

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

# МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

# MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

**№ 1 (29)**  
**2015**

Одеса  
ОНУ  
2015

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

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

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

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

**РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ**

Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р.А. Волков (Чернівці, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П.І. Гвоздяк (Київ, Україна), С.П. Гудзь (Львів, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Ю.П. Зайцев (Одеса, Україна), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), О.А. Кіпріанова (Київ, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), І.П. Метеліцина (Чикаго, США), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немятловський (Варшава, Польща), В.П. Патика (Київ, Україна), Петров С.А. (Одеса, Україна), В.С. Підгорський (Київ, Україна), В.К. Позур (Київ, Україна), В.П. Поліщук (Київ, Україна), А.А. Сибірний (Львів, Україна), Л.М. Сківка (Київ, Україна), М.Я. Співак (Київ, Україна), І.А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф.І. Товкач (Київ, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна)

**Науковий редактор випуску В.О. Іваниця**

*Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються*

Затверджено до друку Вченою радою  
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.  
Протокол № 3 від 24.03.2015 р.

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

**Журнал індексується/реферується в Index Copernicus, Google Scholar  
Джерело, Україніка наукова.**

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

© Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова, 2015

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

**EDITOR-IN-CHIEF**

V.O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

**CO-EDITOR-IN-CHIEF**

T.O. Filipova (Odesa, Ukraine)

**EXECUTIVE SECRETARY**

T.V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

**EDITORIAL BOARD MEMBERS**

V. O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland), P.I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), S.P. Gudz (Lviv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), O. A. Kiprianova (Kyiv, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B. P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I.P. Metelitsyna (Chicago, USA), G. G. Minicheva (Odesa, Ukraine), M. Niemialtowsky (Warsaw, Poland), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S.A. (Odesa, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), V. P. Polishuk (Kyiv, Ukraine), V. K. Pozur (Kyiv, Ukraine), M. Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A. A. Sybirny (Lviv, Ukraine), L.M. Skivka (Kyiv, Ukraine), I.A. Tykhonovych (St.-Peterburg, Russia), F.I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L.D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R.A. Volkov (Chernivtsi, Ukraine), Yu. P. Zaytsev (Odesa, Ukraine)

**Scientific editor V.O. Ivanytsia**

*Accepted for publishing articles are reviewed*

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University.  
Minutes No 3, 24.03.2015

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

**MBT Journal is indexed in Index Copernicus and Google Scholar database  
and is abstracted in Ukrainian abstract journals "Source" (Dzherelo),  
and Bibliographic Database "Ukrainika scientific" (Ukrainika Naukova)**

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

© Odesa National Mechnykov  
University, 2015

## З М І С Т

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

<b>А.М. Остапчук</b> МОЛЕКУЛЯРНО–БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМУ <i>BACILLUS SP.</i> ONU14 З ЕНТОМОПАТОГЕННОЮ АКТИВНІСТЮ .....	6
<b>Д.С. Бережна, О.А. Іващенко, В.П. Поліщук</b> ОЦІНКА ЕПІЗООТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ ВІРУСУ ХВОРОБИ МАРЕКА НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ .....	14
<b>К.В. Авдіюк, Л.Д. Варбанець, В.О. Іваниця</b> ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ <i>ACHROMOBACTER SP.</i> 7A – ПРОДУЦЕНТА $\alpha$ -АМІЛАЗИ.....	21
<b>Л.О. Білявська</b> БІОСИНТЕЗ АУКСИНІВ ГРУНТОВИМИ СТРЕПТОМІЦЕТАМИ – АНТАГОНІСТАМИ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ І НЕМАТОД .....	36
<b>Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця</b> ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ-АНТАГОНІСТІВ РОДУ <i>BACILLUS</i> .....	44
<b>Л.А. Сафронова</b> ВПЛИВ АМІНОКИСЛОТ НА ЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> SUBSP. <i>PLANTARUM</i> .....	50
<b>А.М. Венгер, Н.Е. Волкова</b> МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ДІАГНОСТИКИ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО .....	60
<b>А.О. Рой, О.С. Харкевич</b> МІКОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ФОСФАТМОБІЛІЗУВАЛЬНИХ ГРУНТОВИХ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>BACILLUS</i> SOHN .....	66
<b>Н.Л. Поєдинок, О.Б. Михайлова, В.М. Ходаковський, І.О. Дудка</b> ВПЛИВ НА РОСТОВУ АКТИВНІСТЬ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ КУЛЬТИВОВАНИХ МАКРОМІЦЕТІВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ .....	77
<b>О.О. Нечипуренко, М.А. Хархота, Л.В. Авдєєва</b> ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ КАРБОНУ, НІТРОГЕНУ ТА СОЛЕЙ МЕТАЛІВ НА ПРОДУКТИВНІСТЬ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ШТАМІВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 1.1 ТА <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> УКМ В-5113 .....	87
АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2014 РОЦІ .....	96
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ .....	102

## CONTENTS

### EXPERIMENTAL WORKS

<b>A.M. Ostapchuk</b> MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND IDENTIFICATION OF <i>BACILLUS SP. ONU14</i> STRAIN WITH ENTOMOPATHOGENIC ACTIVITY .....	6
<b>D.S. Berezna, O.A. Ivashchenko, V.P. Polishchuk</b> EVALUATION OF EPIZOOTIC SITUATION WITH MAREK'S DISEASE VIRUS IN UKRAINE .....	14
<b>K.V. Avdiyuk, L.D. Varbanets, V.O. Ivanytsia</b> OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR $\alpha$ -AMYLASE PRODUCER <i>ACHROMOBACTER SP. 7A</i> .....	21
<b>L.O. Biliavska</b> AUXINS BIOSYNTHESIS BY SOIL STREPTOMYCES – THE ANTAGONISTS OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS AND NEMATODES .....	36
<b>Zh. Sergieieva, V. Ivanytsia</b> PLASMID PROFILES OF <i>BACILLUS</i> GENUS ANTAGONISTIC STRAINS .	44
<b>L. A. Safronova</b> EFFECT OF THE AMINO ACIDS UPON LYTIC ACTIVITY OF <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> SUBSP. <i>PLANTARUM</i> STRAINS.....	50
<b>A.M. Venger, N.E. Volkova</b> MOLECULAR BIOTECHNOLOGY OF HOP CROWN GALL DIAGNOSTIC... 60	
<b>A.A. Roy, E.S. Kharkevich</b> MYCOLYTIC ACTIVITY OF PHOSPHATE MOBILIZING SOIL BACTERIA OF GENUS <i>BACILLUS</i> COHN.....	66
<b>N.L. Poyedinok, O.B. Mikhailova, V.M. Khodakovsky, A. Dudka</b> EFFECT OF LOW-INTENSITY LASER IRRADIATION ON THE CULTIVATED MACROMYCETES SEED CULTURE GROWTH ACTIVITY .....	77
<b>O. Nechypurenko, M. Kharhota, L. Avdeeva</b> THE IMPACT OF CARBON, NITROGEN SOURCES AND METAL SALTS ON PRODUCTIVITY OF CAROTENE SYNTHESIZING STRAINS <i>BACILLUS SUBTILIS</i> 1.1 AND <i>B. AMYLOLIQUEFACIENS</i> UCM B-5113.....	87
ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL "MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY" IN 2014 YEAR.....	96
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS .....	102

УДК 579.852.11

**А.М. Остапчук**

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ МСП, 03680, Україна,  
тел.: +38 (044) 220 11 95, e-mail: chromas@ukr.net

## МОЛЕКУЛЯРНО–БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМУ *BACILLUS SP. ONU14* З ЕНТОМОПАТОГЕННОЮ АКТИВНІСТЮ

**Мета.** Вивчити молекулярно-біологічні характеристики та провести ідентифікацію штаму *Bacillus sp. ONU14* з ентомопатогенною активністю проти шкідника грибів грибною комарика *Bradisia pilistriata* Frey. **Методи.** Ідентифікацію проводили за жирно-кислотним складом методом газо-рідинної хроматографії з використанням автоматизованої системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock та реакції мультиплексної ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) із групо-специфічними праймерами. Для молекулярно-біологічної характеристики застосовували методи фазово-контрастної та електронної мікроскопії, SDS-PAGE, метод градієнтного ультрацентрифугування. **Результати.** Склад жирних кислот та продукти реакції мультиплексної ПЛР з групо-специфічними праймерами дозволяють віднести досліджуваній штаму до виду *Bacillus thuringiensis*. Виявлені білкові клітинні включення мають неправильну форму та при розчиненні утворюють протоксини масою близько 66 та 25 кДа. **Висновки.** З використанням мікробіологічних та молекулярно-біологічних методів охарактеризовано ендоспоро-утворювальний штам *Bacillus sp. ONU14* з ентомопатогенною активністю. За жирно-кислотним складом та продуктами реакції ПЛР штаму ідентифіковано як *Bacillus thuringiensis*.

**Ключові слова:** *Bacillus thuringiensis*, жирно-кислотний склад, протоксин, мультиплексна ПЛР.

Представники групи *Bacillus* об'єднані у велику та гетерогенну групу дуже розповсюджених мікроорганізмів з широким спектром особливих фізіолого-біохімічних властивостей. Вони широко використовуються в сучасній біотехнології для синтезу протеолітичних ферментів, біосурфактантів, фітогормонів тощо на ряду з іншими мікроорганізмами. Так, особливою групою із значним біотехнологічним потенціалом, який вирізняє її від інших представників, стоять представники виду *Bacillus thuringiensis*. Не зважаючи на те, що сьогодні цей вид мікроорганізмів широко вивчений та інтенсивно використовується в



сільському господарстві в боротьбі з комахами-шкідниками [1], з'являються нові ізоляти, які розширюють відомі уявлення про фізіолого-біохімічні характеристики цієї групи.

Вид *B. thuringiensis* на ряду з *B. anthracis*, *B. mycoides*, належать до групи *B. cereus*, представники котрої характеризуються високим ступенем генетичної та фенотипової спорідненості. Так аналіз 16S-rRNA показує, що члени групи мають майже ідентичні послідовності. Специфічною експрес-ознакою, за якою можливо диференціювати *B. cereus* від *B. thuringiensis* є здатність останнього до формування параспоральних білкових включень на етапі споруляції, які можуть займати до 30% від маси клітини та проявляють ентомотоксичну активність [2]. Проблема використання такого підходу полягає в тому, що подібні включення виявленні серед представників *Brevibacillus*, *Paenibacillus* та *Clostridium* [3].

Використання комплексу мікробіологічних, біохімічних та молекулярно-генетичних методів дозволяє охарактеризувати та ідентифікувати нові ізоляти, які можуть бути перспективними для біотехнології.

Метою нашої роботи було вивчити молекулярно-біологічні характеристики та провести ідентифікацію штаму *Bacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю проти шкідника грибів грибного комарика *Bradisia pilistriata* Frey.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був ендоспоро-утворювальний штам *Bacillus sp.* ONU14, виділений із мертвих комах грибного комарика та зберігається в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова [4].

Культивування проводили на рідкому поживному середовищі Лурія-Бертані при 30 °С впродовж 24 год при 180 об/хв. Для індукції спороутворення та кристалоутворення добову культуру поміщали в розчин 0,86% NaCl та культивували при 30 °С впродовж наступних 24 год при 180 об/хв. Формування спор та кристалів спостерігали в фазово-контрастний мікроскоп Laboval 4 (Karl Zeiss).

Морфологію та розміри клітин визначали методом електронної мікроскопії. Зразки адсорбували на мідних сіточках з формваровою підложкою впродовж 10 хв, промивали водою та контрастували спиртовим розчином ураніл ацетату. Дослідження проводили на електронному мікроскопі JEM-1400 (Jeol, Японія) при 80 кВ.

Для виділення кристалів добову культуру поміщали в колбу з стерильною водою та культивували при 30 °С впродовж 72 год до повного лізису клітин. Ступінь лізису контролювали методом фазового контрасту та забарвленням суспензії розчином сафраніну.

Очистку кристалів проводили згідно Sharpe [5], методом ультрацентрифугування в лінійному градієнті розчину ренографіну на ультрацентрифузі Beckman при 20 000 g впродовж 1 год.

Розчинення очищених кристалів проводили в розчині 50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> з рН-10,5 для вивільнення молекул протоксинів, які входять до складу кристалів.



Спектр протоксिनних білкових субодиниць очищених кристалів досліджуваних штамів вивчали методом вертикального електрофорезу в поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE). Розділення проводили в 14% гелі на електрофоретичній камері Bio-Rad Mini Protean.

Реакцію мультиплексної ПЛР проводили згідно Park [6]. Групоспецифічні праймери, які визначають приналежність досліджуваного штаму до групи бактерій *B. cereus* та специфічно взаємодіють з геном groEL – продукт 400 п.н, та видоспецифічні праймери до *B. thuringiensis*, які взаємодіють з геном gytB – продукт 299 п.н. Як негативний контроль використовували *B. subtilis* ATCC 7001, позитивний контроль на групоспецифічний праймер – *B. cereus* ATCC 10702 та *B. thuringiensis* IMV 7173 на видоспецифічний праймер.

Ідентифікацію за жирно-кислотним складом проводили методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Колонка капілярна 25м×0,2мм×0,33мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носіє водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв. Досліджувану культуру двічі пасивували на твердому поживному середовищі Лурія-Бертані.

Чисту культуру пересівали на ТВА середовище та вирощували впродовж 24 год при 28 °С. Послідовно проводили: омилення ліпідів клітинної стінки бактерій після додавання метанольного розчину NaOH, метилювання вивільнених солей жирних кислот в присутності кислого розчину метанолу, екстракцію органічним розчинником методом рідинно-рідинної екстракції та нейтралізацію проби з додаванням 0,1 М розчину NaOH. Отримані метилові ефіри аналізували методом газової хроматографії.

### Результати та обговорення

Раніше було показано, що досліджуваний штам *Bacillus sp.* ONU14 проявляє ентомоцидну активність проти грибного комарика *Bradisia pilistriata* Frey [4].

При рості на рідкому поживному середовищі для клітин досліджуваного штаму була характерна видовжена форма (рис. 1), клітини розміщені поодинокі або парами. На 3-ю добу культивування спостерігалось утворення ендоспор для яких було характерним розміщення в одному з кінців клітин. За Грамом досліджуваний штам забарвлювався позитивно.

Методом фазово-контрастної мікроскопії була показана здатність штаму до формування контрастних кристалічних включень неправильної та овальної форми (рис. 1).

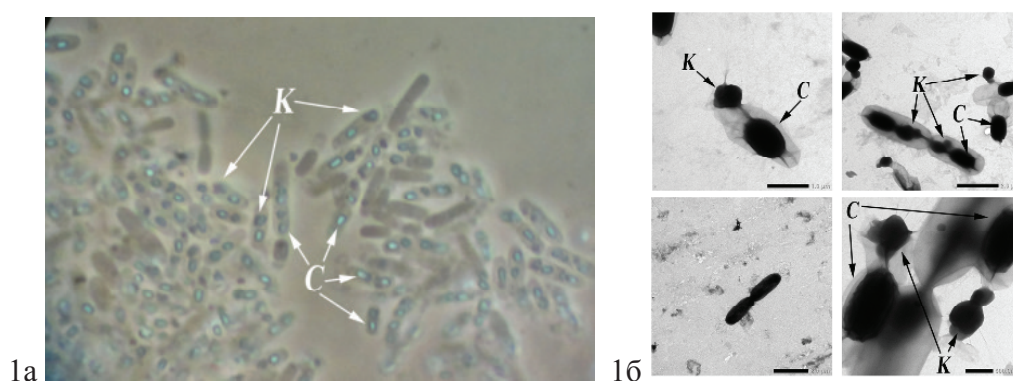
Подібні білкові включення характерні для представників виду *B. thuringiensis*, та є факторами патогенності поряд з фосфоліпазами, хітиназами, протеазами, β-екзотоксином та речовинами з антифунгіцидною дією, такими як цвітерміцин [7]. Формування таких кристалів у *B. thuringiensis* є унікальним генетично детермінованим феноменом, який індукується стресовими факторами навколишнього середовища та пов'язаний із фізичним виходом води в процесі споруляції. Біологічно, такий ефект направлений на виживання клітин





провокуючи летальну дію направлену на комаху господаря (руйнування клітин епітелію кишківника комахи, вивільнення поживних речовин та переходу у вегетативну фазу бактерії та подальшого розмноження).

Параспоральні включення *B. thuringiensis* являють собою олігомери які складаються з поліпептидних протоксिनних субодиниць [2]. Вони можуть включати Сгу токсини, які вимагають специфічного білкового рецептора для зв'язування з епітеліальними клітинами кишково-шлункового тракту комахи та Сут токсини, які зв'язуються з фосфоліпідами, і тому не мають такої чіткої специфічності. Останні мають молекулярну масу близько 25 кДа є високо-активним проти комарів та можуть підсилювати дію Сут токсинів [9].



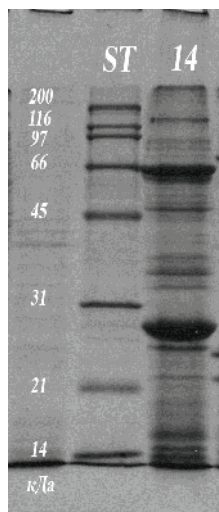
**Рис. 1.** Бактерії, ендоспори (С), кристали (К) штаму *Bacillus sp.* ONU14 фазово-контрастна мікроскопія (1а), електронна мікроскопія (1б)

**Fig. 1.** Bacteria cells, spores (C), crystals (K) *Bacillus sp.* ONU14 strain phase-contrast microscopy (1a), electron microscopy (1b)

Методом ультрацентрифугування були отримані очищені кристалічні включення досліджуваного штаму. З використанням SDS-PAGE показано, що після розчинення кристалів утворюються протоксини з молекулярною масою близько 65 кДа (рис. 2). Відомо, що *B. thuringiensis* можуть формувати два типи протоксинів з молекулярною масою 125–135 кДа та 72 кДа, які процесуються в активні токсини з молекулярною масою близько 65 кДа та 68 кДа, відповідно [8]. Також була виявлена інтенсивна білкова полоса з молекулярною масою близько 30 кДа, яка очевидно відповідає Сут токсину (рис. 2).

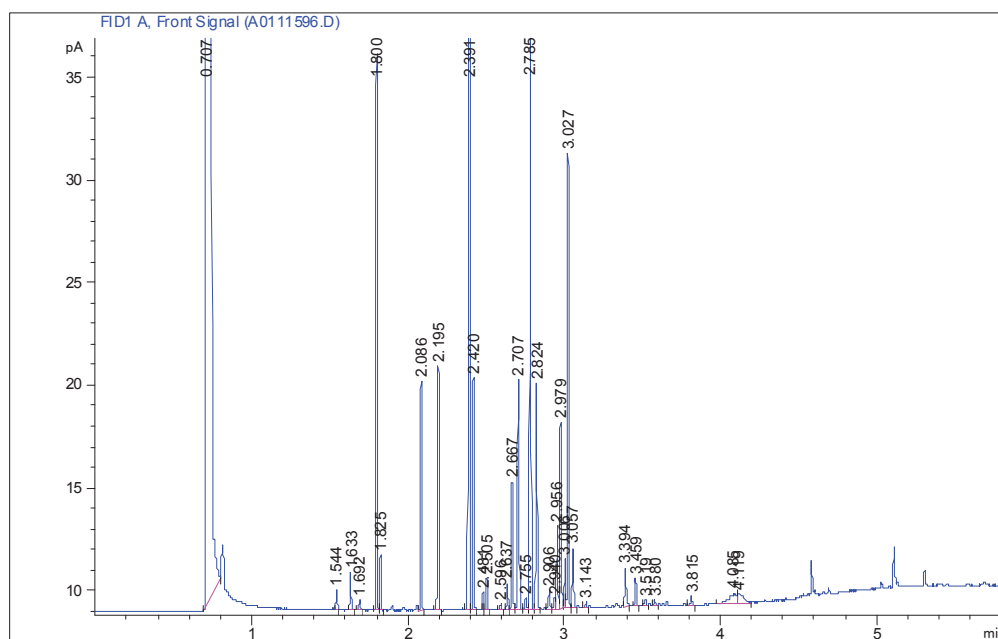
Для ідентифікації досліджуваного штаму ми використали метод хемотаксономії, що базується на порівнянні профілю загально клітинних жирних кислот.

Для жирно-кислотного складу (рис. 3.) досліджуваного штаму були характерні розгалужені жирні кислоти. Показано, що переважальними в жирно-кислотному профілі були C15:0 iso (32,11%) ізомери C16:1 (11,74%), C13:0 iso (10,76%) в менших кількостях виявлені C14:0 iso (4,10%), C14:0 (4,59%), C15:0 anteiso (4,16%), C16:0 iso (4,68%), C16:0 (4,16%), ізомери C17:1 iso (6,2%), C17:0 iso (5,27%), жирні кислоти C12:0 iso, C12:0, C13:0 anteiso, C17:0 anteiso,



**Рис. 2. SDS-PAGE очищених кристалів штаму *Bacillus sp.* ONU14**  
**Fig. 2. Purified crystals SDS-PAGE of *Bacillus sp.* ONU14 strain**

C17:1 anteiso – до 2% від загальної суми площ піків. Автоматичною системою ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA) за спектром жирних кислот досліджуваний штам ідентифіковано як *Bacillus thuringiensis*.

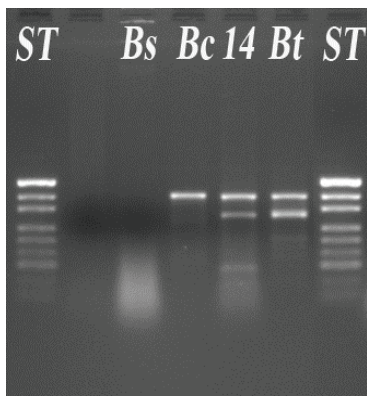


**Рис. 3. Спектр жирних кислот штаму *Bacillus thuringiensis* ONU14**  
**Fig. 3. FAMES spectra of *Bacillus thuringiensis* ONU14 strain**

Як уже зазначалось, представники групи *B. cereus* є близькими за фенотиповими та генотиповими характеристиками. Методом мультиплексної ПЛР показана здатність до утворення досліджуваним штамом продуктів двох типів – амплікону в 400 п.н. до гену *groEL*, який характерний для всіх представників



групи *B. cereus* та амплікону в 209 п.н. до гену *gurB* діагностичного маркера для виду *B. thuringiensis* (рис. 4).



**Рис. 4. Мультиплексна ПЛР з групо- та видоспецифічними праймерами**

14 – *Bacillus sp.* ONU14, Bs – *B. subtilis* ATCC 7001, Bc – *B. cereus* ATCC 10702, Bt – *B. thuringiensis* IMV 7173, ST – стандарт

**Fig. 4. Multiplex PCR with group- and strainspecific primers**

14 – *Bacillus sp.* ONU14, Bs – *B. subtilis* ATCC 7001, Bc – *B. cereus* ATCC 10702, Bt – *B. thuringiensis* IMV 7173, ST – MW marker

Таким чином, з використанням мікробіологічних та молекулярно-біологічних методів охарактеризовано ендоспоро-утворювальний штам *Bacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю. Для досліджуваного штаму характерні кристали неправильної та овальної форми, до складу яких входять протоксини з молекулярною масою близько 65 та 25 кДа. За жирно-кислотним складом та продуктами реакції ПЛР досліджуваний штам віднесено до виду *Bacillus thuringiensis*.

Автор висловлює щирю вдячність завідувачу кафедрою мікробіології, вірусології і біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, д.б.н. В.О. Іваниці за надання штамів та проведення критичного рецензування роботи та аспіранту кафедри мікробіології, вірусології і біотехнології Н.В. Коротасвій за допомогу в організації та проведенні експериментів.

**А.Н. Остапчук**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина, тел.: +38 (044) 220 11 95,  
e-mail: chromas@ukr.net

## МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММА *BACILLUS SP.* ONU14 С ЭНТОМОПАТОГОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

### Реферат

**Цель.** Изучить молекулярно-биологические характеристики и провести идентификацию штамма *Bacillus sp.* ONU14 с энтомопатогенной активностью против вредителя грибов грибного комарика *Bradisia pilistriata* Frey. **Методы.** Идентификацию проводили по жирно-кислотному составу методом газожидкостной хроматографии с использованием автоматизированной системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock и реакции мультиплексной



ПЦР с группоспецифическими праймерами. Для молекулярно-биологической характеристики использовали методы фазово-контрастной и электронной микроскопии, SDS-PAGE, метод градиентного ультрацентрифугирования. **Результаты.** Состав жирных кислот и продукты реакции мультиплексной ПЦР с группоспецифическими праймерами позволяют отнести исследуемый штамм к виду *Bacillus thuringiensis*. Белковые клеточные включения имеют неправильную форму и при растворении образуют протоксины с массой приблизительно 66 и 25 кДа. **Выводы.** С использованием микробиологических и молекулярно-биологических методов охарактеризован эндоспоро-образующий штам *Bacillus sp. ONU14* с энтомопатогенной активностью. По жирно-кислотному составу и продуктам реакции мультиплексной ПЦР штамм идентифицирован как *Bacillus thuringiensis*.

*Ключевые слова:* *Bacillus thuringiensis*, жирно-кислотный состав, протоксин, мультиплексная ПЦР.

**A.M. Ostapchuk**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny St., Kyiv, MSP 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 220 11 95, e-mail:chromas@ukr.net

## MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND IDENTIFICATION OF *BACILLUS SP. ONU14* STRAIN WITH ENTOMOPATHOGENIC ACTIVITY

### Summary

**Aim.** To study molecular-biological characteristics and *Bacillus sp. ONU14* strain with entomopathogenic activity against mushrooms pest *Bradisia pilistriata* Frey. **Methods.** The identification methods were FAMES analysis by GC with MIDI Sherlock identification system and multiplex PCR with group-specific primers. The molecular-biological characteristics were studied with phase-contrast microscopy, electron microscopy, SDS-PAGE and gradient ultracentrifugation. **Results.** Fatty acids composition and multiplex reaction products identify the strain as *Bacillus thuringiensis*. Intracellular crystals have irregular shape and form protoxins with 65 and 25 kDa. **Conclusions.** Endospore-forming *Bacillus sp. ONU14* strain with entomopathogenic activity was characterized by the microbiological and molecular-biological methods. Fatty acids composition and multiplex PCR reaction identified it as *Bacillus thuringiensis*.

*Key words:* *Bacillus thuringiensis*, fatty acids composition, protoxin, multiplex PCR.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sanahuja G., Banakar R., Twyman M., Capel T., Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications // Plant Biotechnol J. – 2011. – 9. – P. 283–300.
2. Ibrahim M.A., Griko N, Junker M, Bulla L.A. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective // Bioeng Bugs. – 2010. – 1(1). – P. 31–50.



3. Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis* // *Anticancer Res.* – 2009. – 29(1). – P. 283–300.
4. Кривицька Т.М., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непомща Н.М., Іваниця В.О. Характеристика штамів бактерій роду *Bacillus* з ларвіцидною активністю до грибних комариків *Bradysia pilistriata* Frey // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2010. – № 3. – С. 86–94.
5. Sharpe, E.S., Nickerson K.W., Bull L.A., Aronson. J.N. 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain X-ray contrasting agents // *Appl. Microbiol.* – 1975. – 30. – P. 1052–1053.
6. Park S.H., Kim H.J., Kim J.H., Kim T.W., Kim H.Y. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR // *J Microbiol Biotechnol.* – 2007. – 17(7). – P. 1177–1182.
7. Ed. Lawrence I. Gilbert and Sarjeet S. Gill *Insect Control: Biological and Synthetic Agents.* – Elsevier: London, 2010. – 451 p.
8. Melo A.L., Socol V.T., Socol C.R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review // *Crit Rev Biotechnol.* – 2014. – 29. – P. 1–10.
9. Soberón M.1., López-Díaz J.A., Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms // *Peptides.* – 2013. – 41. – P. 87–93.

Стаття надійшла до редакції 18.03.2015 р.



Д.С. Бережна<sup>1,2</sup>, О.А. Іващенко<sup>1,2</sup>, В.П. Поліщук<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирівська, 64/13, Київ, 01601, Україна,

<sup>2</sup>Науково-дослідне підприємство «Центр ветеринарної діагностики»  
вул. Ушинського, 25, Київ, 03151, Україна,  
тел.: +38 (097) 587 72 34, e-mail: Daria.Berehna@gmail.com

## ОЦІНКА ЕПІЗООТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ ВІРУСУ ХВОРОБИ МАРЕКА НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

**Мета.** Оцінити епізоотичну ситуацію з вірусом хвороби Марека на території України. **Методи.** Птицю з характерними клінічними ознаками для вірусу хвороби Марека досліджували методом патогістологічного аналізу з підтвердженням наявності інфекційного агента методом ПЛР у варіації *nested*. **Результати.** У результаті проведених досліджень встановлено наявність вірусу ХМ в птахогосподарствах Київської, Черкаської, Хмельницької, Полтавської, Дніпропетровської, Кіровоградської, Запорізької, Миколаївської, Донецької, Вінницької, Волинської, Івано-Франківської, Житомирської, Рівненської, Закарпатської областей України та АР Криму. Показано збільшення кількості інфікованої птиці в 2012 і 2013 рр. та зміну ступеню ураженості птиці вірусом хвороби Марека. **Висновки.** У результаті трирічного дослідження було встановлено, що вірус хвороби Марека циркулює в 14 областях України та АР Крим. Враховуючи підвищений рівень поширеності та активні торговельні відносини між птахівничими господарствами України, необхідним є впровадження більш жорсткої системи контролю за ВХМ.

*Ключові слова:* вірус хвороби Марека, епізоотична ситуація, патогістологічний аналіз, високопатогенні штами.

Суттєвою загрозою розвитку галузі промислового вирощування птиці на території України є вірус хвороби Марека (ВХМ). Наслідками захворювання у світі являються щорічні втрати, що становлять 1–2 мільярди доларів [6].

Вірус хвороби Марека належить до роду *Mardivirus*, підродини *Alphaherpesvirinae*, родини *Herpesviridae*. Розрізняють 3 серотипи: перший (ВХМ-1), другий (ВХМ-2) та герпесвірус індиків (ГВІ) [7]. Однак, онкогенними є лише представники першого серотипу.

Хвороба Марека (ХМ) проявляється у вигляді злоякісних лімфом у вісцеральних органах та в периферійних нервах птиці. Розрізняють класичну форму прояву захворювання, при якій середній відсоток смертності складає 10–15% та гостру форму, де смертність становить 10–30%, а в деяких випадках сягає 70% [2]. За класичної форми хвороби фіксують потовщення нервового волокна, натомість гостра форма характеризується наявністю неопластичних поліморфних інфільтрацій в паренхіматозних органах та нервовому волокну [8]. Утворення лімфом та загибель птиці детектують на 3–4 тиждень після інфікування. Проте



F.R. Carvalho та колеги показали, що птиця, уражена патогенними штамми вірусу хвороби Марека, гине на 3–4 день після інфікування [3]. Такий процес розвитку хвороби називають синдромом ранньої смертності (EMS) і саме він є надзвичайно небезпечним у птахогосподарствах.

Проте, не зважаючи на постійне використання вакцин, вірус хвороби Марека продовжує циркулювати та уражувати імунізовану птицю в багатьох країнах світу [5]. Що стосується України, то станом на 1994 рік на її території спостерігалось помітне зменшення інфікування вірусом хвороби Марека. На 2004 рік, за даними МЕБ, Україна була вільною від вищеописаного патогена. Проте, слід додати, що в період з 1994–2004 рр. були зафіксовані поодинокі спалахи захворювання на території Луганської, Одеської, Харківської, Дніпропетровської, Херсонської та АР Крим [1]. На сьогодні, інформація щодо поширення вірусу хвороби Марека в межах України відсутня, таким чином метою роботи було встановити епізоотичну ситуацію вірусу хвороби Марека на території України за останній період (2011–2013 рр).

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були бройлери. Яєчне та батьківське поголів'я птиці відбирали з характерними зовнішніми клінічними проявами хвороби Марека, а саме: параліч кінцівок, викривлення шиї, ускладнене дихання, опускання голови, неконтрольований рух, схуднення, падіння яйценосності і швидка загибель поголів'я.

Для діагностики одного клінічного випадку відбирали органи не менше ніж від двох хворих птахів. Так, протягом трьох років було проаналізовано 400 курей, що становили 160 клінічних випадків із 83 птахогосподарств 24 областей України та АР Крим. Для гістологічного дослідження відбирали секційний матеріал наступних органів: нирок, печінки, селезінки, легень, серця, мозку, трахеї, кишечника, бурси, нерву, підшлункової залози, залозистого шлунку та стравоходу від птиці віком 24–180 днів. Для молекулярної діагностики відбирали легені, печінку, нирки та селезінку.

Аналіз патологічних змін структури органів проводили гістологічним методом діагностики [3]. Для підтвердження наявності вірусу хвороби Марека використовували метод полімеразної ланцюгової реакції у варіації «nested».

Виділення ДНК та постановку зворотної транскрипції виконували з використанням комерційних тест-систем «РИБОСОРБ» та «РЕВЕРТА-L», («АмплиСенс», Росія). Виявлення та ідентифікація вірусу хвороби Марека в патологічних зразках проводили за допомогою пари праймерів M-S і M-AS – для першого сету аплікації та MR-S, MR-AS – для другого [7].

### Результати та їх обговорення

Вірус хвороби Марека являється убіквітарним патогеном і був ідентифікований в усіх країнах світу. Проте, станом на 2014 рік епізоотична ситуація ВХМ значно відрізняється на різних континентах.



Так, з 2011 по 2013 роки, гістологічним методом аналізу, хворобу Марека було діагностовано у 310 курей (77,5%). Крім того, наявність герпесвірусу птиці у кожному окремому випадку було підтверджено методом ПЛР. Таким чином, хвороба Марека та вірус, що її викликає, були детектовані у 41 господарстві (49,3%) із 14 областей України та АР Крим. Нами не виявлена циркуляція вірусу хвороби Марека в 10 областях України, а саме: Чернігівській, Сумській, Полтавській, Харківській, Луганській, Херсонській, Чернівецькій, Закарпатській, Тернопільській та Львівській (рис.1). Варто відмітити, що основними осередками циркуляції вірусу є центральна, північно-західна та південно-східна частини України.

Необхідно зазначити, що у 90 хворих курей (22,5%), які мали характерні зовнішні клінічні ознаки хвороби Марека, вірус не детектували. Даний факт можна пояснити тим, що схожу клінічну картину та патологоанатомічні зміни могли бути викликані вірусом хвороби Ньюкасла, ретровірусом птахів, сальмонельозною інфекцією та незбалансованістю кормової бази.



**Рис. 1. Поширення вірусу хвороби Марека на території України**

Примітка: сірим кольором позначено області в яких виявили вірус ХМ

**Fig. 1. The map of Marek's disease virus spreading in Ukraine**

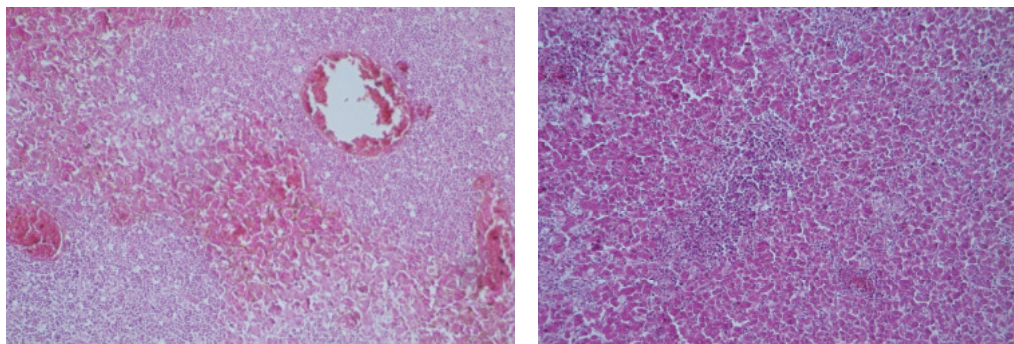
Note: grey marked the regions – the area where MDV was found

Звертає на себе увагу той факт, що в 2011 році вірус хвороби Марека було виявлено у 24 клінічних випадках (58,5%) із 41 діагностованих. Натомість, в 2012 та 2013 рр. позитивними були 100 діагностичних випадків (84%) із 119 досліджуваних. Таке масове інфікування поголів'я в птахогосподарствах могло бути пов'язане з низкою причин. Серед них такі, як відсутність імунізації, технічні помилки при вакцинації, а також поява високовірулентних штамів вірусу хвороби Марека.

Слід відмітити, що ступень ураження поголів'я птиці у 2011, 2012 та 2013 роках значно різниться. Важливо, що патогістологічні зміни в тканинах органів інфікованих курей в 2011 році мали досить м'який характер. Так, при дослідженні хворого поголів'я ми детектували характерні поліморфні лімфоцитарні інфільтрації в таких органах як печінка (рис. 2 а), легені, нирки, мозок



та нервових волокнах з незначним ураженням (рис. 3, а). Натомість, в 2012 та 2013 рр. спостерігали збільшення вдвічі кількості органів з лімфоцитарними проліфераціями (рис. 2 б; 3б, в).



а

б

**Рис. 2. Лімфоцитарні інфільтрація в печінці, збільшення X100**

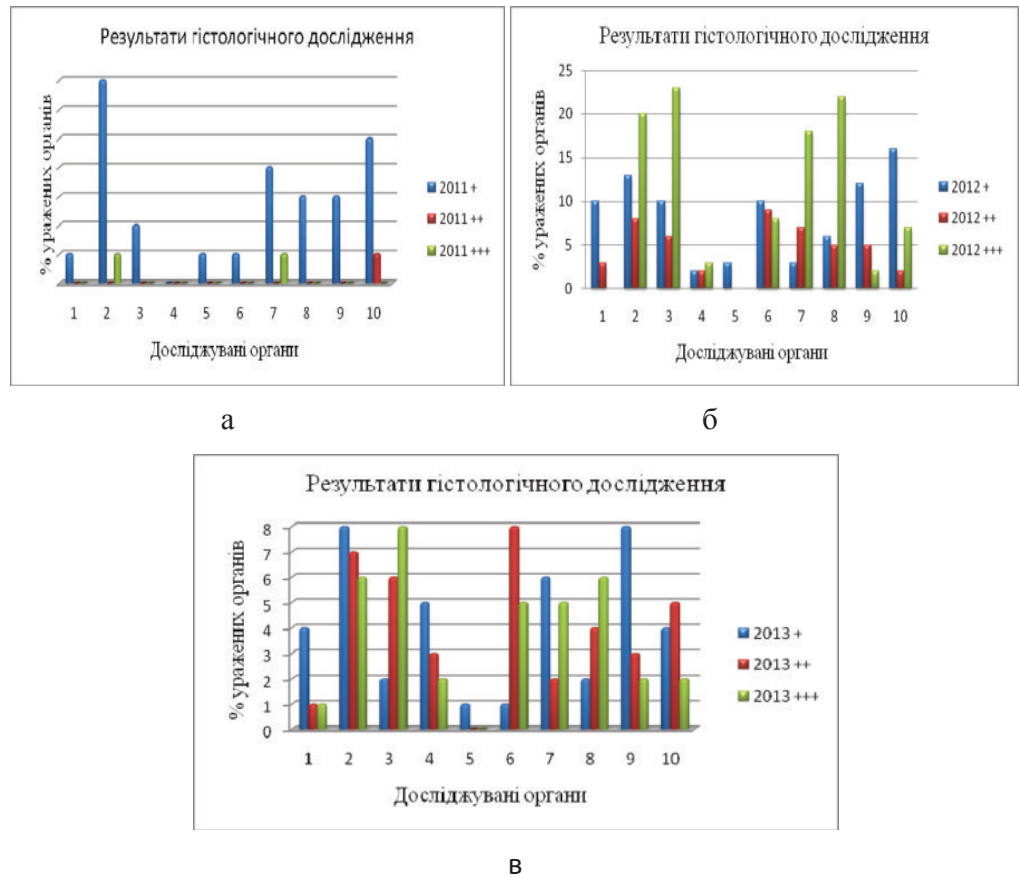
**Fig. 2. Lymphocytic infiltration in liver, increasing X100**

Крім того, змінився ступінь ураження, який визначався за розміром інфільтратів, кількості тканин органів, в яких детектували характерні поліморфні лімфоцитарні інфільтрати неправильної форми. В значній кількості органів відмічали патогістологічні зміни середньої та глибокої тяжкості, що вказують на дисфункцію органів.

Нами було встановлено, що гостра форма захворювання з ураженням паренхіматозних органів і нервових волокон є переважаючою в птахогосподарствах України і була відмічена у 279 курей (90%). Натомість, потовщення нервового волокна детектували лише у 43 хворих курей (13,8%) із 310 птахів інфікованих ВХМ.

В цілому встановлення епізоотичної ситуації з вірусом хвороби Марека в усіх країнах світу є досить проблематичним. Morgow та Fehler пояснюють таку проблематику у відсутності обов'язкової реєстрації усіх випадків ХМ в господарствах [6]. Так, в список захворювань, які контролюються Міжнародним Епізоотичним Бюро хворобу Марека було включено лише у 2011 році [9]. Проте Gimeno та співавтори в роботах 2003 та 2014 років відмітили значне збільшення інфікування ВХМ на території франкомовної Африки, південної Америки, східної Європи та Азії. Натомість, країни центральної Європи повідомили про зниження кількості випадків вірусного інфікування в птахогосподарствах в межах їх держав [4,5]. Що стосується України, то з 2004 року інформація про виявлення, циркуляцію, а тим паче, про зниження або підвищення кількості випадків хвороби Марека зовсім відсутня.

Таким чином, у результаті трирічного дослідження нами було встановлено, що вірус хвороби Марека циркулює в 14 областях України та АР Крим. Поширення хвороби вірусної етіології є досить однорідним і охоплює Київську,



**Рис. 3. Ступінь ураження хворої птиці ВХМ в 2011(а), 2012 (б) та 2013 (в)рр.**

Примітка: + -- незначні зміни, ++ -- середньої тяжкості зміни, +++ -- глибокі патогістологічні зміни, що вказують на дисфункцію. 1 – селезінка, 2 – печінка, 3 – шлунок, 4 – власна пластинка кишечника, 5 -- бурса, 6 – серце, 7 – легені, 8 – нирки, 9 – мозок, 10 – нерв.

**Fig. 3. Degree of lesions in sick birds in 2011 (a), 2012 (б), 2013 (в)**

Note: + -- minor changes, ++ -- middle severe changes, +++ -- deep histopathology changes that point on dysfunction. 1 – spleen, 2 – liver, 3 – stomach, 4 – lamina propria of the intestine, 5 – bursa, 6 – heart, 7—lungs, 8 – kidney, 9 – brain, 10 – nerve.

Черкаську, Хмельницьку, Полтавську, Дніпропетровську, Кіровоградську, Запоріжську, Миколаївську, Донецьку, Вінницьку, Волинську, Івано-Франківську, Житомирську, Рівненську, Закарпатську області та АР Крим. З'ясовано, що основною формою прояву захворювання є гостра форма з середнім та глибокими патоморфологічними змінами. Враховуючи підвищений рівень поширеності та активні торгівельні відносини між птахівничими господарствами України необхідним є впровадження більш жорсткої системи контролю за ВХМ. З огляду на вищевказане, наступним етапом нашого дослідження буде з'ясування штамового різноманіття ВХМ, що циркулює на території України.



**Д.С. Бережная<sup>1,2</sup>, О.А Иващенко<sup>1,2</sup>, В.П. Полищук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка,  
ул. Владимирская, 64/13, Киев, 01601, Украина,

<sup>2</sup>Научно-исследовательское предприятие «Центр ветеринарной диагностики»  
ул. Ушинского, 25, Киев, 03151, Украина,  
тел.: +38 (097) 587 72 34, e-mail: Daria.Berehna@gmail.com

## ОЦЕНКА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ

### Реферат

**Цель.** Оценить эпизоотическую ситуацию с вирусом болезни Марека на территории Украины. **Методы.** Птицу с характерными клиническими признаками для вируса болезни Марека исследовали методом патогистологического анализа с подтверждением наличия инфекционного агента методом ПЦР в вариации nested. **Результаты.** В результате исследований установлено наличие вируса БМ в птицефабриках Киевской, Черкасской, Хмельницкой, Полтавской, Днепропетровской, Кировоградской, Запорожской, Николаевской, Донецкой, Винницкой, Волынской, Ивано-Франковской, Житомирской, Ровенской, Закарпатской областей Украины и АР Крым. Показано увеличение количества инфицированной птицы в 2012 и 2013 гг., а также изменение степени пораженности птицы вирусом болезни Марека. **Выводы.** В результате трехлетнего исследования было установлено, что вирус болезни Марека циркулирует в 14 областях Украины и АР Крым. Учитывая повышенный уровень распространенности и активные торговые отношения между птицеводческими хозяйствами Украины, необходимо внедрение более жесткой системы контроля за ВБМ.

*Ключевые слова:* вирус болезни Марека, эпизоотическая ситуация, патогистологический анализ, высокопатогенные штаммы.

**D.S. Berezhna<sup>1,2</sup>, O.A. Ivashchenko<sup>1,2</sup>, V.P. Polishchuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64 /13, Volodumirivska st., Kyiv, 01601

<sup>2</sup>LTD «Center of veterinary diagnostic», 25, Ushinsky st., Kyiv, 03151,  
tel.: +38 (097) 587 72 34, e-mail: Daria.Berehna@gmail.com

## EVALUATION OF EPIZOOTIC SITUATION WITH MAREK'S DISEASE VIRUS IN UKRAINE

### Summary

**Aim.** To evaluate epizootic situation of Marek's disease virus in Ukraine. **Methods.** Poultry with characteristic clinical features to Marek's disease virus were investigated by histopathological analysis to prove the research we have used nested-PCR. **Results.** As a result of studies it was found a virus in poultry farms of Kyiv, Cherkasy, Khmelnytsky, Poltava, Dnipropetrovsk, Kirovograd, Zaporizhye, Mykolaiv, Donetsk, Vinnytsia, Volyn, Ivano-Frankivsk, Zhytomyr, Rivne, Transcarpathian regions of



*Ukraine and Crimea. There were shown increasing the number of infected poultry in 2012 and 2013 and changes in the degree of infestation of poultry by Marek's disease virus. **Conclusions.** As a result of three years of study we have found that Marek's disease virus has been circulating in 14 regions of Ukraine and Crimea. Taking into consideration the increasing prevalence and active trade relations between Ukraine poultry farms, it is necessary to implement a more rigid system of control over MDV.*

*Key words: Marek's disease virus, epizootic situation, histopathological analysis, highly pathogenic strains.*

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Герілович А.П. Вивчення епізоотичного стану з хвороби Марека та її профілактики в Україні // Ветеринарна медицина. – 2004. – № 83. – С. 28–31.
2. Calnek B.W. Marek's disease—a model for herpesvirus oncology. // Crit Rev Microbiol. – 1986. – № 12. – P. 293–320.
3. Carvallo F.R., French R.A., Gilbert-Marcheterre K. Mortality of one-week-old chickens during naturally occurring Marek's disease virus infection. // Veterinary Pathology. – 2011. – V. 48, № 5. – P. 993–998.
4. Davison A.J. Evolution of the herpesviruses. // Veterinary Microbiology. – 2002. – №86. – P. 69–88.
5. John R., Gimeno I.M. Current status of Marek's disease in the United States and worldwide based on a questionnaire survey. // Avian Diseases. – 2013. – № 57 (2s1). – P. 483–490.
6. Morrow C., Fehler F. Marek's disease: a worldwide problem. In: Marek's disease: an evolving problem. T. F. Davison and V. K. Nair, eds. / Elsevier—England: Academic Press, 2004. – 49–61 pp.
7. Murata S., Chang K., Lee S., Konnai S. Development of a nested polymerase chain reaction method to detect oncogenic Marek's disease virus from feather tips. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2007. – V. 19, № 5. – P. 471–478.
8. Nair V. Evolution of Marek's disease – A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. // The Veterinary Journal. – 2005. – № 170. – P. 175–183.
9. [O.I.E] World Organisation for Animal Health. Listed diseases 2008 [Internet]. Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2008>.

Стаття надійшла до редакції 30.07.2014 р.



**К.В. Авдіюк<sup>1</sup>, Л.Д. Варбанець<sup>1</sup>, В.О. Іваниця<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна, тел.:+38(044) 526 23 39,  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup>Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

## **ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ACHROMOBACTER SP. 7A – ПРОДУЦЕНТА $\alpha$ -АМІЛАЗИ**

**Мета.** Оптимізувати умови культивування продуцента  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a* для підвищення рівня її біосинтезу. **Методи.** При вивченні впливу різних джерел карбону і нітрогену на біосинтез  $\alpha$ -амілази крохмаль і натрій нітрат у базовому поживному середовищі замінювали на різноманітні вуглеводи і джерела нітрогену у кількості, еквівалентній до загального вмісту карбону (44,4%) і нітрогену (16,5%) у базовому середовищі. Активність  $\alpha$ -амілази визначали йодометричним методом, вміст білка – методом Lowry et al. Для виявлення значущих елементів мінерального живлення базового середовища проводили відсіювальний експеримент. Визначення оптимальних концентрацій джерел карбону і нітрогену у поживному середовищі проводили шляхом двофакторного експерименту на чотирьох рівнях. **Результати.** Встановлено, що найвищий рівень синтезу фермента спостерігається на 3 добу глибинного культивування. Показано, що суміш солоду з крохмалем у співвідношенні 1:9 і натрій нітрат є оптимальними джерелами карбону і нітрогену, відповідно, для максимального біосинтезу фермента. Визначено оптимальні параметри біосинтезу  $\alpha$ -амілази: температура 28 °С, вихідне значення рН середовища 6,0, об'єм поживного середовища 100 мл, кількість посівного матеріалу 15% та інтенсивність перемішування 210 об/хв. **Висновки.** За результатами двофакторного експерименту і підбору оптимальних умов культивування продукція  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a* була підвищена у 4 рази.

*Ключові слова:*  $\alpha$ -амілаза, *Achromobacter sp.*, оптимізація, двофакторний експеримент.

$\alpha$ -Амілази – ферменти, що належать до класу гідролаз, підкласу глікозидаз, які каталізують гідроліз внутрішніх  $\alpha$ -D-1,4-глікозидних зв'язків у крохмалі і споріднених йому сполуках [9]. Вони складають одну з найважливіших груп промислових ферментів, які широко застосовуються у харчовій, пивовареній, спиртовій, паперовій і текстильній промисловостях, а також на одній із стадій виготовлення біопалива [11]. Останніми роками межі використання  $\alpha$ -амілаз поширилися в клінічну, медичну і аналітичну хімію [9].

Джерелами більшості  $\alpha$ -амілаз, які випускають у промислових масштабах, є мікроорганізми, що зумовлено низкою переваг, якими володіють мікробні ферменти порівняно з ензимами рослинного чи тваринного походження, а



сама висока активність та стабільність, здатність до позаклітинного синтезу, широка субстратна специфічність, а також наявність унікальних властивостей (кислото-, алкало-, термостійкість) [2]. Однак для отримання високого виходу ферменту важливе значення має не лише вибір продуценту, а і підбір оптимальних умов культивування. Тому метою роботи була оптимізація умов культивування *Achromobacter* sp. 7a для інтенсифікації синтезу  $\alpha$ -амілази.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була культура *Achromobacter* sp. 7a з колекції морських культур Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова, яка виділена з Чорного моря поблизу острова Зміїний та ідентифікована у Київському національному університеті імені Тараса Шевченка на кафедрі мікробіології та загальної імунології Зеленою П.П. і Шепелевич В.В.

Культивування *Achromobacter* sp. 7a в глибинних умовах на базовому середовищі Чапека (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 2,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{KCl}$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,015; нерозчинний картопляний крохмаль – 20,0;  $\text{H}_2\text{O}$  – до 1,0 л; рН 6,0, в 0,75 л колбах Ерленмейера зі 100 мл поживного середовища при інтенсивності перемішування 220 об/хв та за температури 28 °С протягом 3 діб. У колби вносили 10%-ий інокулюм (об'єм/об'єм), отриманий шляхом вирощування продуценту на вищевказаному середовищі протягом однієї доби.

Біомасу відділяли центрифугуванням при 5000 g, 30 хв. У супернатанті культуральної рідини (СКР) визначали вміст білка і  $\alpha$ -амілазну активність.

Активність  $\alpha$ -амілази визначали йодометричним методом відповідно ГОСТу 20264.4-89 [3], вміст білка – методом Lowry et al [3]. Питому активність виражали в перерахунку на 1 мг білка (од/мг білка).

При вивченні впливу різних джерел карбонового живлення на біосинтез  $\alpha$ -амілази крохмаль у базовому поживному середовищі замінювали на різноманітні моноцукриди – пентози: ксилозу, арабінозу; гексози – глюкозу, галактозу, манозу, рамнозу; дицукриди: лактозу, мальтозу, цукрозу; трицукрид: рафінозу; цукроспирти: маніт та інозит; поліцукриди: кукурудзяний, пшеничний і рисовий крохмаль, а також соєве борошно у кількості, еквівалентній до загального вмісту карбону у базовому середовищі (44,4%).

Для визначення оптимального джерела нітрогену натрій нітрат вилучали з базового середовища, замінюючи його на амоній хлорид, амоній сульфат, амоній нітрат, дріжджовий автолізат, пептон, сечовину і соєве борошно у кількості, еквівалентній вмісту нітрогену у базовому середовищі (16,5%).

Кількість клітин *Achromobacter* sp. 7a визначали, висіваючи 0,1 мл культуральної рідини (КР) у розведеннях ( $10^{10}$ – $10^5$ ) на чашки Петрі з МПА. Посіви інкубували за температури 28 °С протягом 1–2 діб.

При визначенні значущих факторів базового середовища для біосинтезу  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a дослідження проводили у пробірках об'ємом 50 мл, які містили 10 мл середовища Чапека при інтенсивності перемішування 220 об/хв та за температури 28 °С протягом 3 діб. У пробірки вносили 1%-ий інокулюм (об'єм/об'єм).



Для виявлення значущих елементів мінерального живлення базового середовища проводили відсіновальний експеримент, в якому нижній рівень концентрацій усіх компонентів приймали за нуль (дослідження проводили у великих пробірках об'ємом 50 мл). Значення верхнього рівня дорівнювали концентрації кожного компонента у базовому поживному середовищі. Визначення оптимальних концентрацій джерел карбону і нітрогену в поживному середовищі проводили шляхом двофакторного експерименту на чотирьох рівнях, при цьому фактори поживного середовища позначали як  $X_n$  [4].

Усі експерименти проводили у 3-5 повторностях. Аналіз одержаних результатів проводили шляхом їх статистичної обробки, вираховуючи середні арифметичні величини, відхилення від середнього значення не перевищувало 5%.

### Результати та їх обговорення

З літературних даних відомо, що максимальний синтез  $\alpha$ -амілаз відбувається наприкінці експоненційної, як у *Geobacillus* sp. ПРТН, *Bacillus cohnii* US147 [2], або під час стаціонарної фази росту, як у *Bacillus* sp. YX-1 [8]. У *Achromobacter* sp. 7a максимальний рівень синтезу ферменту спостерігався на 3 добу культивування (рис. 1).

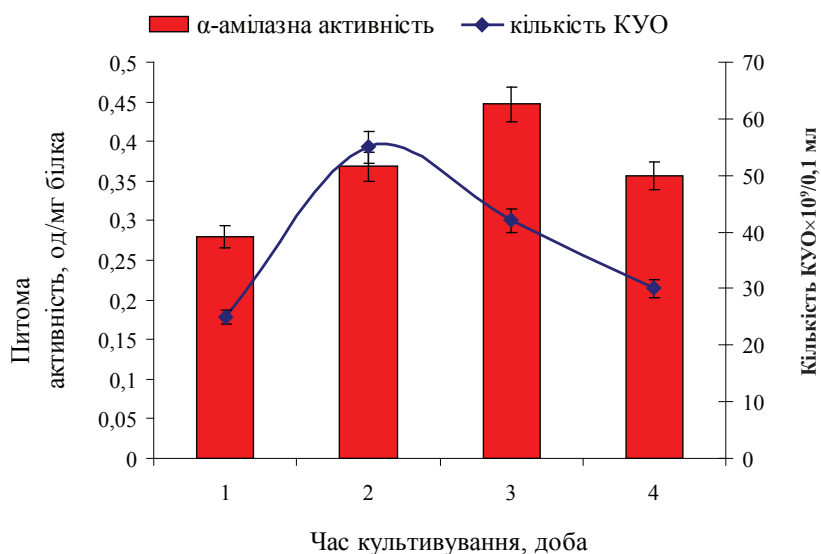


Рис. 1. Динаміка накопичення  $\alpha$ -амілази за культивування *Achromobacter* sp. 7a на базовому поживному середовищі

Fig. 1. Dynamics of  $\alpha$ -amylase accumulation under the cultivation of *Achromobacter* sp. 7a on the base nutrient medium

Для того, щоб визначити, які саме фактори базового середовища є значущими для біосинтезу  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a, проводили відсіновальний експеримент, в якому з середовища Чапека почергово чи попарно вилучали відповідні компоненти (табл. 1).



Таблиця 1

Визначення значущих факторів базового середовища культивування  
для біосинтезу  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Table 1

Determination of significant factors of base culture medium for the biosynthesis  
of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter* sp. 7a

Варіант середовища	NaNO <sub>3</sub>	Крохмаль	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KCl	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	АА, од/мл	Білок, мг/мл	Питома акт-ть, од/мг білка
1	+	+	–	+	+	+	0,450 ± 0,020	0,410 ± 0,020	1,10 ± 0,050
2	+	+	+	–	+	+	0,490 ± 0,021	0,560 ± 0,022	0,875 ± 0,040
3	+	+	+	+	–	+	0,50 ± 0,025	0,560 ± 0,023	0,890 ± 0,043
4	+	+	+	+	+	–	0	0,60 ± 0,025	0
5	–	+	+	+	+	+	0	0,160 ± 0,007	0
6	+	–	+	+	+	+	0	0,070 ± 0,003	0
7	+	+	–	–	+	+	0	0,40 ± 0,020	0
8	+	+	+	–	–	+	0,50 ± 0,026	0,570 ± 0,024	0,880 ± 0,042
9	+	+	+	+	–	–	0,507 ± 0,025	0,660 ± 0,031	0,770 ± 0,035
10	+	+	–	–	–	+	0,124 ± 0,005	0,420 ± 0,021	0,295 ± 0,014
11	+	+	+	–	–	–	0,447 ± 0,022	0,685 ± -0,031	0,652 ± 0,032
12	+	+	–	–	–	–	0,470 ± 0,023	0,520 ± 0,022	0,90 ± 0,045
13	+	+	–	+	–	+	0,072 ± 0,003	0,490 ± 0,024	0,147 ± 0,007
14	+	+	–	+	+	–	0,422 ± 0,021	0,545 ± 0,026	0,774 ± 0,036
15	+	+	+	–	+	–	0	1,20 ± 0,055	0
16	–	–	+	+	+	+	0	0	0
17	+	+	+	+	+	+	0,550 ± 0,022	0,590 ± 0,028	0,930 ± 0,040

Примітка: «+» – наявність відповідного компонента, «-» – відсутність відповідного компонента. Контроль – варіант середовища № 17, яке містить NaNO<sub>3</sub>, нерозчинний картопляний крохмаль, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O. АА – активність  $\alpha$ -амілази

Note: «+» – presence of the appropriate component, «-» – absence of the appropriate component; data of research was conducted in large test tubes, volume 50 ml. Control – variant of culture medium № 17, containing NaNO<sub>3</sub>, insoluble potato starch, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O. AA – activity of  $\alpha$ -amylase





За результатами даного експерименту показано, що при вилученні джерел карбону, нітрогену, ферум сульфату, суміші солей калію, суміші солей калій хлориду і ферум сульфату синтез  $\alpha$ -амілази (варіанти середовища 4, 5, 6, 7, 15 і 16) був відсутній взагалі. Однак при видаленні окремо калій хлориду (варіант середовища 2) чи фосфату (варіант середовища 1) та магній сульфату варіант середовища (варіант середовища 3) значення питомої  $\alpha$ -амілазної активності було майже на рівні контролю (варіант середовища 17), тому склад поживного середовища залишили без змін.

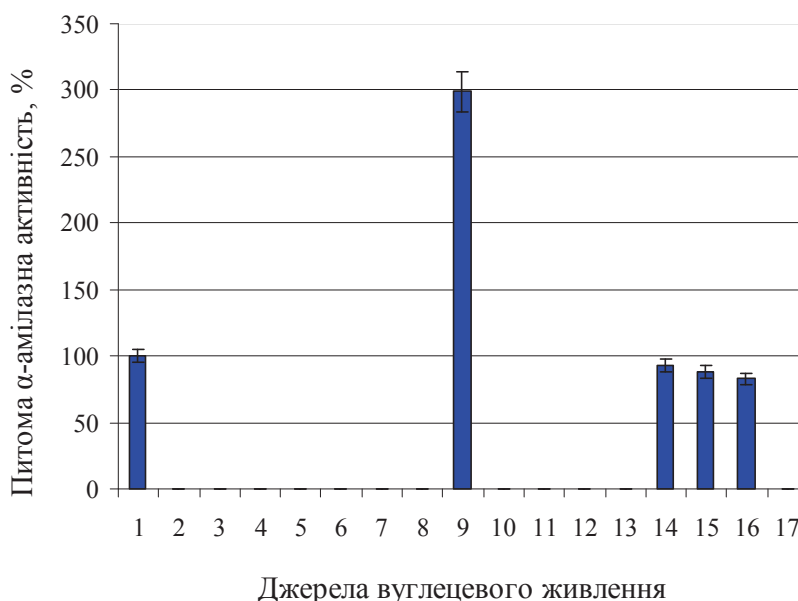
Одним з основних шляхів інтенсифікації біосинтезу ферментів є підбір середовища за джерелами карбону і нітрогену. Джерелом карбону на базовому поживному середовищі виступав крохмаль, який замінювали на різноманітні моноцукриди, дицукриди, трицукрид, цукроспирти, поліцукриди, а також соєве борошно у кількості, еквівалентній до загального вмісту карбону у базовому поживному середовищі (44,4%). За результатами, отриманими різними дослідниками, синтез  $\alpha$ -амілаз зазвичай індукується у присутності крохмалю або продуктів його гідролізу [2]. Однак не завжди синтез цих ферментів пов'язаний з наявністю у середовищі крохмалю. Джерелом карбону можуть виступати також інші вуглеводи, наприклад, лактоза [10], мальтоза [2], галактоза [7], трегалоза [2].

При вивченні впливу вуглеводів на синтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a* (рис. 2) показано, що  $\alpha$ -амілазна активність виявляється лише на середовищі з мальтозою і різними видами крохмалю, використання ж інших джерел карбонового живлення призводить до повного інгібування синтезу ферменту. З даних літератури відомо, що при використанні глюкози, як джерела карбону, синтез більшості  $\alpha$ -амілаз, як і у нашому випадку, пригнічується, що пов'язано з явищем катаболітної репресії [2].

Найкраще  $\alpha$ -амілазу *Achromobacter sp. 7a* синтезував на середовищі з мальтозою, однак оскільки її собівартість є дуже високою, доцільним було перевірити вплив суміші мальтози і крохмалю на біосинтез  $\alpha$ -амілази. Для цього використовували кристалічну мальтозу («Merck», Germany) та солод (суміш ячмінного та рисового), який містить мальтозу («Ning Pagoda Trade Mark», China), що широко застосовується у промисловості Китаю, оскільки є дуже дешевою сировиною, тому її застосування є вигідним з економічної точки зору. Вищезазначені форми мальтози змішували з нерозчинним картопляним крохмалем у співвідношеннях: 1:1, 1:9, 4:6 (рис. 3).

Вивчаючи вплив різних співвідношень мальтози, солоду і нерозчинного картопляного крохмалю на біосинтез  $\alpha$ -амілази, було показано, що найбільш ефективним виявилось використання суміші солоду з нерозчинним крохмалем у співвідношенні 1:9, оскільки при цьому значення питомої  $\alpha$ -амілазної активності було підвищено на 15% порівняно з контролем.  $\alpha$ -Амілаза, виділена з *Bacillus amyloliquefaciens*, також синтезувалася на середовищі, яке містило нерозчинний крохмаль і мальтозу, як джерело карбону [6].





**Рис. 2.** Вплив різних джерел карбонового живлення на синтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a*

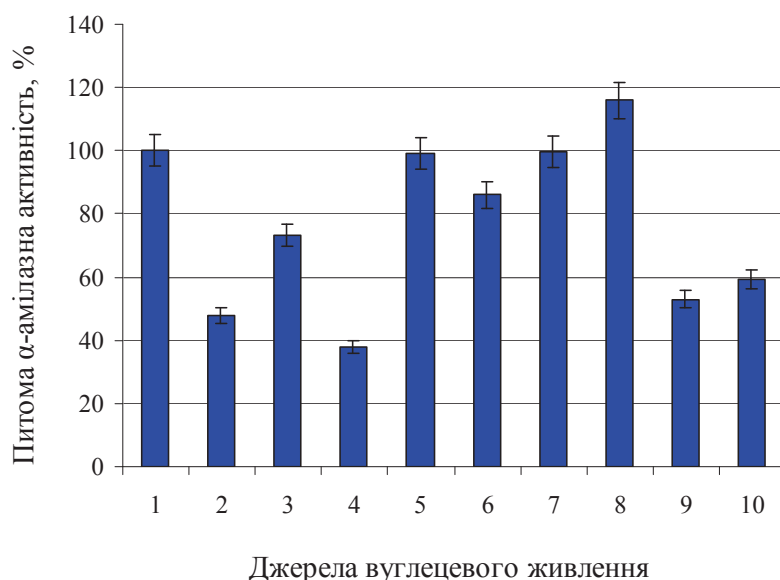
Примітка: 1 – контроль, 2 – ксилоза, 3 – арабіноза, 4 – глюкоза, 5 – галактоза, 6 – маноза, 7 – рамноза, 8 – лактоза, 9 – мальтоза, 10 – сахароза, 11 – рафіноза, 12 – маніт, 13 – інозит, 14 – кукурудзяний крохмаль, 15 – пшеничний крохмаль, 16 – рисовий крохмаль, 17 – соєве борошно. Контроль – середовище, яке містить 2% нерозчинний картопляний крохмаль.

**Fig. 2.** Effect of different sources of carbon on the synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Note: 1 – control, 2 – xylose, 3 – arabinose, 4 – glucose, 5 – galactose, 6 – mannose, 7 – rhamnose, 8 – lactose, 9 – maltose, 10 – sucrose, 11 – raffinose, 12 – mannitol, 13 – inositol, 14 – corn starch, 15 – wheat starch, 16 – rice starch, 17 – soy flour. Control – the culture medium, containing the 2% insoluble potato starch.

Синтез  $\alpha$ -амілаз залежить також від наявності у поживному середовищі органічних чи неорганічних джерел нітрогену. Зазвичай, як джерело нітрогену, більшість дослідників використовують дріжджовий екстракт, пептон [2] чи їх комбінації [8]. Значно рідше застосовують неорганічні джерела нітрогену: натрій нітрат [1] чи амоній нітрат [6]. При вивченні впливу різних джерел нітрогену на біосинтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a* показано (рис. 4), що найкраще фермент синтезувався на середовищі з натрій нітратом, як єдиним джерелом нітрогену.

При використанні дріжджового автолізу, пептону і соєвого борошна значення питомої  $\alpha$ -амілазної активності було нижчим, порівняно з контролем (натрій нітратом), а при застосуванні амоній хлориду, амоній сульфату, амоній нітрату і сечовини синтез  $\alpha$ -амілази був відсутній взагалі. *Acetomonium sporosulcatum* [12] і *B. subtilis* 147 [1] також найкраще синтезували  $\alpha$ -амілази на середовищі з натрій нітратом, як єдиним джерелом нітрогену.



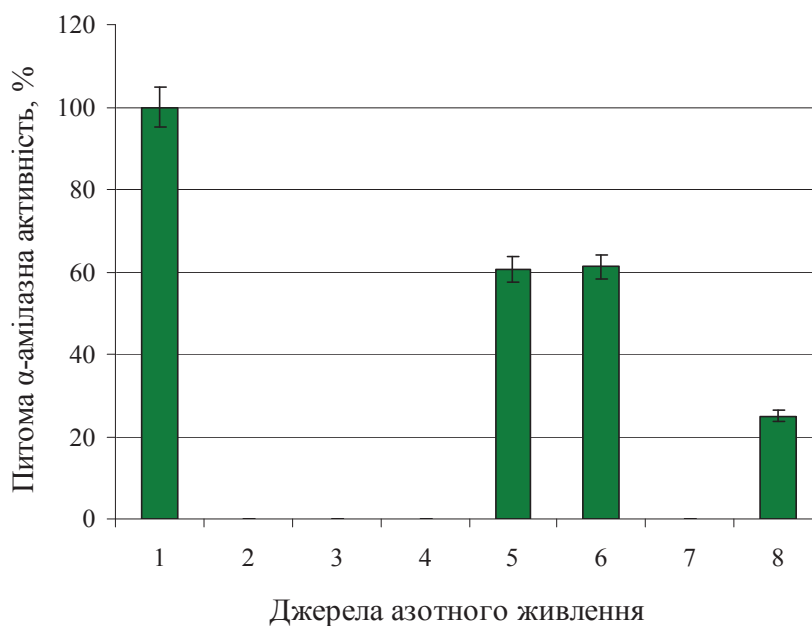
**Рис. 3.** Вплив різних концентрацій мальтози, солоду і нерозчинного картопляного крохмалю на синтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a*

Примітка: 1 – контроль (базове середовище); 2 – розчин мальтози, 2%; 3 – розчин мальтози, 1%; 4 – розчин солоду, 1%; 5, 6, 7 – співвідношення мальтози і нерозчинного картопляного крохмалю: 1:9, 4:6, 1:1; 8, 9, 10 – співвідношення солоду і нерозчинного картопляного крохмалю: 1:9, 4:6, 1:1.

**Fig. 3.** Effect of different concentrations of maltose, malt and insoluble potato starch on the synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Note: 1 – control (base medium); 2 – maltose solution, 2%; 3 – maltose solution, 1%; 4 – solution malt, 1%; 5, 6, 7 – the ratio of maltose and insoluble potato starch: 1:9, 4:6, 1:1; 8, 9, 10 – the ratio of malt and insoluble potato starch: 1:9, 4:6, 1:1.

Відомо, що окрім джерел карбону і нітрогену важливими факторами є і мінеральні компоненти поживного середовища. Для того, щоб визначити, що саме є значущим у складі солі – аніон чи катіон, було проведено серію однофакторних експериментів. При цьому продуцент вирощували на поживному середовищі з вищепідібраними джерелами карбону і нітрогену, змінюючи лише солі. Так, калій фосфат заміняли на натрій фосфат чи кальцій фосфат, магній сульфат – на магній ацетат чи карбонат, калій хлорид – на калій сульфат чи карбонат, ферум сульфат – на ферум хлорид (табл. 2). Було встановлено, що при заміні калій фосфату на кальцій фосфат, питома  $\alpha$ -амілазна активність зростає на 86% (варіант середовища 3), заміщення ж інших солей базового середовища не призводило до інтенсифікації біосинтезу  $\alpha$ -амілази (варіанти середовища 1, 2, 4–8).



**Рис. 4.** Вплив різних джерел нітрогену на синтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Примітка: 1 – натрій нітрат, 2 – амоній хлорид, 3 – амоній сульфат, 4 – амоній нітрат, 5 – дріжджовий автолізат, 6 – пептон, 7 – сечовина, 8 – соєве борошно. Контроль – середовище, яке містить нітрат натрію.

**Fig. 4.** Effect of different sources of nitrogen on the synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter* sp. 7a

Note: 1 – sodium nitrate, 2 – ammonium chloride, 3 – ammonium sulfate, 4 – ammonium nitrate, 5 – yeast autolysate, 6 – peptone, 7 – urea, 8 – soy flour. Control – culture medium, containing the nitrate of sodium.

Для знаходження оптимального співвідношення відібраних джерел карбону (солід+нерозчинний картопляний крохмаль у співвідношенні 1:9) та нітрогену ( $\text{NaNO}_3$ ) на тлі постійних рівнів інших факторів середовища проводили двофакторний експеримент на чотирьох рівнях [4]. У поживному середовищі лише калій фосфат замінили на кальцій фосфат. Фактори поживного середовища позначали: X1 – солід+нерозчинний картопляний крохмаль (1:9), X2 –  $\text{NaNO}_3$  (табл. 3).

Для кожного фактора визначали межі варіювання. У результаті показано, що підібрані концентрації джерел карбону (18 г крохмалю, 2,2 г солоду на л) і нітрогену (2 г/л) є оптимальними для синтезу  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a (табл. 4).

Також важливе значення для біосинтезу фермента відіграє і підбір умов культивування, таких як вихідне значення рН поживного середовища, кількість посівного матеріалу, температура вирощування, інтенсивність аерації та об'єм поживного середовища.

Таблиця 2  
Підбір компонентів мінерального живлення у середовищі культивування для біосинтезу  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a*

Table 2  
Selection of the components of mineral nutrients in the culture medium for the biosynthesis of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter sp. 7a*

Варіант середовища	Содово-нерозчинний карбонічний крохмаль (1:9)	NaNO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	KCl	FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	NaN <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	MgCO <sub>3</sub>	Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	FeCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O	Питома активність, %
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100,0
2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	88,0 ± 4,0
3	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	186,0 ± 9,0
4	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	62,0 ± 2,5
5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	64,0 ± 3,0
6	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	91,0 ± 4,3
7	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	54,0 ± 2,2
8	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	95,0 ± 4,5

Примітка: контроль – варіант середовища № 1, питому активність на якому приймали за 100%  
Note: control – culture medium 1, specific activity which took like 100%



Таблиця 3

Межі варіювання концентрацій основних компонентів поживного середовища культивування *Achromobacter* sp. 7a

Table 3

Limits of variations of nutrient medium main components of *Achromobacter* sp. 7a

Досліджувані фактори	Рівні досліджуваних факторів			
	1	2	3	4
Солод, нерозчинний картопляний крохмаль (1:9), (г/л), X1	9,0 + 1,1	18,0 + 2,2	27,0 + 3,3	36,0 + 4,4
NaNO <sub>3</sub> , (г/л), X2	1,0	2,0	3,0	4,0

Таблиця 4

Результати повного факторного експерименту для основних компонентів поживного середовища культивування *Achromobacter* sp. 7a

Table 4

Results of full factorial experiment for nutrient medium main components of *Achromobacter* sp. 7a

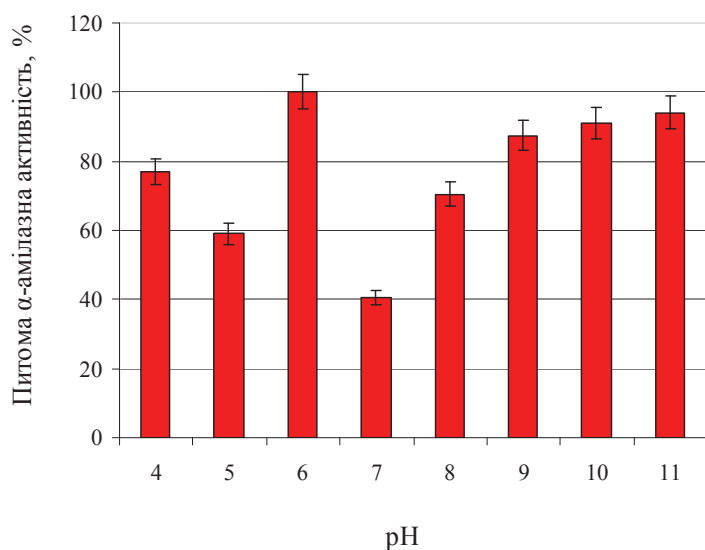
Варіант	X1	X2	Питома $\alpha$ -амілазна активність, од/мг білка
1	1	1	0,230 $\pm$ 0,010
2	1	2	0,450 $\pm$ 0,020
3	1	3	0
4	1	4	0,490 $\pm$ 0,020
5	2	1	0
6	2	2	<b>0,720</b> $\pm$ 0,035
7	2	3	0
8	2	4	0
9	3	1	0
10	3	2	0,350 $\pm$ 0,015
11	3	3	0,110 $\pm$ 0,005
12	3	4	0,160 $\pm$ 0,006
13	4	1	0,417 $\pm$ 0,020
14	4	2	0,216 $\pm$ 0,010
15	4	3	0,30 $\pm$ 0,010
16	4	4	0,15 $\pm$ 0,007

Примітка: X1 – солод+нерозчинний картопляний крохмаль (1:9), X2 – NaNO<sub>3</sub>; 1, 2, 3, 4 – рівні досліджуваних факторів із таблиці 3

Note: X1 – malt+insoluble potato starch (1:9), X2 – NaNO<sub>3</sub>; 1, 2, 3, 4 – the levels of studied factors from Table 3



Відомо, що більшість продуцентів  $\alpha$ -амілаз синтезують дані ферменти у середовище культивування за слабо кислих або нейтральних значень рН [2]. Визначення впливу кислотності середовища на продукування  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a* проводили за вихідних значень рН від 4,0 до 11,0. Показано, що досліджений продуцент росте при всіх вищевказаних значеннях рН поживного середовища, однак найвище значення  $\alpha$ -амілазної активності спостерігається при вихідному значенні рН 6,0, яке ми приймали за 100% (рис. 5).



**Рис. 5. Вплив вихідного значення рН середовища на синтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter sp. 7a***

Примітка: контроль – середовище з вихідним значенням рН 6,0

**Fig. 5. Effect of initial pH value for the synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter sp. 7a***

Note: control – nutrient medium with initial pH 6.0

При кислих і лужних значеннях рН вихідного середовища  $\alpha$ -амілазна активність *Achromobacter sp. 7a* знижувалася. Найбільше інгібування спостерігалось при нейтральному значенні рН вихідного середовища 7,0. Подібні результати були отримані у випадку  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* BS5 [5] та *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 [1], які виявляли найвищий рівень активності при вихідному значенні рН середовища 6,0.

Дослідження впливу інтенсивності аерації та об'єму середовища свідчить, що максимальний рівень питомої  $\alpha$ -амілазної активності у СКР *Achromobacter sp. 7a* спостерігали за швидкості обертання качалки 210 об/хв, за температури 28 °С і оптимального об'єму 100 мл (табл. 5). Подібна кількість поживного середовища сприяла також інтенсивному синтезу  $\alpha$ -амілази *B. subtilis* 147 і *A. flavus* var. *oryzae* 80428 [1].

Вплив кількості посівного матеріалу на біосинтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a відображено на рис. 6. Найвище значення питомої активності ферменту спостерігається при засіві поживного середовища 15% інокулюмом (об'єм/об'єм), хоча зазвичай використовують 2% [2], 5% [8], 8% [2] і 10% [1] інокулюмом.

Таблиця 5

Залежність синтезу  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a від умов глибинного культивування

Table 5

Dependence of  $\alpha$ -amylase synthesis by *Achromobacter* sp. 7a from the submerged cultivation

Об'єм середовища в колбі, мл	Питома активність, од/мг білка					
	24 °С		28 °С		42 °С	
	145 об/хв	250 об/хв	210 об/хв	262 об/хв	168 об/хв	250 об/хв
50	0,960 ± 0,045	0,850 ± 0,040	1,10 ± 0,051	0,870 ± 0,038	1,170 ± 0,055	0,710 ± 0,030
75	1,080 ± 0,050	0,940 ± 0,045	1,060 ± 0,045	1,20 ± 0,055	0,910 ± 0,040	0,650 ± 0,028
100	0,860 ± 0,042	1,110 ± 0,050	<b>1,86 ± 0,088</b>	1,340 ± 0,060	1,290 ± 0,055	1,040 ± 0,048



Рис. 6. Вплив кількості посівного матеріалу на синтез  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a

Fig. 6. Effect of the number of seed grain on the synthesis of  $\alpha$ -amylase by *Achromobacter* sp. 7a

Отже, у результаті проведених досліджень питома активність  $\alpha$ -амілази *Achromobacter* sp. 7a зросла у 4 рази при вирощуванні на поживному сере-





довищі такого складу (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 2,0;  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  – 0,89;  $\text{KCl}$  – 0,05;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,05;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,0015; нерозчинний картопляний крохмаль – 18,0; солод – 2,2 за температури 28 °С, вихідного значення рН середовища 6,0, об'єму поживного середовища 100 мл та інтенсивності перемішування 210 об/хв.

Автори висловлюють щиру подяку к.б.н. Шепелевич В.В. і Зеленій П.П. (Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, Інститут біології, кафедра мікробіології та загальної імунології) за ідентифікацію культури *Achromobacter sp. 7a*.

Е.В. Авдюк<sup>1</sup>, Л.Д. Варбанец<sup>1</sup>, В.А. Іваньця<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна, тел.: +38(044) 526 23 39,  
e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup>Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

## ОПТИМІЗАЦІЯ УСЛОВІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ *ACHROMOBACTER SP. 7A* – ПРОДУЦЕНТА $\alpha$ -АМИЛАЗЫ

### Реферат

**Цель.** Оптимизировать условия культивирования продуцента  $\alpha$ -амилазы *Achromobacter sp. 7a* для повышения уровня её биосинтеза. **Методы.** При изучении влияния разных источников углерода и азота на биосинтез  $\alpha$ -амилазы крахмал и натрий нитрат в базовой питательной среде заменяли на различные углеводы и источники азота в количестве, эквивалентном к общему содержанию углерода (44,4%) и азота (16,5%) в базовой среде. Активность  $\alpha$ -амилазы определяли йодометрическим методом, содержание белка – методом Lowry et al. Для выявления значущих элементов минерального питания базовой среды проводили отсеивающий эксперимент. Определение оптимальных концентраций источников углерода и азота в питательной среде проводили путём двойного эксперимента на четырёх уровнях. **Результаты.** Установлено, что самый высокий уровень синтеза фермента наблюдается на 3 сутки глубинного культивирования. Показано, что смесь солода с крахмалом в соотношении 1:9 и натрий нитрат выступают оптимальными источниками углерода и азота для максимального продуцирования фермента, соответственно. Установлено оптимальные условия биосинтеза  $\alpha$ -амилазы: температура 28 °С, исходное значение рН среды 6,0, объём питательной среды 100 мл, количество посевного материала 15% и интенсивность перемешивания 210 об/мин. **Выводы.** По результатам двойного эксперимента и подбора оптимальных параметров и условий культивирования продукция  $\alpha$ -амилазы *Achromobacter sp. 7a* была повышена в 4 раза.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -амилаза, *Achromobacter sp.*, оптимизация, двойной эксперимент.



К.В. Avdiyuk<sup>1</sup>, L.D. Varbanets<sup>1</sup>, V.O. Ivanytsia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, GSP, D03680, Ukraine, tel.: +38(044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

<sup>2</sup>Odessa I.I.Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str., Odessa, 65082, Ukraine

## OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR $\alpha$ -AMYLASE PRODUCER *ACHROMOBACTER SP. 7A*

### Summary

**Aim.** The investigation of the optimal conditions for  $\alpha$ -amylase production by *Achromobacter sp. 7a*. **Methods.** For studying the effect of different sources of carbon and nitrogen on the  $\alpha$ -amylase biosynthesis the starch and sodium nitrate in a base culture medium were replaced by the various sources of nitrogen and carbohydrates in an amount equivalent to the total carbon content (44.4%) and nitrogen (16.5%) in the basic medium.  $\alpha$ -Amylase activity was determined by iodometric method, protein content – by Lowry et al. The screening experiments were carried out to identify the significant mineral nutrients of base medium. Determination of optimal concentrations of carbon and nitrogen sources in the medium was carried out by bifactorial experiment on four levels. **Results.** It is established that the highest level of enzyme synthesis is observed on the 3 day of deep cultivation. It is shown that mix of malt with starch in the ratio 1:9 and nitrate of sodium are the optimum sources of carbon and nitrogen respectively, for the maximum enzyme producing. The optimum conditions of  $\alpha$ -amylase biosynthesis were established: temperature is 28 °C, initial pH value 6.0, the volume of a nutrient medium is 100 ml, number of seed material 15% and intensity of hashing 210 rpm. **Conclusions.** The  $\alpha$ -amylase production was risen fourfold as a result of bifactorial experiment and selection of optimum conditions of cultivation of *Achromobacter sp. 7a*.

*Key words:*  $\alpha$ -amylase, *Achromobacter sp.*, optimization, bifactorial experiment.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдіюк К.В.  $\alpha$ -Амілази *Aspergillus flavus* var. *oryzae* 80428 і *Bacillus subtilis* 147: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2013. – 24 с.
2. Авдіюк К.В., Варбанець Л.Д. Мікробні  $\alpha$ -амілази: фізико-хімічні властивості, субстратна специфічність та доменна організація // Укр. біохім. журн. – 2013. – 85, № 4. – С. 5–19.
3. Варбанець Л.Д., Борзова Н.В. Глікозидази мікроорганізмів і методи їх дослідження. – Київ: Наук. думка, 2010. – 440 с.
4. Нідялкова Н.А., Мацелюх О.В., Варбанець Л.Д. Оптимізація середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 4. – С. 74–81.
5. Femi-Ola T.O., Olowe B.M. Characterization of alpha amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amitermes evuncifer* Silvestri // Res. J. Microbiol. – 2011. – 6, N 2. – P. 140–146.



6. Gangadharan D., Sivaramakrishnan S., Nampoothiri K.M., Sukumaran R.K., Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* // *Biores. Technol.* – 2008. – 99, N 11. – P. 4597–4602.

7. Goyal N.A., Gupta J.K., Soni S.K. A novel raw starch digesting thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch // *Enzym. Microb. Technol.* – 2005. – 37, N 7. – P. 723–734.

8. Liu X.D., Xu Y. A novel raw starch digesting  $\alpha$ -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. YX-1: purification and characterization // *Biores. Technol.* – 2008. – 99, N 10. – P. 4315–4320.

9. Mobini-Dehkordi M., Javan F.A. Application of alpha-amylase in biotechnology // *J. Biol. Today's World.* – 2012. – 1, N 1. – P. 39–50.

10. Niu D., Zuo Z., Shi G.-Y., Wang Z.-X. High yield recombinant thermostable  $\alpha$ -amylase production using an improved *Bacillus licheniformis* system // *Microb. Cell Fact.* – 2009. – 31, N 8. – P. 58–64.

11. Sundarram A., Murthy T.P.K..  $\alpha$ -Amylase production and applications: a review // *J. Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – 2, N 4. – P. 166–175.

12. Vasant Valaparla K. Purification and properties of a thermostable  $\alpha$ -amylase by *Acremonium sporosulcatum* // *Int. J. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – 6, N 1. – P. 25–34.

Стаття надійшла до редакції 16.01.2015 р.



**Л.О. Білявська**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
тел.: +38(044)526 34 79, e-mail: bilyuvskal@gmail.com

## **БІОСИНТЕЗ АУКСИНІВ ГРУНТОВИМИ СТРЕПТОМІЦЕТАМИ – АНТАГОНІСТАМИ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ І НЕМАТОД**

**Мета.** Дослідити біосинтез ауксинів ґрунтовими стрептоміцетами – антагоністами фітопатогенів та фітонематод. **Методи.** Ауксини в супернатанті культуральної рідини та етанольних екстрактах біомаси продуцентів визначали методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії. **Результати.** В стаціонарну фазу росту в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 накопичується значна кількість речовин ауксинової природи. Окрім основних активних форм ауксинів індол-3-оцтової та індол-3-масляної кислот серед метаболітів виявлені індол-3-оцтової кислоти гідразид, індол-3-карбінол, індол-3-карбоксальдегід і індол-3-карбонова кислота. **Висновок.** Рістстимулювальна активність метаболітних препаратів, розроблених на основі зазначених ґрунтових стрептоміцетів, значною мірою обумовлена їх здатністю до активного синтезу ауксинів, зокрема індол-3-оцтової та індол-3-масляної кислот.

**Ключові слова:** фітогормони ауксинової природи, індол-3-оцтова кислота, індол-3-масляна кислота, ґрунтові стрептоміцети.

Актинобактерії є досить поширеною в природі, а особливо в ґрунті, групою мікроорганізмів. Вони становлять від 20 до 46% усього різноманіття ґрунтової мікробіоти. Понад 10 000 сполук, що становить 45% від загальної кількості метаболітів мікробного походження, синтезовані актинобактеріями. Більшість речовин, що ними продукуються, виявляють антагоністичні властивості до збудників захворювань [14].

Активними продуцентами метаболітів для біоконтролю чисельності фітопатогенів є представники роду *Streptomyces* [9], оскільки синтезують речовини антибактеріальної, антигрибної та антипаразитарної дії. Крім того, вони продукують широкий спектр біологічно активних речовин: амінокислоти, ферменти, вітаміни, фосфоліпіди, стерини, ненасичені жирні кислоти, та інші, більшість з яких характеризується рістрегулюючою дією, а також є індукторами стійкості рослин до фітопатогенів та несприятливих факторів довкілля [4, 7, 10].

Значна роль у регуляції росту і розвитку рослин та встановленні мікробно-рослинних взаємодій належить фітогормонам, продуцентами яких в пере-



важній більшості є ґрунтова мікробіота [6]. До синтезу фітогормонів здатні ґрунтові асоціативні і вільноіснуючі мікроорганізми, що відносяться до родин *Azotobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* та ін. Найменш вивченими в цьому відношенні є представники родини *Actinomycetaceae*, які також є постійним компонентом ґрунтових і ризосферних мікробних угруповань [13].

Серед фітогормональних сполук важлива регуляторна роль в різноманітних ростових процесах як рослин, так і мікроорганізмів належить ауксинам, які за хімічною природою є похідними індолу. Вони впливають на різні системи метаболізму: синтез нуклеїнових кислот, білка, вуглеводний і ліпідний обмін, синтез вторинних метаболітів та ін. Ауксини необхідні ґрунтовим мікроорганізмам для їх росту, розвитку, а також для встановлення зв'язків з рослинами та іншою мікробіотою. [11].

Дослідження синтезу комплексу фітогормонів ауксинової природи ґрунтовими стрептоміцетами, перспективними для створення на їх основі метаболітичних препаратів для агропромисловості, є актуальним. Імовірно, що шляхи і активність біосинтезу ауксинів стрептоміцетами будуть різнитися залежно від умов культивування, зокрема складу поживного середовища.

Метою роботи було дослідити біосинтез ауксинів ґрунтовими стрептоміцетами – антагоністами фітопатогенів і фітонематод за умов культивування на синтетичному та органічному середовищах.

### Матеріали та методи досліджень

Об'єктами досліджень були свіжовиділені співробітниками відділу загальної і ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України (ІМВ НАНУ) з каштанового ґрунту та ідентифіковані штами стрептоміцетів *Streptomyces netropsis* УКМ Ас-2186 та *S. violaceus* УКМ Ас-2191, які виявляють антагонізм до фітопатогенних мікроорганізмів і нематод, а також позитивно впливають на ріст і розвиток рослин [1].

Для вивчення ауксинсинтезувальної здатності досліджувані штами стрептоміцетів вирощували на рідких середовищах: синтетичному – крохмало-аміачному та органічному – соєвому. Культивування проводили впродовж 7-ми діб (стаціонарна фаза росту) на роторних качалках (240 об./хв) у скляних колбах об'ємом 750 мл за температури  $+28 \pm 1$  °C [2]. Етанольні екстракти з біомаси продуцентів отримували за модифікованою методикою [2].

Вміст ауксинів в супернатанті культуральної рідини та етанольних екстрактах біомаси продуцентів визначали методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії з використанням приладу «Camag TLC Scanner» (Швейцарія) [3]. Як стандарти використовували чисті сполуки: індол-3-оцтову кислоту (ІОК), індол-3-масляну кислоту (ІМК), індол-3-оцтової кислоти гідразид, індол-3-карбінол, індол-3-карбоксальдегід та індол-3-карбонову кислоту («Sigma» США).

Біомасу визначали гравіметричним методом і виражали у мг (г) в перерахунку на 1 мл (л) культуральної рідини [2].



Досліди проводили в чотирьох повторностях. Розрахунки і статистичну обробку отриманих даних виконували за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6.0 та Microsoft Excel '00.

### Результати та їх обговорення

Біохімічні дослідження супернатанту культуральної рідини та екстракту біомаси досліджуваних стрептоміцетів *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 показали їх здатність до синтезу ауксинів як на синтетичному, так і на органічному середовищах (таблиця). Аналіз комплексу ауксинів в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191, вирощених в умовах глибинного культивування, показав, що окрім індол-3-оцтової кислоти (ІОК) в них виявлено індол-3-масляну кислоту (ІМК), що утворюється на шляху біосинтезу ІОК, а також індол-3-оцтової кислоти гідразид, індол-3-карбоксальдегід, індол-3-карбінол і індол-3-карбонову кислоту, які є продуктами трансформації ІОК [4].

Рівень синтезу стрептоміцетами ІОК, яка проявляє найбільшу біологічну активність та є основним ауксином, в супернатанті культуральної рідини та біомасі значно різнився. В біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 вирощених як на синтетичному, так і на органічному середовищах накопичення ІОК було більшим ніж в супернатанті культуральної рідини в 61,6–131,4 та 15,2–18,2 разів відповідно. На синтетичному крохмало-аміачному середовищі рівень синтезу ІОК досліджуваними стрептоміцетами був нижчим в середньому в 1,2–4,6 рази порівняно з органічним соєвим середовищем, що пов'язано з наявністю в останньому джерела триптофану. Відомо, що у мікроорганізмів функціонує декілька альтернативних шляхів біосинтезу ІОК [4, 14], але основні пов'язані з використанням як попередника незамінної амінокислоти триптофану, який входить до складу компонентів соєвого середовища. При рості стрептоміцетів на синтетичному крохмало-аміачному середовищі біосинтез похідних попередників ауксинів відбувається *de novo*. З літератури відомо, що для стрептоміцетів характерна значна мінливість у продукуванні ІОК (від 1,04 до 22,56 мкг/мл), а додавання в середовище культивування триптофану (2 мг/мл) сприяє збільшенню рівня накопичення ауксинів від 60,95 до 144 мкг/мл [5, 15]. Це значно вище ніж у рослин, що, імовірно, може сприяти ґрунтовим стрептоміцетам у встановленні відповідних взаємозв'язків з ними та мікроорганізмами. Більш того, відомо, що епіфітні та ризосферні мікроорганізми відіграють першочергову роль у перетворенні триптофану рослинних ексудатів в ІОК [4].

Найбільш інтенсивно *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 продукували індол-3-масляну кислоту (ІМК), рівень накопичення якої в біомасі був відповідно у 2–3 та 2,5–5,5 рази вищим ніж ІОК. ІМК може бути запасною формою ІОК, так і самостійно проявляти значну ауксинову активність [8]. Слід зазначити, що ІМК є більш стабільною сполукою ніж ІОК, а за потреби можливе їх швидке взаємоперетворення [8].



Таблиця  
Table

Біосинтез ауксинів стрептоміцетами на синтетичному та органічному середовищах

Auxins biosynthesis by streptomycetes on the synthetic and organic nutrient mediums

Фітогормони	Вміст фітогормонів, мкг/мл або г АСБ*									
	<i>S. petropsis</i> УКМ Ас-2186					<i>S. violaceus</i> УКМ Ас-2191				
	Крохмало-аміачне середовище		Соеве середовище		Б	Крохмало-аміачне середовище		Соеве середовище		Б
СКР	Б	СКР	Б	СКР		Б	СКР	Б		
Індол-3-оцтова кислота	0,10±0,01	6,04±0,82	0,21±0,09	27,85±1,76	0,55±0,19	9,90±1,05	0,81±0,25	12,22±1,16		
Індол-3-масляна кислота	4,16±0,67	18,82±1,45	4,88±0,74	54,54±2,46	3,24±0,6	24,76±1,66	6,23±0,83	67,22±2,73		
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	0,75±0,29	0,46±0,23	1,22±0,37	14,27±1,26	0,69±0,23	5,00±0,75	0,42±0,18	16,51±1,35		
Індол-3-карбоксальдегід	0,42±0,21	1,47±0,4	0,56±0,25	7,54±0,92	0,26±0,12	4,01±0,67	0,23±0,1	6,71±0,86		
Індол-3-карбінол	0	0,37±0,12	0	0,06±0,03	0	0	0	2,59±0,54		
Індол-3-карбоксилова кислота	0,46±0,22	0,02±0,01	0,33±0,11	2,68±0,55	0,25±0,13	0,01±0,002	0,72±0,28	8,89±0,99		
Всього ауксинів	5,89±0,81	27,18±1,74	7,20±0,89	106,94±3,45	4,99±0,74	43,68±2,20	8,41±0,97	114,14±3,56		
Накопичення біомаси (г/л)	-	5,10±0,75	-	21,10±1,53	-	5,30±0,77	-	17,60±1,29		

Примітка: \* АСБ – абсолютно суха біомаса, СКР – супернатант культуральної рідини, Б – біомаса

Note: \* АСБ – absolutely dry biomass, СКР – supernatant of cultural liquid,

Б – biomass



Рістстимулювальна активність інших виявлених індолних сполук є дещо слабшою, але не менш важливою. Визначені в досліджуваних стрептоміцетах індол-3-карбоксальдегід та індол-3-оцтової кислоти гідразид за літературними даними можуть інгібувати розвиток фітопатогенних мікроорганізмів [12]. Виявлені нами індол-3-карбінол, індол-3-карбоксальдегід та індол-3-карбонова кислота є неактивними формами ауксинів, які утворюються в результаті деградації ІОК. Більшість мікроорганізмів мають активні ферментні системи (пероксидазну та ІОК-оксидазну), здатні за короткий час здійснювати деградацію надлишкових кількостей ІОК [4].

Загальний вміст фітогормонів ауксинової природи при рості на синтетичному середовищі в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 був у 1, 2 і 3,9 та 1,7 і 2,6 рази меншим ніж на органічному середовищі, відповідно. Різниця між двома штамами у рівні накопичення ауксинів в супернатанті культуральної рідини була майже незначною. Тоді як у біомасі *S. violaceus* УКМ Ас-2191 кількість ауксинів була у 1,6 рази вищою порівняно з *S. netropsis* УКМ Ас-2186. Частка ІОК в сумарній фракції ауксинів в супернатанті культуральної рідини і біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 в середньому склала 2,3–24% та 10,3–16,7% відповідно.

Досліджувані стрептоміцети більшість ауксинів накопичували в біомасі, рівень синтезу якої був у 3,3–4,0 рази вищим на органічному середовищі ніж на синтетичному. Це говорить про переваги застосування соєвого середовища перед крохмало-аміачним для максимального використання біотехнологічного потенціалу досліджуваних стрептоміцетів.

З літератури відомо про здатність ауксинів в оптимальних концентраціях сприяти збільшенню накопичення біомаси стрептоміцетів, споруючій та інтенсифікації деяких процесів метаболізму, в тому числі і синтезу антибіотиків [4, 12]. Існують дані, що вони можуть виконувати певні біокаталітичні функції в самій мікробній клітині, регулювати біосинтез інших гормонів та ін. [4], однак це питання потребує подальшого вивчення.

Таким чином, нами показано, що в стаціонарну фазу росту в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 накопичується значна кількість речовин ауксинової природи як при культивуванні на синтетичному, так і органічному середовищах. Окрім основних активних форм ауксинів (індол-3-оцтової та індол-3-масляної кислот) серед метаболітів були виявлені також індол-3-карбінол, індол-3-карбонова кислота, індол-3-карбоксальдегід і індол-3-оцтової кислоти гідразид, що є продуктами деградації ІОК, а останні можуть проявляти антимікробну дію. Важливе значення має той факт, що серед ауксинів, синтезованих досліджуваними стрептоміцетами, в значній кількості накопичується індол-3-масляна кислота, яка поряд з високою фітогормональною активністю є більш стійкою сполукою порівняно з ІОК. Рістстимулювальна активність препаратів, розроблених на основі метаболітів досліджуваних ґрунтових стрептоміцетів, на нашу думку, значною мірою зумовлена їх підвищеною здатністю до синтезу





ауксинів, зокрема індол-3-оцтової (6,04–27,85 мкг/г АСБ) та індол-3-масляної (3,24–67,22 мкг/г АСБ) кислот. Розуміння оптимальних умов біосинтезу останніх, надає нові інструменти для вирішення складних питань взаємозв'язків рослина-мікрорганізм та мікрорганізм-мікрорганізм. Як супернатанти культуральних рідин досліджуваних штамів ґрунтових стрептоміцетів, так і етанольні екстракти їх біомаси є перспективними для створення нових ефективних поліфункціональних біопрепаратів, що поєднують у собі антагоністичну активність до фітопатогенів і фітонематод і одночасно проявляють властивості регуляторів росту рослин та адаптогенів.

**Л.А. Белявская**

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

## **БИОСИНТЕЗ АУКСИНОВ ПОЧВЕННЫМИ СТРЕПТОМИЦЕТАМИ – АНТАГОНИСТАМИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И НЕМАТОД**

### **Реферат**

**Цель.** Исследование биосинтеза ауксинов почвенными стрептомицетами – антагонистами фитопатогенов и фитонематод. **Методы.** Ауксины в супернатанте культуральной жидкости и этанольных экстрактах биомассы продуцентов определяли методом количественной спектроденситометрической тонкослойной хроматографии. **Результаты.** В стационарную фазу роста в супернатанте культуральной жидкости и биомассе *S. petrovsis* УКМ Ас-2186 и *S. violaceus* УКМ Ас-2191 накапливается значительное количество ауксинов. Кроме основных активных форм индол-3-уксусной и индол-3-масляной кислот среди метаболитов обнаружены индол-3-уксусной кислоты гидразид, индол-3-карбинол, индол-3-карбоксальдегид и индол-3-карбоновая кислота. **Выводы.** Рострегулирующая активность метаболитных препаратов, разработанных на основе указанных почвенных стрептомицетов в значительной степени обусловлена их способностью к активному синтезу ауксинов, в частности индол-3-уксусной и индол-3-масляной кислот.

**Ключевые слова:** фитогормоны ауксиновой природы, индол-3-уксусная кислота, индол-3-масляная кислота, почвенные стрептомицеты.



L.O. Biliavska

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine, tel. +38 (044) 526 34 79,  
e-mail: bilyuvskal@gmail.com

## AUXINS BIOSYNTHESIS BY SOIL STREPTOMYCES – THE ANTAGONISTS OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS AND NEMATODES

### Summary

**Aim.** Research of the auxins biosynthesis by soil streptomycetes – the antagonists of phytopathogenic microorganisms and plant parasitic nematodes on synthetic and organic nutrient mediums. **Methods.** Auxins were determined by the quantitative of spectrodensitometric thin layer chromatography in the supernatants of cultural liquid and ethanol extracts of biomass. **Results.** In the stationary growth phase in the supernatants of cultural liquid and biomass of *S. netropsis* UCM Ac-2186 and *S. violaceus* UKM Ac-2191 accumulated a significant amount of auxins. Besides the basic active forms of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid the metabolites contained the indole-3-acetic acid hydrazide, indole-3-carbinol, indole-3-carboxaldehyde and indole-3-carboxylic acid. **Conclusions.** The plant growth regulate activity of metabolite bioformulations developed on the basis of soil streptomycetes is largely due to their increased ability to auxins biosynthesis, particularly indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid.

*Key words:* phytohormones of auxin nature, indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, soil streptomycetes.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білявська Л.О., Козиріцька В.Є., Коломієць Ю.В., Бабич О.Г., Іутинська Г.О. Фітозахисні та рїстрегулювальні властивості метаболїтних препаратїв на основї ґрунтових стрептомїцетїв // Доповїдї НАН України. – 2015. – № 1. – С. 131–137.
2. Белявская Л.А., Козырицкая В.Е., Валагурова Е.В., Иутинская Г.А. Биологически активные вещества препарата аверком // Микроб. журнал. – 2012. – Т. 74, № 3. – С. 10–15.
3. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1991. – Т. 23, № 6. – С. 606–614.
4. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.



5. *Abd-Alla M.H., El-Sayed A., Rasmey A.-H.M.* Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt // *Journal of Biology and Earth Sciences*. – 2013. – V. 3, № 2. – P. B1 82–B1 93.
6. *Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.* Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria // *Curr Opin Plant Biol*. – 2001. – V. 4, № 4. – P. 343–350.
7. *Brader G., Compant S., Mitter B. et al.* Metabolic potential of endophytic bacteria // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – V. 27. – P. 30–37.
8. *Epstein E. and Müller J.-L.* Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport // *Physiologia plantarum*. – 1993. – V. 88. – P. 382–389.
9. *Genilloud O., Ganzalez I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F.* Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 38, № 3. – P. 375–389.
10. *Iutynska G.* Elaboration of natural polyfunctional preparations with antiparasitic and biostimulating properties for plant growing // *Mikrobiol. J.* – 2012. – V. 74, № 4. – P. 3–12.
11. *Khamna S., Yokota A., Peberdy J. F., Lumyong S.* Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils // *Eurasian Journal of BioSciences*. – 2010. – V. 4. – P. 23–32.
12. *Lacret R., Oves-Costales D., Gómez C., Díaz C., Cruz M., Pérez-Victoria I., Vicente F., Genilloud O., Reyes F.* New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis* // *Mar. Drugs*. – 2015. – V. 13. – P. 128–140; doi:10.3390/md13010128
13. *Mac Millan S.* Promoting growth with PGPR // *The Canadian Organic Growth Grower*. – 2007. – № 9. – P. 32–34.
14. *Otto-Hanson L.K., Grabau Z., Rosen C., Salomon C.E., and Kinkel L.L.* Pathogen variation and urea influence selection and success of *Streptomyces* mixtures in biological control // *Phytopathology*. – 2013. – V. 103, № 1. – P. 34–42.
15. *Shutsrirung A., Chromkaew Y., Patnom-Aree W., Choonluchanon S., Boonkerd N.* Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 2013. – V. 59. – P. 322–330.

Стаття надійшла до редакції 06.03.2015 р.



**Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця**

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

## **ПЛАЗМІДНІ ПРОФІЛІ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ-АНТАГОНІСТІВ РОДУ *BACILLUS***

**Метою** дослідження було вивчення плазмідних профілів та ефективності виділення плазмід грампозитивних бактерій-антагоністів роду *Bacillus* різними методами. **Методи.** В роботі використано штами бактерій видів *B. thuringiensis* і *B. subtilis*. Виділення плазмідних ДНК з клітин бактерій здійснювали лужним методом Кадо і Ліу, методом Дженсена та методом Кроса. Плазмідну ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. **Результати.** В результаті вивчення плазмідного складу штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis* було виявлено, що 90% штамів утримують від 5 до 7 позахромосомних елементів різного розміру. **Висновок.** Виявлені у досліджених штамів баціл плазмідні умовно можна поділити на дві групи: невеликі плазмідні, розміром приблизно 10 т.п.н., і мегаплазмідні, розміром від 100 до 200 т.п.н. Для отримання повноцінної картини плазмідних профілів *B. thuringiensis* або *B. subtilis* найбільш ефективним є адаптований метод Дженсена.

*Ключові слова:* *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, плазмідні, плазмідні профілі.

*Bacillus thuringiensis* є широко розповсюдженою бактерією, яку можна виділити з різних екологічних ніш, таких як ґрунт, вода, комахи, зернові продукти тощо. Плазмідні *B. thuringiensis* можуть бути наявні у кількості від 1 до 17 на клітину і мати розмір від 3 до 120 т.п.н., та несуть у собі гени, що відповідають за резистентність до антибіотиків, синтез ентомопатогенних токсинів та ін. [4, 6]. Плазмідні профілі – це якісна характеристика, представлена специфічним набором плазмід вони можуть бути використані для характеристики окремих штамів [1, 2, 3].

Тобто, плазмідні профілі можуть бути цінним інструментом для характеристики будь-яких бактерій, у тому числі багатьох бактерій роду *Bacillus*, зокрема *B. thuringiensis* і *B. subtilis*. Бактерії можуть втрачати плазмідні, але базовий набір залишається незмінним, і може бути виявленим і вивченим. Крім того, плазмідні профілі дозволяють диференціювати специфічні штами, які належать до інтелектуальної власності [3, 4].

Існують різні методи виділення позахромосомних генетичних елементів бактерій, але підбір адекватного методу для отримання відтворюваних та достовірних результатів досі залишається актуальним. Особливо це стосується



пошуку методичних підходів для вивчення плазмідного складу окремих груп бактерій.

Метою нашого дослідження було виявити та оцінити вміст позахромосомних генетичних елементів штамів бактерій роду *B. thuringiensis* і *B. subtilis* з використанням різних методичних підходів.

### Матеріали і методи

В дослідженнях використовували штами *B. thuringiensis* ОНУ 392, ОНУ 513, ОНУ 514, ОНУ 515, ОНУ 516, ОНУ 517, ОНУ 518 (ізолювані з мертвих комах) і *B. subtilis* ОНУ 410, ОНУ 519 (ізолювані з ризосфери рослин), з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Культури бактерій вирощували при оптимальній температурі 25–30 °С протягом 16–18 год у 2 мл рідкого повноцінного поживного середовища LB (пептон 10 г/л, дріжджовий екстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л).

Виділення плазмідної ДНК проводили лужним методом Кадо і Ліу, методом Кроса для будь-яких бактерій і плазмід і методом Дженсена, адаптованим для виділення плазмід *B. thuringiensis* або *B. subtilis*.

**Лужний метод Кадо і Ліу** [5]. Біомасу бактерій, отриману осадженням клітин 16–18 годинної культури, ресуспендували в 100 мкл буфера Е (40 мМ тріс-НСl, 2мМ ЕДТА рН 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера Кадо (тріс-НСl – 609 мг, додецилсульфат натрію (SDS) – 3 г, Н<sub>2</sub>О – 100 мл, 2М NaOH – 2,2 мл). Зразки інкубували при 60–68 °С впродовж 30–45 хв. Після цього до лізату додавали подвійний об'єм (300 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 10000 об/хв (8000g), 15–20 хв. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем. Далі додавали 1 об'єм хлороформу, перемішували і знову центрифугували.

**Метод Дженсена** [3]. Стандартні лужні методи або протоколи з кип'ятінням більш ефективні для виділення малих плазмід, але майже або, навіть, зовсім не підходять для виділення великих плазмід. Наступний протокол є добре відтворюваним і дає повноцінну картину плазмідних профілів *B. thuringiensis*, *B. subtilis* або *B. cereus*.

Біомасу клітин ресуспендували в 100 мкл буфера Е з сахарозою (15% сахарози, 40 мМ тріс-НСl, 2 мМ ЕДТА рН 7,9). До суспензії додавали подвійний об'єм (200 мкл) лізуючого буфера (3% SDS, 50мМ тріс-НСl рН 12,5). Зразки інкубували при 60 °С впродовж 30 хв. Після цього до лізату додавали 5 U протеїнази К і перемішували 20 разів. Далі інкубували 90 хв при температурі 37 °С. Після цього додавали 1 мл суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували 40 разів до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 11000 об/хв (8800g), 15 хв.

**Метод Кроса** [5]. Біомасу клітин ресуспендували в 2 мкл буфера ТЕ (0,05М тріс-НСl рН 8,0, 0,01М ЕДТА). Центрифугували і знов ресуспендували



в 40 мкл буфера TE. До суспензії додавали 600 мкл буфера TE з 4% SDS (рН 12,5). Зразки інкубували при 37 °С протягом 20–30 хв. Після цього до лізату додавали 30 мкл 2М тріс-НСІ рН 7,0, а потім 240 мкл 5 М NaCl, інкубували 4 год на льоду. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 11000 об/хв (8800g), 10 хв. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем і додавали подвійний об'єм (800 мкл) суміші кислого фенолу з хлороформом (1:1). Акуратно перемішували до утворення однорідної суспензії. Зразки центрифугували на мікроцентрифузі при 10000 об/хв (8000g), 15–20 хв. Верхню фазу, де знаходилася плазмідна ДНК, відбирали піпеткою з розширеним кінцем. Далі додавали 1 об'єм хлороформу, перемішували, і знов центрифугували.

Препарати плазмідних ДНК зберігали за 4 °С. У всіх методах верхню фазу зі зразками отриманої плазмідної ДНК аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (агароза 0,55–0,75%, 55–60В, 4–4,5 год, обладнання фірми “BioRad”: камера SubCell GT, джерело напруги PowerPac Basic, візуалізація результатів проведена на трансільюмінаторі Molecular Imager Doc XR<sup>+</sup> imaging system за допомогою програми «Quantity One»).

### Результати та їх обговорення

У результаті вивчення складу плазмід штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis* за допомогою метода Дженсена, адаптованого для виділення плазмід з клітин бацил, було виявлено, що майже усі штами утримують позахромосомні елементи різного розміру, переважно мегаплазмід (рис. 1, А). Виявлені плазмідні умовно можна поділити на дві групи: невеликі плазмідні, розміром приблизно 10 т.п.н., і мегаплазмідні, розміром від 100 до 200 т.п.н. Встановлено, що штами *B. thuringiensis* утримують від 5 (ОНУ 513, ОНУ 515, ОНУ 516, ОНУ 517) до 7 (ОНУ 392) позахромосомних елементів (рис. 1, А, Б).

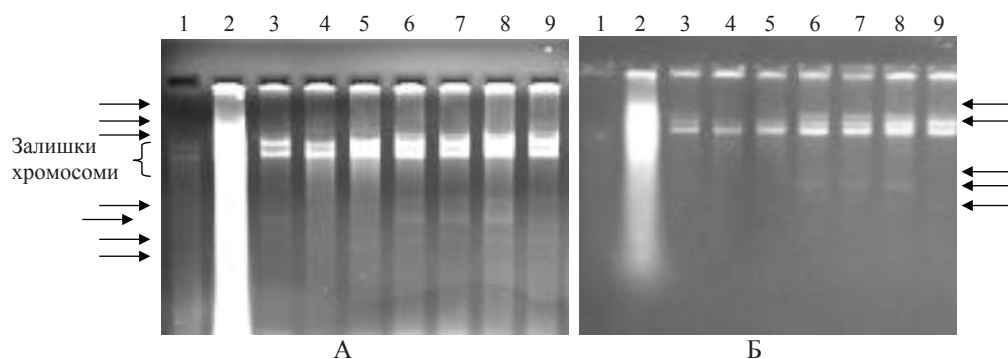
Невеликі за розміром позахромосомні елементи зазвичай виділяються у більшій кількості через наявність їх у клітині у більшій кількості копій; однак у випадку з виділенням плазмід з клітин *B. thuringiensis* і *B. subtilis* методом Дженсена значно краще виділяються мегаплазмідні (рис. 1, А). Після 7 днів відмивання агарозного гелю у дистильованій воді від залишків зайвого бромистого етідію (рис. 1, Б) краще розрізняються смуги, які відповідають мегаплазмідам.

У подальших дослідженнях плазмід штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis* порівнювали якість виділення плазмід різними методами (адаптований метод Дженсена, лужний метод Кадо і Ліу та метод Кроса) (рис. 2).

Дослідження показали, що для отримання повноцінної картини плазмідних профілів *B. thuringiensis* та *B. subtilis* найбільше підходить адаптований метод Дженсена, який дозволяє виявити на електрофореграмі мегаплазмідні бацил разом з плазмідними невеликого розміру (рис. 1) і у значно більшій кількості виділеної ДНК порівняно з іншими методами (рис. 2). Метод Кроса не підходить для виділення плазмід бацил, на гелі після електрофорезу відсутні смуги плазмідної ДНК (рис. 2). Лужний метод Кадо і Ліу дає можливість здійснити скринінг щодо наявності плазмід, але не дає повноцінної картини плазмідних



профілів штамів бацил, особливо у відношенні мегаплазмід і у порівнянні з результатами отриманими методом Дженсена (рис. 2).



**Рис. 1 (А, Б). Плазмідні спектри *B. subtilis* ОНУ 410 (1), ОНУ 519 (2) і *B. thuringiensis* ОНУ 515 (3), ОНУ 514 (4), ОНУ 518 (5), ОНУ 513 (6), ОНУ 516 (7), ОНУ 517 (8), ОНУ 392 (9). Агароза – 0,55 %, 55В, 4 години.**

Тут і надалі стрілками вказані позахромосомні ДНК.  
Примітка: А – гель після візуалізації ДНК бромідом етидію,  
Б – гель після 7 днів відмивання у  $DH_2O$ .

**Fig. 1 (A, B). Plasmid profiles of *B. subtilis* ONU 410 (1), ONU 519 (2) and *B. thuringiensis* ONU 515 (3), ONU 514 (4), ONU 518 (5), ONU 513 (6), ONU 516 (7), ONU 517 (8), ONU 392 (9). Agarose – 0.55 %, 55V, 4 hours.**

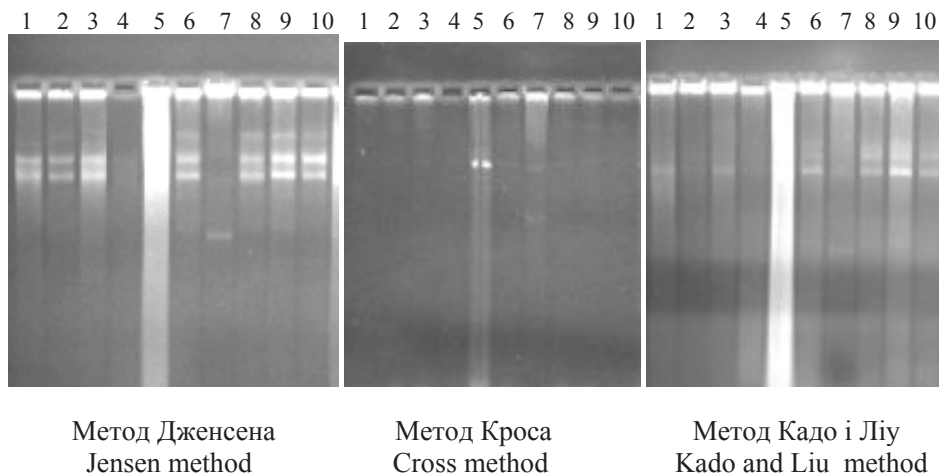
Here and further nonchromosomal DNAs are indicated by the arrows.

Note: A – gel after ethidium bromide staining,  
B – gel after 7 days wash in  $DH_2O$ .

Характеристика плазмідних профілів штамів бацил також показала, що штам *B. thuringiensis* ОНУ 513, ОНУ 515, ОНУ 516, ОНУ 517 і ОНУ 392 можливо є спорідненими через наявність декількох плазмідних смуг на одному рівні на електрофореграмах. З іншого боку штам *B. thuringiensis* ОНУ 514 і ОНУ 518 теж мають декілька плазмідних смуг на одному рівні на електрофореграмах, а тому теж можуть бути спорідненими. Крім того, завдяки різним плазмідним профілям на електрофореграмах виявлено відсутність близької подібності штамів *B. thuringiensis* ОНУ 514 і ОНУ 518 з однієї сторони і ОНУ 515 з другої, не зважаючи на виділення цих штамів з одного зразка тканин комах.

Для бактерій групи *B. thuringiensis* показана наявність множинного утримання плазмід різного розміру [6], і результати наших досліджень також це демонструють. Крім того, відзначається наявність в клітинах одного штаму декількох мегаплазмід близьких за розміром [3], що теж підтверджується отриманими нами даними (рис. 1).

Таким чином, адаптований метод Дженсена дає найбільш повну картину плазмідного профілю штамів *B. thuringiensis* і *B. subtilis*. Встановлено, що 90% штамів утримують від 5 до 7 позахромосомних елементів різного розмі-



**Рис. 2.** Плазмідні спектри *B. thuringiensis* ONU 514 (1), ONU 515 (2), ONU 518 (3), ONU 513 (6), ONU 516 (8), ONU 517 (9), ONU 392 (10) і *B. subtilis* ONU 410 (4), ONU 519 (5); pCA25 9,8 т.п.н. (7).

Агароза — 0,75%, 60В, 4,5 години.

**Fig. 2.** Plasmid profiles of *B. thuringiensis* ONU 514 (1), ONU 515 (2), ONU 518 (3), ONU 513 (6), ONU 516 (8), ONU 517 (9), ONU 392 (10) and *B. subtilis* ONU 410 (4), ONU 519 (5); pCA25 9,8 kb (7).

Agarose — 0.75%, 60V, 4.5 hours.

ру. Плазмідні ДНК досліджених штамів бацил умовно розподіляються на дві окремі групи: невеликі плазміди, розміром 10 т.п.н. і мегаплазміди, розміром від 100 до 200 т.п.н.

**Zh. Sergieieva, V. Ivanytsia**

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

## PLASMID PROFILES OF *BACILLUS* GENUS ANTAGONISTIC STRAINS

### Summary

The **aim** of the study was to investigate plasmid profiles and to compare the results of the Gram-positive *Bacillus* genus bacteria plasmid isolation efficiency by various methods. **Methods.** Strains of *B. thuringiensis* and *B. subtilis* were used. Plasmids isolation from the cells was carried out using alkaline Kado and Liu method, Jensen method and Cross method. **Results.** Plasmid profiles study of *B. thuringiensis* and *B. subtilis* strains revealed that 90% of strains carried from 5 to 7 extrachromosomal genetic elements of different sizes. **Conclusion.** Isolated plasmids can be divided into two groups: small plasmids, about 10 kb in size and megaplasmids 100 to 200 kb. The most suitable method for the study and complete picture of *B. thuringiensis* or *B. subtilis* plasmid profiles was Jensen method adapted for bacillus megaplasmids isolation.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, plasmids, plasmid profiles.





Ж.Ю. Сергеева, В.А. Иваныця

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

## ПЛАЗМИДНЫЕ ПРОФИЛИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ-АНТАГОНИСТОВ РОДА *BACILLUS*

### Реферат

**Целью** исследования было изучение плазмидных профилей и сравнение эффективности выделения плазмид грамположительных бактерий-антагонистов рода *Bacillus* различными методами. **Методы.** В работе использовались штаммы бактерий-антагонистов *B. thuringiensis* и *B. subtilis*. Выделение плазмид из клеток осуществлялось щелочным методом Кадо и Лиу, методом Дженсена и методом Кросса. Плазмидную ДНК анализировали при помощи электрофореза в агарозных гелях. **Результаты.** В результате изучения плазмидного состава штаммов *B. thuringiensis* и *B. subtilis* было обнаружено, что 90% штаммов содержат от 5 до 7 внехромосомных генетических элементов различного размера. **Вывод.** Выявленные плазмиды условно можно разделить на две группы: небольшие плазмиды, размером примерно 10 т.п.н., и мегаплазмиды, размером от 100 до 200 т.п.н. Для получения полноценной картины плазмидных профилей *B. thuringiensis* или *B. subtilis* наиболее подходит адаптированный метод Дженсена.

**Ключевые слова:** *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, плазмиды, плазмидные профили.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Andrup L. Detection of large plasmids from the *Bacillus cereus* group / L. Andrup, K. K. Barfod, G. B. Jensen, L. Smidt // *Plasmid*. – 2008. – V. 59, № 2. – P. 139–143.
2. Guglielmetti S. Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: organization, distribution, and their possible role in host physiology / S. Guglielmetti, D. Mora, C. Parini // *Plasmid*. – 2007. – V. 57, № 3. – P. 245–264.
3. Jensen G.B. The genetic basis of aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16 / G. B. Jensen et al. // *J. Bacteriol.* – 1995. – V. 177. – P. 2914–2917.
4. Leplae R.I. A first global analysis of plasmid encoded proteins in the ACLAME database / R.I. Leplae, G. Lima-Mendez, A. Toussaint // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2006. – V. 30, № 6. – P. 980–994.
5. Rohde C. Plasmid isolation from bacteria: some fast procedures / C. Rohde // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 1995. – V. 11, Issue 3. – P. 367–369.
6. Zhong C. Determination of plasmid copy number reveals the total plasmid DNA amount is greater than the chromosomal DNA amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520/ C. Zhong et al. // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6, № 1. – P. 1–8.

Стаття надійшла до редакції 26.02.2015 р.



**Л.А.Сафронова**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,  
тел.: +38(044) 526 23 79, e-mail: safronova\_larisa@ukr.net

## **ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM***

*Целью работы* было изучение литической активности пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и возможности использования аминокислот для ее стимуляции. *Методы.* Объектом исследования были штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 и УКМ В-5140, составляющие основу лечебно-профилактического препарата эндоспорина. В работе использовали отдельные аминокислоты (DL-) и сухие гидролизатные смеси аминокислот. Активность литических ферментов бацилл определяли турбидиметрическим методом и выражали в процентах снижения оптической плотности суспензии живых клеток тест-культур. *Результаты.* Установлена возможность интенсификации роста и литической активности исследуемых штаммов бацилл по отношению к клеткам грамотрицательных бактерий с помощью смесей аминокислот. Однако более эффективными были отдельные аминокислоты такие как аргинин, аланин, триптофан, гистидин и фенилаланин, которые стимулировали, как рост *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, так и синтез ими литических ферментов. При этом степень разрушения клеточных стенок *E. coli* увеличилась более чем на 30–100%, а *S. aureus* в 2,3–4 раза. *Вывод.* Высокая литическая активность бацилл, характеризующая их антимикробные свойства, при условии безвредности споровых бактерий для теплокровных может быть не менее важным показателем, чем их антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам при отборе штаммов для создания пробиотиков.

*Ключевые слова:* *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, пробиотики, внеклеточные литические ферменты, аминокислоты.

На основе аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus* разработаны и с успехом применяются на практике ряд эффективных пробиотических препаратов [3,7]. Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах вызывают улучшение здоровья организма-хозяина [8].

Свойства пробиотиков определяются совокупностью биологических свойств, используемых штаммов микроорганизмов [9,10]. Одной из основных характеристик пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus* является их высокая антимикробная активность, обусловленная синтезом антибиотиков, бактериоцинов и литических энзимов.



Следует отметить, что литические ферменты бацилл изучены недостаточно и литературные сведения о них ограничены, поэтому остается актуальной задачей получение новых данных, характеризующих их способность к лизису клеточных стенок микроорганизмов – представителей различных таксономических групп.

Бациллы продуцируют литические ферменты типа лизоцима, а также комплекс ферментов, включающий глюканазу, маннаназу, протеазу, ацетилгексозаминидазу, амидазу и другие ферменты, способные разрушать клеточные стенки грамотрицательных микроорганизмов [6].

Одним из перспективных аспектов применения литических ферментов является их использование в качестве антимикробных средств в медицине и ветеринарии для борьбы с патогенными микроорганизмами, устойчивыми к традиционным препаратам [4, 6].

В процессе разработки эффективных пробиотиков важной задачей является не только выявление штаммов микроорганизмов, способных синтезировать биологически активные вещества, полезные для микроорганизма, в том числе и литические ферменты, но и создание условий, благоприятных для их синтеза.

Целью исследования было изучение литической активности пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* и возможности использования аминокислот для ее стимуляции.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили штаммы бактерий *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139, УКМ В-5140 из коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, составляющие основу лечебно-профилактического препарата эндоспорина [5, 11]. Культивирование штаммов осуществляли на оптимизированной синтетической питательной среде [2]. Для изучения влияния аминокислот на биосинтез литических ферментов была выбрана методика краткосрочных опытов с предварительно выращенными клетками бактерий, чтобы по возможности сократить потребление аминокислот при конструктивном метаболизме. Клетки, выращенные в течение 24 часов, находящиеся в логарифмической фазе роста, отделяли центрифугированием, промывали стерильной водой и ресуспендировали в свежей питательной среде, лишенной источника азота. Аминокислоты первоначально растворяли в дистиллированной воде (рН 6,8–6,9) и стерилизовали при 0,5 атм. Перед проведением опыта растворы аминокислот разбавляли безазотистой синтетической средой. Конечная концентрация каждой аминокислоты в опытной пробе составляла 30 мг% по азоту. В работе использовали отдельные аминокислоты (*DL*-) и сухие гидролизатные смеси аминокислот (САГ) (ТУ 10.16 УССР 40-88). САГ, полученные из отходов мясной промышленности, предоставлены сотрудниками Института биоорганической химии НАН Украины.



Активность литических ферментов определяли турбидиметрическим методом [2] и выражали в процентах снижения оптической плотности (ОП) субстрата – суспензии клеток тест-культуры при инкубации реакционной смеси при температуре 41 °С в течение 60 мин. Измерения проводили на КФК-2 при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 5 мм. Литическую активность (%) рассчитывали по формуле

$$\frac{ОД_{исх} - ОДОД_{исх} - ОД}{ОД_{исх} \quad ОД_{исх}} \times 100\%,$$

где  $ОД_{исх}$  – оптическая плотность реакционной смеси до инкубации,  $ОД$  – оптическая плотность после инкубации.

Как тест-культуры для исследований литической активности бацилл использовали отмытые клетки штаммов *Staphylococcus aureus* 209, *Escherichia coli* 25922 и *Candida albicans* 885/653. Тест-культуры выращивали на МПА в течение 24 ч. Клетки смывали 0,1 М раствором натрий-фосфатного буфера рН 7,0, суспендировали в том же буфере и доводили ОП суспензии до 0,6–0,7 ед.

Для определения литической активности к 2 мл суспензии тест-культуры добавляли 2 мл отцентрифугированной от клеток культуральной жидкости исследуемых штаммов бацилл и смесь инкубировали при 41 °С в течение 60 мин.

Накопление биомассы клеток оценивали в единицах оптической плотности, регистрируемой на КФК-2 при 540 нм.

Количество спор у бацилл рассчитывали в процентах от общего числа клеток, установленных прямым подсчетом под микроскопом.

Опыты проводили в 3–5 повторностях. Полученные экспериментальные данные обрабатывали, используя компьютерную программу Microsoft Excel 2007.

### Результаты и их обсуждение

Биологическая активность микроорганизмов и синтез ими различных метаболитов, как правило, связана с определенными этапами их развития [1]. Поэтому была изучена динамика роста и образования литических ферментов у пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139, УКМ В-5140 в условиях глубинного культивирования на синтетической питательной среде.

Показано, что литические ферменты синтезируются в основном в логарифмической и начале стационарной фазы. С увеличением количества биомассы возрастает продукция внеклеточных ферментов и их выделение в среду культивирования (рис. 1, 2). Максимальная литическая активность *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 наблюдалась к началу стационарной фазы роста культуры. При этом лизис клеток *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans* составил 23, 5 и 34% соответственно (рис. 2). Аналогичная закономерность выявлена и для штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5140. При дальней-



шем культивировании изучаемых продуцентов отмечалось снижение уровня биомассы и уменьшение ферментативной литической активности штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 и УКМ В-5140.

Грамположительные бактерии рода *Staphylococcus* оказались слабо чувствительными к литическому действию ферментов исследуемых штаммов.

Продолжительность культивирования, соответствующая максимальной литической активности составила для *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 – 24 часа, для *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5140 – 18 часов. К этому времени у исследованных штаммов уже заканчивался процесс спорообразования.

В биотехнологии получения эффективных лечебно-профилактических пробиотиков из бацилл главным является достижение максимального выхода биомассы клеток бактерий, спор и синтезируемых бактериальными культурами биологически активных веществ. Эти основные показатели определяют продуктивность, перспективность и рентабельность технологического процесса.

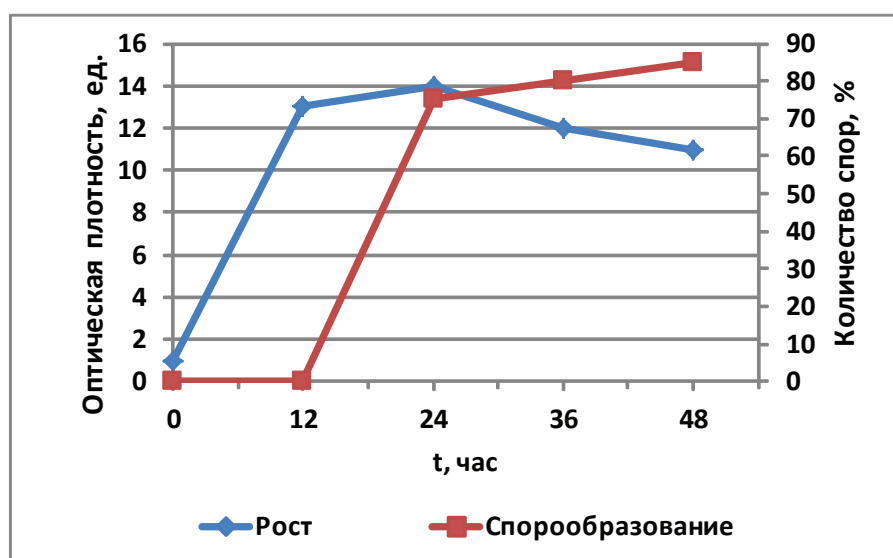


Рис. 1. Динамика роста и спорообразования *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139.

Fig. 1. Dynamics of the growth and sporulation of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139

Проведенные исследования показали, что в логарифмической фазе происходит пропорциональное увеличение как биомассы клеток, так и литической активности исследуемых штаммов бактерий, а в стационарной фазе – интенсивный синтез и выделение в среду внеклеточных ферментов (рис. 1, 2).

Поскольку деградация клеточных стенок тест-микроорганизмов (с разной структурой и связями в строении) и вследствие этого лизис самих клеток

происходит под действием разных ферментов, можно предположить, что исследованные штаммы бацилл синтезируют комплексы литических гидролаз, которые различаются по своим функциональным и физико-химическим свойствам.

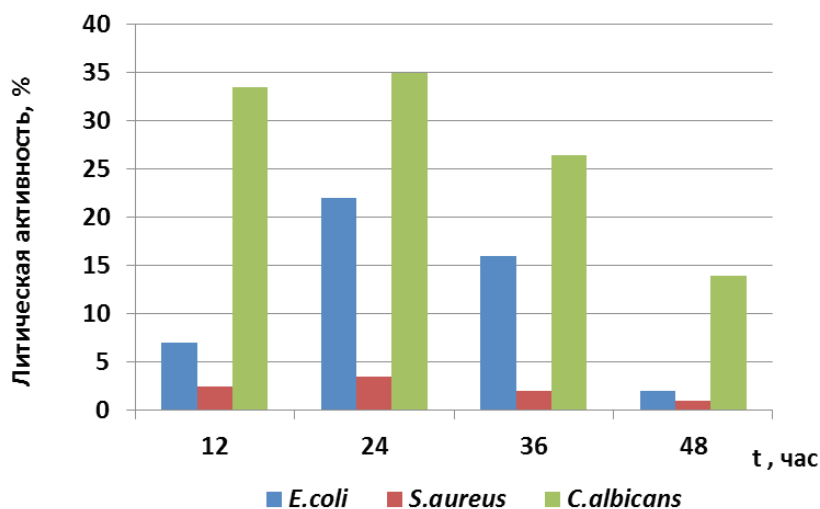


Рис. 2. Динамика литической активности (%) *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 по отношению к тест-культурам

Fig. 2. Dynamics of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139 lytic activity (%) in relation to test cultures

Чтобы выяснить, какое действие оказывают аминокислоты на активность внеклеточных литических ферментов у исследуемых штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, в среду культивирования вносили как отдельные аминокислоты, так и их смеси. Как показали результаты экспериментов, отдельные аминокислоты по-разному влияют на степень лизиса клеточных стенок тест-культур (рис. 3).

Так, аргинин, аланин, триптофан, фенилаланин и гистидин стимулировали накопление внеклеточных литических ферментов бактериями *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*. Внесение в среду названных аминокислот усиливает литическую активность *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 по отношению к клеткам *E. coli* на 34,8–104,3%, по отношению к стафилококку – на 33,3–266,7% по сравнению с активностью в контрольных средах, не содержащих аминокислот. Лизис дрожжевых клеток не стимулировался вообще.

В то же время другие аминокислоты и, прежде всего, валин, цистин, глицин, метионин оказывали репрессивное действие на синтез ферментов, лизирующих клетки бактерий и дрожжей. Вследствие этого литическая активность по отношению к *E. coli*, *C. albicans* и *S. aureus* была ниже на 52,20–65,2%, 35,3–82,4% и 33,3% соответственно, чем в контрольной среде.



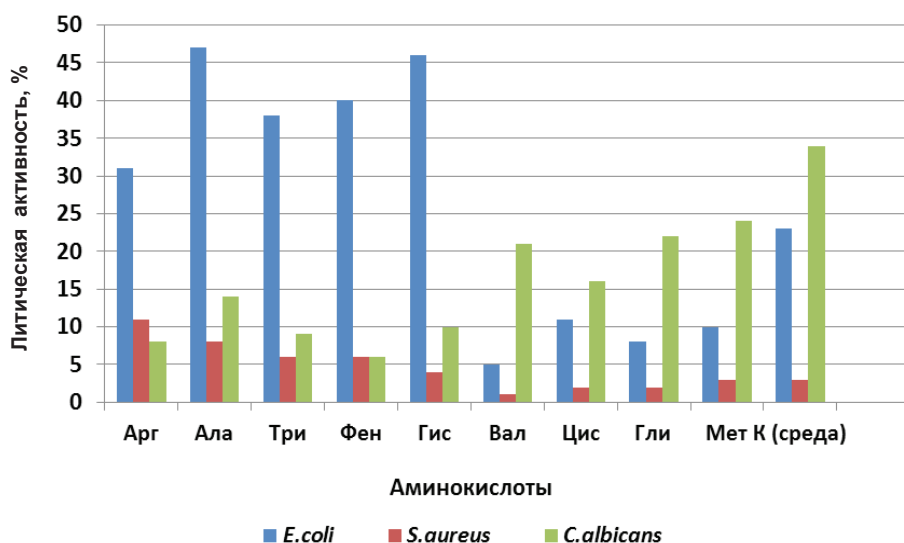
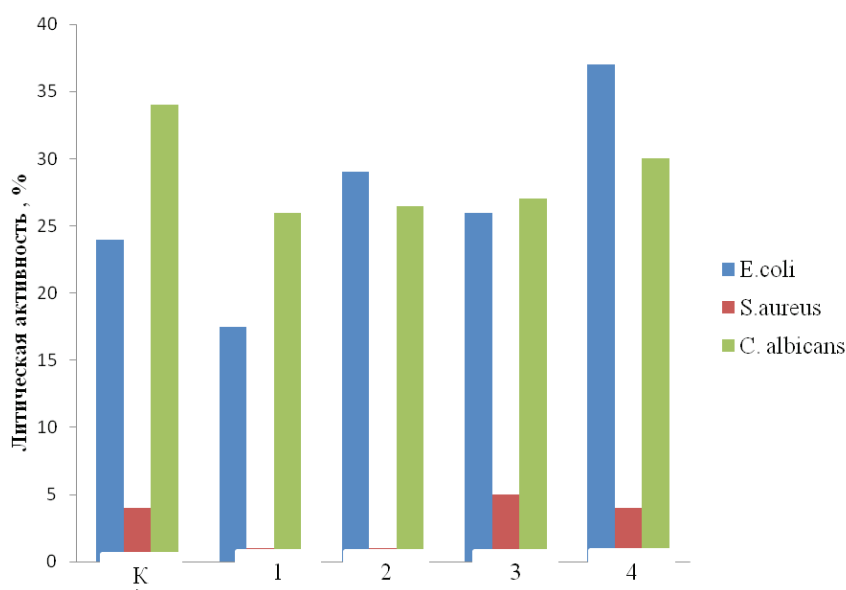


Рис. 3. Изменение литической активности *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 при добавлении в среду культивирования отдельных аминокислот

Fig. 3. Changing of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139 lytic activity, when added to the culture medium of single amino acids

При добавлении в питательную среду культивирования аминокислот в виде смесей гидролизатов аминокислот (САГ) заметно стимулировали степень лизиса клеток только грамотрицательных бактерий (рис. 4). Лизис грамположительных бактерий и дрожжей при этом снижался по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что аминокислотам принадлежит важная роль в регулировании активности литических ферментов у пробиотических штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 и УКМ В-5140. Следовательно, можно предположить, что синтез литических ферментов у *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* стимулируется отдельными аминокислотами. Установлена возможность интенсификации роста и литической активности исследуемых штаммов бацилл по отношению к клеткам грамотрицательных бактерий с помощью сухих гидролизатных смесей аминокислот. Однако более эффективными были отдельные аминокислоты такие как аргинин, аланин, триптофан, гистидин и фенилаланин, которые стимулировали, как рост *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, так и образование ими литических ферментов. При этом степень разрушения клеточных стенок *E. coli* увеличилась на 30–100%, а *S. aureus* в 2,3–4 раза. Глицин, хотя и стимулировал рост бактерий, но задерживал синтез литического комплекса. Цистин и метионин резко подавляли как рост, так и литическое действие штаммов *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*.



**Рис. 4.** Влияние комплекса аминокислот на активность литических ферментов у *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139.

К – среда без аминокислот; 1 – среда с дрожжевым автолизатом; 2 – среда с САГ– I; 3 – среда с САГ-II; 4 – среда с САГ-III

**Fig. 4.** Effect of the amino acids complex on the activity of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* UCM B-5139 lytic enzymes.

К – medium without amino acids; 1 – medium with yeast autolysate; 2 – medium + SAG- I; 3 – medium + SAG-II; 4 – medium + SAG -III

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что высокая литическая активность бацилл, характеризующая их антимикробные свойства, при условии их безвредности для теплокровных может быть не менее важным показателем, чем их антагонистическая активность по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам при отборе штаммов для создания пробиотиков.



Л.А. Сафронова

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
тел. : +38 (044) 526 23 79, e-mail: safronova\_larisa@ukr.net

## ВПЛИВ АМІНОКИСЛОТ НА ЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM*

### Реферат

**Метою** роботи було вивчення літичної активності пробіотичних штамів *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* і можливості використання амінокислот для її стимуляції. **Методи.** Об'єктом дослідження були штами бактерій *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* УКМ В-5139 і УКМ В-5140, які складають основу лікувально-профілактичного препарату ендоспорина. В роботі використовували амінокислоти (DL-) і сухі гідролізатні суміші амінокислот. Активність літичних ферментів бацил визначали турбідиметричним методом і виражали у відсотках зниження оптичної густини суспензії живих клітин тест-культур. **Результати.** Встановлена можливість інтенсифікації росту і літичної активності досліджуваних штамів бактерій по відношенню до клітин грамнегативних бактерій за допомогою сумішей амінокислот. Однак, більш ефективними були окремі амінокислоти, такі як аргінін, аланін, триптофан, гістидин і фенілаланін, які стимулювали як ріст *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, так і синтез ними літичних ферментів. При цьому ступінь руйнування клітинних стінок *E. coli* збільшився більше ніж на 30–100%, а *S.aureus* – в 2,3–4 рази. **Висновок.** Висока літична активність бацил, яка характеризує їх антимікробні властивості, за умови нешкідливості спорових бактерій для теплокровних може бути не менш важливим показником, ніж їх антагоністична активність по відношенню до патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів при відборі штамів для створення пробіотиків.

**Ключові слова:** *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, позаклітинні літичні ферменти, амінокислоти.

UDC 579.222.3.11

L. A. Safronova

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, D 03143, Ukraine,  
tel.:+38 (044) 526 23 79, e-mail: safronova\_larisa@ukr.net

## EFFECT OF THE AMINO ACIDS UPON LYTIC ACTIVITY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* STRAINS

### Summary

**The aim** of the work was to study the lytic activity of probiotic strains of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and the possibility of using amino acids for its stimulation. **Methods.** The research objects were *B. amyloliquefaciens* subsp.



*plantarum* UCM B-5139, UCM B-5140 – the basis of therapeutic and prophylactic preparation endosporin. The amino acid (DL-) and dry hydrolyzate mixture of amino acids were used. The lytic enzyme activity of bacilli was determined by the turbidimetric method and expressed as the percentage decrease in the optical density of live cell suspension of the test cultures. **Results.** Stimulation of the growth and lytic activity of studied bacilli strains against Gram negative bacteria cells by the mixtures of amino acids was installed. However, the separate amino acids such as arginine, alanine, tryptophan, histidine and phenylalanine stimulated the growth of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and the synthesis of lytic enzymes were more effective. The degree of destruction of the *E. coli* cell walls increased more than 30–100% and *S. aureus* in 2.3–4 times. **Conclusion.** High lytic activity of bacilli characterizing their antimicrobial properties, provided spore-forming bacteria harmless for warm-blooded may be no less important than their antagonistic activity against pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms in the selection of strains for development of probiotics.

*Key words:* *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, extracellular lytic enzymes, amino acids.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варбанец Л.Д., Мацелюх Е.В. Пептидазы микроорганизмов и методы их исследования. – Киев: Наукова думка, 2014. – 325 с.
2. Кудрявцев В.А., Осадчая А.И., Сафронова Л.А. Аэробы рода *Bacillus* как источник продуцентов литических ферментов. // Биотехнология. – 2004, № 4. – С. 24–33.
3. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2–3. – С. 20–41.
4. Рязанова Л.П. Действие протеолитических ферментов *Bacillus licheniformis* и лизомидазы *Lysobacter sp.* XL1 на клетки *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*/ Л.П.Рязанова, Л.А.Ледова, Н.В.Цурикова, О.А.Степная, А.П.Синицын, И.С.Кулаев// Прикладная биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41. – № 5. – С. 558–564.
5. Сафронова Л.А., Зеленая Л.Б., Ключко В.В., Авдеева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бацилл-компонентов эндоспорина // Микробиол. журнал. – 2012. – Т. 74. – № 5. – С. 55–66.
6. Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rashmi H.N., Tamil Selvi A. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities // Bioresource Technology. – 2007. – V. 98. – № 14. – P. 2758–2764.
7. Cutting S.M. *Bacillus* probiotics / Food Microbiology. – 2011. – V. 28. – P. 214–220.
8. *Probiotics and prebiotics – World Gastroenterology Organisation Practice Guideline, 2008* [Электронный ресурс] / Режим доступа: [http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19\\_probiotics\\_prebiotics.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/en/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics.pdf)].



9. Sanders M.E. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*/ M.E. Sanders, L. Morelli, T.A. Tompkins //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.— 2003. – V. 2. – P. 101–110.

10. Sorokulova I. Preclinical Testing in the Development of Probiotics: Regulatory Perspective with *Bacillus* Strains as an Example.//Clinical Infectious Diseases. – 2008. – V. 46. – P. 92–95.

11. Пат. № 76669, А61К 35/74, А61Р 31/00. Біопрепарат для лікування та профілактики кишкових та гнійних інфекцій у тварин / Сафронова Л.А., Осадча А.І., Кудрявцев В.О.; заявник і патентовласник Інститут мікробіології і вірусології НАН України. -№ а200504434; заявл.12.05.2006. – Опубл.15.08.2006, Бюл.№ 8.

Стаття надійшла до редакції 03.02.2015 р.



**А.М. Венгер, Н.Е. Волкова**

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення,  
вул. Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,  
тел.: +38 (048)789 52 89, e-mail: venger87@ukr.net

## **МОЛЕКУЛЯРНА БІОТЕХНОЛОГІЯ ДІАГНОСТИКИ БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО**

**Мета.** Розробка молекулярної біотехнології діагностики бактеріального раку у хмелю звичайного. **Методи.** Ізоляція чистої культури клітин, екстракція ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), гель-електрофорез. **Результати досліджень.** Для екстракції тотальної ДНК з тканин хмелю звичайного використано буфер, який враховує наявність у тканинах хмелю специфічних сполук. Проведена ПЛР з праймерами до генів вірулентності і патогенності *Ti*-плазміді і ДНК чистої культури збудника бактеріального раку рослин *Agrobacterium tumefaciens*, здорових зразків хмелю звичайного, зразків хмелю звичайного з візуальними симптомами бактеріального раку і суміші ДНК агробактерій і здорового хмелю, взяті в пропорції 1:1, 1:5, 1:10. Отримано продукти ПЛР з праймерами до генів патогенності і вірулентності *Ti*-плазміді і ДНК, виділеними з чистої культури *A. tumefaciens*, тканин зразків хмелю звичайного з візуальними симптомами ураження агробактерій і суміші ДНК агробактерій і здорового хмелю. За результатами ПЛР з тотальною ДНК здорових зразків хмелю і в негативному контролі (ПЛР-суміш без ДНК) продуктів ампліфікації не виявлено. Хворими бактеріальним раком вважали ті зразки хмелю звичайного, в тотальній ДНК яких виявлено гени вірулентності і патогенності *Ti*-плазміді. Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного складається з етапу виділення і очищення тотальної ДНК з тканин хмелю, етапу двокрокової ПЛР-детекції *Ti*-плазміді і генів *ipt* і *virD2*, що відповідають за патогенність і вірулентність, і етапу гель-електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації, їх візуалізації та обліку результатів. **Висновки.** Діагностика бактеріального раку хмелю повинна включати детекцію генів патогенності і вірулентності *ipt* і *virD2*.

*Ключові слова:* хміль звичайний, бактеріальний рак, полімеразна ланцюгова реакція, біотехнологія.

Хміль європейський, або звичайний *Humulus lupulus* L., відноситься до родини *Cannabaceae*. Шишки використовують традиційно для пивоваріння, але завдяки наявності унікальних біоактивних компонентів хміль використовується також у медицині, харчовій, фармакологічній промисловості [2]. У період росту і розвитку хміль уражується чисельними патогенами, що викликають хвороби, які призводять до зниження кількості та якості врожаю.

Одним із патогенів хмелю звичайного є збудник бактеріального раку грам-негативна бактерія *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend, Conn). Даний



патоген інтеркалює патогенну Ті-плазмиду в геном рослини, що ініціює синтез фітогормонів, які викликають надмірний поділ клітини та утворення пухлини. Така пухлина руйнується при низьких температурах, що може викликати загибель рослини [4]. Уражена рослина може змінити свої якості, зокрема, рівень гірких та ароматичних кислот в складі шишок. *A. tumefaciens* є ґрунтовою бактерією, через що її накопичення у ґрунті може викликати контамінацію рослини шляхом попадання через пошкоджені підземні частини [1]. Невиліковність бактеріального раку робить актуальним проведення ранньої детекції *A. tumefaciens* у рослин, добору рослин, вільних від збудника, та їх подальше розмноження в умовах, що запобігають ураженню.

Для діагностики захворювання використовується мікробіологічний метод, який є довготривалим, дозволяє виявити збудника бактеріального раку рослин *A. tumefaciens*, але не виявляє у агробактерії патогенну Ті-плазмиду. Також запропоновано поєднання мікробіологічного та молекулярно-біологічного методів, спрямованих на культивування *A. tumefaciens* на поживному середовищі та подальшу ідентифікацію патогенних штамів з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [3]. Але використання такого підходу є довготривалою процедурою та має низку недоліків. По-перше, існує вірогідність невиявлення *A. tumefaciens*, адже таким чином можна виявити лише ті клітини, що проросли на середовищі. По-друге, здійснюється ідентифікація патогенних штамів *A. tumefaciens* через наявність продуктів ампліфікації з праймерами до генів вірулентності або патогенності, але наявність патогенних властивостей не обумовлює наявності вірулентних, і навпаки. Все це робить актуальним розробку надійного та ефективного способу детекції бактеріального раку хмелю звичайного.

Мета даної роботи полягала в розробці молекулярної біотехнології діагностики бактеріального раку у хмелю звичайного.

### Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували рослини сортів хмелю звичайного Альта та Клон 18, люб'язно надані Інститутом сільського господарства Полісся НААН.

Тотальну ДНК виділяли з листя або мікропагонів п'яти здорових, введених в культуру *in vitro* та бруньок п'яти хворих з візуальними симптомами ураження *A. tumefaciens* – наявністю корончатих галів зразків сортів хмелю за методом [5] (далі – здорові та хворі зразки, відповідно). ДНК з ізольованої культури *A. tumefaciens* виділяли за методом [3].

З листя, бруньок та мікропагонів зразка сорту Альта з візуальними симптомами захворювання на бактеріальний рак в чисту культуру ізольовано агробактерії на поживне середовище YPGA для культивування бактерій біовару 1 (патогенного для хмелю) [6].

Умови ПЛР та послідовності праймерів наведено в [3]. ПЛР проводили у трьох повторностях. Електрофоретичний розподіл (в 2 % агарозних гелях) та візуалізацію продуктів ампліфікації проведено за загальноприйнятими методами.



### Результати та обговорення

Більшість праймерів, сконструйованих для видо- і родоспецифічної детекції патогенів, засновано на варіабельності послідовностей ДНК в регіонах внутрішніх транскрибованих спейсерів ядерної рибосомної ДНК. Кластери рибосомних генів завдяки особливостям їх структурно-функціональної організації є найбільш перспективними для діагностичного використання. Регіони багатокопійної рДНК, які включають внутрішні транскрибовані спейсери (ITS1 і ITS2) і 5,8S рДНК, придатні для ампліфікації в ПЛР і містять ділянки, які значно різняться за швидкістю молекулярної еволюції.

Для видової ПЛР-детекції агробактерії досліджували консервативну послідовність гена патогенності Ті-плазміді *ipt*, що містить внутрішні транскрибовані спейсери, за допомогою ПЛР з парою праймерів Cyt F і Cyt R, очікувана довжина продукту ампліфікації 427 пар нуклеотидів (п.н.), та найбільш консервативний регіон гена вірулентності *virD2* за допомогою ПЛР з парою праймерів vir A і vir C, довжина продукту ампліфікації 224 п.н.

Проведено ПЛР-аналіз ДНК здорових та хворих зразків хмелю, чистої культури *A. tumefaciens* та суміші ДНК здорових зразків хмелю і чистої культури *A. tumefaciens* в співвідношенні 1:1, 5:1, 10:1. Продукти ПЛР довжиною 224 п.н. та 427 п.н. виявлені у зразках ДНК, виділеної з чистої культури *A. tumefaciens*, уражених зразків хмелю та сумішей тотальної ДНК здорових зразків хмелю та *A. tumefaciens* (рис.). При ПЛР-аналізі ДНК здорових зразків хмелю та в негативном контролі (ПЛР-суміш без ДНК) продуктів ампліфікації не виявлено.

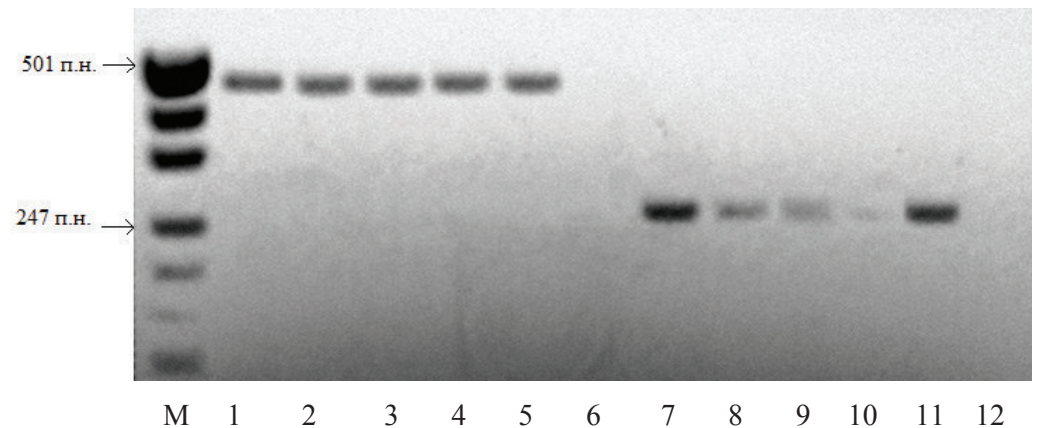


Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації регіонів генів *ipt* (1-6) та *virD2* (7-12) в ДНК *A. tumefaciens* (1, 7), суміші ДНК *A. tumefaciens* та хмелю сорту Альта в співвідношенні 1:1, 1:5, 1:10 (2-4, 8-10), ДНК хворого (5, 11) та здорового (6, 12) зразків хмелю сорту Альта. М – маркер молекулярної маси pUC19 ДНК/MspI

Fig. Electrophoregram of the amplification products of genes *ipt* (1-6) and *virD2* (7-12) in DNA of *A. tumefaciens* (1, 7), the mixture of DNA *A. tumefaciens* and hop variety Alta in the ratio 1:1, 1:5, 1:10 (2-4, 8-10), DNA of the ill (5, 11) and healthy (6, 12) samples of hop variety Alta. M- molecular weight marker pUC19 DNA/MspI

Оскільки наявність патогенних властивостей у бактерій не обумовлює наявності вірулентних, і навпаки, то хворими на бактеріальний рак зразками хмелю та патогенними штамми агробактерії вважали ті, виділена ДНК з яких мала одночасно сайти праймування як для праймерів до гена патогенності Ті-плазмід *ipt*, так і гена вірулентності *virD2*.

Двохетапна перевірка присутності в тотальній ДНК Ті-плазмід важлива для оцінювання ризику наявності патогенних штамів *A. tumefaciens* у тканині хмелю. Так, за наявності в Ті-плазміді регіону *virD2*, який відповідає за вірулентність, але при відсутності гена патогенності *ipt*, *A. tumefaciens* не здатний викликати бактеріальний рак, тому при відсутності гена *ipt* наявність *A. tumefaciens* є припустимою [3]. Слід зазначити важливість етапу виділення та очищення ДНК із зразків тканин хмелю саме методом, який враховує наявність таких специфічних сполук, як гумулон, лупулон, ксантагумол та ін. [5]. Використання даного методу виділення тотальної ДНК з зразків хмелю дозволяє уникнути стадії ізоляції патогенів для їх ідентифікації та проводити їх видову детекцію безпосередньо на рівні геномів в багатокомпонентній системі.

За використанням даного підходу проведено діагностику донорних рослин сортів Клон 18 та Альта та добрано зразки для введення в культуру *in vitro* 10 зразків чубуків кожного сорту. Подальше спостереження за даними зразками в процесі розмноження показало відсутність інфекції.

Таким чином, розроблена молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного містить етап виділення та очищення тотальної ДНК з тканин хмелю, етап двокрокової ПЛР-детекції Ті-плазмід та генів *ipt* і *virD2*, що відповідають за патогенність та вірулентність, та етап гель-електрофоретичного розподілу продуктів ампліфікації, їх візуалізації та врахування результатів. Запропонована біотехнологія є надійним та ефективним підходом для експрес-діагностики бактеріального раку хмелю звичайного на ранніх стадіях патогенеза.

Діагностика бактеріального раку хмелю звичайного повинна включати детекцію генів патогенності та вірулентності *ipt* і *virD2*.

Молекулярна біотехнологія діагностики бактеріального раку хмелю звичайного складається з етапів екстракції тотальної ДНК з урахуванням очищення від специфічних для тканин хмелю речовин, двокрокової ПЛР-ампліфікації регіонів Ті-плазмід в багатокомпонентній системі «рослина-патоген», гель-електрофорезу та обчислення результатів аналізу.

## А.Н. Венгер, Н.Э. Волкова

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения,  
ул. Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина,  
тел.: +38 (048)789 52 89, e-mail: venger87@ukr.net

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ХМЕЛЯ ОБЫКНОВЕННОГО

### Реферат

**Цель.** Разработка молекулярной биотехнологии диагностики бактериального рака у хмеля обыкновенного. **Методы.** Изоляция чистой культуры клеток, экстракция ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), гель-электрофорез. **Результаты исследований.** Для экстракции тотальной ДНК из тканей хмеля обыкновенного использован буфер, который учитывает наличие в тканях хмеля специфических соединений. Проведена ПЦР с праймерами к генам вирулентности и патогенности Ti-плазмиды и ДНК чистой культуры возбудителя бактериального рака растений *Agrobacterium tumefaciens*, здоровых образцов хмеля обыкновенного, образцов хмеля обыкновенного с визуальными симптомами бактериального рака и смеси ДНК агробактерий и здорового хмеля, взятых в пропорции 1:1, 1:5, 1:10. Получены продукты амплификации ДНК, выделенной из чистой культуры *A. tumefaciens*, тканей образцов хмеля обыкновенного с визуальными симптомами поражения агробактериями, и смеси ДНК агробактерий и здорового хмеля. В результате ПЦР-анализа в ДНК здоровых образцов хмеля и негативном контроле (ПЦР-смесь без ДНК) продуктов амплификации не обнаружено. Больными бактериальным раком считали те образцы хмеля обыкновенного, в тотальной ДНК которых выявлено гены вирулентности и патогенности Ti-плазмиды. Молекулярная биотехнология диагностики бактериального рака хмеля обыкновенного состоит из этапа выделения и очистки тотальной ДНК из тканей хмеля, этапа двушаговой ПЦР-детекции Ti-плазмиды и генов *ipt* и *virD2*, отвечающих за патогенность и вирулентность, и этапа гель-электрофоретического разделения продуктов амплификации, их визуализации и учета результатов. **Выводы.** Диагностика бактериального рака хмеля должна включать детекцию генов патогенности и вирулентности *ipt* и *virD2*.

*Ключевые слова:* хмель обыкновенный, бактериальный рак, полимеразная цепная реакция, биотехнология.

A.M. Venger, N.E. Volkova

Plant-Breeding and Genetics Institute; 3, Ovidiopska doroga Str., Odesa, 65036, Ukraine,  
tel.: +38 (048)789 52 89, e-mail: venger87@ukr.net

## MOLECULAR BIOTECHNOLOGY OF HOP CROWN GALL DIAGNOSTIC

### Summary

**Aim.** The development of molecular biotechnology for crown gall diagnosis in hop.  
**Methods.** Isolation of pure culture cells, extraction of DNA, polymerase chain reac-





tion (PCR), gel electrophoresis. **Results.** For the total DNA extraction from the tissue there were used the buffer, which recorded the presence in hop tissue such specific compounds as humulone, lupulon, xanthohumol and others. There were performed PCRs with primers for genes of virulence and pathogenicity of the Ti-plasmid and DNAs extracted from the pure culture of the crown gall causative *Agrobacterium tumefaciens*, healthy samples of hop, hop samples with visual crown gall symptoms and *agrobacterium* and hop DNA mixtures at the ratio of 1:1 1:5, 1:10. PCR products were obtained with the primers to virulence and pathogenic genes of Ti-plasmid and DNA extracted from a pure culture of *A. tumefaciens*, the hop tissue samples with visual symptoms of crown gall and the mixtures of DNA from hop. According to the results of PCRs with total DNA from healthy samples of hops and controls (PCR-mix without DNA) the amplification products were not observed. Infected by crown gall were considered those samples of hop in which the total DNA virulence and pathogenicity genes of Ti-plasmid were identified. **Conclusion.** The diagnosis of hops should include the detection of pathogenes and virulence genes *ipt* and *virD2*.

*Key words:* *Humulus lupulus*, crown gall, polymerase chain reaction, biotechnology.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ліманська Н. В. Наявність патогенних штамів *Agrobacterium vitis* у ґрунті виноградників // Вісник аграрної науки. – 2005. – № 2. – С. 81–83.
2. Chadwick L. R., Pauli G. F., Farnsworth N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties // *Phytomedicine* – 2006. – 13. – P. 119–131.
3. Haas J. M., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – 61, № 8. – P. 2879–2884.
4. Jia Y. H., Lia L. P., Houa Q. M., Pana Shen Q. An *Agrobacterium* gene involved in tumorigenesis encodes an outer membrane protein exposed on the bacterial cell surface // *Gene*. – 2002. – 284. – P. 113–124.
5. Okada Y., Saeki K., Inaba A., Suda N., Kaneko T., Ito K. Construction of gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter // *Plant Physiol.* – 2003. – 160. – P. 1101–1108.
6. Pionnat S., Keller H., Richer D. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // *Appl. Environm. Microbiol.* – 1999. – 65, № 9. – P. 4197–4206.

Стаття надійшла до редакції 04.12.2014 р.



УДК 579.851.2+579.264+577.152.3+582.28

**А.А. Рой, Е.С. Харкевич**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,  
e-mail: allroy@ukr.net

## **МИКОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ ПОЧВЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* SОНН**

**Цель.** Исследование хитинолитической активности у фосфатмобилизирующих почвенных бактерий рода *Bacillus*, а также их антагонистических свойств к микроскопическим грибам. **Методы.** В работе исследованы 16 штаммов фосфатмобилизирующих почвенных бактерий рода *Bacillus* и штаммы микромицетов – сапрофитов и фитопатогенов. Для определения антагонистической активности бацилл к микромицетам применяли метод блоков и лунок, используя как культуры бацилл, выращенные на агаризованной питательной среде, так и их супернатанты. Степень угнетения роста грибов при совместном культивировании с бациллами в статических условиях в жидкой питательной среде определяли гравиметрически по разности абсолютно сухого веса мицелия в контроле и опыте. Хитинолитическую активность бацилл определяли по образованию редуцирующих сахаров при гидролизе коллоидного хитина с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты фотокolorиметрически. При статистической обработке полученных данных использовали критерий Стьюдента для 5%-ного уровня значимости. **Результаты.** Установлено наличие хитинолитической активности у всех исследованных бацилл в среде с коллоидным хитином. Штаммы, проявившие высокую хитинолитическую активность (*B. megaterium* 16, *B. pumilus* 7, *B. cereus* v. *tyusoides* 10), также обладали высокой антагонистической активностью к фитопатогенным грибам (*Fusarium oxysporum* 54 и *Trichothecium roseum* 658). Бациллы способны использовать автоклавированный мицелий грибов в качестве единственного источника углерода и азота. При совместном культивировании микроскопических грибов с бактериями в статических условиях отмечены угнетение роста и наличие морфологических изменений – образование вздутий и зон лизиса мицелия. **Выводы.** Показано, что фосфатмобилизирующие штаммы почвенных бактерий рода *Bacillus* проявляют хитинолитическую активность, а также угнетают рост грибов-фитопатогенов и вызывают их морфологические изменения при совместном культивировании. Установлена прямая зависимость между антагонистической и хитинолитической активностью у бацилл. На примере *B. cereus* v. *tyusoides* 10 показана способность бацилл использовать автоклавированный мицелий грибов в качестве единственного источника углерода и азота.

**Ключевые слова:** хитинолитическая и антагонистическая активность, р. *Bacillus*, микромицеты.

© А.А. Рой, Е.С. Харкевич, 2015



В последнее время ведется интенсивный поиск альтернативных экологически безопасных способов защиты растений, одним из направлений которого является использование препаратов на основе микроорганизмов. Представители рода *Bacillus* являются перспективными для биологического контроля, обладая способностью продуцировать не только миколитические ферменты, но и ряд веществ, специфически угнетающих синтез клеточной стенки грибов и нарушающих проницаемость клеточных мембран [1, 11, 15]. Антифунгальную активность бактерий часто ассоциируют с наличием ферментов, гидролизующих хитин – один из основных компонентов клеточной стенки грибов [9]. Так, отмечают антагонистическую активность изолятов рода *Bacillus* к микромицетам, которые поражают зерновые культуры (степень подавления патогенов 26,7–79,6%). Причем все исследованные изоляты продуцировали хитиназы [13]. Известно, что штаммы *Paenibacillus polymyxa* характеризовались антигрибной, фосфатрастворяющей активностью, а также способностью усиливать рост растений [14]. Выделенные нами ранее фосфатмобилизирующие штаммы бактерий рода *Bacillus* используют труднорастворимые неорганические и органические соединения фосфора, проявляют антагонистическую активность к фитопатогенным бактериям и грибам, а также положительно влияют на всхожесть семян, рост и развитие различных растений. Так, они снижали поражение семян хвойных растений микромицетами на 85–95% [8]. Таким образом, представляло интерес изучить их миколитическую активность к некоторым видам патогенных микромицетов.

Целью работы было исследование хитинолитической активности у фосфатмобилизирующих почвенных бактерий рода *Bacillus*, а также их антагонистических свойств к микроскопическим грибам.

### Материалы и методы

Объектами исследований были 16 штаммов фосфатмобилизирующих почвенных бактерий рода *Bacillus*, изолированных из образцов черноземной почвы, а также штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 Stm<sup>r</sup>, резистентный к стрептомицину (1600 мкг/мл), полученный методом спонтанного мутагенеза путем последовательных пересевов на картофельный агар с повышенными концентрациями стрептомицина [7]. Штамм обладал биологическими свойствами, подобными природному родительскому штамму *B. subtilis* ИМВ В-7023, и может использоваться как индикаторная культура для изучения процессов колонизации корневой зоны растений, влияния на их ростовую активность и биологического контроля фитопатогенных микроорганизмов [7, 8]. В экспериментах также использовали *Fusarium oxysporum* Schltdl. 54, *Trichothecium roseum* (Pers.) Link 658 – возбудителей болезней сельскохозяйственных культур и сапрофит *Trichoderma viride* Pers. 614 [2] из коллекции отдела физиологии и систематики микромицетов ИМВ НАН Украины.

Бактерии выращивали в течение 72 час при 25 °С в жидкой среде состава, (г/л): коллоидный хитин [5] – 5,0; пептон – 3,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O – 0,5.



Хитиноподобную активность определяли по образованию редуцирующих сахаров при гидролизе коллоидного хитина с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты [13]. Активность рассчитывали как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль N-ацетилглюкозамина за 1 час. Удельную хитиноподобную активность определяли, рассчитывая ее на мг белка [10]. При изучении антагонистической активности бактерий к микромицетам использовали метод блоков и лунок [3]. Суспензию конидий гриба ( $2,0 \times 10^6$ /мл) засеивали в чашки Петри с агаризованным сушлом, на поверхности которого размещали блоки с культурой бактерий, или делали лунки ( $d=8$  мм), в которые добавляли 0,1 мл супернатанта культуры. Совместное культивирование *F. oxysporum* 54 с бактериями, проявившими наибольшую антагонистическую активность, а также с *B. subtilis* IMB B-7023 Stm<sup>+</sup>, проводили в жидкой среде Чапека в статических условиях при 25 °С в течение 7 суток. Бактерии предварительно выращивали в течение двух суток на агаризованной среде, указанного выше состава, клетки суспендировали в физиологическом растворе и вносили в среду Чапека ( $1,0 \times 10^8$  кл/мл) одновременно с суспензией конидий 2-х недельных культур гриба в концентрации ( $2,0 \times 10^6$  конидий/мл). После совместного культивирования полученную биомассу отмывали физиологическим раствором, высушивали при 105 °С до постоянного веса. Степень угнетения роста гриба рассчитывали по разности значений массы сухого мицелия в контроле (культура гриба, выращенного в таких же условиях, но без внесения бактерий) и опыте. Препараты фиксировали жаром, окрашивали раствором фуксина и исследовали в световом микроскопе МБИ-15. Для получения мицелия как субстрата для бактерий гриба выращивали в жидкой среде Чапека при 26–28 °С на протяжении 14 суток. Мицелий отфильтровывали и отмывали дистиллированной водой. Полученную биомассу высушивали на воздухе, измельчали и добавляли в качестве источника углерода и азота (0,5%) в жидкую среду на основе водопроводной воды без добавления минеральных солей. Среду стерилизовали при 0,5 атм. Концентрацию роста бактерий определяли по оптической плотности на фотокolorиметре КФК-2 при длине волны 540 нм.

Опыты проводили в 3-х кратной повторности. При статистической обработке полученных данных использовали критерий Стьюдента для 5%-ного уровня значимости [6].

### Результаты и их обсуждение

Установлено, что все исследованные штаммы бактерий рода *Bacillus* способны угнетать рост *T. roseum* 658 и *F. oxysporum* 54 в разной степени. Так, *B. megaterium* 1, 12; *B. cereus* v. *mycoides* 14; *B. subtilis* 13 не проявили антагонизма к *F. oxysporum* 54 в отличие от *B. megaterium* 16 и *B. pumilus* 7, которые были активны по отношению к данному фитопатогену. Следует отметить, что подобным действием обладали как клетки, так и их супернатанты, причем в первом случае эффект был более выраженным (табл. 1, рис. 1).



Таблица 1

Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бактерий  
рода *Bacillus* по отношению к фитопатогенным грибам

Table 1

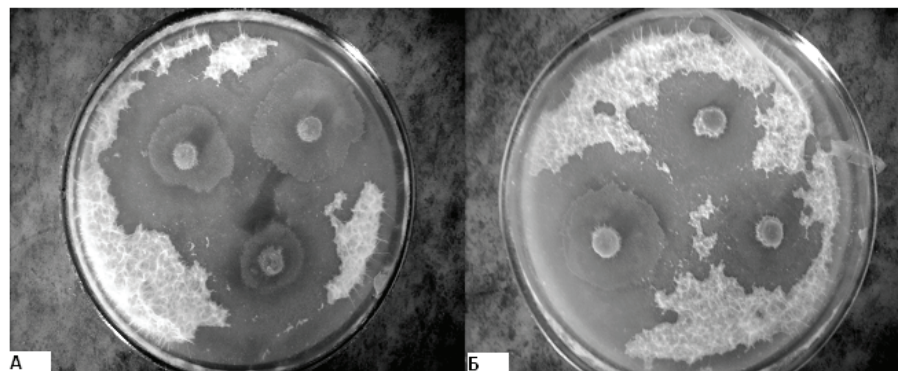
Antagonistic activity of phosphate-mobilizing bacteria  
of the genus *Bacillus* towards phytopathogenic fungi

Штаммы	Зона задержки роста грибов бациллами, мм			
	<i>Trichothecium roseum</i> 658		<i>Fusarium oxysporum</i> 54	
	Клетки бацилл	Супернатант бацилл	Клетки бацилл	Супернатант бацилл
<i>B. cereus</i> v. <i>mycooides</i> 6	7,3±0,8	12,0±0,0	12,0±0,69	-
<i>B. cereus</i> v. <i>mycooides</i> 10	25,0±0,69	14,0±0,69	16,0±0,69	13,67±0,4
<i>B. cereus</i> v. <i>mycooides</i> 14	16,3±0,4	15,3±0,4	-	-
<i>B. megaterium</i> 1	11,67±0,4	11,0±0,69	-	-
<i>B. megaterium</i> 2	11,3±0,4	6,0±0,69	9,3±0,4	7,0±0,69
<i>B. megaterium</i> 9	15,3±0,4	11,0±1,2	11,3±1,06	-
<i>B. megaterium</i> 12	9,3±0,4	11,33±1,06	6,0±0,7	11,33±1,06
<i>B. megaterium</i> 16	13,0±0,69	12,67±0,4	26,0±0,69*	13,0±0,7
<i>B. subtilis</i> 11	15,0±0,0	13,67±0,8	-	-
<i>B. subtilis</i> 13	17,3±0,4	15,67±0,4		
<i>B. subtilis</i> 15	13,0±1,38	10,3±1,45	9,0±0,69	-
<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023	12,3±0,4	9,0±0,69	22,3±0,4*	18,0±0,69
<i>B. subtilis</i> ИМВ В-7023 Stm <sup>r</sup>	11,0±0,69	6,0±0,69	9,0±0,69	8,0±0,69
<i>B. pumilus</i> 3	11,67±0,4	10,67±0,4	8,0±0,69	-
<i>B. pumilus</i> 4	17,0±0,0	16,3±0,4	12,3±0,4	-
<i>B. pumilus</i> 7	15,3±1,06	13,3±1,06	28,3±1,06*	13,0±0,7
<i>B. pumilus</i> 8	14,67±0,4	17,67±0,8	10,67±0,8	-

Примечание: \* – наибольшие зоны задержки роста *F. oxysporum* 54  
Note: \* – size of the largest areas of growth retardation of *F. oxysporum* 54 were allocated

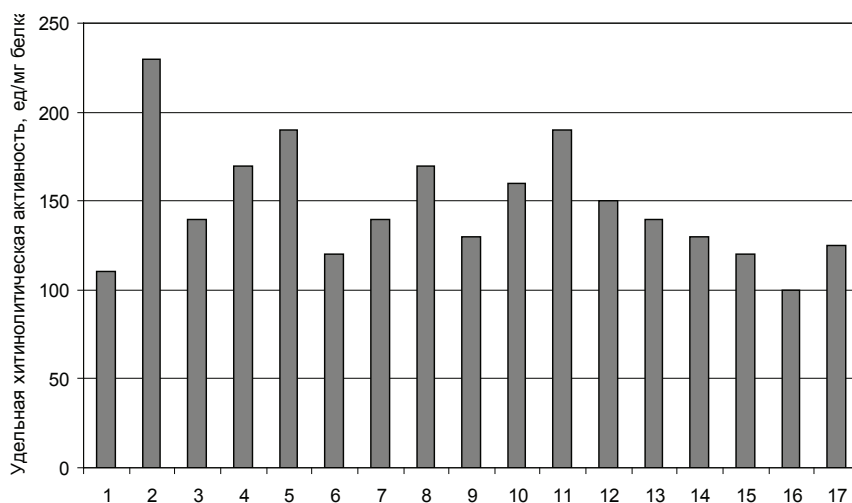
Нами установлено наличие хитинолитической активности у всех исследуемых штаммов бацилл при культивировании в жидкой среде с коллоидным хитином. Данные других исследователей свидетельствуют о наличии такой активности лишь у 30% исследованных штаммов бацилл [4]. Наибольшей активностью отличался штамм *B. cereus* v. *mycooides* 10 (230 ед/мг). Для *B. megaterium* (штаммы 1, 2, 16) и *B. pumilus* (штаммы 4, 7, 8) эти показатели были несколько ниже – 170–190 и 150–190 ед/мг соответственно (рис. 2).





**Рис. 1. Антагонистическая активность *Bacillus megaterium* 16 (А) и *Bacillus pumilus* 7 (Б) по отношению к *Fusarium oxysporum* 54 (метод блоков)**

**Fig. 1. Antagonistic activity of *Bacillus megaterium* 16 (A) and *Bacillus pumilus* 7 (Б) towards *Fusarium oxysporum* 54 (block method)**



**Рис. 2. Удельная хитинолитическая активность бактерий рода *Bacillus* в среде с коллоидным хитином**

Примечание: 1 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 6; 2 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 10; 3 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 14; 4 – *Bacillus megaterium* 1; 5 – *Bacillus megaterium* 2; 6 – *Bacillus megaterium* 9; 7 – *Bacillus megaterium* 12; 8 – *Bacillus megaterium* 16; 9 – *Bacillus pumilus* 3; 10 – *Bacillus pumilus* 4; 11 – *Bacillus pumilus* 7; 12 – *Bacillus pumilus* 8; 13 – *Bacillus subtilis* 11; 14 – *Bacillus subtilis* 13; 15 – *Bacillus subtilis* 15; 16 – *Bacillus subtilis* ИМБ В-7023 Stm<sup>r</sup>; 17 – *Bacillus subtilis* ИМБ В-7023

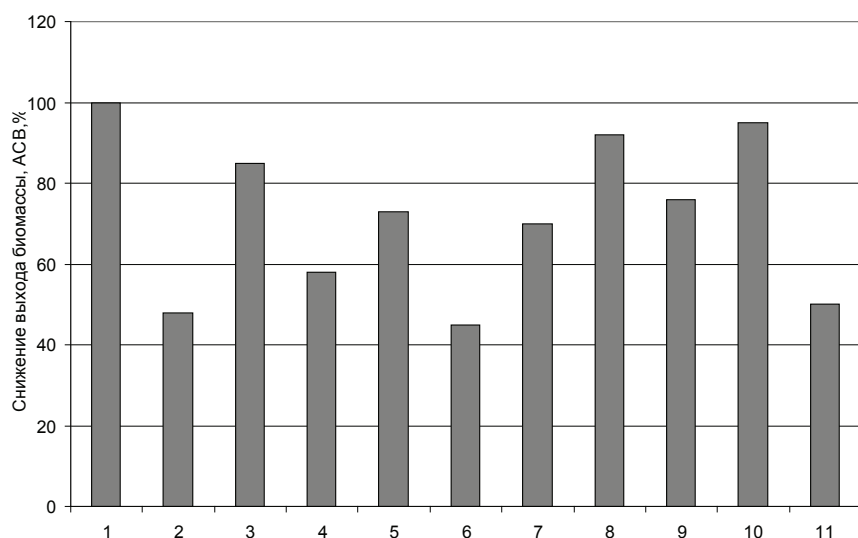
**Fig. 2. Specific chitinolytic activity of bacteria of genus *Bacillus* in medium with colloidal chitin**

Notes: 1 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 6; 2 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 10; 3 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 14; 4 – *Bacillus megaterium* 1; 5 – *Bacillus megaterium* 2; 6 – *Bacillus megaterium* 9; 7 – *Bacillus megaterium* 12; 8 – *Bacillus megaterium* 16; 9 – *Bacillus pumilus* 3; 10 – *Bacillus pumilus* 4; 11 – *Bacillus pumilus* 7; 12 – *Bacillus pumilus* 8; 13 – *Bacillus subtilis* 11; 14 – *Bacillus subtilis* 13; 15 – *Bacillus subtilis* 15; 16 – *Bacillus subtilis* ИМБ В-7023 Stm<sup>r</sup>; 17 – *Bacillus subtilis* ИМБ В-7023



Следует отметить, что эти величины превышают регистрируемые для представителей рода *Bacillus* – 1,36 мкмоль/мин на 1 мг белка [4]. Штаммы, проявившие высокую антагонистическую активность (*B. megaterium* 16, *B. pumilus* 7, *B. cereus* v. *mycooides* 10), также обладали и высокой хитиноподобной активностью, что дает возможность предположить перспективность их применения в растениеводстве. Резистентный к стрептомицину штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023 Stm<sup>r</sup> показал наименьшую активность – 100 ед/мг.

При совместном культивировании наиболее активных штаммов бацилл-антагонистов, а также резистентного штамма *B. subtilis* ИМВ В-7023 Stm<sup>r</sup> и *F. oxysporum* 54 было установлено, что исследованные бактерии угнетали рост гриба на 5–60% (относительно контроля) (рис. 3).



**Рис. 3.** Угнетение роста мицелия *Fusarium oxysporum* 54 штаммами рода *Bacillus* при совместном культивировании в среде Чапека

Примечание: 1 – *Fusarium oxysporum* 54; 2 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 10; 3 – *Bacillus megaterium*, 4 – *Bacillus megaterium* 2, 5 – *Bacillus pumilus* 4, 6 – *Bacillus pumilus* 7, 7 – *Bacillus pumilus* 8, 8 – *Bacillus subtilis* 11, 9 – *Bacillus subtilis* 13, 10 – *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 Stm<sup>r</sup>, 11 – *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023

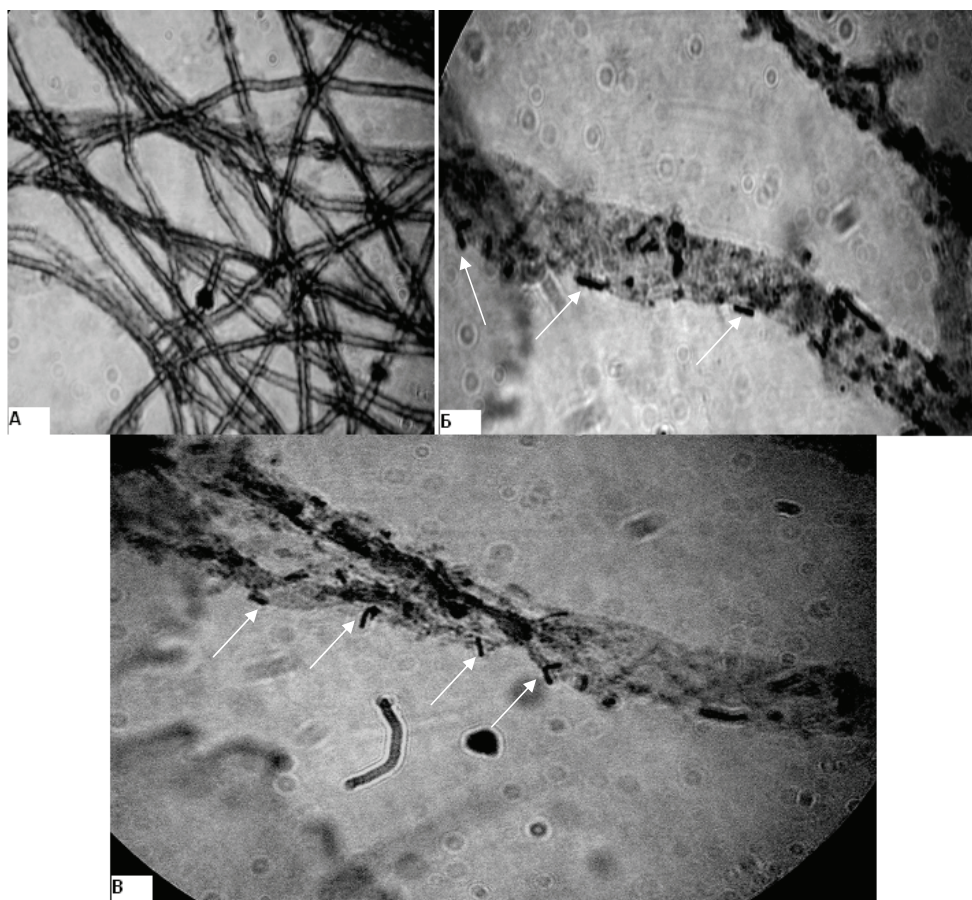
**Fig. 3.** Inhibition of growth of mycelium *Fusarium oxysporum* 54 by strains of genus *Bacillus* at mixed cultivation on Czapek medium

Note: 1 – *Fusarium oxysporum* 54; 2 – *Bacillus cereus* v. *mycooides* 10; 3 – *Bacillus megaterium*, 4 – *Bacillus megaterium* 2, 5 – *Bacillus pumilus* 4, 6 – *Bacillus pumilus* 7, 7 – *Bacillus pumilus* 8, 8 – *Bacillus subtilis* 11, 9 – *Bacillus subtilis* 13, 10 – *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 Stm<sup>r</sup>, 11 – *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023

Наибольшее угнетение регистрировали при совместном культивировании гриба с теми бациллами, у которых была отмечена высокая хитиноподобная активность. Так, штамм *B. cereus* v. *mycooides* 10, обладающий наибольшей активностью, угнетал рост *F. oxysporum* 54 на 60% по отношению к контролю. До 50% угнетал рост гриба штамм *B. subtilis* ИМВ В-7023, являющийся-

ся компонентом бактериальных препаратов для растениеводства. Мутант *B. subtilis* ИМВ В-7023  $Stm^r$  обладал низкой хитинолитической активностью и незначительно угнетал рост фитопатогена – всего лишь на 5%. При этом наблюдали адгезию клеток бактерий на гифах и морфологические изменения мицелия – образование вздутий и зон лизиса мицелия (рис. 4), что согласуется с данными литературы [1].

Так, при выращивании бацилл в хитинсодержащих средах они продуцируют комплекс ферментов, эффективно гидролизующих клеточные стенки грибов. Причем хитиназы и  $\beta$ -1,3-глюканазы наиболее активно осуществляли этот процесс.



**Рис. 4.** Влияние *Bacillus megaterium* 16 на морфологию *Fusarium oxysporum* 54 при совместном культивировании в среде Чапека (90x10).  
А – контроль; Б, В – изменения мицелия, вызванные бактериями (стрелками указаны точки прикрепления и воздействия бактерий)

**Fig. 4.** Influence of *Bacillus megaterium* 16 on morphology of *Fusarium oxysporum* 54 at mixed cultivation on Czapek medium  
А – control; Б, В – mycelial changes caused by bacteria (the arrows show the sites of attachment and the effects of bacteria)



Штамм *B. cereus* v. *mycooides* 10, проявивший наиболее высокую антагонистическую и хитиноподобную активность, культивировали в среде с автоклавированным мицелием каждого из 3-х исследованных штаммов грибов, как единственным источником углерода и азота. Показано, что высокие показатели хитиноподобной активности наблюдали в среде с мицелием *Trichothecium roseum* (100%); тогда как с мицелием *Trichoderma viride* 614 она составляла – 27%, а с мицелием *F. oxysporum* 54 – 18%, соответственно (табл. 2). Установлено, что при использовании мицелия *T. roseum* 658 удельная хитиноподобная активность бациллы возрастала на 26,7% по сравнению с таковой в среде с коллоидным хитином. Однако при использовании мицелия *T. viride* 614 и *F. oxysporum* 54 величина активности была значительно ниже – на 38,2 и 58,7%, соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Удельная хитиноподобная активность и рост  
*Bacillus cereus* v. *mycooides* 10 в среде с мицелием микромицетов

Table 2

Specific chitinolytic activity and growth of  
*Bacillus cereus* v. *mycooides* 10 on the medium with mycelium of micromycetes

Микромицет	Удельная хитиноподобная активность, ед/мг	Оптическая плотность суспензии бактерий, ед
<i>Trichothecium roseum</i> 658	288,0±21,1	1,2±0,11
<i>Trichoderma viride</i> 614	178,0±15,5	0,5±0,02
<i>Fusarium oxysporum</i> 54	119,0±10,0	1,6±0,1

Следует отметить, что корреляция роста и хитиноподобной активности не была установлена. На примере *B. cereus* v. *mycooides* 10 показана его способность не только угнетать рост живой культуры грибов, но и разрушать мертвый мицелий, используя его в качестве единственного источника углерода и азота в среде, что опосредованно подтверждает возможность разложения мицелия грибов бациллами в почве [12]. Наряду с установленными антагонистическими свойствами и хитиноподобной активностью, эти результаты могут свидетельствовать о наличии миколитического потенциала у исследованных штаммов и возможных перспективах их использования в качестве составляющих комплексных препаратов для растениеводства в дальнейшем. Данные литературы свидетельствуют о комплексной природе антагонистической активности бактерий р. *Bacillus* [1, 6]. Роль хитиноподобных ферментов очевидна, так как хитин – один из основных компонентов клеточной стенки грибов [9]. Однако механизмы антагонизма зависят как от штаммовых особенностей бактерий-антагонистов, так и от вида гриба-патогена.

Таким образом, показано, что фосфатмобилизирующие штаммы почвенных бактерий рода *Bacillus* проявляют хитиноподобную активность, а также угнетают рост грибов-фитопатогенов и вызывают их морфологические из-

менения при совместном культивировании. Установлена прямая зависимость между антагонистической и хитиноподобной активностью у бацилл. На примере *B. cereus* v. *tyucoides* 10 показана способность бацилл использовать автоклавированный мицелий грибов в качестве единственного источника углерода и азота.

А.О. Рой, О.С. Харкевич

Институт мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,  
e-mail: allroy@ukr.net

## МІКОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ФОСФАТМОБІЛІЗУВАЛЬНИХ ГРУНТОВИХ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* SOHN

### Реферат

**Метою** роботи було дослідження хітиноподобної активності фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій роду *Bacillus*, а також їх антагоністичних властивостей щодо мікроскопічних грибів. **Методи.** В роботі досліджені 16 штамів фосфатмобілізувальних ґрунтових бактерій роду *Bacillus* і штами мікроміцетів – сапрофітів та фітопатогенів. Для визначення антагоністичної активності бацилл щодо мікроміцетів застосовували метод блоків та лунок, використовуючи як культури бацилл, вирощені на агаризованому поживному середовищі, так і їх супернатанти. Ступінь пригнічення росту грибів при сумісному культивуванні з бациллами в статичних умовах в рідкому поживному середовищі визначали гравіметрично за різницею абсолютної сухої ваги міцелію в контролі та досліді. Хітиноподобну активність бацилл визначали за утворенням редукувальних цукрів з використанням 3,5-динітросаліцилової кислоти фотокolorиметрично. Статистичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням критерію Стюдента для 5%-ного рівня значущості. **Результати.** Встановлена наявність хітиноподобної активності у всіх досліджених бацилл в середовищі з колоїдним хітином. Штами, які виявили високу хітиноподобну активність (*B. megaterium* 16, *B. pumilus* 7, *B. cereus* v. *tyucoides* 10), також виявляли високу антагоністичну активність щодо фітопатогенних грибів (*Fusarium oxysporum* Schldl. 54 і *Trichothecium roseum* Pers. 658). Бацилли здатні використовувати автоклавований мицелій грибов як єдине джерело вуглецю та азоту. При сумісному культивуванні грибів та бактерій в статичних умовах відмічені пригнічення росту та наявність морфологічних змін – утворення здуттів та ділянок лізису міцелію. **Висновки.** Показано, що фосфатмобілізувальні штами ґрунтових бактерій роду *Bacillus* виявляють хітиноподобну активність, а також пригнічують ріст грибів-фітопатогенів та викликають їх морфологічні зміни при сумісному культивуванні. Встановлена пряма залежність між антагоністичною та хітиноподобною активністю бацилл. На прикладі *B. cereus* v. *tyucoides* 10 показана здатність бацилл використовувати автоклавований мицелій грибов як єдине джерело вуглецю та азоту.

**Ключові слова:** хітиноподобна та антагоністична активність, р. *Bacillus*, мікроміцети.



**A.A. Roy, E.S. Kharkevich**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,  
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine,  
e-mail: allroy@ukr.net

## MYCOLYTIC ACTIVITY OF PHOSPHATE MOBILIZING SOIL BACTERIA OF GENUS *BACILLUS* COHN

### Summary

**The aim** of this research was study of the chitinolytic activity of phosphate-mobilizing soil bacteria of genus *Bacillus* and their antagonistic properties towards microscopic fungi. **Methods.** In this research 16 strains of phosphate-mobilizing soil bacteria of genus *Bacillus* and saprophytic and plant pathogenic strains of micromycetes were investigated. The antagonistic activity of bacilli against micromycetes was determined by the method of blocks and holes. Bacilli on agar medium and also their supernatants were used. Inhibition of fungal growth under co-cultivation with bacilli under static conditions in the liquid culture medium was determined gravimetrically by the difference of dry weight mycelium in control and in experiment. Bacilli chitinolytic activity was determined photocolometrically by the formation of reducing sugars by hydrolysis of colloidal chitin using 3,5-dinitrosalicylic acid. Student test for 5% significance level was used for statistical processing of the obtained data. **Results.** The presence of chitinolytic activity in all tested bacilli in colloidal chitin medium was established. *B. megaterium* 16, *B. pumilus* 7, *B. cereus* v. *mycoides* 10 strains showed high chitinolytic activity, they were also characterized by high antagonistic activity against plant pathogenic fungi (*Fusarium oxysporum* 54 and *Trichothecium roseum* 658). Bacilli were capable to using autoclaved mycelium as the sole of carbon and nitrogen source. Cultivation of bacteria and microscopic fungi under static conditions showed growth inhibition and changes in morphological features – blistering and areas of lysis of mycelium. **Conclusions.** It was established that phosphate-mobilizing strains of soil bacteria of the genus *Bacillus* showed chitinolytic activity and growth inhibition of plant pathogens and caused their morphological changes in co-culture. The direct relationship between the antagonistic and chitinolytic activity of bacilli was demonstrated. The bacilli ability to use autoclaved fungal mycelium as a sole source of carbon and nitrogen was showed on the example of *B. cereus* v. *mycoides* 10.

*Key words:* chitinolytic and antagonistic activity, genus *Bacillus*, micromycetes.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Широков А.В. Исследование миколитических свойств аэробных спорообразующих бактерий – продуцентов внеклеточных хитиназ // Микробиол. – 2008. – 77, 6. – С. 788–797.
2. Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / Киев: Наук. думка, 1988. – 588 с.
3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / М.: Изд-во МГУ, Наука, 2004. – 528 с.



4. Ильина А.В., Варламов В.П. Энзимология синтеза и деградации хитина и хитозана // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – С. 79–90.
5. Кузнецов В.Д., Янгулова И.В. Использование среды с хитином для выделения и учета актиномицетов из почвы // Микробиол. – 1970. – 39, 5. – С. 902–906.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Рой А.А., Яценко И.П., Гордиенко А.С., Курдиш И.К. Свойства *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого штамма // Прикл. биохим. микробиол. – 2011. – 47, 1. – С. 23–25.
8. Рой А.О., Царенко І.Ю., Захарченко В.О., Курдиш І.К. Вплив гранульованих бактеріальних препаратів комплексної дії на розвиток деяких хвойних рослин // Сільськогосп. мікробіол. – 2007. – 5. – С. 96–102.
9. Феофилова Е.П. Ключевая роль хитина в клеточной стенке грибов // Хитин и хитозан. Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, Г.А. Варламова. – М.: Наука, 2002. – С. 91–99.
10. Bradford M.M. A rapid sensitive method for the quantative of microgram quantivities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
11. Brussan W., Fontes Figueiredo J.E. Chitinolytic *Bacillus* spp. isolates antagonistic *Fusarium moniliforme* in maize // J. Plant Pathol. – 2010. – 92, 2. – P. 343–347.
12. Dighton J. Fungi in Ecosystem processes / New York-Basel: Marcel Dekker Inc., 2003. – 432 p.
13. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars // Anal. Chem. – 1959, – 31, 3. – P. 426–428.
14. Nielsen P., Sorensen J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere // FEMS Microbiol. Ecol. – 1997. – 22, 3. – P. 183–192.
15. Podile A.R., Prakash A.P. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1 // Can. J. Microbiol. – 1996. – 42. – P. 533–538.

Стаття надійшла до редакції 15.08.2014 р.



УДК 544.431.122: 582.284.3: 628.93

Н.Л. Поединок<sup>1</sup>, О.Б. Михайлова<sup>2</sup>, В.М. Ходаковский<sup>3</sup>, И.А. Дудка<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт пищевых биотехнологий и геномики НАН Украины,  
ул. Осиповского, 2А, Киев, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 434 37 77,  
e-mail: iht@i.kiev.ua

<sup>2</sup> Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601,  
Украина, тел.: +38 (044) 234 40 41, e-mail: inst@botany.kiev.ua

<sup>3</sup> Институт физики НАН Украины, просп. Науки, 46, Киев, 03028, Украина,  
тел.: +38 (044) 525 31 38, e-mail: negriyko@iop.kiev.ua

## ВЛИЯНИЕ НА РОСТОВУЮ АКТИВНОСТЬ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ МАКРОМИЦЕТОВ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

**Цель.** Изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на ростовые процессы спор и мицелия культивируемых макромицетов. **Методы.** Объектами исследований были чистые культуры базидиальных грибов *Flammulina velutipes* 1974, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* 1887, *Hericium erinaceus* 963, *Lentinus edodes* 520 и *Pleurotus ostreatus* 531. В качестве источников когерентного света использовали гелий-неоновый лазер с излучением на длине волны 632,8 нм и аргоновый ионный лазер – 514,5 нм и 488,0 нм. Облучение проводили на стадиях прорастания спор и развития вегетативного мицелия. **Результаты.** Выявлены значительные различия в фоточувствительности между видами на разных стадиях онтогенеза. Определены эффективные режимы фотостимуляции роста для исследуемых штаммов. Показано, что световую обработку посевного мицелия *F. velutipes*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* целесообразно проводить в экспоненциальной и стационарной фазах роста, *G. lucidum* – в стационарной. Облучение спор *H. erinaceus* лазерным светом с длиной волны 488 нм приводит к максимальной стимуляции ростовых процессов и накопление биомассы увеличивается почти в три раза по сравнению с контролем. Фотостимуляция красным и синим светом одинаково эффективна на всех изученных стадиях онтогенеза *L. edodes*. Использование активированного посевного мицелия позволило снизить количество его внесения в субстрат в 4 раза. Впервые установлено, что в вегетативном мицелии, сформировавшемся из модифицированных под действием света спор, сохраняется способность к ускоренному росту и изменения, вызванные светом, могут передаваться на дальнейшую онтогенетическую стадию от спор к мицелию. **Выводы.** Низкоинтенсивное лазерное излучение может эффективно использоваться для повышения биологической активности посевного материала культивируемых макромицетов с целью стимуляции их роста и интенсификации технологических этапов культивирования.

**Ключевые слова:** макромицеты, посевной материал, стимуляция, низкоинтенсивное лазерное излучение.

Для большинства макромицетов, несмотря на то, что они не относятся к фототрофным организмам, свет служит важным морфогенетическим фактором

© Н.Л. Поединок, О.Б. Михайлова, В.М. Ходаковский, И.А. Дудка, 2015



[5, 10]. Наряду с температурным режимом и влажностью, он принадлежит к экологическим факторам, которые влияют на жизнедеятельность гриба. Характер ответа на световой сигнал зависит от его продолжительности, интенсивности, спектральных свойств, особенностей организма и может быть, как позитивным, так и негативным. Наиболее эффективным с точки зрения влияния на фотоморфогенез грибов является синий свет. У грибов описано несколько видов фоторецепторов [5, 11]. Гены, ответственные за фоторецепцию синего света, найдены у базидиомицетов *Coprinus cinereus* (Schaeff.) Gray, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P.Kumm. и *Lentinus edodes* (Berk.) Singer [6, 8]. Кроме этого, исследования геномов грибов позволило идентифицировать довольно неожиданные фоторецепторные гены, вроде чувствительных к красному свету фитохромов, в дополнение к поглощающим синий свет криптохромов и родопсина [6].

Таким образом, анализ работ направленных на изучение механизмов фоторецепции у грибов, позволяет научно обосновано утверждать, что свет может продуктивно использоваться для целенаправленной регуляции их морфогенеза и биологической активности и это, несомненно, может лечь в основу создания новых экологически чистых интенсивных технологий их культивирования.

В настоящее время, в биотехнологии большое применение нашли лазерные технологии. Преимуществом лазерного излучения является возможность создания высокой спектральной яркости излучения, не достигаемой при использовании обычных некогерентных источников света. Такие свойства лазеров позволяют говорить о возможности реализации высокоэффективных биотехнологий для получения культур с высокой биологической активностью, повышенным внутри- и внеклеточным содержанием ценных биологических продуктов. Однако, сведения об использовании лазерной стимуляции в биотехнологиях культивирования грибов очень ограничены [4].

Целью наших исследований было изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на ростовые процессы спор и мицелия культивируемых макромицетов.

### Материалы и методы

В работе использовали чистые культуры базидиальных грибов *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 1974, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1899, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1887, *Hericiium erinaceus* (Bull.) Pers. 963, *Lentinus edodes* (Berk.) Singer 520 и *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 531 из Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники НАН Украины.

Плодовые тела получены в процессе интенсивного культивирования [3] на следующих субстратах: *F. velutipes*, *G. applanatum* и *G. lucidum* – осиновые опилки (60%) и пшеничные отруби (40%); *H. erinaceus* и *L. edodes* – буковые опилки (60%) и кукурузная крупа (40%); *P. ostreatus* – солома пшеничная 40%, опилки ольхи 40%, пшеничные отруби 20%

Споры получали из зрелых плодовых тел [1]. Из них готовили суспензию в стерильной дистиллированной воде и высевали на сусло-агар. Для предот-



вращения бактериальной инфекции в среду добавляли 200 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина. Посевы инкубировали в темноте при температуре 26 °С в течение 10–14 суток до полного обрастания поверхности среды воздушным мицелием. Вырезали агаровые диски с мицелием диаметром 5 мм и переносили их в колбы (10 штук на колбу) емкостью 0,5 л со 150 мл стерильного пивного сусла (8° по Балингу). Культивирование проводили в динамическом режиме (180–200 об/мин) при 25–27 °С до стационарной фазы роста. Полученный посевной материал (первый засев) в количестве 5% от объема среды, переносили в колбы (второй засев) с пивным суслом (8° по Балингу) и культивировали в том же режиме до стационарной фазы роста. Мицелий первого засева и в опытах и контроле получали из спор.

Количество биомассы определяли весовым методом после её отделения от культуральной жидкости и высушивания до постоянного веса при температуре  $105 \pm 1$  °С.

В качестве источника когерентного видимого света использовали газовые лазеры: гелий-неоновый лазер ЛГН-215 с излучением на длине волны 632,8 нм (красный цвет), производства НПО «Полярон», Львов, Украина, и аргонового ионного лазера (модифицированная модель ЛГН-106М1 производства НПО «Плазма», Россия), излучение с длиной волны 514,5 нм и 488,0 нм. Лазерный луч расфокусировался линзой до размера чашки Петри со спорами или размера дна колбы с жидким мицелием.

Плотность мощности лазерного излучения измерялась с помощью цифрового оптического измерителя мощности и энергии PM-100D, Thorlabs Inc. со стандартным фотодиодным датчиком мощности S120C, рабочий диапазон 400-1100 нм.

Энергетическая доза облучения (световая энергия, падающая на единицу площади) определялась как произведение плотности мощности и времени облучения. Благодаря довольно широкой вариации выходной мощности используемых источников света (от 10 мВт для He-Ne лазера до 300 мВт для Ag<sup>+</sup> лазера), экспозиция выбиралась в соответствии с заданной дозой и варьировала от 1 до 30 мин, в зависимости от схемы опыта.

Проведенные ранее эксперименты на других биологических объектах свидетельствуют, что относительно малые плотности мощности ( $10^2$ – $10^3$  Дж/м<sup>2</sup>) и короткое время освещения клеток монохроматическим светом способствуют макроэффекту, который сохраняется на протяжении длительного времени [2]. В наших экспериментах энергия оптического излучения составляла 230 мДж/см<sup>2</sup>. Это значение выбрано на основании результатов наших предыдущих исследований [9] и анализе результатов, полученных другими исследователями [11]. Как хорошо известно, фоторецепторная система грибов адаптирована к видимому свету в диапазоне длин волн от 350 до 730 нм [5, 11] и этот спектральный ряд хорошо представляют выбранные нами длины волн (синяя, зеленая и красная области).

Световую обработку посевного материала проводили при полном отсутствии других источников света: сухих споровых отпечатков – непосредственно



в чашках Петри, а мицелий, полученный из необлученных спор, на разных фазах глубинного культивирования (экспоненциальная и стационарная) – в колбах с широким плоским дном (толщина слоя 1 см). Полученный таким образом активированный мицелий (первого засева) использовали для вторичного засева. Культивирование в динамическом режиме во всех вариантах опыта и контроле проводили в темноте на всем протяжении эксперимента. За показатель активности посевного материала принимали накопление биомассы.

Повторность опытов пятикратная. Результаты опытов обработаны методами математической статистики с использованием программ статистического анализа Office Excel, разницу между средними величинами считали достоверной при  $P < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Поскольку, известно, что у большинства грибов отношение к свету меняется в процессе их онтогенеза [6], для определения фоточувствительности макромицетов на разных стадиях получения посевного материала и установления фазы их развития на которой световое воздействие вызовет наибольший ростостимулирующий эффект, облучение проводили по следующей схеме (рис. 1).

Полученный по этой схеме мицелий использовали для вторичного засева. Показателем роста стимулирующей активности облучения было накопление биомассы. Контролем служил мицелий, полученный из необлученных спор и не подвергавшийся световым воздействиям ни на одной стадии роста.



Рис. 1. Схема активизации посевного материала и получение мицелия первого засева

Fig. 1. Scheme of activation of the seed culture and receiving mycelium of the first seeding





Результаты, представленные в таблице, демонстрируют различную активность посевного мицелия макромицетов облученного в разных режимах на разных фазах онтогенеза. Так, использование посевного мицелия *G. applanatum* и *P. ostreatus*, полученного из спор, облученных зеленым светом (514 нм) не вызывало достоверного изменения накопления биомассы по сравнению с контролем, а у *F. velutipes*, *G. lucidum* и *H. erinaceus* отмечали её снижение. Однако, в процессе формирования вегетативного мицелия чувствительность *G. lucidum*, *H. erinaceus* и *P. ostreatus* к свету этой длины волны кардинально меняется и использование посевного мицелия, облученного в стационарной фазе роста, увеличивает выход биомассы этих макромицетов на 34,8%, 43,1% и 46,1%, соответственно. Споры *G. applanatum* не проявляют чувствительности к синему свету (488,0 нм) и полученный из них мицелий не отличался своей активностью от контроля. Тогда как, облучение как красным (632,8 нм) так и синим светом на всех указанных фазах развития изученных видов приводит к значительному повышению активности посевного мицелия.

Разнообразие эффектов кратковременного НИЛИ исследователи других биологических объектов объясняют тем, что величина конечного эффекта зависит от изначального физиологического состояния облучаемого объекта, которое определяется его редокс-потенциалом (смещение в сторону более окисленного состояния связано со стимуляцией жизнедеятельности клетки, в сторону более восстановленного состояния – связано с её подавлением). Вследствие светового воздействия происходит нормализация редокс-потенциала клетки [2]. Эффект облучения является тем более выраженным, чем больше редокс-потенциал клетки сдвинут в восстановленную сторону.

Поскольку в вегетативном мицелии, сформировавшемся из модифицированных под действием света спор, также сохраняется способность к ускоренному росту, то можно утверждать, что изменения, вызванные светом, имеют пролонгированное действие и могут передаваться на дальнейшую онтогенетическую стадию от спор к мицелию. Такие реакции связывают с изменениями в параметрах клеточного гомеостаза, и они вписываются в теорию об универсальных механизмах лазерной биостимуляции [2]. Согласно этой теории, основные физические и/или химические изменения, вызванные НИЛИ в фотоакцепторных молекулах (например, в терминальных ферментах дыхательных цепей), сопровождается каскадом биохимических реакций в клетках, которые не требуют дальнейшей активизации светом (цепи передачи и усиления фотосигнала или клеточная сигнализация).

Анализ ростовых показателей активированного посевного материала позволил определить параметры облучения для каждого штамма, позволяющие получить максимальный стимулирующий эффект. Так, активацию посевного мицелия *F. velutipes*, *G. applanatum* и *P. ostreatus* целесообразно проводить на экспоненциальной и стационарной фазах роста, а *G. lucidum* – в стационарной. Облучение спор *H. erinaceus* лазерным светом с длиной волны 488,0 нм приводит к максимальной стимуляции последующих ростовых процессов и накопление биомассы увеличивается почти в три раза по сравнению с контро-



Таблица  
Table

Рост макромицетов (накопление биомассы, г/л сухой биомассы) при использовании посевного материала, облученного низкоинтенсивным лазерным светом на разных фазах онтогенеза

Macromycetes growth (biomass accumulation, g/l of dry biomass) using seed culture irradiated by low-intensity laser light at different stages of ontogenesis

Вид	Посевой мицелий, облученный на стадиях онтогенеза												Контроль, не облучавшийся посевой мицелий
	Споры			Экспоненциальная фаза роста			Стационарная фаза роста			488,0 нм	514,0 нм	632,8 нм	
	632,8 нм	514,0 нм	488,0 нм	632,8 нм	514,0 нм	488,0 нм	632,8 нм	514,0 нм	488,0 нм				
<i>F. velutipes</i>	4,7±0,3	2,0±0,1	5,1±0,4	4,5±0,3	1,8±0,2	<b>5,9±0,2</b>	5,0±0,3	2,5±0,1	<b>5,7±0,1</b>	3,2±0,1			
<i>G. aprlanatum</i>	8,9±0,5	6,0±0,3	6,2±0,3	<b>9,3±0,2</b>	6,2±0,4	<b>9,0±0,5</b>	<b>8,7±0,3</b>	5,9±0,4	<b>9,5±0,5</b>	6,1±0,2			
<i>G. lucidum</i>	10,0±0,5	3,0±0,1	10,9±0,6	9,6±0,3	6,9±0,2	8,0±0,1	<b>11,5±0,6</b>	9,3±0,2	<b>12,1±0,3</b>	6,9±0,3			
<i>H. erinaceus</i>	<b>13,2±0,4</b>	2,4±0,2	<b>15,0±0,6</b>	11,3±0,7	3,3±0,2	12,6±0,3	8,8±0,1	8,3±0,5	9,8±0,3	5,8±0,2			
<i>L. edodes</i>	<b>14,6±0,3</b>	13,0±0,5	<b>15,7±0,3</b>	13,9±0,4	12,4±0,1	<b>15,3±0,5</b>	<b>15,1±0,3</b>	13,7±0,6	<b>16,0±0,8</b>	6,3±0,4			
<i>P. ostreatus</i>	16,2±0,7	11,9±0,2	14,5±0,8	<b>19,2±0,9</b>	13,9±0,6	14,6±0,4	<b>18,4±0,7</b>	17,1±0,7	15,1±0,3	11,7±0,5			

Примечание: жирным шрифтом отмечено максимальное накопление биомассы при использовании посевного материала, облученного низкоинтенсивным лазерным светом

Note: the bold marked maximum accumulation of biomass by using inoculum irradiated by low-intensity



олем. Фотостимуляція червоним і синім світлом однаково ефективна на всіх изучених стадіях онтогенеза *L. edodes*.

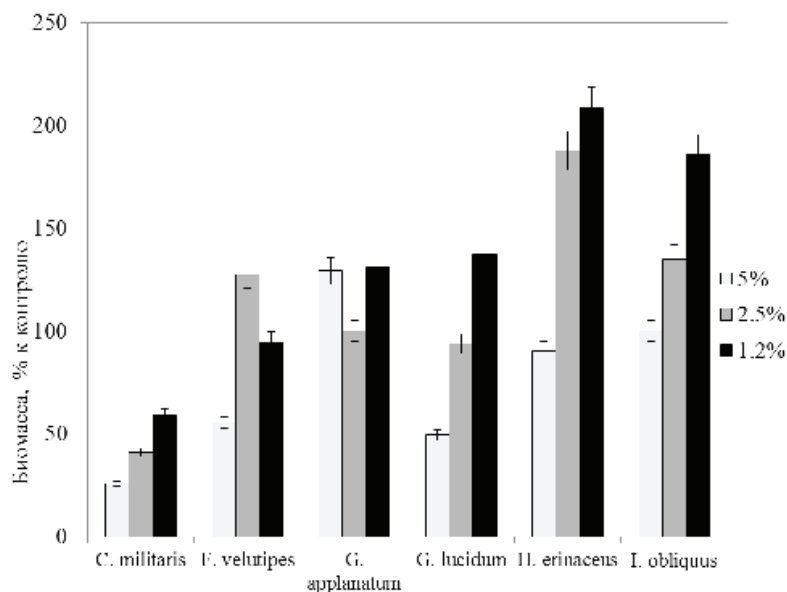
Одним из важных моментов, которые определяют экономическую эффективность биотехнологического процесса, является количество инокулюма, который вносят в ферментационную среду. Нами проведены исследования зависимости накопления биомассы изученными макромицетами от количества посевного материала. В работе для инокуляции был использован посевной мицелий, облученный в режимах, вызывающих наибольший стимулирующий эффект на ростовые процессы для каждого вида макромицетов (*F. velutipes*, *G. applanatum*, *G. lucidum* и *L. edodes* – в стационарной фазе роста светом с длиной волны 488 нм; *P. ostreatus* – в экспоненциальной, 632,8 нм; *H. erinaceus* – на стадии прорастания спор, 488 нм). В качестве контроля использовали мицелий, не подвергавшийся световым воздействиям. При изучении динамики накопления биомассы различными макромицетами, ранее нами было установлено, что кратковременное облучение светом низкой интенсивности увеличивает скорость их роста, что приводит к сокращению периода до достижения культурой стационарной фазы на 2–3 суток [4]. Поэтому, для оценки эффективности разрабатываемых нами методов активации посевного мицелия накопление биомассы в опыте и контроле определяли после того как процесс культивирования в опытных вариантах достигнет стационарной фазы роста.

Полученные результаты показали, что проведенная нами фотоактивация позволяет снизить количество мицелия, используемого для инокуляции в 4 раза (1,2%) (рис. 2). При этом накопление биомассы *G. lucidum*, *H. erinaceus*, *L. edodes* и *P. ostreatus* достоверно выше, чем при внесении 5% необлученного посевного материала.

Следует отметить, что уменьшение количества вносимого активизированного инокулюма, способствует увеличению стимулирующего эффекта. При 1,2% инокуляции субстрата накопление биомассы *P. ostreatus* увеличивается более чем на 240%, в сравнении с контролем, тогда как при внесении 5% активированного посевного материала – на 80%. Аналогичная тенденция наблюдается у *G. applanatum*, *G. lucidum* и *H. erinaceus*. Это согласовывается с данными других исследователей, которые считают, что фоторегуляция в позитивном смысле (стимуляция) может происходить только тогда, когда условия для роста культуры не являются оптимальными [2].

Таким образом, проведенные исследования позволили впервые определить наиболее эффективные режимы стимуляции ростовых процессов, культивируемых макромицетов на стадиях прорастания спор и роста вегетативного мицелия с помощью использования низкоинтенсивного лазерного света и разработать методы получения высокоактивного посевного материала. Новые подходы, позволяющие целенаправленно регулировать биологическую активность макромицетов, открывают большие перспективы для модификации существующих технологий их культивирования и интенсификации технологических этапов получения биомассы и нутрицевтиков, что позволит повысить экономическую эффективность биотехнологического процесса.





**Рис. 2.** Влияние количества активизированного инокулюма (5; 2,5; 1,2%) на реализацию фотостимулирующего эффекта

**Fig. 2.** Influence of the amount of activated inoculum (5; 2.5; 1.2%) on the realization of the photostimulating effect

Полученные нами новые для макромицетов данные о возможности передачи изменений, вызванных светом, от спор на следующие онтогенетические стадии развития вегетативного мицелия, являются логическим основанием для проведения дальнейших исследований о длительности сохранения фотоиндуцированных изменений при масштабировании активированного посевного материала.

Н.Л. Посдинок<sup>1</sup>, О.Б. Михайлова<sup>2</sup>, В.М. Ходаковський<sup>3</sup>, І.О. Дудка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, вул. Осиповського, 2А, Київ, 04123, Україна, тел.: +38 (044) 434 37 77, e-mail: iht@i.kiev.ua

<sup>2</sup>Інститут ботаніки НАН України ім. М.Г. Холодного, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна, тел.: +38 (044) 234 40 41, e-mail: inst@botany.kiev.ua

Інститут фізики НАН України, просп. Науки 46, Київ, 03028, Україна, тел.: +38 (044) 525 31 38, e-mail: negriyko@iop.kiev.ua

## ВПЛИВ НА РОСТОВУ АКТИВНІСТЬ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ КУЛЬТИВОВАНИХ МАКРОМІЦЕТІВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

### Реферат

**Мета.** Вивчення впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання на ростові процеси спор і мицелію культивованих макромицетів. **Методи.** Об'єктами досліджень були чисті культури базидіальних грибів *Flammulina velutipes* 1974, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* 1887, *Hericiium erinaceus* 963, *Lentinus*



*edodes* 520 і *Pleurotus ostreatus* 531. Як джерела когерентного світла використовували гелій-неоновий лазер з випромінюванням на довжині хвилі 632,8 нм та аргонієвий іонний лазер – 514,5 нм і 488,0 нм. Опромінення проводили на стадіях проростання спор і розвитку вегетативного міцелію. **Результати.** Виявлено значні відмінності у фоточутливості між видами на різних стадіях онтогенезу. Визначено ефективні режими фотостимуляції росту досліджуваних штамів. Світлову обробку посівного міцелію *F. velutipes*, *G. applanatum* і *P. ostreatus* доцільно проводити в експоненційній та стаціонарній фазах росту, *G. lucidum* – на стаціонарній. Опромінення спор *H. erinaceus* лазерним світлом з довжиною хвилі 488 нм призводить до максимальної стимуляції ростових процесів і накопичення біомаси збільшується майже втричі порівняно з контролем. Фотостимуляція червоним і синім світлом однаково ефективна на всіх вивчених стадіях онтогенезу *L. edodes*. Використання активованого посівного міцелію дозволило знизити кількість його внесення у субстрат в чотири рази. Вперше встановлено, що у вегетативному міцелії, сформованому з модифікованих під дією світла спор, зберігається здатність до прискореного росту і зміни, викликані світлом, можуть передаватися на подальшу онтогенетичну стадію від спор до міцелію. **Висновки.** Низькоінтенсивне лазерне випромінювання може ефективно використовуватися для підвищення біологічної активності посівного матеріалу культивованих макроміцетів з метою стимуляції їх росту та інтенсифікації технологічних етапів культивування.

*Ключові слова:* макроміцети, посівний матеріал, стимуляція, низькоінтенсивне лазерне випромінювання.

**N.L. Poyedinok<sup>1</sup>, O.B. Mikhailova<sup>2</sup>, V.M. Khodakovsky<sup>3</sup>, A. Dudka<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osipovsky, 04123, Kyiv, Ukraine, tel +38 (044) 434 37 77, e-mail: iht@i.kiev.ua

<sup>2</sup> M.G. Kholodny Institute of Botany of National Academy of Sciences of Ukraine, 2, Tereshchenkivska St., 01601 Kyiv, Ukraine, tel +38 (044) 234 40 41, e-mail: inst@botany.kiev.ua

<sup>3</sup> Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 46, Nauki prosp., 03028, Kyiv, Ukraine, tel +38 (044) 525 31 38, e-mail: negriyko@iop.kiev.ua

## EFFECT OF LOW-INTENSITY LASER IRRADIATION ON THE CULTIVATED MACROMYCETES SEED CULTURE GROWTH ACTIVITY

### Summary

**Aim.** The study of the effect of low-intensity laser radiation on the growth processes of spores and mycelia of cultured macromycetes. **Methods.** The research objects were pure cultures of basidiomycetes *Flammulina velutipes* 1974, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum* 1887, *Hericium erinaceus* 963, *Lentinus edodes* 520 and *Pleurotus ostreatus* 531. Helium-neon laser with radiation at the wavelength of 632.8 nm and argon ion laser 514.5 nm and 488.0 nm were used as the sources of coherent light. Irradiation has been carried out at the stages of spore germination and development of the vegetative mycelium. **Results.** The significant differences in photosensitivity between the species at different stages of ontogenesis have been revealed. The analysis of growth parameters allowed us to determine the optimal pacing modes for studied strains. It is expedient to carry out the light processing of *F. velutipes*, *G. applanatum* and *P. ostreatus* seed mycelium in the exponential and stationary growth phases, while for *G. lucidum* it should be done in the stationary phase. Irradiation of *H. erinaceus*



spores by laser light with the wavelength 488 nm leads to the maximum stimulation of growth processes and biomass accumulation increased almost three times compared with the control. The photostimulation by red and blue light is equally effective at all the examined stages of *L. edodes* ontogenesis. The use of activated inoculum has reduced four times the number of its entry in the substrate. It has been established that the vegetative mycelium, which was formed from spores modified under the light influence, retains its ability to accelerate the growth and changes induced by light can be transmitted to the further ontogenetic stage from spores to mycelium. **Conclusions.** Low-intensity laser radiation can be effectively used to increase the biological activity of seed culture cultivated macromycetes to stimulate their growth and intensification of technological stages of cultivation.

*Key words:* macromycetes, seed culture, stimulation, low-intensity laser light.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – К.: Наук. думка, 1988. – 144 с.
2. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохромоксидазы. Голография: фундаментальные исследования, инновационные проекты и нанотехнологии // XXV1 школа по когерентной оптике и голографии. – Иркутск: «Папирус», 2008 – С. 156–175.
3. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / Под ред. А.С. Бухало. – К.: Чернобыльинтеринформ, 2004. – 127 с.
4. Поєдинок Н.Л. Перспективы использования искусственного света в биотехнологиях культивирования грибов. Обзор // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – 6, № 6. – P. 58–70.
5. Corrochano L.M. Fungal photobiology: a synopsis// *IMA Fungus*. – 2011. – V. 2, № 1. – P. 25–28.
6. Kamada T., Sano H., Nakazawa T., Nakahori K. Regulation of fruiting body photomorphogenesis in *Coprinopsis cinerea* // *Fungal Genetics and Biology*. – 2010. – 47, № 11. – P. 917–921.
7. Moore, D., Robson, G.D., Trinci, A.P.J. 21st Century Guidebook to Fungi. – Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2011. – 236 p.
8. Nakano Y., Fujii N., Kojima M. Identification of Blue-Light Photoresponse Genes in Mushroom Mycelia // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2010. – 74, № 10. – P. 2160 – 2165.
9. Poyedinok N.L., Potemkina J.V., Buchalo A.S., Negriyko A.M., Grygansky A. Ph. Stimulation with low-intensity laser light of basidiospore germination and growth of monocaryotic isolates in Medicinal Mushroom *Hericium erinaecus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllorphomycetidae) // *Int. J. Med. Mushr.* – 2000. – 2, № 4. – P. 339–342.
10. Purschwitz J., Muller S., Kastner Ch. and Fischer R. Seeing the rainbow: light sensing in fungi // *Current Opinion in Microbiology*. – 2006. – 9, № 6. – P. 566–571.
11. Tisch D., Schmoll M. Light regulation of metabolic pathways in fungi // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – 85, № 5. – P. 1259–1277.

Стаття надійшла до редакції 06.10.2014 р.



**О.О. Нечипуренко, М.А. Хархота, Л.В. Авдєєва**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д 03680, Україна,  
тел.: +38 (093) 762 30 83, e-mail: ne4upura@ukr.net

## **ВПЛИВ ДЖЕРЕЛ КАРБОНУ, НІТРОГЕНУ ТА СОЛЕЙ МЕТАЛІВ НА ПРОДУКТИВНІСТЬ КАРОТИНСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ШТАМІВ *BACILLUS SUBTILIS* 1.1 ТА *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113**

**Мета.** Дослідити вплив джерел карбону, нітрогену, солей металів на продуктивність каротинсинтезувальних штамів *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1. **Методи.** Динаміку росту та пігментоутворення досліджених каротинсинтезувальних штамів визначали шляхом глибинного культивування у періодичних умовах з урахуванням біотехнологічних показників. Екстракцію пігментів проводили з використанням суміші хлороформу та метанолу (2:1). Якісний склад каротиноїдів оцінювали за їх спектрами поглинання. **Результати.** Загальна продуктивність каротиноїдів штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 була найбільшою на середовищах з арабінозою, мальтозою,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{FeSO}_4$  і становила 168 та 384 мг/л, 310 та 570 мг/л, 296 та 640 мг/л, 309 та 605 мг/л, відповідно. **Висновки.** Оптимальними для накопичення біомаси та каротиногенезу обох досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* серед джерел карбону, нітрогену та солей металів були арабіноза, мальтоза,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{FeSO}_4$ . Загальна продуктивність каротиноїдів штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищах з арабінозою, мальтозою,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{FeSO}_4$  була більшою ніж на контрольному середовищі у 2,1–3,9 та 1,6–2,7 рази, відповідно, при незмінному якісному складі пігментів.

*Ключові слова:* штами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, *B. subtilis* 1.1, пігментоутворення, каротиноїди, джерела карбону, нітрогену.

У народному господарстві широко використовуються каротиноїдні пігменти, які переважно отримують шляхом хімічного та мікробіологічного синтезу. Перевагою останнього є те, що мікроорганізми-продуценти здатні синтезувати широкий спектр каротиноїдів. До того ж варіюванням складу поживного середовища можна досягнути значних змін у рівні накопичення біомаси бактерій, кількісному та якісному вмісті каротиноїдних пігментів [7].

Підбір оптимального джерела карбону є одним з найважливіших чинників інтенсифікації пігментоутворення. Показано, що у результаті варіювання джерел карбону у поживному середовищі кількість синтезованого бактеріями  $\beta$ -каротину збільшувалась у 3 рази [9]. Нітроген також є необхідним компонентом для росту та пігментоутворення бактерій, оскільки він входить до складу



структурних елементів клітин, ферментів, нуклеїнових кислот та ін. [1]. Окрім цього, у літературі зустрічаються дані щодо здатності солей металів стимулювати синтез каротиноїдів у дріжджеподібних грибів, проте відомості щодо бактерій роду *Bacillus* відсутні [3, 8]. До того ж для промислового культивування бактерій широко використовують живильні середовища виготовлені на водопровідній воді, що може містити високі концентрації катіонів металів ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) і, як наслідок, інгібувати ріст та продуктивність мікроорганізмів [4].

Раніше нами було показано, що штами *Bacillus amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1 здатні синтезувати пігменти каротиноїдної природи, представлені комплексом з протеїнами та ліпідами [2]. Однак, вплив складових компонентів поживного середовища на їх ріст та пігментоутворення залишається недослідженим. З огляду на вищевикладене метою нашої роботи було дослідити вплив джерел карбону, нітрогену та солей металів на продуктивність каротинсинтезувальних штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *B. subtilis* 1.1 з музею відділу антибіотиків та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України.

Досліджені штами бактерій вирощували в умовах глибинного культивування з використанням контрольного синтетичного середовища ( $\text{pH} = 7,0$ ) наступного складу (г/л):  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O} - 1,29$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 - 4,75$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 9,60$ ,  $\text{MgSO}_4 - 0,18$ , глюкоза – 20,00. Культивування бактерій здійснювали на качалці зі швидкістю 200 об/хв за температури 37 °С впродовж 18–24 годин.

Для дослідження впливу джерел карбону на рівень накопичення біомаси та пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 використано, моноцукри (галактоза, фруктоза, рамноза, арабіноза, ксилоза), дисахариди (лактоза, цукроза, мальтоза), полісахариди (крохмаль, тилоза), спирти (манітол, дульцитол, гліцерин, еритрит, сорбітол) у кількості еквівалентній глюкозі у контрольному середовищі. Також було вивчено вплив джерел неорганічного нітрогену ( $\text{C(N)} = 7 \text{ mM}$ ):  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  та  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; органічного нітрогену (0,2%): соєвий концентрат, дріжджовий екстракт, дріжджовий автолізат, казеїн, солодові паростки, пептон, соєве борошно; та солей металів (0,1 mM):  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $\text{FeCl}_3$  [1, 3]. Контролем для всіх варіантів дослідів слугувало вихідне синтетичне середовище.

Екстракцію пігментів проводили шляхом гомогенізації сухої біомаси бацил у ступці з поступовим додаванням суміші хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 [7, 8]. Кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) бактерій (г/л), загальний вміст каротиноїдів у біомасі (мг/г, показник, який відображає закономірності синтезу каротиноїдів і не пов'язаний з накопиченням біомаси у культуральній рідині) та загальну продуктивність каротиноїдів (мг/л, відобра-





жає взаємозв'язок накопичення біомаси та пігментів бактерій у культуральній рідині) встановлювали на основі калібрувальних кривих, отриманих шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідин та екстрактів пігментів за довжини хвилі 540 та 440 нм, відповідно. Для попереднього аналізу якісного складу каротиноїдів у екстракті визначали спектри поглинання у видимій області світла на Spesord 11.

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

### Результати дослідження

Для синтезу ізопреноїдних ланцюгів каротиноїдів мікроорганізмам обов'язково необхідні джерела карбону, такі як, спирти, тріози, тетрози, пентози, гексози, дисахариди, полісахариди або інші карбонвмісні речовини. Підбір оптимального джерела карбону є одним з найважливіших чинників інтенсифікації пігментоутворення [1]. Нами показано, що серед усіх досліджених моноцукрів оптимальними для культивування *B. subtilis* 1.1 були фруктоза, арабіноза та ксилоза, додавання яких у середовище призводило до накопичення біомаси на 50–70% більше ніж на вихідному середовищі ( $p > 0,05$ ) (рис. 1).

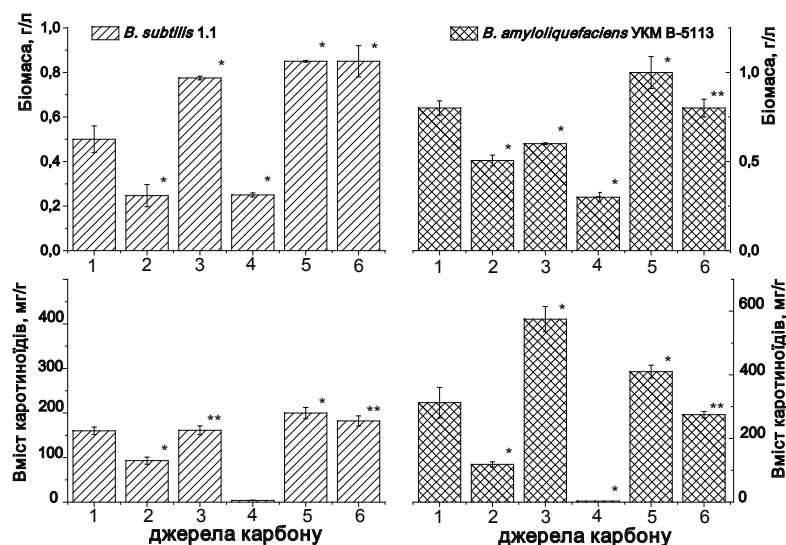


Рис. 1. Вплив моноцукрів на накопичення біомаси та пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

Примітка: 1 – глюкоза (контроль), 2 – галактоза, 3 – фруктоза, 4 – рамноза, 5 – арабіноза, 6 – ксилоза; \* – різниця достовірна ( $p > 0,05$ ), \*\* – різниця недостовірна ( $p > 0,05$ )

Fig. 1. Monosaccharides influence upon biomass accumulation and pigment production of strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113

Note: 1 – glucose (control), 2 – galactose, 3 – fructose, 4 – rhamnose, 5 – arabinose, 6 – xylose; \* – significant difference ( $p > 0.05$ ), \*\* – nonsignificant difference ( $p > 0.05$ )



Для накопичення біомаси штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 оптимальним джерелом карбону виявилась арабіноза, що забезпечувала на 20% більший приріст за глюкозу ( $p > 0,05$ ). Ксилоза не впливала, а фруктоза, рамноза та галактоза призводили до зменшення накопичення біомаси цього штаму (рис. 1). Отже, пентози краще метаболізуються вищезгаданими культурами бацил, ніж гексози, що вказує на провідну роль пентозофосфатного шляху у засвоєнні карбону і узгоджується з даними, викладеними у роботах Gorke В. [4].

Відмічено, що арабіноза, яка стимулювала ріст обох досліджених штамів також стимулювала синтез пігментів. Так загальний вміст каротиноїдів для штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищі з арабінозою становив  $200 \pm 10$  та  $410 \pm 20$  мг/г АСБ, що на 20 та 24% більше за відповідні значення у контролі ( $p > 0,05$ ). Загальний вміст каротиноїдів у штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищі з фруктозою збільшувався на 57% порівняно з контролем ( $p > 0,05$ ).

За культивування штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на середовищі з арабінозою загальна продуктивність каротиноїдів була найбільшою і перевищувала у 2,1 та 1,6 рази відповідні показники, отримані на контрольному середовищі. Встановлений факт є відмінним від даних щодо синтезу каротиноїдів дріжджеподібними грибами роду *Rhodotorula*, які найбільшу кількість пігменту утворювали на середовищі з глюкозою та фруктозою [3]. З огляду на отримані дані, висуваємо припущення, що синтез каротиноїдів вищезгаданими штамми бацил відбувається через 2С-метил-D-еритрол-4-фосфатний шлях [6].

Іншою групою цукрів, вплив яких досліджено на ріст та пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, були дисахариди та полісахариди (рис. 2).

Показано, що ріст обох культур був вищий порівняно з контролем за використання цукрози, мальтози чи крохмалю як джерел карбону ( $p > 0,05$ ). Найбільший стимулюючий ефект на ріст штамів відмічали за їх культивування на середовищі з мальтозою. Штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 накопичували у 2,7 та 3,8 рази більше біомаси, ніж за культивування на середовищі з глюкозою (рис. 2).

Мальтоза підвищувала загальний вміст каротиноїдів штаму *B. subtilis* 1.1 у 1,4 рази та не впливала на пігментоутворення штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. Загальна продуктивність каротиноїдів була максимальною при вирощуванні на середовищах з цукрозою та мальтозою. Згаданий показник перевищував контрольні значення для штаму *B. subtilis* 1.1 у 1,8–3,9 рази та для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – у 1,7–2,3 рази, відповідно.

Слід зазначити, що за культивування штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на середовищах з лактозою, крохмалем та тилозою достовірно зменшувався загальний вміст каротиноїдів ( $p > 0,05$ ). Тоді як, за даними літератури, у штаму *Streptomyces* sp. T1027 крохмаль стимулює утворення каротиноїдів, що можливо пов'язано з відмінністю їх шляхів синтезу [9].



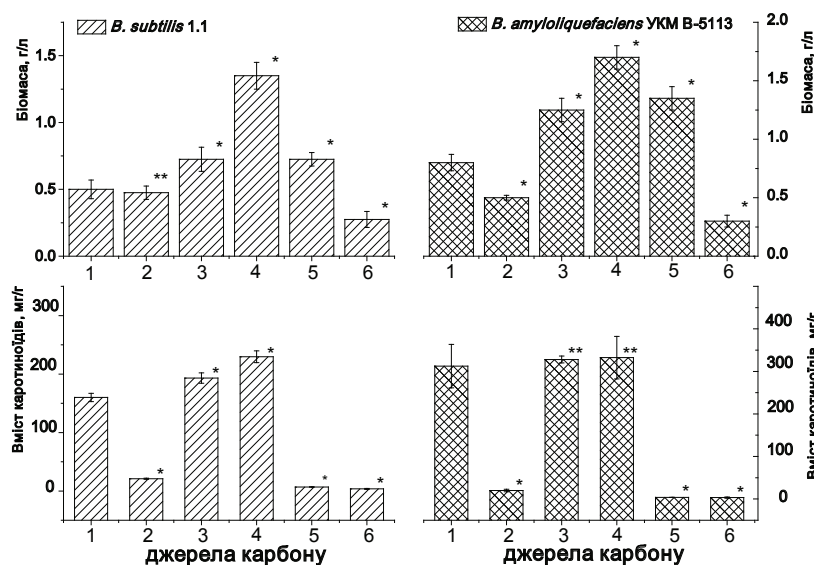


Рис. 2. Вплив дисахаридів та полісахаридів на накопичення біомаси та пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 і *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

Примітка: 1 – глюкоза (контроль), 2 – лактоза, 3 – цукроза, 4 – мальтоза, 5 – крохмаль, 6 – тілоза; \* – різниця достовірна ( $p > 0,05$ ), \*\* – різниця недостовірна ( $p > 0,05$ )

Fig. 2. Disaccharides and polysaccharides influence upon biomass accumulation and pigment production of strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113

Note: 1 – glucose (control), 2 – lactose, 3 – saccharose, 4 – maltose, 5 – starch, 6 – tilose; \* – significant difference ( $p > 0,05$ ), \*\* – nonsignificant difference ( $p > 0,05$ )

Оскільки спирти також використовуються як компоненти поживних середовищ, нами було вивчено їх вплив на ріст та продукування каротиноїдів бацилами. Встановлено, що досліджувані спирти не впливали (манітол) або інгібували (дульцитол, гліцерол, еритрит, сорбітол) ріст та пігментоутворення вищезгаданих штамів. Однак, відомо, що у стрептоміцетів манітол та гліцерол значно підвищують вихід каротиноїдів [1, 9].

Отже, серед усіх досліджених джерел карбону, на накопичення біомаси та синтез каротиноїдних пігментів штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 найбільш позитивно впливали арабіноза, фруктоза та мальтоза.

Іншими важливими складовими поживного середовища, що можуть змінювати ростову та біосинтетичну активність мікроорганізмів, є джерела нітрогену, оскільки останній входить до складу структурних елементів клітин, ферментів, нуклеїнових кислот та ін. [1, 3]. Нами встановлено, що найбільш сприятливими для росту та пігментоутворення досліджуваних штамів були амонійні солі (рис. 3).

Використання солей  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{NH}_4\text{Cl}$  забезпечувало достовірно найвищі ( $p > 0,05$ ) рівні накопичення біомаси штамми *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, що становили  $1,7 \pm 0,1$ ,  $1,2 \pm 0,1$  та  $2,0 \pm 0,1$ ,  $1,6 \pm 0,2$  г/л АСБ, відповідно (рис. 3). Однак, рівень пігментоутворення культур

за наявності у середовищах амонійних солей не відрізнявся від контрольного значення ( $p > 0,05$ ). Загальна продуктивність каротиноїдів штамми *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 була найбільшою на середовищі з  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  і складала  $296 \pm 11$  та  $640 \pm 15$  мг/л, відповідно.

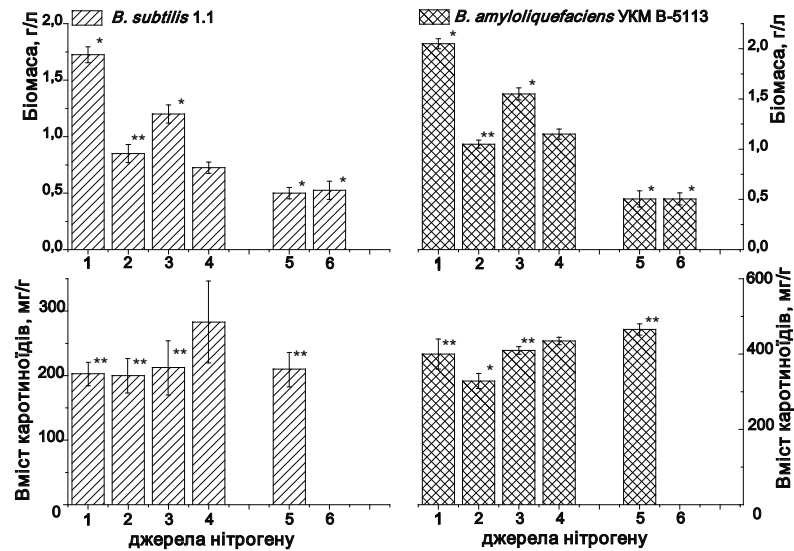


Рис. 3. Вплив джерел нітрогену на накопичення біомаси та пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 і *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113

Примітка: 1 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 4 –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (контроль), 5 –  $\text{NaNO}_3$ , 6 –  $\text{KNO}_3$ ; \* – різниця достовірна ( $p > 0,05$ ), \*\* – різниця недостовірна ( $p > 0,05$ )

Fig. 3. Nitrogen sources influence upon biomass accumulation and pigment production of strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113

Note: 1 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 4 –  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (control), 5 –  $\text{NaNO}_3$ , 6 –  $\text{KNO}_3$ ; \* – significant difference ( $p > 0,05$ ), \*\* – nonsignificant difference ( $p > 0,05$ )

Використання солей  $\text{NaNO}_3$  та  $\text{KNO}_3$  призводило до пригнічення росту обох культур та інгібування їх пігментоутворення, можливо через низьку активність нітрат- та нітритредуктаз. Проте, за даними літератури нітратні солі є оптимальними для накопичення каротиноїдів стрептоміцетами, що вказує на відмінність шляхів метаболізму нітрогену у бактерій [1, 9].

Нами встановлено, що серед органічних джерел нітрогену дріжджовий автолізат та соєве борошно забезпечували найкращі ростові показники штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 ( $p > 0,05$ ). Останні при цьому накопичували  $1,4 \pm 0,1$  і  $1,3 \pm 0,1$  г/л АСБ та  $1,5 \pm 0,1$  г/л АСБ відповідно, однак, продуктивність каротиноїдів була нижчою ніж на контрольному середовищі. Отже, оптимальними джерелами нітрогену для синтезу каротиноїдів штамми *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 були неорганічні джерела



амонійного нітрогену. Отримані результати узгоджуються з даними отриманими А. Ванна щодо дріжджеподібних грибів *Rhodotorula glutinis* [3].

У літературі зустрічаються дані щодо здатності катіонів металів стимулювати спороутворення та синтез каротиноїдних пігментів, оскільки вони є кофакторами ферментів, а також здатні виступати індукторами антиоксидантних систем захисту мікробної клітини [3, 8]. З огляду на це нами було досліджено вплив солей металів на ріст та каротинсинтезувальну здатність штамів *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1.

Встановлено, що  $\text{FeSO}_4$  активував ріст штаму *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 у 3 та 2,5 рази, відповідно, а рівень синтезу каротиноїдів було збільшено для обох штамів на 15% ( $p > 0,05$ ). Загальна продуктивність каротиноїдів становила  $309 \pm 10$  та  $605 \pm 12$  мг/л. Слід зазначити, що за культивування штаму *Rhodotorula* sp. Y1621 на середовищі з  $\text{FeSO}_4$  вихід каротиноїдів збільшувався у 2 рази порівняно з контролем [3].

У свою чергу  $\text{MnSO}_4$  та  $\text{FeCl}_3$  стимулювали ріст обох штамів у 2 рази, проте не впливали на рівень пігментоутворення. Інша група солей, а саме  $\text{CaCl}_2$  та  $\text{ZnSO}_4$ , не впливали на ріст досліджених штамів бацил, проте достовірно підвищували рівень синтезу пігментів на 10% ( $p > 0,05$ ). Відомо, що для дріжджеподібних грибів *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* за культивування у присутності  $\text{ZnSO}_4$  також відбувається збільшення рівня каротиноїдів, що можливо пов'язано з використанням цинку як кофактору ензимів, необхідних для синтезу пігментів [3]. Встановлено, що під впливом  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  кількість біомаси штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 не змінювалася, проте вони інгібували синтез каротиноїдів на 16–77%. Солі  $\text{CuSO}_4$  та  $\text{CdSO}_4$  інгібували ріст обох досліджених штамів у 5 разів порівняно з контролем та повністю пригнічували пігментоутворення, можливо за рахунок формування супероксидних аніонів, руйнації Fe-S кластерів та цитоплазматичної мембрани бактерій [5]. Отже, для оптимізації чи розробки нового середовища перспективним є використання катіонів  $\text{FeSO}_4$ .

Відомо, що внаслідок варіювання компонентів поживного середовища змінюється якісний склад каротиноїдів, а отже, і значення максимумів спектрів поглинання. У всіх досліджених варіантах середовищ спектри поглинання каротиноїдів не зміщувалися і були стандартними для штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 [2]. Отримані дані вказують на сталість якісного складу пігментів за умов варіювання складових середовища.

Таким чином, оптимальними для накопичення біомаси та каротиногенезу обох досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* серед джерел карбону, нітрогену та катіонів металів були арабіноза, мальтоза,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{FeSO}_4$ . Загальна продуктивність штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищах з арабінозою, мальтозою,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  та  $\text{FeSO}_4$ , була більшою ніж на контрольному у 2,1–3,9 та 1,6–2,7 рази, відповідно, при незмінному якісному складі пігментів.



УДК 579.66

**А.А. Нечипуренко, М.А. Хархота, Л.В. Авдеева**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина,  
тел.: (093) 762 30 83, e-mail: ne4upura@ukr.net

**ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА, УГЛЕРОДА  
И СОЛЕЙ МЕТАЛЛОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ  
КАРОТИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS*  
1.1 И *B. AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113**

**Реферат**

**Цель.** Исследовать влияние источников углерода, азота, солей металлов на продуктивность каротинсинтезирующих штаммов *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 и *B. subtilis* 1.1. **Методы.** Динамику роста и пигментообразования каротинсинтезирующих штаммов определяли путем глубинного культивирования в периодических условиях с учетом биотехнологических показателей. Экстракцию пигментов осуществляли с использованием смеси хлороформа и метанола (2:1). Качественный состав каротиноидов оценивали по их спектрам поглощения. **Результаты.** Общая продуктивность каротиноидов для штаммов *B. subtilis* 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 была наибольшей на средах с арабинозой, мальтозой,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$  и составила 168 и 384 мг/л, 310 и 570 мг/л, 296 и 640 мг/л, 309 и 605 мг/л, соответственно. **Выводы.** Оптимальными для роста и синтеза каротиноидов обоих исследованных штаммов бактерий рода *Bacillus* среди источников углерода, азота и солей металлов были арабиноза, мальтоза,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$ . Общая продуктивность штаммов *B. subtilis* 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 при культивировании на средах с арабинозой, мальтозой,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{FeSO}_4$  была больше чем на контрольной среде в 2,1–3,9 и 1,6–2,7 раза, соответственно, при неизменном качественном составе пигментов.

**Ключевые слова:** штаммы *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113, *B. subtilis* 1.1, пигментообразование, каротиноиды, источники карбона, нитрогена.

UDC 579.66

**O. Nechipurenko, M. Kharhota, L. Avdeeva**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Acad. Zabolotny st.,  
Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine tel: +38 (093) 762 03 83, e-mail: ne4upura@ukr.net

**THE IMPACT OF CARBON, NITROGEN SOURCES AND METAL  
SALTS ON PRODUCTIVITY OF CAROTENE SYNTHESIZING  
STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* 1.1 AND *B. AMYLOLIQUEFACIENS*  
UCM B-5113**

**Summary**

**Purpose.** To investigate the impact of carbon, nitrogen sources and metal salts on the productivity of carotene synthesizing strains *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 and



*B. subtilis* 1.1. **Methods.** The features of growth and pigment production of investigated strains were determined by submerged cultivation in periodic conditions based on biotechnology parameters. The pigments extraction was carried out with the use of mixture of chloroform and methanol (2:1). The qualitative composition of carotenoids was assessed by their absorption spectra. **Results.** The highest total carotenoids productivity of strains *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 and *B. subtilis* 1.1 was on the media containing arabinose, maltose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{FeSO}_4$  and composed 168 and 384 mg/l, 310 and 570 mg/l, 296 and 640 mg/l, 309 and 605 mg/l, respectively. **Conclusion.** Arabinose, maltose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{FeSO}_4$  were the optimum sources of carbon, nitrogen and metal salts for growth and carotenoids synthesis by investigated *Bacillus* strains. Overall productivity of strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 was higher than on control medium at 2.1–3.9, and 1.6–2.7 times, respectively, with constant quality of pigment composition.

*Key words:* strains *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113, *B. subtilis* 1.1, pigment formation, carotenoids, carbon, nitrogen sources.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голембіовська С.Л., Тимошенко С.Г., Мацелюх Б.П. Вплив джерел вуглецю і азоту на біосинтез лікопіну у *Streptomyces globisporus* 4лср // Мікробіологічний журнал. – 2010. – Т. 72, № 6. – С. 46–51.
2. Нечипуренко О.О. Природа та фізико-хімічні властивості каротиноїдних пігментів штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. / О. Нечипуренко, М. Хархота, Л. Авдєєва, Л. Зелена // XI Український біохімічний конгрес (6–10 жовтня 2014 року, Київ) : зб. тез. Доповідей. – Київ, 2014. – С. 34.
3. Banna A.A., Razek A.M., Mahdy A.R. Some factors affecting the production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* // Food and Nutrition Sciences. – 2012. – Vol. 3. – P. 64–71.
4. Gorke B., Foulquier E., Galinier A. YvcK of *Bacillus subtilis* is required for a normal cell shape and for growth on Krebs cycle intermediates and substrates of the pentose phosphate pathway // Microbiology. – 2005. – Vol. 151. – P. 3777–3791.
5. Lemire J.A., Harrison J.J., Turner R.J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 371–384.
6. Liu H., Wang Y. MEP pathway-mediated isopentenol production in metabolically engineered *Escherichia coli* // Microbial Cell Factories. – 2014. – Vol. 13. – P. 1–7.
7. Perez-Fons L., Bramley P.M., Fraser P.D. The optimisation and application of a metabolite profiling procedure for the metabolic phenotyping of *Bacillus* species // Metabolomics. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 77–90.
8. Perez-Fons L., Steiger S., Khaneja R. Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange *Bacillus* spore-formers // Biochemica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 1811. – P. 177–185.
9. Subhash V., Vishnupriya B., Selvam K. Characterization of marine *Streptomyces* sp. T1027 producing  $\beta$ -carotene under light induction // Am. J. PharmTech Res. – 2013. – Vol. 3. – P. 743–756.

Стаття надійшла до редакції 29.01.2015 р.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,  
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ  
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»  
У 2014 РОЦІ**

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Авдєєва Л.В. див. Драговоз І.В.</i>	4	77
<i>Адамчук-Чала Н.І., Копилов Є.П.</i> Ультроструктурна організація апікальних меристем проростків пшениці ярої під дією інокуляції бактеріями штаму <i>Azospirillum brasilense</i> 102	4	44
<i>Адамчук-Чала Н.І., Титова Л.В., Іутинська Г.О.</i> Мікробні пейзажі ризосфери сої за інтродукції різних інокулянтів	3	40
<i>Антоняк Г.Л. див. Кушкевич І.В.</i>	4	26
<i>Баранов В.І. див. Кузьмішина С.В.</i>	4	69
<i>Басюл О.В., Ямборко Г.В., Іваниця В.О.</i> Біологічні властивості лактобактерій – представників резидентної мікро- біоти гливи звичайної	2	45
<i>Берегова Х.А., Пирог Т.П.</i> Вплив поверхнево-активних речовин <i>Nocardia vaccinii</i> ІМВ В-7405 на адгезію бактерій та дріжджів до поверхонь силіконових катетерів	3	57
<i>Бєляєва Т.О. див. Гудзенко Т.В.</i>	1	72
<i>Бєляєва Т.О. див. Гудзенко Т.В.</i>	3	31
<i>Білявська Л.О., Повниця О.Ю., Шермолович Ю.Г., Гудзь Г.П., Нєстєрова Н.В.</i> Дослідження антиаденовірусної активності нових фторовмісних гетероциклічних сполук	1	19
<i>Бобик Л.В. див. Драговоз І.В.</i>	4	77
<i>Бобрєшова Н.С. див. Мірось С.Л.</i>	2	64
<i>Борецька М.О. див. Радченко О.С.</i>	1	53
<i>Буга К.П. див. Мірось С.Л.</i>	2	64
<i>Будзанівська І.Г. див. Руднєва Т.О.</i>	4	15
<i>Буценко Л.М. див. Савєнко О.А.</i>	3	15
<i>Василенко О.М. див. Лівінська О.П.</i>	4	6
<i>Василюк О.М., Гармашєва І.Л., Коваленко Н.К.</i> Пробіотичні властивості штамів <i>Lactobacillus plantarum</i> , ізольованих з ферментованих продуктів	3	23
<i>Вільданова Р.І. див. Шульга О.М.</i>	2	85
<i>Вінніков А.І. див. Жєрносєкова І.В.</i>	1	79
<i>Вінніков А.І. див. Сідашенко О.І.</i>	3	77
<i>Волошко Т.Є. див. Федотов О.В.</i>	3	65
<i>Волювач О.В. див. Гудзенко Т.В.</i>	1	72





АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Автори	№ вип.	№ стор.
Волювач О.В. див. Гудзенко Т.В.	3	31
Воронкова О.С. див. Крисенко О.В.	1	35
Воронкова О.С. див. Сідашенко О.І.	1	63
Воронкова О.С. див. Сідашенко О.І.	3	77
Галкін Б.М. див. Русакова М.Ю.	4	88
Галкін М.Б. див. Мухліс Абедалабас	1	45
Галкін М.Б. див. Мухліс Абедалабас	2	15
Гармашева І.Л. див. Лівінська О.П.	4	6
Гармашева І.Л. див. Василюк О.М.	3	23
Герасименко І.О., Курдиш І.К. Вплив фізико-хімічних факторів на дегідрогеназну активність <i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7023	4	61
Гнатуш С.О. див. Кузьмішина С.В.	4	69
Голембіовська С.Л., Дворник Т.В., Янченко Л.М., Мацелюх Б.П. Продуктивність мутантного штаму <i>Streptomyces globisporus</i> 1912-4 LCP НР7 за різних умов культивування	2	6
Горшкова О.Г. див. Гудзенко Т.В.	1	72
Горшкова О.Г. див. Гудзенко Т.В.	3	31
Гриценко Л.М. див. Зелена П.П.	1	27
Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Горшкова О.Г., Пузирьова І.В., Іваниця В.О. Видалення броміду гексадецилпіридинію із водних розчинів бактеріями роду <i>Pseudomonas</i> за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітозаном	1	72
Гудзенко Т.В., Коротасва Н.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Склад жирних кислот ліпідів нафтоокиснювальних штамів бактерій роду <i>Pseudomonas</i>	3	31
Гудзь Г.П. див. Білявська Л.О.	1	19
Данкевич Л.А. див. Драговоз І.В.	4	77
Дворник Т.В. див. Голембіовська С.Л.	2	6
Домбровська І.В. див. Зелена П.П.	1	27
Драговоз І.В., Леонова Н.О., Лапа С.В., Данкевич Л.А., Падалко С.Ф., Бобик Л.В., Авдєєва Л.В. Фітостимулювальна, антагоністична активність та біологічна ефективність штаму <i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7243	4	77
Жерносєкова І.В., Тимчук О.А., Ткаченко В.П., Вінніков А.І. Вплив продуктів метаболізму <i>Streptomyces recifensis</i> var. <i>lyticus</i> на ріст проростків овочевих культур	1	79
Зелена П.П. див. Радченко О.С.	1	53



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ**

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Зелена П.П., Юмина Ю.М., Домбровська І.В., Малиновська І.М., Шепелевич В.В., Гриценко Л.М., Яворська Н.В., Позур В.К., Сківка Л.М.</i> Вплив ефірних олій <i>Aniba rosaeodora, Laurus nobilis, Syzygium aromaticum, Mentha piperita</i> та <i>Lavandula angustifolia</i> на ріст мікроміцетів	1	27
<i>Зінченко О.Ю., Шматкова Н.В., Сейфулліна І.Й., Лерер В.О.</i> Вплив похідних ізоніазиду на чутливість лактамазапродукувальних <i>Staphylococcus aureus</i> до пеніциліну	4	52
<i>Золотарьова О.К.</i> див. <i>Мокросноп В.М.</i>	3	49
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Басюл О.В.</i>	2	45
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Гудзенко Т.В.</i>	1	72
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Гудзенко Т.В.</i>	3	31
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Ліманська Н.В.</i>	1	8
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Мірось С.Л.</i>	2	64
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Сергєєва Ж.Ю.</i>	4	36
<i>Івах В.В.</i> див. <i>Русакова М.Ю.</i>	4	88
<i>Іутинська Г.О.</i> див. <i>Адамчук-Чала Н.І.</i>	3	40
<i>Карпенко І.В.</i> див. <i>Шульга О.М.</i>	2	85
<i>Коваленко Н.К.</i> див. <i>Огірчук К.С.</i>	2	34
<i>Коваленко Н.К.</i> див. <i>Василюк О.М.</i>	3	23
<i>Коваленко Н.К.</i> див. <i>Лівінська О.П.</i>	4	6
<i>Копилов Є.П.</i> див. <i>Адамчук-Чала Н.І.</i>	4	44
<i>Коротаєва Н.В.</i> див. <i>Гудзенко Т.В.</i>	3	31
<i>Коротаєва Н.В.</i> див. <i>Ліманська Н.В.</i>	1	8
<i>Крисенко О.В., Скляр Т.В., Воронкова О.С., Сірокваша О.А., Шевченко Т.М.</i> Особливості складу мікробних асоціацій та стійкості до антибіотиків мікробіоти ротової порожнини	1	35
<i>Кузьмішина С.В., Гнатуш С.О., Баранов В.І.</i> Мікробіота породного відвалу Центральної збагачувальної фабрики Червоноградського гірничопромислового району за внесення золи	4	69
<i>Курдиш І.К.</i> див. <i>Герасименко І.О.</i>	4	61
<i>Кучеров В.О.</i> див. <i>Мірось С.Л.</i>	2	64
<i>Кушкевич І.В.</i> Активність та кінетичні властивості аденозин-5'-фосфосульфатредуктази кишкових сульфатвідновлювальних бактерій	2	54
<i>Кушкевич І.В., Антоняк Г.Л., Фафула Р.В.</i> Активність і кінетичні властивості супероксиддисмутази сульфатвідновлювальних бактерій <i>Desulfovibrio piger Vib-7</i> та <i>Desulfomicrobium sp. Rod-9</i>	4	26
<i>Лана С.В.</i> див. <i>Драгатов І.В.</i>	4	77
<i>Леонова Н.О.</i> див. <i>Драгатов І.В.</i>	4	77



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Автори	№ вип.	№ стор.
Лерер В.О. див. Зінченко О.Ю.	4	52
Литвиненко Р.О. див. Фролов О.К.	2	94
Лівінська О.П., Василенко О.М., Томила Т.В., Гармашева І.Л., Коваленко Н.К. Дослідження тейхоєвих кислот пробіотичних штамів лактобацил із застосуванням фізичних та імунобіологічних методів	4	6
Ліманська Н.В., Коротаєва Н.В., Ямборко Г.В., Іваниця В.О. Вплив <i>Lactobacillus plantarum</i> на утворення пухлин, спричинених <i>Rhizobium radiobacter</i>	1	8
Малиновська І.М. див. Зелена П.П.	1	27
Мацелюх Б.П. див. Голембіовська С.Л.	2	6
Мацелюх О.В. Субстратна специфічність серинової лужної пептидази <i>Bacillus thuringiensis</i> ІМВ В-7324	2	24
Мірось С.Л., Бобрешова Н.С., Кучеров В.О., Буга К.П., Іваниця В.О. Модифікаційна мінливість <i>Auricularia auricula-judae</i> при культивуванні на середовищах різного складу	2	64
Мокросноп В.М., Поліщук О.В., Золотарьова О.К. Вплив етанолу на дихання і фотосинтез <i>Euglena gracilis</i>	3	49
Мухліс Абедалабас, Галкін М.Б., Пахомова Є.Ю., Філіпова Т.О. Кінетика біосинтезу дурамноліпідів та активність рамнозілтрансферази 2 за присутності сигнального хінолону <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	45
Мухліс Абедалабас, Галкін М.Б., Філіпова Т.О. Біосинтез рамноліпідів <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ONU 301 за присутності екзогенного сигнального хінолону	2	15
Нестерова Н.В. див. Білявська Л.О.	1	19
Огірчук К.С., Коваленко Н.К., Полтавська О.А. Оптимізація умов культивування <i>Lactobacillus acidophilus</i> 55 в середовищі з селенітом натрію	2	34
Остапчук А.М. див. Путніков А.В.	2	74
Падалко С.Ф. див. Драгозов І.В.	4	77
Пасічник Л.А. див. Савенко О.А.	3	15
Патика В.П. див. Савенко О.А.	3	15
Пахомова Є.Ю. див. Мухліс Абедалабас	1	45
Пирог Т.П. див. Берегова Х.А.	3	57
Повниця О.Ю. див. Білявська Л.О.	1	19
Позур В.В. див. Путніков А.В.	2	74
Позур В.К. див. Зелена П.П.	1	27
Позур В.К. див. Шевченко Ю.І.	3	6
Поліщук В.П. див. Руднева Т.О.	4	15
Поліщук О.В. див. Мокросноп В.М.	3	49
Полтавська О.А. див. Огірчук К.С.	2	34



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ

Автори	№ вип.	№ стор.
Пристаї М.В. див. Шульга О.М.	2	85
Пузирьова І.В. див. Гудзенко Т.В.	1	72
Путніков А.В., Рудик М.П., Позур В.В., Фурзікова Т.М., Остапчук А.М., Толстанова Г.М., Сківка Л.М. Вплив мультипробіотика «Симбітер ацидофільний» на функціональну активність перитонеальних макрофагів щурів на тлі введення антибіотика цефтріаксону	2	74
Радченко О.С., Степура Л.Г., Юмина Ю.М., Борецька М.О., Зелена П.П. Зміна деяких біологічних властивостей <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> під впливом додецилсульфату натрію	1	53
Ребець О.Л. див. Фролов О.К.	2	94
Рудик М.П. див. Путніков А.В.	2	74
Руднєва Т.О., Шевченко Т.П., Цвігун В.О., Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Філогенетична спорідненість українських ізолятів вірусу мозаїки кавуна 2	4	15
Русакова М.Ю., Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Івах В.В., Тілянов О.О. Продукція сидерофорів бактеріями роду <i>Pseudomonas</i>	4	88
Савенко О.А., Буценко Л.М., Пасічник Л.А., Патица В.П. RAPD-аналіз <i>Pseudomonas syringae</i> , виділених з бур'янів в агрофітоценозі пшениці	3	15
Сейфулліна І.Й. див. Зінченко О.Ю.	4	52
Сергєєва Ж.Ю., Іваниця В.О. Плазмідні профілі фітопатогенних бактерій родів <i>Erwinia</i> , <i>Ralstonia</i> , <i>Agrobacterium</i> , визначені різними методами	4	36
Сищикова О.В. Біологічні властивості та таксономічний склад стрептоміцетів природних ґрунтів та техноземів Криворіжжя	1	91
Сідашенко О.І., Воронкова О.С., Шевченко Т.М., Сірокваша О.А. Чутливість до антибіотиків планктонних та біоплівкових культур <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	63
Сідашенко О.І., Шевченко Т.М., Воронкова О.С., Сірокваша О.А., Вінніков А.І. Вплив фторхінолонів на біоплівки <i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	77
Сірокваша О.А. див. Крисенко О.В.	1	35
Сірокваша О.А. див. Сідашенко О.І.	1	63
Сірокваша О.А. див. Сідашенко О.І.	3	77
Сківка Л.М. див. Зелена П.П.	1	27
Сківка Л.М. див. Путніков А.В.	2	74
Скляр Т.В. див. Крисенко О.В.	1	35
Скурник М. див. Шевченко Ю.І.	3	6
Степура Л.Г. див. Радченко О.С.	1	53
Тимчук О.А. див. Жерносєкова І.В.	1	79
Титова Л.В. див. Адамчук-Чала Н.І.	3	40



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ У 2014 РОЦІ**

<b>Автори</b>	<b>№ вип.</b>	<b>№ стор.</b>
<i>Тітлянов О.О. див. Русакова М.Ю.</i>	4	88
<i>Ткаченко В.П. див. Жерносєкова І.В.</i>	1	79
<i>Толстанова Г.М. див. Путніков А.В.</i>	2	74
<i>Томила Т.В. див. Лівінська О.П.</i>	4	6
<i>Фафула Р.В. див. Кушкевич І.В.</i>	4	26
<i>Федотов О.В., Волошко Т.Є.</i> Отримання та аналіз ферментних препаратів оксидоредуктаз деяких базидіоміцетів	3	65
<i>Філіпова Т.О. див. Мухліс Абедалабас</i>	1	45
<i>Філіпова Т.О. див. Мухліс Абедалабас</i>	2	15
<i>Філіпова Т.О. див. Русакова М.Ю.</i>	4	88
<i>Фролов О.К., Литвиненко Р.О., Ребець О.Л., Юрчук І.С.</i> Вплив екзогенних біологічно активних речовин медичної п'явки на біологічні властивості <i>Escherichia coli</i> 3912/41	2	94
<i>Фурзікова Т.М. див. Путніков А.В.</i>	2	74
<i>Цвігун В.О. див. Руднєва Т.О.</i>	4	15
<i>Шевченко Т.М. див. Крисенко О.В.</i>	1	35
<i>Шевченко Т.М. див. Сідашенко О.І.</i>	1	63
<i>Шевченко Т.М. див. Сідашенко О.І.</i>	3	77
<i>Шевченко Т.П. див. Руднєва Т.О.</i>	4	15
<i>Шевченко Ю.І., Позур В.К., Скурник М.</i> Участь WaaL лігаз бактерій <i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 та O:8 в формуванні резистентності до сироватки крові	3	6
<i>Шепелевич В.В. див. Зелена П.П.</i>	1	27
<i>Шермолович Ю.Г. див. Білявська Л.О.</i>	1	19
<i>Шматкова Н.В. див. Зінченко О.Ю.</i>	4	52
<i>Шульга О.М., Пристай М.В., Карпенко І.В., Щеглова Н.С., Вільданова Р.І.</i> Вплив алюмокалієвих галунів на синтез мікробних поверхнево-активних сполук	2	85
<i>Щеглова Н.С. див. Шульга О.М.</i>	2	85
<i>Юмина Ю.М. див. Зелена П.П.</i>	1	27
<i>Юмина Ю.М. див. Радченко О.С.</i>	1	53
<i>Юрчук І.С. див. Фролов О.К.</i>	2	94
<i>Яворська Н.В. див. Зелена П.П.</i>	1	27
<i>Ямборко Г.В. див. Басюл О.В.</i>	2	45
<i>Ямборко Г.В. див. Ліманська Н.В.</i>	1	8
<i>Янченко Л.М. див. Голембіовська С.Л.</i>	2	6



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

**Текст статті має включати такі складові:**

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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



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

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

### **ВРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ**

#### **На книги**

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

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

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

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

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

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

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

#### **На журнальні статті**

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

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

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

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





### **На тези доповідей**

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

### **На депоновані наукові роботи**

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

### **На стандарти**

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

### **На автореферати дисертацій**

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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

Верстка В.Г. Вітвицька

Підписано до друку 26.12.2014 р. Формат 70x100/16.  
Ум.-друк. арк. 9,7. Тираж 100 пр.  
Зам. № 1122.

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

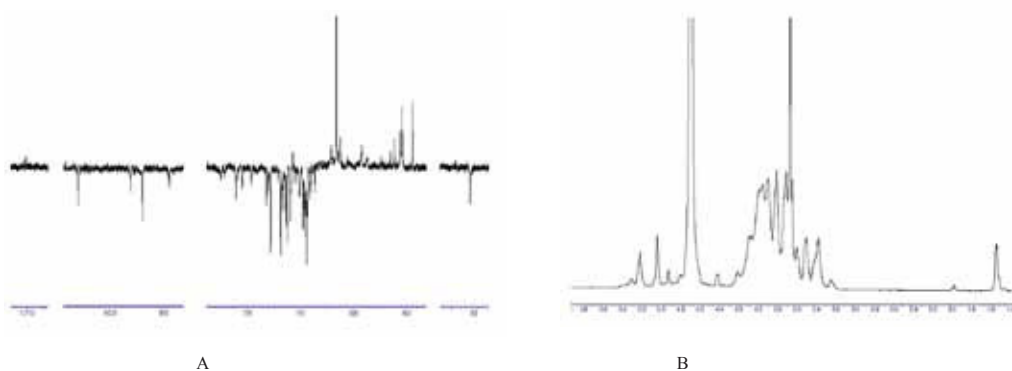
*Шановні колеги!*

*У журналі “Мікробіологія і біотехнологія” № 4 за 2014 рік у статті*

**О.Р. Livinska, О.М. Vasilenko, Т.V. Tomila, I. L.Garmasheva, N.K. Kovalenko**

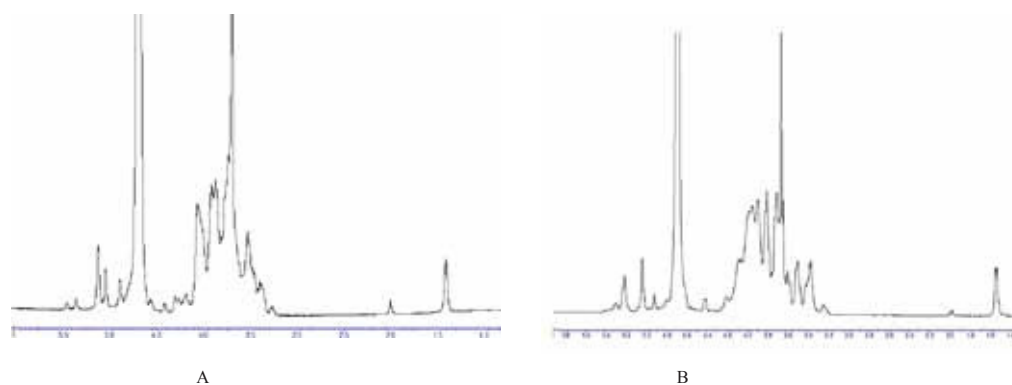
**PHYSICAL AND IMMUNOBIOLOGICAL STUDIES OF TEICHOIC ACIDS OF  
PROBIOTIC LACTOBACILLI STRAINS**

На с. 10 - Fig 3 - A (Proton NMR-spectra of teichoic acids from *Lactobacillus plantarum* 11/16) замість спектру, який представлений:



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

має бути:



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