість утворення на їх поверхні біоплівки, сформованої клітинами окремих штамів бактерій роду *Pseudomonas*. Для цієї мети нами було використано цеоліт, подрібнені мушлі мідій, пісок, керамічні трубки, активоване вугілля, торф верховий, синтетичний носій типу "ВІЯ". Хоча відомо, що в даний час асортимент матеріалів для використання їх в біотехнологіях очищення води від поллютантів дуже різноманітний (це диски, пластини, насадки з полімерних матеріалів, неткане полотно тощо [12, 15], основна вимога до них – інертність і принципова можливість утворення на них біоплівки. Перевага також надається використанню дрібнодисперсних твердих носіїв, матеріалів типу піску, який, наприклад, в процесах з псевдозрідженим шаром забезпечує набагато більшу площу поверхні для прикріплення на одиницю об'єму реактора, ніж в традиційних процесах. Частинки носія, які зазвичай мають діаметр менший за один мм, просто завантажуються в реактор, який потім інокують звичайним чином.

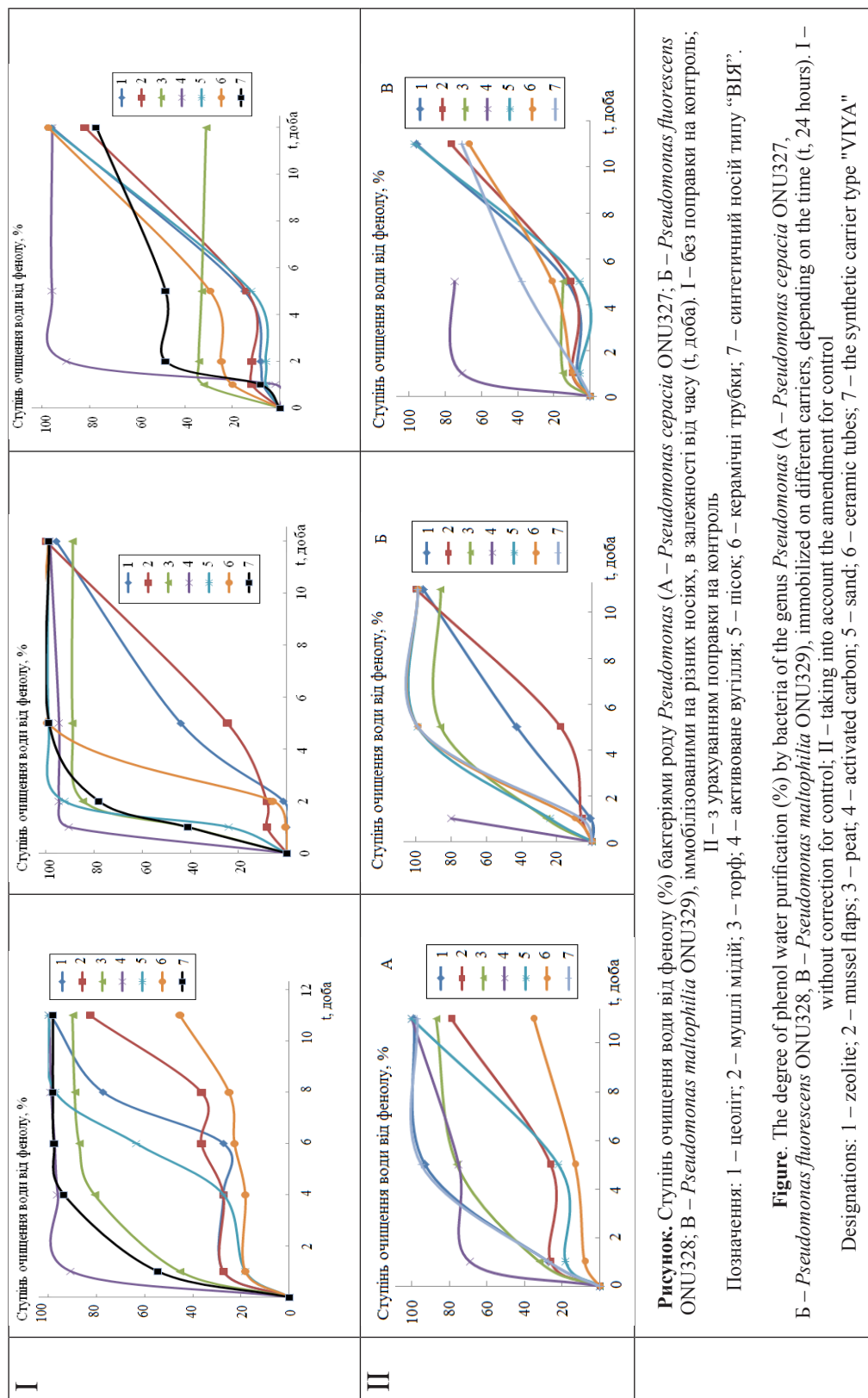
Нами експериментально оцінено здатність цеоліту, подрібнених мушлів мідій, піску, активованого вугілля, торфу верхового, керамічних трубок та синтетичного носія типу "ВІЯ" сорбувати фенол із водних розчинів з концентрацією 200 мг/л за умов: присутності мінеральних компонентів М-9, рН ~ 7 , температури 18 ± 2 °С (таблиця). Як видно з таблиці, випробувані нативні носії слабо адсорбують фенол, за винятком активованого вугілля (що, як відомо [15], має питому поверхню ~ 26 м²/г. З'ясовано, що за відсутності біологічної модифікації верховий торф і волокниста насадка типу "ВІЯ" характеризуються помірною адсорбційною здатністю. Протягом перших 24 годин сорбції концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200 мг/л до $90 \pm 8,7$ мг/л при використанні активованого вугілля (ступінь очищення води від фенолу (α) сягав 55%); до $125 \pm 10,5$ мг/л – при використанні волокнистої насадки типу "ВІЯ" ($\alpha=38\%$) та до $160 \pm 15,2$ мг/л – при використанні верхового торфу ($\alpha=20\%$) (рисунок, таблиця).

Ефективність процесу сорбції фенолу із води на четверту добу сягала близько 84% при використанні активованого вугілля (залишкова концентрація фенолу у воді складала $32,0 \pm 2,4$ мг/л); практично не змінювалася для верхового торфу і була на рівні 20–22% (залишкова концентрація фенолу у воді складала $157 \pm 14,5$ мг/л) та, мабуть, внаслідок процесу десорбції зменшувалася до 17% для волокнистої насадки типу "ВІЯ".

З подальшим продовженням процесу обробки води вищенаведеними нативними сорбентами до 11 діб ефективність сорбції фенолу із водних розчинів збільшувалася лише за використання активованого вугілля (залишкова концентрація фенолу у воді складала $6,0 \pm 0,5$ мг/л; $\alpha=97\%$) та залишалася практично незмінною за використання волокнистої насадки типу "ВІЯ" та верхового торфу (рисунок, таблиця).

Практично інертними до фенолу були цеоліт, мушлі мідій та річковий пісок. Ступінь вилучення фенолу із води вищезгаданими нативними





Таблиця

Table

Ефективність очищення води від фенолу іммобілізованими клітинами бактерій роду *Pseudomonas*Efficiency of phenol water purification by immobilized cells of bacteria of the genus *Pseudomonas*

Носій з іммобілізованими бактеріями	Залишкова концентрація фенолу у воді після обробки, мг/л														
	<i>P. serasia ONU327</i>						<i>P. fluorescens ONU328</i>						<i>P. maltophilia ONU329</i>		
	1		5		11		1		5		11		1	5	11
цеоліт	145,0±11,4	145,0±11,0	2,0±0,14	197,0±17,7	112,0±10,8	8,0±0,95	186,0±16,7	170,0±11,0	8,0±0,95	176,0±14,8	162,0±15,8	134,0±11,5	8,0±0,72	6,0±0,55	5,5±0,25
мушлі мідій	145,0±11,8	135,0±10,7	34,0±3,1	183,5±15,7	150,0±14,1	0,001±0,0001	118,0±10,8	22,0±1,7	22,0±1,7	26,0±1,5	8,0±0,64	176,0±14,7	141,0±12,7	104,0±9,5	46,0±3,2
торф	109,0±10,8	38,0±3,5	20,0±1,7	118,0±10,8	10,0±0,79	3,0±0,27	18,0±1,2	152,0±13,8	2,0±0,15	2,0±0,12	1,0±0,12	160,0±15,2	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1
актив. вугілля	28,0±1,2	8,0±0,75	0,001±0,0001	18,0±1,2	10,0±0,79	3,0±0,27	18,0±1,2	152,0±13,8	2,0±0,15	2,0±0,12	1,0±0,12	160,0±15,2	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1
пісок	163,5±15,6	146,0±14,3	0,001±0,0001	152,0±13,8	2,0±0,15	2,0±0,12	199,0±17,6	118,0±12,4	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038
керамічні трубки	163,5±15,5	155,0±14,1	109,0±9,8	199,0±17,6	118,0±12,4	2,0±0,15	118,0±12,4	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15
носій "ВІЯ"	91,0±8,5	5,0±0,45	4,0±0,038	118,0±12,4	2,0±0,15	2,0±0,15	118,0±12,4	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15

Примітка: "—" не визначено; концентрація фенолу у воді до очищення – 200,0 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – 10×10^9 КУО/мл; рН 6,8–7,2

Note: " ---" undefined; concentration of phenol in water for purification – 200,0 mg/l; concentration of bacterial cells is 10×10^9 CFU/ml; рН 6,8–7,2



сорбентами складав ~2–3% на 1–2 добу обробки. Однак, не зважаючи на ці показники ефективності обробки, дані матеріали були “біологічно позитивними” для утворення біоплівки клітинами бактерій роду *Pseudomonas* –деструкторів фенолу. Цікавим виявився той факт, що вже через добу з використанням іммобілізованих на піску клітин бактерій штаму *P. fluorescens* ONU328 концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200 мг/л до $152 \pm 13,8$ мг/л, що складало 24% вилучення фенолу із води. Прикріплення клітин штаму *P. ceracia* ONU327 на цеоліті та мушлях мідій сприяло процесу біодеструкції фенолу на 26–27%. Слід зазначити, що найефективніше процес очищення води від фенолу протягом першої доби протікав у разі використання для іммобілізації клітин бактерій роду *Pseudomonas* активованого вугілля. Ступінь очищення води від фенолу (з урахуванням поправки на контроль – активоване вугілля за відсутності мікроорганізмів) сягав 69%, 80% і 71% при використанні штамів *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329, що відповідало залишковій концентрації фенолу у воді $28,0 \pm 1,2$ мг/л; $18,0 \pm 1,2$ мг/л і $26,0 \pm 1,5$ мг/л (рисунок, таблиця).

Адгезія клітин штамів бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 до цеоліту та річкового піску сприяла протягом всього терміну обробки води біодеструкції фенолу на 96–100% (залежно від обраного штаму бактерій). Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки (протягом 11 діб) іммобілізованими на цеоліті клітинами штаму *P. fluorescens* ONU328 або штаму *P. maltophilia* ONU329 зменшувалася з 200 мг/л до $8,0 \pm 0,95$ мг/л (ступінь очищення води від фенолу (α)-96%) і до $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α =99%) – у разі використання іммобілізованих клітин штаму *P. ceracia* ONU327. Встановлено, що при використанні іммобілізованих на піску річковому мікроорганізмів-деструкторів залишкова концентрація фенолу у воді на 11 добу обробки складала $6,0 \pm 0,55$ мг/л (α =97%) і $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α =99%) – відповідно для штамів *P. maltophilia* ONU329 і *P. fluorescens* ONU328; та сягала рівня ГДК (0,001 мг/л) – у разі іммобілізованих (на піску річковому) клітин штаму *P. ceracia* ONU327.

Показано (дані таблиці), що за рахунок іммобілізації клітин бактерій роду *Pseudomonas* на носіях, зокрема на волокнистій насадці типу “ВІЯ” сорбційно-фенол-деструктивна система набувала стабільності, тобто не відбувалося процесу десорбції фенолу, як наприклад, у разі використання синтетичного носія типу “ВІЯ”. В кожному конкретному випадку активність штамів бактерій роду *Pseudomonas*, іммобілізованих на різних носіях, оцінювали за ступенем очищення води від фенолу.

Прискорення очищення води від фенолу відбувалося за умови використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* (*P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328) іммобілізованих на керамічних трубках і волокнистій насадці типу «ВІЯ». Протягом 5-ти діб експозиції ступінь очищення води від фенолу іммобілізованими на волокнистій насадці типу «ВІЯ» мікроорганізмами-деструкторами з урахуванням поправки на контроль (нативний немодифікований сорбент «ВІЯ») сягав 97% – за дії штаму *P. ceracia* ONU327; та 99% – за дії штаму *P. fluorescens* ONU328.

Експериментально підтверджено, що через 11 діб використання



імобілізованих на активованому вугіллі, піску клітин бактерій *P. cepacia* ONU327 або імобілізованих на мушлях мідій клітин бактерій *P. fluorescens* ONU328 відбувалося зниження концентрації фенолу до рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК) (ГДК для водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового користування складає 0,001 мг/л) [1].

Із експериментальних даних, представлених у таблиці і на рисунку видно, що застосування окремих імобілізованих штамів бактерій роду *Pseudomonas* для очищення водних розчинів від фенолу (з концентрацією 200 мг/л) дозволяє при використанні певного носія досягти необхідної глибини очищення (96–100%). Високою швидкістю розкладання фенолу володіють клітини штаму *P. fluorescens* ONU328, імобілізовані на піску та на синтетичних носіях – керамічних трубках, волокнистій насадці типу «ВІЯ». В результаті біотехнологічної обробки води бактеріями *P. fluorescens* ONU328-деструкторами, імобілізованими або на піску, або на керамічних трубках, або на волокнистій насадці типу «ВІЯ» ступінь біодеструкції фенолу вже на 5-ту добу експерименту однаковий і сягає 99% (залишкова концентрація фенолу у воді з поправкою на контроль складає $1,0 \pm 0,12$ мг/л і $2,0 \pm 0,15$ мг/л, відповідно).

Таким чином, біохімічно-активні штами *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 можуть бути рекомендовані для широкого використання в біотехнології очищення стічних вод хімічних, фармацевтичних виробництв, нафтохімічного комплексу, медичних установ від токсичних органічних забруднювачів, зокрема від фенолу. Основні переваги пропонованої технології очищення води від фенолу бактеріями-деструкторами роду *Pseudomonas*, імобілізованими на природних (цеоліт, мушлі мідій, пісок, активоване вугілля, верховий торф) і синтетичних (волокниста насадка типу «ВІЯ», керамічні трубки) носіях є: екобезпека, ефективність, простота здійснення, відсутність вторинного забруднення.

Експериментально встановлено здатність штамів *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 окиснювати фенол (рН 6,8–7,2; температура 28 ± 1 °С). Ступінь очищення води від фенолу дії вільних клітин бактерій у кількості $7,5 \times 10^5$ КУО/мл протягом 10 діб експозиції сягав 45% – при використанні штаму *P. cepacia* ONU327, 78% – штаму *P. fluorescens* ONU328 і 93% – при використанні штаму *P. maltophilia* ONU329.

Експериментально підтверджено, що через 11 діб використання імобілізованих на активованому вугіллі, піску клітин бактерій *P. cepacia* ONU327 або імобілізованих на мушлях мідій клітин бактерій *P. fluorescens* ONU328 відбувалося зниження концентрації фенолу з 200 мг/л до рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК для водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового користування складає 0,001 мг/л)

Прискорення очищення води від фенолу відбувається за умови використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328), імобілізованих на керамічних трубках і волокнистій насадці типу «ВІЯ». Протягом 5-ти діб експозиції ступінь очищення води від фенолу імобілізованими на волокнистій насадці типу «ВІЯ» мікроорганізмами-деструкторами з урахуванням поправки на контроль



(нативный немодифицированный сорбент «ВИЯ») сягав 97% – за дії штаму *P. serasia* ONU327; та 99% – за дії штаму *P. fluorescens* ONU328.

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

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

ОЧИСТКА ВОДЫ ОТ ФЕНОЛА БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ

Реферат

Цель. Оптимизация процесса очистки воды от фенола с использованием бактерий рода *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329), иммобилизованных на природных и синтетических носителях. **Методы.** Концентрацию фенола в воде определяли экстракционно-фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина. Для очистки воды от фенола (с концентрацией 200 мг/л) использовано непатогенные отдельные штаммы бактерий *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327, иммобилизованные на носителях различной природы (цеолит, створки мидий, речной песок, керамические кольца, активированный уголь, верховой торф, синтетический носитель типа «ВИЯ»). **Результаты.** Экспериментально подтверждено, что адгезия клеток штаммов бактерий *P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 к цеолиту, речному песку (которые практически не сорбируют фенол) способствовала эффективной биодеструкции фенола на 96–100% (в зависимости от выбранного штамма бактерий). Остаточная концентрация фенола в воде при ее обработке (в течение 11 суток) иммобилизованными на цеолите клетками штамма *P. fluorescens* ONU328 или штамма *P. maltophilia* ONU329 уменьшалась с 200 мг/л до $8,0 \pm 0,95$ мг/л (степень очистки воды от фенола (α) – 96%) и до $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α = 99%) – при использовании иммобилизованных клеток штамма *P. serasia* ONU327. Установлено, что при использовании иммобилизованных на песке речном микроорганизмов-деструкторов остаточная концентрация фенола в воде на 11-е сутки обработки составляла $6,0 \pm 0,55$ мг/л (α = 97%) и $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α = 99%) – соответственно для штаммов *P. maltophilia* ONU329 и *P. fluorescens* ONU328; и достигала уровня предельно-допустимой концентрации (ПДК=0,001 мг/л) – в случае иммобилизованных на песке речном клеток штамма *P. serasia* ONU327. Экспериментально установлено, что ускорение очистки воды от фенола происходило при использовании клеток бактерий рода *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328), иммобилизованных на керамических трубках и волокнистой насадке типа «ВИЯ». В течение 5-ти суток экспозиции степень очистки воды от фенола иммобилизованными на волокнистой насадке типа «ВИЯ» микроорганизмами-деструкторами с учетом поправки на контроль (нативный немодифицированный сорбент типа «ВИЯ») достигала 97% – в результате действия штамма *P. serasia* ONU327; и 99% – в результате действия штамма *P. fluorescens* ONU328. **Вывод.** Для



ускорения очистки воды от фенола (в течение 5 суток) на 97–99% рекомендуется использовать штаммы бактерий *P. cepacia* ONU327 и *P. fluorescens* ONU328, иммобилизованные на волокнистой насадке типа "ВИЯ". Полное обесфеноливание воды наблюдается при ее обработке штаммами бактерий *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, отдельно иммобилизованных на активированном угле, речном песке (для штамма *P. cepacia* ONU327) и на створках мидий (для штамма *P. fluorescens* ONU328) соответственно.

Ключевые слова: очистка воды, фенол, сорбенты, иммобилизованные клетки бактерии рода *Pseudomonas*.

**T.V. Gudzenko, V.O. Ivanytsia, I.P. Konup, O.G. Gorshkova,
O.V. Voliuvach, T.O. Belyaeva, M.M. Chaban**

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

PURIFICATION OF WATER FROM PHENOL BY BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* IMMOBILIZED ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS

Summary

Aim. Optimization of the process of water purification from phenol using bacteria of the genus *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329) immobilized on natural and synthetic carriers. **Methods.** The concentration of phenol in water was determined by extraction-photometric method using 4-aminoantipyrin. For purification of water from phenol (with a concentration of 200 mg / l) non-pathogenic individual strains of bacteria *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327, immobilized on carriers of different nature (zeolite, mussel doors, river sand, ceramic rings, activated carbon, high peat, synthetic carrier type "VIYA"). **Results.** There were experimentally confirmed that adhesion of cells of the bacterial strains of *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 to zeolite, river sand (which practically do not sorb phenol) contributed to the effective biodegradation of phenol by 96–100% (depending on the selected strain bacteria). The residual concentration of phenol in water during its treatment (for 11 days) by cells of *P. fluorescens* ONU328 strain or *P. maltophilia* ONU329 strain immobilized on zeolite decreased from 200 mg / l to 8.0 ± 0.95 mg / l (water purification from phenol (α) – 96%) and up to 2.0 ± 0.14 mg / l (α = 99%) – when using immobilized cells of the strain *P. cepacia* ONU327. It was established that when river microorganisms-destroyers were immobilized on the river sand, the residual concentration of phenol in water on the 11th day of treatment was 6.0 ± 0.55 mg / l (α = 97%) and 2.0 ± 0.14 mg / l (α = 99%) – respectively for the strains of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328; and reached the level of maximum permissible concentration (MPC = 0.001 mg / l) – in the case of river cells of strain *P. cepacia* ONU327 immobilized in the sand of the river. It was established experimentally that the acceleration of water purification from phenol occurred when using cells of bacteria of the genus *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens*



ONU328) immobilized on ceramic tubes and a fibrous nozzle of the "VIYA" type. Within 5 days of exposure, the degree of water purification from phenol immobilized on the fibrous attachment of the VIYA type by destructive microorganisms, taking into account the control correction (native unmodified sorbent of the VIA type) reached 97% – as a result of the action of the strain *P. cepacia* ONU327; and 99% – as a result of the strain *P. fluorescens* ONU328. **Conclusion.** To accelerate the purification of water from phenol (for 5 days) by 97–99%, it is recommended to use the strains of the bacteria *P. cepacia* ONU327 and *P. fluorescens* ONU328 immobilized on a fibrous nozzle of the type "VIYA". Full dephenolization of water is observed when it is treated with the strains of bacteria *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, which are immobilized separately on activated carbon, river sand (for the strain *P. cepacia* ONU327) and on the mussel doors (for the strain *P. fluorescens* ONU328), respectively.

Key words: water purification, phenol, sorbents, immobilized cells of bacteria of the genus *Pseudomonas*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Беспамятков Г.П. Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде / Г.П. Беспамятков, Ю.А. Кротов. – Л.: Химия, 1985. – 585 с.
2. Быкова Г.С., Шаталаев И.Ф., Воронин А.В. Фитомасса наяды мелкозубчатой в доочистке фенолсодержащих загрязненных вод фармацевтических производств // Медицинский альманах. – 2014. – №1(31). – С. 102–105.
3. Галимова Р.З. Очистка фенолсодержащих сточных вод нативными и модифицированными адсорбционными материалами на основе отходов сельскохозяйственного и промышленного производства: Автореф. дис. к.т.н. 03.02.08-экология. – Казань: Казанский нац. исследов. ун-т, 2017. – 23.
4. Гвоздяк П.И., Могилевич Н.Ф., Куликов Н.И., Романова Е.А., Нездоимин В.И. Очистка фенолсодержащих сточных вод закрепленными микроорганизмами // Химия и технология воды. – 1989. – Вып. 1. – С. 73–75.
5. Горшикова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Конуп І.П., Беляева Т.О. Очищення води від фенолу та йонів важких металів асоціацією бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 2. – С. 70–80. DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134293](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134293)
6. Горшикова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляева Т.О., Конуп І.П., Чернишова М.О. Деструктивна та метал-акумуляуюча здатність бактерій роду *Pseudomonas* // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія» – 2018. – № 2(73). – С. 49–53.
7. Корженевич В.И. Микробная очистка фенолсодержащих сточных вод : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.07 : Саратов, 2003. – 23 с.
8. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. – 448 с.
9. Путилина Н.Т, Квитницкая Н.Н., Костовецкий Я.И. Микробный метод обесфеноливания сточных вод. – Киев: Здоровье, 1964. – 87 с.
10. Самсонова А. Биоремедиация природных и производственных сред // Наука и инновации. – 2011. – № 11(105). – С. 66–70.



11. Часова Э.В. Эколого-химические характеристики и методы защиты окружающей среды от фенола / Э.В. Часова, В.В. Ивчук // Вестник Криворожского национального университета. – 2013. – №34(1). – С. 209–213.

12. Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate // Arch Microbiol. – 2001. – Vol. 175(3). – P. 198–207.

13. Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Gal-kin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa. Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych. – Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1). – 85 p.

14. Патент України на винахід № 116299. Спосіб здійснення дефенолізації промислових стоків / Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Конуп І.П., Беляєва Т.О. Номер заявки № а201608635 від 25.07.2016 р. Опубл. 26.02.2018, Бюл. № 4.

15. Патент України на винахід №116058. Спосіб біологічного очищення поверхневих вод / Гвоздяк П.І., Капарник А.І., Домбровський К.О., Рильський О.Ф., Болгова О.С. Опубл. 25.01.2018., Бюл. №2

References

1. Bespamjatkov GP. Maximum permissible concentrations of chemicals in the environment / G.P. Bespamjatkov, Ju.A. Krotov. L.: Himija, 1985:585. [in Russian].

2. Bykova GS, Shatalaev IF, Voronin AV. The phytomass of finely serrated mollusk in the post-treatment of phenogenic contaminated waters of pharmaceutical industries. Medicinskij al'manah. 2014;1(31):102–105. [in Russian].

3. Galimova RZ. Purification of phenol-containing wastewater using native and modified adsorption materials based on agricultural and industrial waste: Avtoref. dis. k.t.n. 03.02.08-jekologija. – Kazan': Kazanskij nac. issledov. un-t, 2017:23. [in Russian].

4. Gvozdyak PI, Mogilevich NF, Kulikov NI, Romanova EA, Nezdojminov VI. Treatment of phenol-containing wastewater with fixed microorganisms. Himija i tehnologija vody. 1989;1:73–75. [in Russian].

5. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voljuvach OV, Konup IP, Beljaeva TO. Purification of water from phenol and heavy metal ions by association of bacteria of the genus *Pseudomonas*. Microbiology&Biotechnology. 2018;2:70–80. DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134293](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134293) [in Ukrainian].

6. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voljuvach OV, Beljaeva TO, Konup IP, Chernishova MO. Destructive and metal-storage capacity of bacteria of the genus *Pseudomonas*. Naukovi zapiski Ternopil's'kogo nacional'nogo pedagogichnogo universitetu imeni Volodimira Gnatjuka. Serija: Biologija». 2018;2(73):49-53. [in Ukrainian].

7. Korzhenevich VI. Microbial treatment of phenol-containing wastewater: Avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 03.00.07 : Saratov, 2003:23. [in Russian].



8. Lur'e JuJu. Analytical chemistry of industrial wastewater. M.: Himija, 1984:448. [in Russian].
9. Putilina NT, Kvitnickaja HH, Kostoveckij JaI. Microbial method of wastewater defenolization. K: Zdorov'ja, 1964:87. [in Russian].
10. Samsonova A. Bioremediation of natural and industrial environments. Nauka i innovacii. 2011;11(105):66-70. [in Russian].
11. Chasova JeV. Ecological and chemical characteristics and methods of protecting the environment from phenol / Je.V. Chasova, V.V. Ivchuk. Vestnik Krivorozhskogo nacional'nogo universiteta. 2013;34(1):209-213. [in Russian].
12. Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. Arch Microbiol. 2001;175(3):198–207. [in English]
13. *Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Galkin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa.* Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych. – Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1). – 85 p. [in Polish]
14. Patent Ukrai'ny na vynahid № 116299. Method of defenolization of industrial effluents / Ivanycja V.O., Gorshkova O.G., Gudzenko T.V., Voljuvach O.V., Konup I.P., Bjeljajeva T.O. Nomer zajavky № a201608635 vid 25.07.2016 r. Opubl. 26.02.2018, Bjul. № 4. [in Ukrainian].
15. Patent Ukrai'ny na vynahid №116058. Method of biological treatment of surface water / Gvozdyak P.I., Kaparnyk A.I., Dombrovs'kyj K.O., Ryl's'kyj O.F., Bolgova O.S. Opubl. 25.01.2018., Bjul. №2. [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції 05.12.2019 р.



УДК 634.8:579.64

Н.І. Теслюк, І. Аврамович

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

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ АДАПТАЦІЇ МІКРОКЛОНІВ *PAULOWNIA TOMENTOSA* ДО УМОВ *IN VIVO* З ВИКОРИСТАННЯМ БАКТЕРІЙ *BACILLUS* *MEGATERIUM* ONU 500

Мета роботи: удосконалення процесів адаптації мікроклонів Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa*), вирощеної у культурі *in vitro*, до умов *in vivo* з використанням штаму *Bacillus megaterium* ONU500. **Матеріали і методи.** У роботі використовували методи введення ініціальних експлантів в культуру *in vitro* і мікроклонального розмноження. Корені, підготовлених до адаптації мікроклонів Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa*), за 30 хв перед висадкою у ґрунт інокулювали суспензією бактерій у концентрації $4,6 \times 10^7$ кл/мл, у другій групі – $2,3 \times 10^7$ кл/мл, а третя зі стерильною дистильованою водою слугувала контролем. Після цього рослини висаджували в окремі ємності з підготовленим ґрунтом. На 14-ту, 30-ту та 100-ту добу адаптації вимірювали параметри росту та розвитку досліджуваних рослин. **Результати.** Встановлено, що найбільше життєздатних рослин на 100-ту добу адаптації залишилося у групі мікроклонів з використанням суспензії *B. megaterium* ONU500 у концентрації $2,3 \times 10^7$ кл/мл. Інокуляція коренів мікроклонів Павловнії повстяної перед висадкою у ґрунт бактеріями *B. megaterium* ONU500 у концентрації $2,30 \times 10^7$ кл/мл прискорює процеси росту, підвищує середній приріст пагонів адаптованих рослин на 10,5 см на 100-ту добу адаптації та на 4,0 збільшує утворення кількості вузлів на одну рослину. **Висновок.** Застосування бактерій *B. megaterium* ONU500 з концентрацією $2,3 \times 10^7$ кл/мл підвищує життєздатність, висоту рослин та утворення вузлів мікроклонів Павловнії повстяної.

Ключові слова: *Paulownia tomentosa*, культура *in vitro*, адаптація, мікроклональне розмноження, *Bacillus megaterium*.

Павловнія повстяна (*Paulownia tomentosa*) відноситься до одних з самих швидкорослих дерев і володіє значним економічним потенціалом (цінна деревина, високий темп вироблення біомаси, підвищена стійкість до стресів та ін.) [6]. Павловнія повстяна добре очищає землі [5]. Це є дуже важливим чинником для вирощування її на території України. Основним джерелом забруднення ґрунтів є відходи промислових підприємств, автотранспорт є головним джерелом надходження до ґрунту свинцю, цинку, а також погано працюючі системи санітарної очистки. Забруднені землі потребують відновлювальних робіт. Вирощування Павловнії повстяної рекомендоване для очищення ґрун-

© Н.І. Теслюк, І. Аврамович, 2019



тів і відновлення їх властивостей шляхом інтенсивного землеробства. Звичайні методи розмноження насінням ненадійні через хвороби і шкідників, поганого проростання, а також повільного росту, ніж живці [12]. Застосування методів мікроклонального розмноження для агролісомеліорації має важливе значення. Цей метод пропонує швидкий спосіб виробництва клонованого фонду та сприяє наповненню екологічним високоякісним матеріалом, котрий є генетично однорідним, без хвороб і вірусів [8]. Основним недоліком цього методу є низька життєздатність мікроклонів під час адаптації їх до умов *in vivo*, що часто призводить до втрати 90–100% мікроклонів.

Актуальним та важливим є пошук універсальних, раціональних варіантів технологічного процесу вирощування Павловнії повстяної при масовому розмноженні та удосконалення окремих етапів мікроклонального розмноження з використанням бактерій. Один із найскладніших етапів є адаптація рослин з умов *in vitro* до *in vivo*. Першою серйозною перешкодою для адаптації стає контакт порівняно слабо розвиненої і повністю стерильної кореневої системи мікроклона із мікробіотою ґрунту. Якщо у природі процеси формування ризосфери проходять поступово, то при адаптації рослин з умов *in vitro* коренева система є абсолютно беззахисною проти патогенних мікроорганізмів відкритого ґрунту. Тому саме на цьому етапі є доцільним використання корисних бактерій, вплив яких потенційно може підвищити кінцевий вихід мікроклонів.

У практиці аграрного виробництва накопичено значний матеріал, який підтверджує ефективність використання різних мікроорганізмів, зокрема, ризосферних азотфіксувальних та фосфатмобілізувальних бактерій, для стимуляції росту та розвитку рослин [2]. Із аналізу літературних джерел відомо, що бактерії *Bacillus spp.* позитивно впливають на урожайність, тому що формують біоплівки на коренях рослин та займають екологічні ніші фітопатогенів [7]. Рід *Bacillus* – це один з найбільш різноманітних і комерційно корисних груп бактерій, які синтезують антимікробні речовини проти фітопатогенів: циклічний ліпопептид, сурфактин, ітурін, макролактин та фунгіцин. Ці речовини успішно використовуються у сільському господарстві [9, 10, 11]. Завдяки антагоністичним властивостям по відношенню до інших видів бактерій бацили використовують у виробництві антибіотиків [4]. В лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова вивчено штам *B. megaterium* ONU500, який характеризується високою антагоністичною активністю до фітопатогенних мікроорганізмів та значно стимулює ріст дводольних та однодольних рослин. Цей штам запатентовано як штам-антагоніст проти збудників хвороб сільськогосподарських рослин [14]. Метою роботи було удосконалення процесів адаптації мікроклонів Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa*), вирощеної у культурі *in vitro*, до умов *in vivo* з використанням бактерій штаму *Bacillus megaterium* ONU500.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували мікроклони Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa*), а також бактерії штаму *Bacillus megaterium* ONU500.



Цей штам характеризується високою антагоністичною активністю до фітопатогенних мікроорганізмів, значно стимулює ріст дводольних та однодольних рослин [14].

Для мікроклонального розмноження Павловнії повстяної *in vitro* застосовували тверде середовище МС (середовище Мурасіге і Скуга) з модифікаціями, яке є зручним для посадки експлантів різних розмірів і розмноження мікроклонів павловнії. В роботі використовували агар-агар у концентрації 8 г/л, фітогормон групи цитокінінів – 6-БАП (6-бензиламінопурин) – 1,2 мг/л та фітогормон групи ауксинів – індолілоцтова кислота (ІОК) – 0,5мг/л [1]. Культивування введених у культуру експлантів здійснювалося в умовах культурального боксу за температури 25 °С, інтенсивності освітлення 2500 лк, відносній вологості 56–70% та фотоперіоді 16 год. Рослини, що сформували 6–7 вузлів, вилучали з пробірок і повторно живцювали. Початок формування коренів спостерігався через 6–8 днів. На цьому етапі здійснювали підготовку культур мікроорганізмів до експерименту.

Бактерії штаму *B. megaterium* ONU500 вирощували у рідкому середовищі LB (Lysogeny broth) стандартного складу, рН – 7,9 у термостаті-шейкері за 180 об/хв до загальної концентрації $9,2 \times 10^7$ кл/мл, яку вони досягали на другу добу культивування[13].

Для адаптації рослин до умов *in vivo* відбирали мікроклони Павловнії повстяної з розвинутою кореневою системою. Рослини мали 5–6 вузлів та були за висотою 5–8 см (Рис. 1).

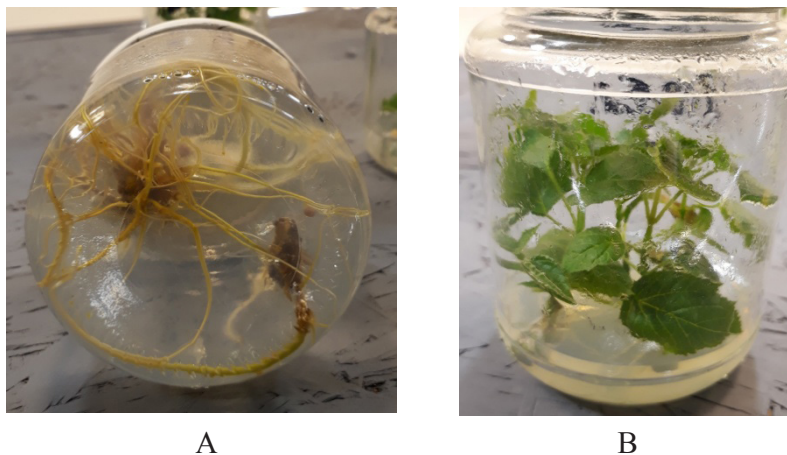


Рис. 1. Культивування мікроклонів Павловнії повстяної на живильному середовищі МС в умовах *in vitro* (А, В):

А – коренеутворення у мікроклонів Павловнії повстяної при розмноженні в культурі *in vitro*; **В** – мікроклони Павловнії повстяної висотою 5–6 см

Fig. 1. Cultivation of microclones of Pavlowniya tomentosa on nutrient medium MS *in vitro* (A, B):

A – root formation in Pavlowniya tomentosa microclones at reproduction in culture *in vitro*; **B** – Pavlowniya tomentosa microclones with height of 5–6 cm

Величина обсягу вибірки для однієї повторності експерименту становила 30 мікроклонів. На 10-ти мікроклонах тестували дію $4,6 \times 10^7$ кл/мл бактерій, на наступних 10-ти мікроклонах – дію $2,3 \times 10^7$ кл/мл бактерій, а інші 10 рослин були контрольними зразками.

Адаптацію проводили за розробленою нами методикою у дві стадії. Перша – підготовка фізіологічного стану мікроклонів: розвиток та нормалізація функціонування продохів, активізація процесів фотосинтезу та дихання мікроклонів, нарощування коренів. З цією метою рослинам поступово відкривали доступ до звичайного повітря протягом семи діб в умовах стерильного культурального боксу (рис. 2).



Рис. 2. Мікроклони Павловнії повстяної на першому етапі адаптації до умов *in vivo*

Fig. 2. Microclones of Pavlowniya tomentosa of the first stage of adaptation for *in vivo* conditions

Потім проводили висадку рослин у підготовлений субстрат, яким слугувала суміш простерилізованих гарячим паром під тиском однієї атм ґрунту «Поліський» універсальний (виробник – ТзОВ «Richland», Україна) та корисної домішки «Агроперліт» (виробник – ТзОВ «Richland», Україна).

Після підготовчого етапу адаптації мікроклони розділяли на три групи. Корені рослин першої групи 30 хв перед висадкою витримували у $4,6 \times 10^7$ кл/мл бактерій, другої групи – у $2,3 \times 10^7$ кл/мл, а третя слугувала контролем зі стерильною дистильованою водою. Після цього рослини висаджували у персональні ємності із підготовленим ґрунтом. Полив здійснювали автоклавованим дистиллятом протягом перших двох тижнів, а потім – звичайною водою за необхідності.

Спостереження за рослинами після висадки проводили протягом 100 діб. На 14-й, 30-й та 100-й дні адаптації, як найбільш показові для етапів та темпу росту мікроклонів Павловнії повстяної, проводили вимірювання параметрів росту та розвитку досліджуваних рослин. Результати опрацьовували за методом дисперсійного аналізу [3] із використанням комп'ютерних статистичних програм Excel. Дисперсійний аналіз проводили окремо за кожним досліджуваним показником.

Результати дослідження та їх обговорення

Приживлюваність і життєздатність рослин. В зв'язку з тим, що до-



слідження з адаптації мікроклонів Павловнії повстяної проводили в осінньо-зимовий період, результати з приживлюваності за всіма дослідним варіантами були досить низькими, але при цьому зберігалися достовірні закономірності (табл.). Було виявлено, що в середньому найбільше життєздатних рослин на 100-ту добу адаптації залишалось у групі мікроклонів з додаванням $2,3 \times 10^7$ кл/мл бактерій *B. megaterium* ONU500, а саме $51,7 \pm 0,1\%$. Для концентрації $4,6 \times 10^7$ кл/мл цей показник був нижчим і складав $23,6 \pm 0,2\%$, а у контрольній групі на 100-ту добу залишалось лише $8,3 \pm 0,4\%$ життєздатних рослин.

Таблиця

Приживлюваність адаптованих мікроклонів Павловнії повстяної після інокуляції бактеріями *B. megaterium* ONU500

Table

Survival of the adapted microclones of Pavloniya tomentosa after inoculation with bacteria of *B. megaterium* ONU500

Доба	Концентрація бактерій <i>B. megaterium</i> , кл/мл	Приживлюваність мікроклонів*, %
14	$4,6 \times 10^7$	$29,2 \pm 0,4$
	$2,3 \times 10^7$	$66,1 \pm 0,5$
	контроль	$40,2 \pm 0,4$
30	$4,6 \times 10^7$	$29,2 \pm 0,1$
	$2,3 \times 10^7$	$66,1 \pm 1,1$
	контроль	$20,8 \pm 0,4$
100	$4,6 \times 10^7$	$23,6 \pm 0,2$
	$2,3 \times 10^7$	$51,8 \pm 0,1$
	контроль	$8,3 \pm 0,4$

Примітка – *середнє значення з дослідних повторностей
Note –* average value of experimental repetitions

Показники приживлюваності були відповідно на 43,4% та 15,3% більшими за контрольні, що свідчить про значний позитивний вплив бактерій *B. megaterium* ONU500 на приживлюваність рослин у процесі адаптації.

Висота та приріст рослин. Протягом усього часу спостереження за рослинами найвищі показники приросту надземної частини реєстрували у групі мікроклонів, які інокулювали бактеріями *B. megaterium* ONU500 у концентрації $2,3 \times 10^7$ кл/мл. Трохи нижчими були рослини з використанням $4,6 \times 10^7$ кл/мл, і найменшу висоту мали рослини у контролі (рис. 3).

На 30-ту добу спостереження контрольні рослини у середньому мали приріст висоти $6,8 \pm 0,3$ см, рослини інокульовані бактеріями в концентрації $4,6 \times 10^7$ кл/мл – висотою $7,1 \pm 0,5$ см, а ті, що оброблені суспензією $2,3 \times 10^7$ кл/мл – $8,3 \pm 0,9$ см.

Через 100 днів різниця за висотою приросту пагонів між групами складала $6,0 \pm 0,02$ см, рослини з $4,6 \times 10^7$ кл/мл бактерій *B. megaterium* ONU500 – $13,2 \pm 0,02$ см, з $2,3 \times 10^7$ кл/мл бактерій – $16,5 \pm 1,6$ см.



Таким чином, завдяки інокуляції коренів мікроклонів Павловнії повстяної перед висадкою в ґрунт суспензією бактерій *B. megaterium* ONU500 в концентрації $2,3 \times 10^7$ клм/л, на 100-ту добу адаптації вдалося прискорити процеси росту рослин та підвищити середню висоту приросту пагонів на 7,2 см порівняно із обробкою $4,6 \times 10^7$ кл/мл бактерій та на 10,5 см порівняно із контрольними рослинами.

Найвищі показники за кількістю новоутворених вузлів у рослин протягом 100 діб спостережень мали рослини Павловнії повстяної, корені яких інокулювали бактеріями *B. megaterium* ONU500 у концентрації $2,3 \times 10^7$ кл/мл (рис. 4).

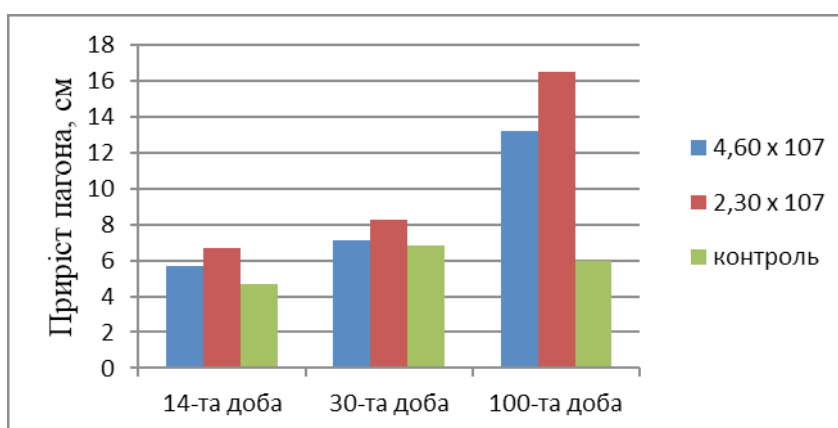


Рис. 3. Приріст рослин Павловнії повстяної під час адаптації після інокуляції бактеріями *B. megaterium* ONU500

Fig. 3. Increase of height of Pavlovniya tomentosa plants during adaptation after inoculation with bacteria of the *B. megaterium* ONU500 strain

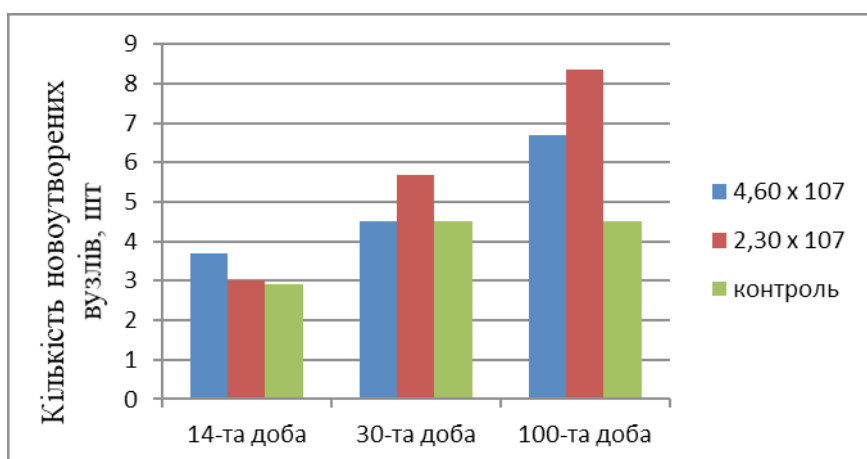


Рис. 4. Кількість новоутворених вузлів у рослин Павловнії повстяної під час адаптації після інокуляції бактеріями *B. megaterium* ONU500

Fig. 4. Number of new formed knots of Pavlovniya tomentosa plants during adaptation after inoculation with bacteria of the *B. megaterium* ONU500 strain

На 30-ту добу експерименту контрольні рослини у середньому мали $3,8 \pm 0,3$ новоутворених вузлів, рослини з $4,6 \times 10^7$ кл/мл бактерій *B. megaterium* ONU500 – $4,5 \pm 0,4$ новоутворених вузлів, а група тих, що інокулювали з бактеріями в концентрації $2,3 \times 10^7$ кл/мл, мали в середньому $5,6 \pm 0,2$ новоутворених вузлів.

Через 100 діб після інокуляції кількість новоутворених вузлів у контрольному варіанті складала по $4,3 \pm 0,01$ вузлів, у варіанті із використанням $4,6 \times 10^7$ кл/мл бактерій *B. megaterium* ONU500 – $6,7 \pm 0,3$ вузлів, а у рослини в досліді з $2,3 \times 10^7$ кл/мл отримано в середньому по $8,3 \pm 0,3$ вузлів.

Таким чином, застосування методу інокуляції кореневої системи мікроклонів суспензією *B. megaterium* ONU500 з концентрацією $2,3 \times 10^7$ кл/мл дозволило підвищити утворення кількості вузлів на 4,0 шт. у рослин павловнії порівняно з контролем на 100-ту добу адаптації.

Результати досліджень з адаптації Павловнії повстяної підтвердили, що бактерії штаму *B. megaterium* ONU500 позитивно впливають на життєздатність лабораторних мікроклонів. Виявлено, що суспензії бактерій *B. megaterium* ONU500 позитивно впливають на параметри росту та розвитку рослин Павловнії повстяної під час адаптації до умов *in vivo*.

Встановлено, що найбільш ефективними для удосконалення процесів адаптації Павловнії повстяної є використання суспензії *B. megaterium* ONU500 з концентрацією $2,3 \times 10^7$ кл/мл. Застосування такого прийому дозволяє підвищити життєздатність, приріст рослин та кількість новоутворених вузлів.

N.I. Tesliuk, I. Avramovych

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

IMPROVING OF ADAPTATION METHODS OF PAVLOWNIYA TOMENTOSA MICROCLONES TO CONDITIONS *IN VIVO* WITH USE OF BACTERIA OF *BACILLUS MEGATERIUM* ONU50

Summary

Aim. Improvement of the processes of adaptation of pavlowniya microclones of the felt (*Paulownia tomentosa*) which is grown up in the culture *in vitro* to *in vivo* conditions with use of a strain of *Bacillus megaterium* ONU500. **Materials and methods.** The roots of *Pavlownia tomentosa* microclones were inoculated with $4,60 \times 10^7$ cells/ml bacteria suspension for in 30 minutes before planting, in the second group with $2,30 \times 10^7$ cells per ml, and the third one was the control group with sterile distilled water. The plants were then planted in separate containers with the prepared soil. After planting, the plants were observed for 100 days. On the 14th, 30th and 100th adaptation days, the measurements by growth and development parameters of under studying plants were made. **Results.** More viable plants on the 100th day of adaptation remained in the microclone group with the suspension of *B. megaterium* ONU500, with the concentration of $2,30 \times 10^7$ cells



per ml. Due to inoculating the roots of *Pavlovnia felt* microclones, $2,30 \times 10^7$ cells/ml of *B. megaterium* bacteria ONU500 there were given the opportunity to accelerate growth processes and increase the average height of adapted plants by 7.30 cm on the 100th day of adaptation. Also, the use of *B. megaterium* ONU500 bacteria with a cell number of $2,30 \times 10^7$ in ml allowed to increase the formation of the number of nodes per 4.04 pcs in *Pavlovnia felt* plants comparing to the control group on the 100th day of adaptation. **Conclusion.** The usage of *B. megaterium* ONU500 bacterium with the concentration of $2,30 \times 10^7$ cells per ml increases the viability, plant height and number of nodes by 43.45%, 10,5 cm and 4.04 pcs, respectively, comparing to the control group on the 100th day of adaptation.

Key words: *in vitro* culture, adaptation, clonal micropropagation, *Bacillus megaterium* ONU500, *pavlovnia*.

Н.И. Теслюк, И. Аврамович

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

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ АДАПТАЦИИ МИКРОКЛОНОВ *PAULOWNIA TOMENTOSA* К УСЛОВИЯМ *IN VIVO* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *BACILLUS MEGATERIUM* ONU 500

Реферат

Цель работы: усовершенствование процессов адаптации микроклонов Павловнии войлочной (*Paulownia tomentosa*), выращенной в культуре *in vitro*, к условиям *in vivo* с использованием штамма *Bacillus megaterium* ONU500.

Материалы и методы. Использовали методы введения инициальных эксплантов в культуру *in vitro* и микроклонального размножения. Корни подготовленных к адаптации микроклонов Павловнии войлочной (*Paulownia tomentosa*) за 30 мин., перед высадкой инокулировали суспензией бактерий в концентрации $4,60 \times 10^7$ клеток/мл, во второй группе – с количеством клеток $2,30 \times 10^7$ в мл, а третья служила контролем со стерильной дистиллированной водой. После этого растения высаживали в отдельные емкости с подготовленным грунтом. На 14-й, 30-й и 100-й дни адаптации проводились измерения параметров роста и развития исследуемых растений.

Результаты. Больше жизнеспособных растений на 100-е сутки адаптации оставалось в группе микроклонов с суспензией *B. megaterium* ONU500 $2,30 \times 10^7$ клеток в мл. Благодаря инокулированию корней микроклонов Павловнии войлочной перед высадкой в грунт $2,30 \times 10^7$ клеток в мл *B. megaterium* ONU500 удалось ускорить процессы роста и повысить среднюю высоту прироста адаптированных растений на 7,30 см на 100-е сутки адаптации. Также использование бактерий *B. megaterium* ONU500 с количеством клеток $2,30 \times 10^7$ в мл позволило повысить образование количества узлов на 4,04 шт. у растений Павловнии войлочной по сравнению с контролем на 100-е сутки адаптации. **Вывод.** Применение бактерий *B. megaterium* ONU500 с концентрацией $2,30 \times 10^7$ клеток в мл повышает жизнеспособность, прирост растений и количество узлов на 43,45%, 10,5 см и 4,04 шт. соответственно по сравнению с контролем на 100-е сутки адаптации.



Ключевые слова: культура *in vitro*, адаптация, микрклональное размножение, *Bacillus megaterium* ONU500, павловния.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аврамович І., Теслюк Н.І. Клональне мікророзмноження Павловнії повстяної (*Paulownia tomentosa*) // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: матеріали XIII наукової конференції молодих вчених, присвяченої 100-річчю з дня заснування Національної академії аграрних наук України (м. Чернігів, 24–25 жовтня 2018 р.) : тез.доп.: Чернігів : видавець Брагинець О.В. – 2018. – С. 176–179.
2. Мельничук М.Д., П. Григорюк, Т.В. Новак, О.Л. Кляченко, Ю.В. Коломієць, В. Г. Спиридонов, Ключащенко А.А., Антіпов І.О., Оверченко В.В. Біотехнологія рослин : практикум. – К., ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. – 215 с.
3. Менчер Э. М., Земшман А.Я. Основы планирования эксперимента с элементами математической статистики в исследованиях по виноградарству // – Кишинев: Штиинца, 1986. – С. 238.
4. Мерліч А.Г., Ліманська Н.В., Жунько І.Д., Бабенко Д.О. Вплив *Lactobacillus plantarum* та *Bacillus atrophaeus* на проростання насіння та ріст проростків пшениці // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – № 1. – С. 36–47.
5. Ткаченко К. Адамове дерево, чи царствена павловнії // У світі рослин. – № 12. – 2013. – С. 26–29.
6. Шурганов Б.В., Мишуткина Я.В., Нескородов Я.Б. Разработка эффективной системы регенерации *Paulownia shan tong* (*P. fortunei* x *P. tomentosa*) // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2015. – № 3. – С. 49–58.
7. Arkhipova T.N., Veselov S.U., Melentiev A.I., Martynenko E.V., Kudoyarova G.R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants // Plant Soil. – 2005. – Vol. 272, № 1–2. – P. 201–209.
8. Bahri NB, Bettaieb T. *In vitro* propagation of a forest tree *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. – A valuable medicinal tree species // Albanian journal of agricultural sciences. – 2013– V. 12(1). – P. 37–42.
9. Chen Y., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation // Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 15, № 3. – P. 848–864.
10. Eppinger M., Bunk B., Johns M.A., Edirisinghe J.N., Kutumbaka K.K., Koenig S.S., Vary P.S Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319 // Journal of Bacteriology. – 2011. – V. 193(16). – P. 1499–4213.
11. Huang J., Wei Z., Tan S., Mei X., Shen Q, Xu Y. Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62 // J. Agric. Food Chem. – 2014. – Vol. 62. – P. 10708–10716.
12. Rahman M.A., F.Rahman, M. Rahmatullah *In vitro* regeneration of *Paulownia tomentosa* Steud. plants through the induction of adventitious shoots in



explants derived from selected mature trees, by studying the effect of different plant growth regulators // American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. – 2013. – V. 7(4). – P. 259–268.

13. Shimizu K., Nakamura H., Ashiuchi M Salt-Inducible Bionylon Polymer from *Bacillus megaterium* // Applied and Environmental Microbiology. –2007. –V. 73(7). – P. 2378–2379.

14. Пат. 126879 Україна, МПК C12N 1/20, A01N 63/00, на корисну модель. Штам-антагоніст *Bacillus megaterium* ONU 500 проти збудників хвороб сільськогосподарських рослин / Іваниця В. О., Крилова К. Д., Ліманська Н. В., Жунько І. Д., Драгуновська О. І. ; заявл. 29.01.2018 ; опубл. 10.07.2018, Бюл. № 13. – с 4.

References

1. Avramovych I, Tesliuk NI. Clonal micropropagation of Paulownia tomentosa // Microbiology in modern agricultural production: materials of the 13th Scientific Conference of Young Scientists on the 100th Anniversary of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine (Chernihiv, 2018) Report: Chernihiv: Publisher Braginets OV - 2018. - P. 176-179.

2. Melnychuk MD, Grigoryuk P, Novak TV, OL Klyachenko OL, Kolomiets YuV, Spiridonov VG, Klyuvadenko AA, Antipov IO, Overchenko VV. Plant biotechnology: a workshop. Agar Media Group LLC, Kiev, 2012: 215 (in Ukrainian).

3. Mencher EM. Fundamentals of experiment planning with elements of mathematical statistics in viticulture research. Shtiintsa, Chisinau, 1986: 238 (in Russian).

4. Merlich AG, Limanskaya NV, Zhunko ID, Babenko DO. Influence of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus atrophaeus* on seed germination and growth of wheat seedlings. Microbiology and biotechnology. 2017. 1: 36–47(in Ukrainian).

5. Tkachenko K. Adam's Tree, or the Royal Pavlovia. In the Plant World. 2013.12: 26-29 (in Ukrainian).

6. Shurhanov BV, Myshutkina YV, Neskorodov YB. Development of an effective system of regeneration *Paulownia shan tong* (*P. fortunei* x *P. tomentosa*). Bulletin of the Russian University of Friendship of Peoples. Series: Agronomy and Livestock. 2015.3:49-58 (in Russian).

7. Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. Plant Soil. 2005. 272(1-2): 201-209.

8. Bahri NB, Bettaieb T. *In vitro* propagation of a forest tree *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud. - A valuable medicinal tree species. Albanian journal of agricultural sciences. 2013. 12(1): 37 – 42.

9. Chen Y, Yan F, Chai Y, Liu H, Kolter R, Losick R. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environ. Microbiol. 2013.15(3): 848–864.

10. Eppinger M, Bunk B, Johns MA, Edirisinghe JN, Kutumbaka KK, Koenig S.S., Vary P.S Genome sequences of the biotechnologically important *Bacil-*



lus megaterium strains QM B1551 and DSM319. Journal of Bacteriology. 2011. 193(16):1499 – 4213

11. Huang J, Wei Z, Tan S, Mei X, Shen Q, Xu Y. Suppression of bacterial wilt of tomato by bioorganic fertilizer made from the antibacterial compound producing strain *Bacillus amyloliquefaciens* HR62. J. Agric. Food Chem. 2014.62: 10708 – 10716.

12. Rahman MA, Rahman F, Rahmatullah M. *In vitro* regeneration of *Paulownia tomentosa* Steud. plants through the induction of adventitious shoots in explants derived from selected mature trees, by studying the effect of different plant growth regulators. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture. 2013. 7(4): 259 – 268.

13. Shimizu K, Nakamura H, Ashiuchi M. Salt-Inducible Bionylon Polymer from *Bacillus megaterium*. Applied and Environmental Microbiology. 2007.73(7): 2378 – 2379.

14. A.s. 126879 In Ukraine IPC A01N63 / 00. *Bacillus megaterium* antagonist strain against pathogens of agricultural plants / Ivanytsya VO, Krylov KD, Limanskaya NV, Zhunko ID, Dragunovskaya OI. - № u201800796; Filed on 01/29/2018; Publ. 10.07.2018 - Bull. № 13. - 4 p.

Стаття надійшла до редакції 05.11.2019 р.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

Стаття має відповідати тематичному спрямуванню журналу і, відповідно до п. 3 Постанови ВАК України від 15.01.2003 р. №7-5/1, включати такі структурні елементи: постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими чи практичними завданнями; аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано вирішення даної проблеми і на які опирається автор; виокремлення раніше не вирішених частин загальної проблеми, котрим присвячується стаття; формулювання мети статті (постановка завдання); виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням наукових результатів; висновки з даного дослідження і перспективи подальших пошуків у даному напрямі.

До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом до 18 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);



- місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail);
- Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

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

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

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

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

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

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в 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 указати прізвища, імена та по-батькові усіх авторів, поштову адресу, телефон, факс, e-mail (для кореспонденції).

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



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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

Розділ “Матеріали і методи”:

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

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

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

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

Розділ “Результати досліджень та їх обговорення” має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.



Список використаної літератури

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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

Зразки посилання літератури

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

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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



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

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

Зразки посилань літератури в романській абетці

References

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

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

Статті в журналах:

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

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

Книги:

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

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

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

Матеріали з'їздів, конференцій:

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



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

Диссертационные работы:

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

Сборники:

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

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

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

Патенти, заявки:

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

Статті з електронних журналів:

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

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

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

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

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

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

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



Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів,
що надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія»,
можливі лише за умови посилання на джерело інформації
та з дозволу редакційної колегії.

Усі права захищені згідно законодавства України.

Верстка С. О. Остапенко
Підписано до друку 16.12.2019 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 8,94. Тираж 100 пр.
Зам. № 2046.

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
e-mail: druk@onu.edu.ua