

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

№ 2(30)
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), 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 № 6 від 23.06.2015 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), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), S.A. Petrov (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 6, 23.06.2015

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](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

О.Є. Боброва, Й.Б. Крістофферсен, В.О. Іваниця МЕТАГЕНОМНИЙ 16S РРНК АНАЛІЗ МІКРОБНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ЧОРНОГО МОРЯ В РАЙОНІ ОСТРОВА ЗМІЇНИЙ	6
С.В. Бабій, Л.В. Лейбенко, А.Ю. Фесенко, Л.В. Радченко, О.Ю. Смутько, О.Г. Бояльська, А.П. Міроненко ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНУ НЕЙРАМІНІДАЗИ ВІРУСІВ ГРИПУ А(Н3N2), ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В СЕЗОНІ 2013–2014 РР	20
Н.В. Ліманська, Д.О. Бабенко, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця ВИЯВЛЕННЯ ГЕНІВ ПЛАНТАРИЦИНІВ У ШТАМІВ <i>LACTOBACILLUS</i> <i>PLANTARUM</i> – АНТАГОНІСТІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ	27
О.Д. Масловська, С.О. Гнатуш ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА ПИТОМА АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ БАКТЕРІЙ <i>DESULFUROMONAS</i> <i>ACETOXIDANS</i> ІМВ В-7384 ЗА ВПЛИВУ ФЕРУМ ЦИТРАТУ	34
О.О. Нечипуренко, М.А. Хархота, К.С. Бордунос, Л.В. Авдєєва РІСТ І УТВОРЕННЯ КАРОТИНІВ ШТАМАМИ <i>BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS</i> УКМ В-5113 ТА <i>B. SUBTILIS</i> 1.1 В УМОВАХ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ	41
І.Л. Гармашева, О.М. Василюк, Н.К. Коваленко, Л.Т. Олещенко ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИРОДИ АНТАГОНІСТИЧНОЇ ДІЇ ШТАМІВ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ЩОДО УМОВНО-ПАТОГЕННИХ ТА ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ	49
Л.Л. Сіда, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко, А.І. Вінніков ВПЛИВ АНТИСЕПТИКІВ І ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ	59
Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМУ <i>BREVIBACTERIUM FLAVUM</i> ІМВ В-7446 ТА ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСИНТЕЗУ ТРЕОНІНУ	68
Є.П. Копилов, Г.В. Цехмістер ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНІСТЬ ГРИБА <i>ACREMONIUM</i> SP. 502, ВИДІЛЕНОГО З УРАЖЕНИХ РОСЛИН ОГІРКІВ	80
А.В. Путніков, Ю.В. Голота, Т.М. Сергійчук, А.М. Остапчук, Л.В. Закордонець, Л.І. Остапченко, Г.М. Толстанов КІЛЬКІСНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ КИШКОВОЇ НОРМОБІОТИ ЩУРІВ	89
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	101

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

- O.E. Bobrova, J.B. Kristoffersen, V.O. Ivanytsia**
METAGENOME 16S RRNA GENE ANALYSIS OF THE BLACK SEA
MICROBIAL DIVERSITY IN THE REGION OF THE ZMIINYI ISLAND 6
- S.V. Babii, L.V. Leibenko, A.Yu. Fesenko, L.V. Radchenko,
O.Yu. Smutko, O.G. Boyalska, A.P. Mironenko**
PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NEURAMINIDASE GENE OF INFLUENZA
A(H3N2) VIRUSES ISOLATED IN UKRAINE IN 2013-2014 SEASON..... 20
- N.V. Limanska, D.O. Babenko, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia**
DETECTION OF PLANTARICIN GENES IN STRAINS
OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* – ANTAGONISTS
OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA 27
- O. Maslovska, S. Hnatush**
OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND SPECIFIC SUPEROXIDE
DISMUTASE ACTIVITY OF *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*
IMV B-7384 BACTERIA UNDER THE INFLUENCE OF FERRIC CITRATE .34
- O.O. Нечипуренко, М.А. Хархота, К.С. Бордунос, Л.В. Авдєєва**
РІСТ І УТВОРЕННЯ КАРОТИНІВ ШТАМАМИ
BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS УКМ В-5113 ТА *B. SUBTILIS* 1.1
В УМОВАХ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ 41
- O. Nechypurenko, M. Kharkhota, K. Bordunos, L. Avdeeva**
GROWTH AND CAROTENE SYNTHESIS BY THE STRAINS *BACILLUS*
AMYLOLIQUEFACIENS UCM B-5113 AND *B. SUBTILIS* 1.1
AT SUBMERGED CULTIVATION 49
- L.L. Sedaya, O.S. Voronkova, E.A. Sirokvasha, T.N. Shevcheno,
A.I. Vinnikov**
INFLUENCE OF ANTISEPTIC AND DESINFECTIVE PREPARATES
ON FILMFORMING BACTERIA 59
- G.S. Andriiash, G.M. Zabolotna, A.F. Tkachenko, S.M. Shulga**
THREONINE MUTANT STRAIN-PRODUCER *BREVIBACTERIUM*
FLAVUM IMB B-7446 CHARACTERISTICS AND OPTIMIZATION
PROCESS OF ITS BIOSYNTHESIS..... 68
- E.P. Kopilov, G.V. Tsehmister**
CELLULOLYTIC ACTIVITY OF STRAIN OF THE FUNGUS *ACREMONIUM*
SP. 502 PICKED UP FROM AFFECTED CUCUMBER PLANTS 80
- A.V. Putnikov, Yu.V. Holota, T.M. Sergeychuk, A.M. Ostapchuk,
L.V. Zakordonets, L.I. Ostapchenko, G.M. Tolstanova**
QUANTITATIVE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF RAT
INTESTINAL MICROBIOTA..... 89
- ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 101



УДК 579.6+ 578

О.Е. Bobrova¹, J.B. Kristoffersen², V.O. Ivanytsia¹

¹Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., 65082, Odesa, Ukraine,
e-mail: o.bobrova@onu.edu.ua

²Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research,
Gournes 71500, 71003 Heraklion, Greece

METAGENOME 16S RRNA GENE ANALYSIS OF THE BLACK SEA MICROBIAL DIVERSITY IN THE REGION OF THE ZMIINY ISLAND

*The aim of the study was to determine the marine microbial biodiversity of the Zmiiny island coastal seawater with the help of metagenomic analysis. **Methods.** The dual-indexing primers were used to amplify v4 region of the 16S rRNA gene. Sequencing was performed on Illumina MiSeq platform. Nucleotide sequences were analyzed by SILVAngs and QIIME pipelines. **Results.** As the result of metagenomics 16S rRNA gene analysis there were detected about 3200 Operational Taxonomic Units. The main revealed phyla among domain Bacteria were: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, Fusobacteria, Firmicutes and candidate divisions of uncultivated prokaryotic representatives: SRI, BD1-5, BHI80-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 and TM6. As a result of taxonomy analysis lots of bacterial families and genera were identified. The most abundant genera among studied samples were: Marivita, Loktanella, Paracoccus, Pseudoalteromonas, Vibrio, Coraliomargarita, Acholeplasma, Pseudomonas, Phaeobacter, Neptunomonas, Allivibrio, Oceaniserpentilla, Oceanospirillum, Robiginitalea, Acinetobacter, Haliea. **Conclusion.** The metagenomic 16S rRNA gene analysis allowed evaluating of rich taxonomic prokaryotes diversity in the Zmiiny island area of the Black Sea surface water. Lots of them were either poorly investigated or uncultivable.*

Key words: the Black Sea, the Zmiiny island, seawater, the 16S rRNA gene analysis, taxonomic diversity, metagenomics, marine microbial diversity, candidate divisions, new generation sequencing technologies.

Microorganisms play an essential role in marine ecosystems [3]. Different global metagenomics investigations held in open Ocean and coastal waters [5, 14, 20] helped to estimate prokaryotic microorganisms distribution in space [19, 21], their taxonomic diversity [17] and role in biogeochemical processes [10]. Based on it there were observed dominant taxa distribution of microbial communities in water habitats: Proteobacteria, Actinobacteria, Flavobacteria, Bacteroidetes [11].



The Zmiinyi island is situated on the shelf in north-western part of the Black Sea at approximate distance of 37 km from the Kiliya Danube estuary. The island's coastal waters marine ecosystem is highly influenced by the Danube river flow which brings nutrients and allochthonic microorganisms. That leads to forming of the unique microbiota composition in this area of the sea.

In the last half of XX century, microbiological investigations gave first understanding about taxonomic composition of the Black Sea coastal and Deepwater regions living microorganisms [2, 3]. Due to the military activity on the island the studies of the Black Sea biological diversity in this area were not held till 2002. The following demilitarization studies made by Odessa National University microbiologists were fragmentary and allowed to determine different heterotrophic bacteria, to investigate separate groups of microorganisms and the influence of the environment on it [1, 4].

The investigations made with the help of classical isolation and pure cultures analysis methods do not allow to evaluate marine microbiota taxonomic composition. It's considered that only 1% of existing prokaryotes are capable of cultivation on nutrient media [12]. It is suggested that there are at least 38 known taxonomic groups of uncultivated prokaryotic representatives, referred to as candidate divisions or candidate phyla [13].

For deeper understanding of the processes, occurring in marine ecosystem, it is important to know more about biological diversity of prokaryotic populations that inhabit these waters. Therefore the aim of this research is to determine the microbial diversity of the Zmiinyi island coastal waters with the help of the metagenomic 16S RNA gene analysis by total DNA extraction and pyrosequencing with following bioinformatics analysis.

Materials and methods

Sampling of marine water for the analysis of microbial diversity took place in July 2014 in the region of the Zmiinyi island at the depth of 1 meter from the surface in three sterile glass bottles in a volume 750 ml each. Three replicate samples marked as Zm1, Zm2, Zm3 were collected at the same location with coordinates 45.257426, 30.203378 (Fig. 1). The samples were stored at -4°C till further processing in the laboratory. Water was filtered through 0.22 μm membrane filters (Sartorius) for separation of microorganisms.

Isolation of the nucleic acids from microorganisms collected by filtration was performed with the Power Water DNA isolation kit (MO BIO Laboratories). The DNA extraction procedure was performed as described by the manufacturer's instructions. The size of extracted DNA was evaluated by electrophoresis on a 0.8% agarose gel.

The primer design followed Kozich et al. [15], who modified the single-index method by Caporaso et al. [7] to a more efficient dual index approach. The Caporaso et al. primers are used in the Earth Microbiome project. Each PCR primer (Table 1) consists of the appropriate Illumina adapter, an 8-nt index sequence, a 10-nt pad sequence, a 2-nt linker, and the 16S pDNA V4 variable region specific primer pair



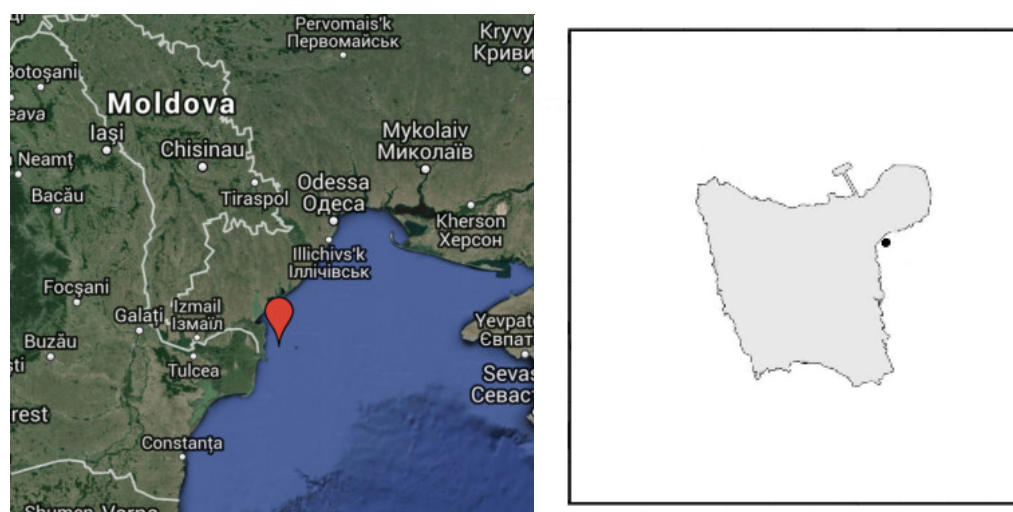


Fig. 1. Map-scheme of Zmiinyi island with marked sampling site

515f, 806r. That composed the insert fragment of about 253 bp. The complete amplified product by those primers was around 387 bp.

PCR reactions were performed using KAPA HiFi HotStart PCR kits (Kapa Biosystems). Each PCR reaction contained 0.2 M Trehalose, 5 μ l Fidelity buffer, 0.75 μ l KAPA dNTP mix, 0.3 μ M of the forward and reverse primers, 0.5 units KAPA HiFi polymerase, about 25 ng template DNA, and PCR grade water until 25 μ l. Thermal cycling conditions were: 95 $^{\circ}$ C for 3 min followed by 27 cycles of 98 $^{\circ}$ C for 20 s, 61 $^{\circ}$ C for 10 s, and 72 $^{\circ}$ C for 15 s. A final extension step was performed at 72 $^{\circ}$ C for 5 min.

Table 1

Primers used in this study

Name	Adapter	Index	Primer pad	Linker	16S primer
SB502 ^(F)	AATGATACGGCGA CCACCGAGATCTACAC	CGTTACTA	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB504 ^(F)	AATGATACGGCGACCA CCGAGATCTACAC	TACGAGAC	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB505 ^(F)	AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACAC	ACGTCTCG	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB501 ^(F)	CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	CTACTATA	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB704 ^(R)	CAAGCAGAAGACG GCATACGAGAT	CATAGAGA	AGTCAGTCAG	CC	GGACTACHVGGG TWTCTAAT

^(F) – Forward primer, ^(R) – Reverse primer



The PCR products were purified with AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter). The amount of DNA in purified reactions was estimated by fluorimeter using the Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Life Technologies) and a plate fluorometer (QuantiFluor). Then the equimolar mix was made from the purified products in order to get approximately equal contribution from each sample. There were also included an empty extraction blank (negative control probe) from the Power Water DNA isolation kit as a negative control. The final pool of obtained 16S rDNA amplicon library was quantified with a KAPA Universal qPCR kit (Kapa Biosystems).

Custom Read1, Read2 and Index1 primers [7] were used for sequencing run. Read1 primer consisted of same as pad+linker+16S (F), Read2 – pad+linker+16S (R), Index1 – Reverse Compliment of Read2 primer. The library was diluted to a final concentration of five pM before loading.

Sequencing was performed on an Illumina MiSeq using v2 reagents kit (MiSeq Reagent kit v2) with 250 cycles for Read1, 8 cycles each for index F and index R reads, and 250 cycles for Read2.

The unprocessed raw sequences after run were analyzed with the help of two bioinformatics pipelines, QIIME (Quantative Insights into Microbial Ecology) [6] and SILVAngs [18]. The pair end reads were quality controlled in FastQC v. 0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The PEAR tool [24] was used for merging the overlapping pair end data and generating of assembled read files. The merged reads were converted to fasta format.

First step of bioinformatic analysis of obtained nucleotide sequences was made in SILVAngs pipeline. For the second analysis all the manipulations were performed in the Bio-linux 7 operating system. After quality control reads were manually trimmed from contamination and quality controlled again. The obtained sequences were used as input for the bioinformatics pipeline QIIME, version 1.8.0 [6]. For visualization of the results MEGAN (version 5_7_0) analyzer was applied.

Results and discussion

As the result of sequencing run there were produced 80206 raw sequences belonged to the 3 studied marine water samples replicas Zm1, Zm2, Zm3 and to the one negative control. Demultiplexing was done automatically by the MiSeq Reporter software at the completion of the sequencing run. All the reads were assigned to their sample according to the unique index sequences for each sample. The sequences were quality controlled in FastQC (Babraham Bioinformatics project), trimmed from adapters, primers and highly repeated regions, and quality controlled again. Finally, there were 79748 sequences remained and were used as the input for bioinformatics analysis.

After SILVAngs analysis there were classified 99.11% of all sequences using reference Silva database, and only 0.82% of sequences were identified as “No relative”.

For the QIIME workflow we used the *de novo* picking strategy. Based on sequence identity the trimmed sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs), which in traditional taxonomy represent groups of organisms defined by intrinsic phenotypic similarity [16]. The level of threshold was set at 97%



of sequence similarity. Most part of sequences (99.8%) were classified in QIIME workflow and 0.2% sequences had no relative. Comparing to SILVAngs analysis the use of QIIME allowed classifying the OTUs up to genus level.

Fig. 2. illustrates alpha diversity (within sample diversity), made in QIIME workflow for studied samples.

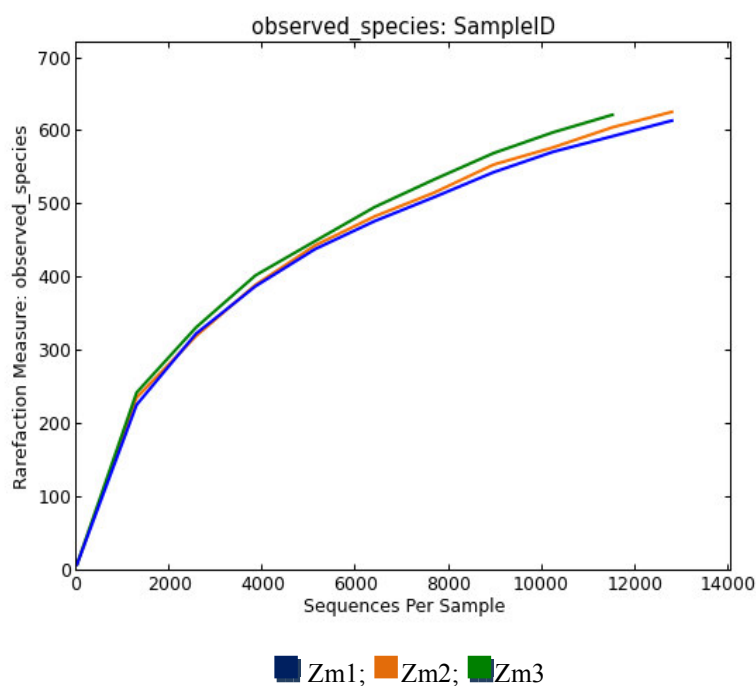


Fig. 2. Analysis of alpha rarecurves at the 97% similarity level. The curves demonstrate the number of observed OTUs as a function from samples sequences

Both SILVAngs and QIIME workflows identified 10 main phyla among the domain *Bacteria*: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*, *SRI*, *Fusobacteria* and *Firmicutes* (Fig. 3, 4).

Graphical representation of the sequence frequency in the studied water samples, showing major detected classes within the *Bacteria* domain. The color of the symbol represents the relative frequency of the taxonomic path within the sample. The size of the symbol represents the number of the OTUs at deeper phylogenetic levels within the taxonomic path. The shape of the symbol represents the number of sequences in the specific taxonomic path.

At the same level some important differences in taxonomic assignments between two bioinformatic analyses were found. The SILVAngs data points at the presence of candidate divisions such as: BD1-5, BHI80-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 and TM6 (Fig. 3). All these divisions were formed on the base of investigations of the 16S rRNA gene data derived from metagenomics studies



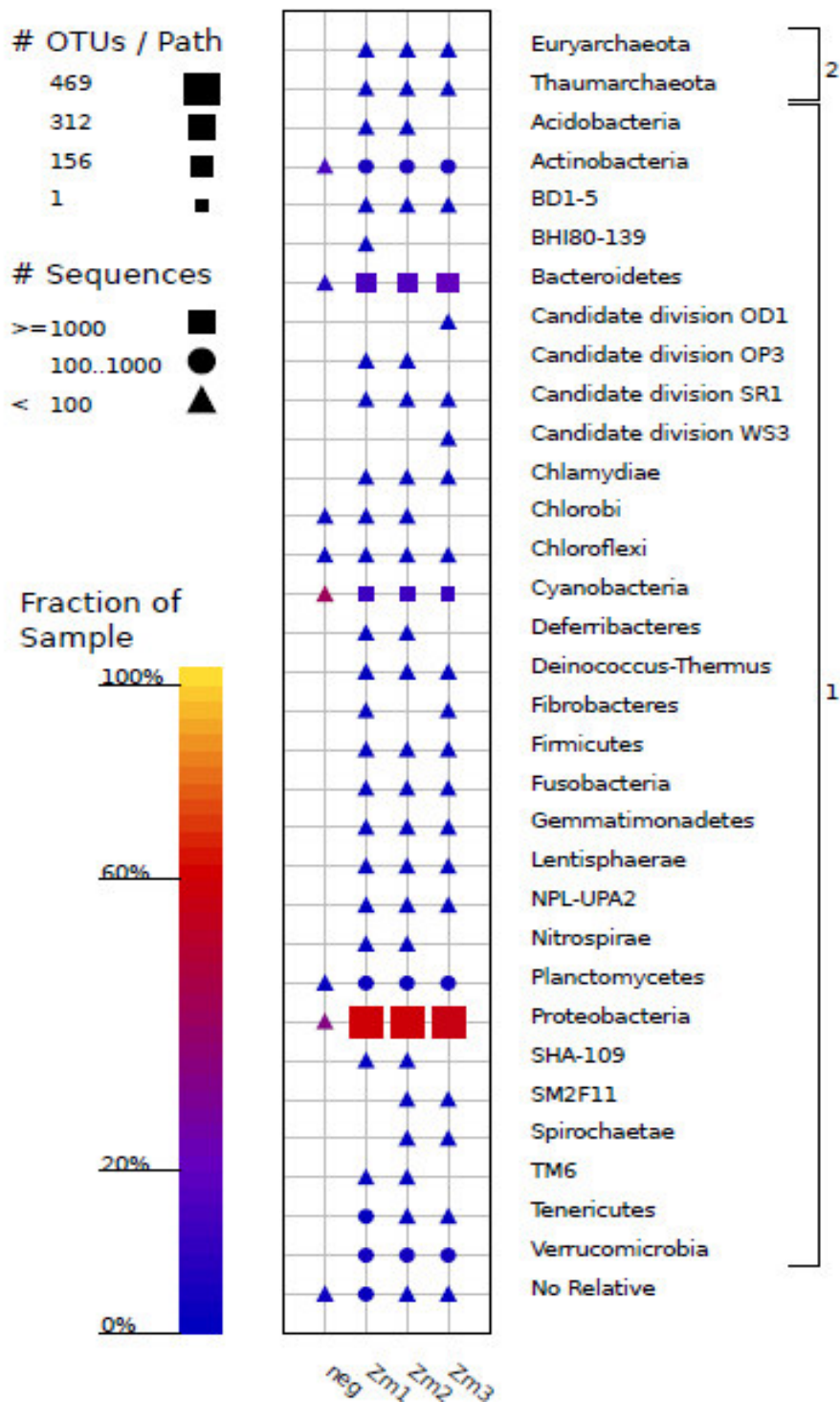


Fig. 3. Taxonomy fingerprint at the phylum level obtained in the SILVAngs pipeline.

of environmental samples. Most part of them was first described for water samples from Yellowstone National Park [9].

QIIME workflow gave opportunity to identify only representatives of SR1 candidate division. However, it has a big group marked as ‘Others’. It includes species, where little information is known or the information is absent in reference Greengenes database (<http://greengenes.secondgenome.com>). Otherwise, their representatives might be presented in small amounts. This can be explained that Silva is the database for the 16S rRNA gene sequences from marine samples whereas Greengenes database contains information from other databases to produce a set of sequences for complete phylogenetic assay.

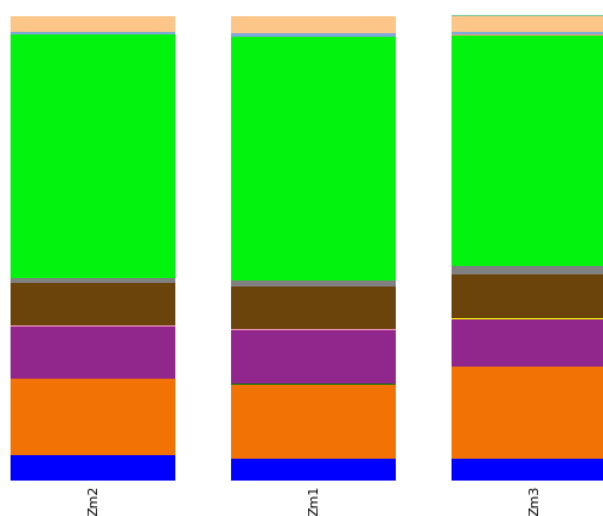


Fig. 4. Bar charts constructed in the QIIME workflow represent the taxonomic distribution of phylogenetic groups at the phylum level

Note: phyla name definitions see in Table 2.

Archaeal sequences were detected in small amounts (less than 100 sequences) by SILVAngs analysis. They belonged to two classes *Thaumarchaeota* and *Euryarchaeota* (Fig. 3).

In the result of the sequence run, there were obtained 272 raw sequences, belonging to negative control. The presence of sequences in the extraction blank may occur due to technical issues such as mixed clusters and tag jumping. These are limitations presently inherent to this sequencing technology.

As it is seen from Table 2 the most abundant phylum for the *Bacteria* domain was *Proteobacteria* (51.4% from all sequences). The most represented classes among *Proteobacteria* were: *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria*. The members of these two classes were also dominating in the Sargasso Sea investigation [20] with the only difference that *Alphaproteobacteria* was the most abundant in Sargasso Sea region. The studied samples are characterized by relatively low representation of other *Proteobacteria* members such as *Betaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* and *Deltaproteobacteria*.

Table 2

Quantity distribution of *Bacteria* domain representatives at the phylum level

Legend	Taxonomy	Total %	Zm1 %	Zm2 %	Zm3 %
	<i>Bacteria; Proteobacteria</i>	51.4	52.4	52.3	49.6
	<i>Bacteria; Bacteroidetes</i>	17.3	15.9	16.2	19.7
	<i>Bacteria; Cyanobacteria</i>	11.1	11.6	11.3	10.4
	<i>Bacteria; Other</i>	9.2	9.2	9.1	9.4
	<i>Bacteria; Actinobacteria</i>	5.1	4.9	5.7	4.8
	<i>Bacteria; Verrucomicrobia</i>	3.5	3.7	3.4	3.4
	<i>Bacteria; Planctomycetes</i>	1.4	1.3	1.2	1.8
	<i>Bacteria; Tenericutes</i>	0.6	0.8	0.5	0.6
	<i>Bacteria; SRI</i>	0.1	0.1	0.1	0.1
	<i>Bacteria; Fusobacteria</i>	0.06	0.1	0.1	0.0
	<i>Bacteria; Firmicutes</i>	0.03	0.0	0.1	0.0

The second sufficiently abundant phylum among domain *Bacteria* were the members of *Bacteroidetes* (17.3%). This taxonomy group includes non-spore forming Gram-negative anaerobic bacteria that are widely spread in the marine environment and sediments. Within this taxa, the most represented were members of two classes such as *Flavobacteria* and *Sphingobacteria*. The representatives of *Flavobacteria* were observed in similar investigation of Arctic and Antarctic regions where it was shown that most part of these bacteria inhabit surface water [11].

Cyanobacteria members known as typical marine inhabitants presented 11.1% of all sequences.

Actinobacteria members presented 5.1% from total diversity in the studied area. Among this phylum the most abundant were members of order *Actinomycetales* that are well known as antibiotics producing bacteria.

The *Verrucomicrobia* bacteria are detected in amount of 3.5% from total OTUs. This phylum is characterized by inhabitants of fresh water and soil environments. The most abundant orders among this phylum in studied samples were *Opitutales* and *Verrucomicrobiales*.

The other phylum *Planctomycetes* composed of 1.4 % of the bacterial diversity. These species are the typical colonizers of salt and fresh water reservoirs.



The QIIME workflow allowed identification of studied samples' sequences up to genus level. During this analysis Megan analyzer tool was used for bright visualizations of the results. The Fig. 5 illustrates so called taxonomy clouds for Zm1, Zm2 and Zm3 samples. The size of the print reflects the bacterial composition of mentioned group representatives' in the samples.

As it is seen from Fig. 5, besides *Bacteroidetes* and *Actinobacter* (described above) members of the *Pseudoalteromonas* genus are sufficiently represented. These are non-spore forming, aerobic, Gram-negative marine bacteria.

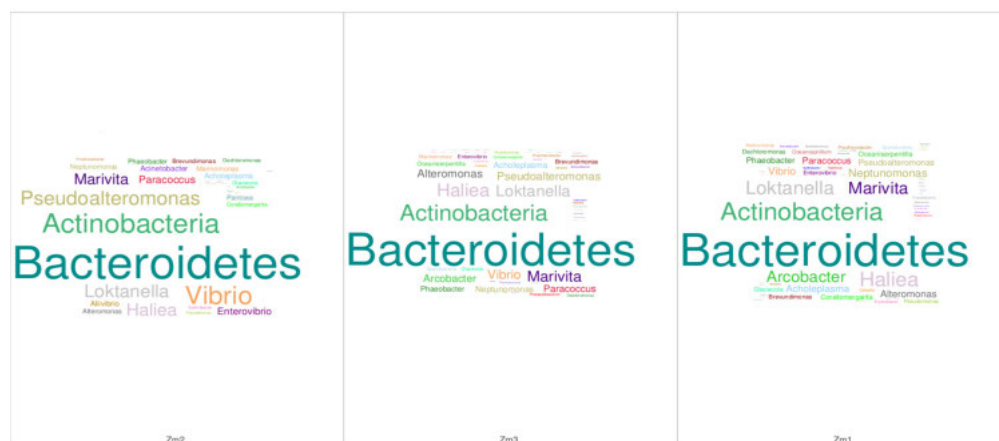


Fig. 5. Cloud charts represent the taxonomic diversity compositions among studied samples

The members of the *Vibrio* genus are also very abundant among studied samples and are typically found in seawater and are facultative anaerobes. Such genera as *Marivita*, *Loktanella* and *Paracoccus* are the representatives of *Rhodobacteraceae* family. *Loktanella* genus was previously observed in surface waters of Arctic and Antarctic polar regions [11]. The members of this family were observed in the coastal waters of the Atlantic and the Pacific oceans, surface waters of the Sargasso Sea, the Arctic and the Antarctic seas [8, 11, 20]. *Rhodobacterales* are also known for its ability to photosynthesis.

Fig. 5 shows that there are lots of representatives of the *Haliea* genus in samples. In literature, it is little known about this genus. These are novel aerobic, Gram-negative bacteria previously isolated from the surface of coastal waters of the north-western Mediterranean Sea [22].

The members of *Acrobacter* genus noticed in Zm1 and Zm3 samples are Gram-negative, spiral-shaped bacteria in the *Campylobacteraceae* family. These species inhabit wide range of environmental niches.

Among other taxonomic genera abundant in studied samples were such representatives as: *Lutibacter*, *Robiginiales*, *Tenacibaculum*, *Winogradskyella*, *Lewinella*, *Bacillariophyta*, *Cryptomonadaceae*, *Rhodopirellula*, *Brevundimonas*, *Maricaulis*, *Phaeobacter*, *Erythrobacter*, *Prosthecobacter*, *Spartobacteria*,



Coraliomargarita, *Acholeplasma*, *SR1*, *Enterovibrio*, *Aliivibrio*, *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Oceaniserpentilla*, *Neptunomonas*, *Marinomonas*, *Umboniibacter* and others.

As a result of downstream QIIME analysis there was obtained a biom file (Biological Observation Matrix) with a table of all detected OTUs. This file was used for the visualization of phylogeny in MEGAN application. Fig. 6 shows a phylogenetic tree, which demonstrates the phylogenetic relatedness between all OTUs in studied samples. It is seen that the microbiota of the studied water is diverse and abundant

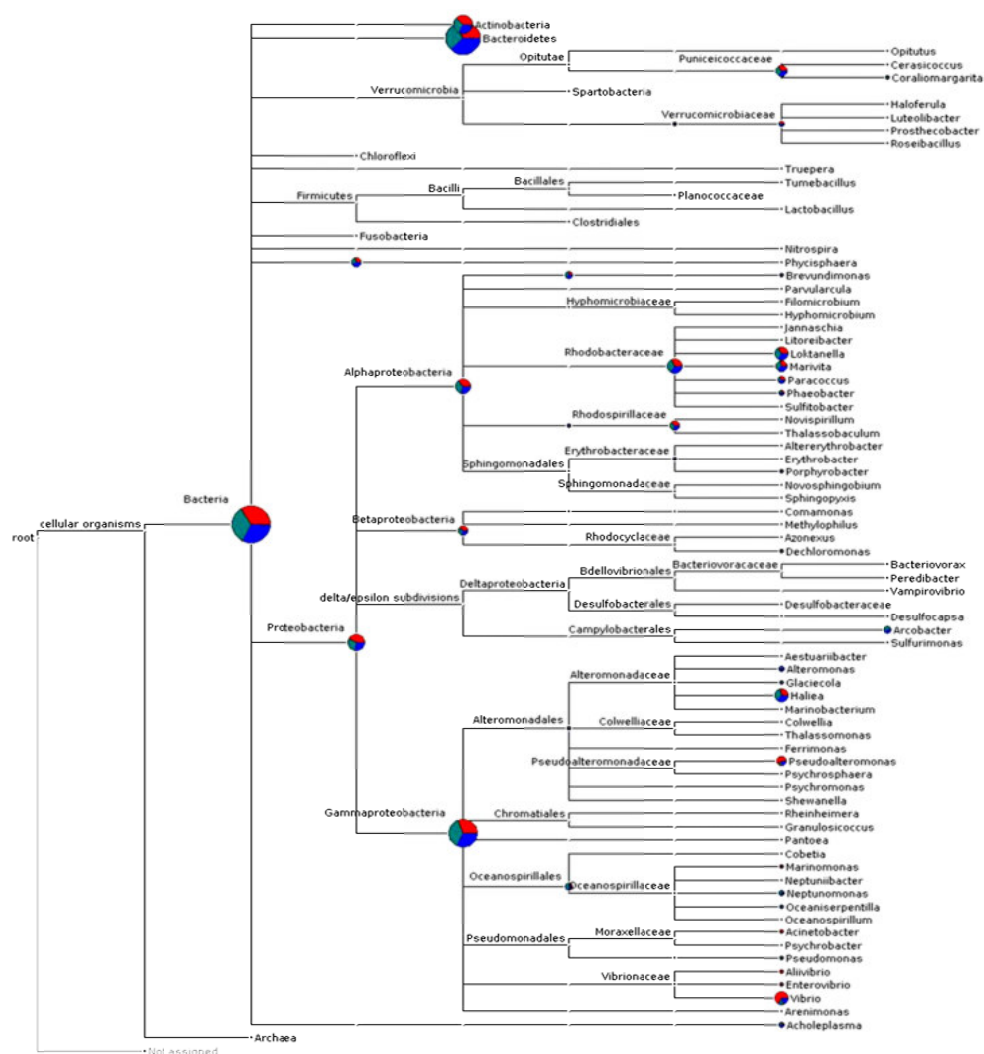


Fig. 6. Phylogenetic tree presented as a cladogram demonstrates the genus relatedness

In the result of the metagenomic 16S rRNA gene analysis, there were detected bacterial populations that inhabit surface waters of the Zmiinyi island. There

were obtained about 3200 OTUs among studied marine samples. There were detected 10 main phyla among *Bacteria* domain: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*, *SRI*, *Fusobacteria* and *Firmicutes*. Among them there were dominant classes: *Gamma*proteobacteria, *Alpha*proteobacteria, *Cyanobacteria*, *Flavobacteria*, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Beta*proteobacteria, *Opitutae*, *Planctomycetacia*, *Epsilon*proteobacteria, *Verrucomicrobiae*, *Mollicutes*, *Delta*proteobacteria, *Fusobacteria* and others.

The majority of studied bacterial representatives belonged to orders *Flavobacteriales*, *Alteromonadales*, *Rhodobacterales*, *Actinomycetales*, *Acidimicrobiales*, *Sphingobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Rhodospirillales*, *Planctomycetales*, *Vibrionales*, *Puniceococcales* etc.

In the result of the taxonomic analysis, the majority of bacterial families and genera were identified. The most represented genera among studied samples were: *Marivita*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Coralimargarita*, *Acholeplasma*, *Pseudomonas*, *Phaeobacter*, *Neptunomonas*, *Allivibrio*, *Oceaniserpentilla*, *Oceanospirillum*, *Robiginitalea*, *Acinetobacter*, *Haliea*.

The results of SILVAngs and QIIME analyses coincide and supplement with each other. Thus, with the help of SILVAngs there were identified sequences belonging to two classes of *Archaea* domain: *Thaumarchaeota* and *Euryarcheota*. In the mentioned above metagenomics study of the Sargasso Sea these two archaea classes were also observed in small amounts.

The obtained data showed that the majority of the identified bacterial groups are typical representatives of marine environments. Many of them are poorly investigated and have not been cultivated yet. The obtained results agree with literature data on similar marine investigations [8, 9, 11, 20, 22] and provide far more data on composition and abundances of the microbiota comparing to classical microbiology methods. The provided metagenome of the 16S rRNA gene allowed to evaluate rich taxonomic diversity of prokaryotes in the surface water of the Zmiinyy island.

О.Є. Боброва¹, Й.Б. Крістофферсен², В.О. Іваниця¹

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.:+38 (0482) 68 79 64, e-mail: o.bobrova@onu.edu.ua

²Інститут Морської Біології, Біотехнології та Аквакультури, Грецький Центр Морських Досліджень, Гурнес 71500, 71003 Іракліон, Греція

МЕТАГЕНОМНИЙ 16S РРНК АНАЛІЗ МІКРОБНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ЧОРНОГО МОРЯ В РАЙОНІ ОСТРОВА ЗМІЙНИЙ

Реферат

Метою дослідження було визначення морського мікробної біорізноманітності прибережної морської води острова Зміїний за допомогою метагеномного аналізу. **Методи.** Для ампліфікації v4 області 16S рРНК гена використовували



праймери з двома індексами. Секвенування здійснювали на платформі Illumina MiSeq. Нуклеотидні послідовності аналізували за допомогою програм SILVAngs та QIIME. **Результати.** В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу в прибережних водах острова Зміїний виявлено близько 3200 ОТЕ. Виявлені основні відділи домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, Fusobacteria, Firmicutes і кандидатні відділи некультивованих представників прокариот: SR1, BD1-5, BH180-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 та TM6. В результаті таксономічного аналізу ідентифіковано багато бактеріальних родів і родів. Найбільш представленими родами серед досліджуваних зразків були Marivita, Loktanella, Paracoccus, Pseudoalteromonas, Vibrio, Coraliomargarita, Acholeplasma, Pseudomonas, Phaeobacter, Neptunomonas, Allivibrio, Oceaniserpentilla, Oceanospirillum, Robiginitalea, Acinetobacter, Haliea. **Висновки.** Метагеномний 16S рРНК аналіз дозволив оцінити величезну таксономічну різноманітність прокариот поверхневих вод Чорного моря в районі острова Зміїний. Багато з них слабо вивчені і не піддаються культивуванню.

Ключові слова: Чорне море, острів Зміїний, морська вода, 16S рРНК аналіз, таксономічна різноманітність, бактерії.

А.Е. Боброва¹, Й.Б. Кристофферсен², В.А. Иваныця¹

¹ Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Украина, тел. (0482) 68 79 64, e-mail: o.bobrova@onu.edu.ua

² Институт Морской Биологии, Биотехнологии и Аквакультуры, Греческий Центр Морских Исследований, Гурнес 71500, 71003 Ираклион, Греция

МЕТАГЕНОМНИЙ 16S рРНК АНАЛІЗ МІКРОБНОГО РІЗНООБРАЗІЯ ЧОРНОГО МОРЯ В РАЙОНЕ ОСТРОВА ЗМЕЙНИЙ

Реферат

Целью исследования было определение морского микробного биоразнообразия прибрежной морской воды острова Змеиный с помощью метагеномного анализа.

Методы. Для амплификации v4 области 16S рРНК гена использовали праймеры с двумя индексами. Секвенирование производили на платформе Illumina MiSeq. Нуклеотидные последовательности анализировали при помощи программ SILVAngs и QIIME. **Результаты.** В результате метагеномного 16S рРНК анализа в прибрежных водах острова Змеиный обнаружено около 3200 ОТЕ. Выявлены основные отделы домена Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, Fusobacteria, Firmicutes и кандидатные отделы некультивируемых представителей прокариот: SR1, BD1-5, BH180-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 и TM6. В результате таксономического анализа идентифицировано множество бактериальных семейств и родов. Наиболее представленными родами среди исследуемых образцов были Marivita, Loktanella, Paracoccus, Pseudoalteromonas, Vibrio, Coraliomargarita, Acholeplasma, Pseudomonas, Phaeobacter, Neptunomonas, Allivibrio, Oceaniserpentilla, Oceanospirillum, Robiginitalea, Acinetobacter, Haliea. **Выводы.** Метагеномный 16S рРНК анализ позволил оценить богатое таксоно-



мическое разнообразия прокариот поверхностных вод Черного моря в районе острова Змеиный. Многие из них слабо изучены и не поддаются культивированию.

Ключевые слова: Черное море, остров Змеиный, морская вода, 16S рРНК анализ, таксономическое разнообразие, бактерии.

LITERATURE

1. Васильева Т.В., Іваниця В.О., Васильева Н.Ю., Бобрешова Н.С., Юргелайтіс Н.Г. Біологічні властивості тіонових бактерій північно-західної частини Чорного моря // Вісник ОНУ. – 2005. – Т. 10, В. 3. – С. 123–135.
2. Іваниця В.О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: Автореф. дис. докт. біол. наук. К., 1996. – 47 с.
3. Крисс А.Е., Мишустина И.Е., Мицкевич И.Н., Земцова Э.В. Микробное население Мирового океана. – М.: АН СССР, 1964. – 300 с.
4. Лісютін Г.В., Бухтіяров А.Є., Білоіваненко С.О., Пономарьова Л.П., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О. Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова зміїний Мікробіологія і біотехнологія // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 1. – С. 88–94.
5. Цыбань А.В. Бактерионейстон и бактериоплактон в прибрежной зоне Черного моря – К.: Наукова думка, 1970. – 272 с.
6. Acinas S.G., Klepac-Ceraj V., Hunt D.E., Pharino C., Ceraj I., Distel D.L., Polz M.F. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community // Nature. – 2004. – V. 430. – P. 551–554.
7. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nature Methods. – 2010. – V. 7. – P. 335–336.
8. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S.M., Betley J., Fraser L., Bauer M. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // The ISME Journal. – 2012. – V. 6. – P. 1621–1624.
9. Cottrell M.T., Mannino A., Kirchman D.L. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre // Applied Environmental Microbiology. – 2006. – V. 72(1). – P. 557–564.
10. Davis J.P., Youssef N.H., Elshahed M.S. Assessment of the Diversity, Abundance, and Ecological Distribution of Members of Candidate Division SR1 Reveals a High Level of Phylogenetic Diversity but Limited Morphotypic Diversity // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – V. 75, № 12. – P. 4139–4148.
11. DeLong E.F., Karl D.M. Genomic perspectives in microbial oceanography // Nature. – 2005. – 437: 336–342.
12. Gilbert J., Jansson J., Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations // BMC Biology. – 2014. – V. 12:69. – 4 p.



13. *Handelsman J., Liles M., Mann D., Riesenfeld C., Goodman R.M.* Cloning the metagenome: Culture-independent Access to the Diversity and Functions of the Uncultivated Microbial World // *Methods in Microbiology*. – V. 33. – P. 240–252.
14. *Kantor R.S., Wrighton K.C., Handley K.M., Sharon I., Hug L.A., Castelle C.J., Thomas B.C., Banfield J.F.* Small Genomes and Sparse Metabolisms of Sediment-Associated Bacteria from Four Candidate Phyla // *mBio*. – 2013. – V. 4, № 5. – P. 1–11.
15. *Kelly K.M., Chistoserdov A.Y.* Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island) // *FEMS Microbiol Ecol*. – 2001. – 35: 85–95.
16. *Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D.* Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79, № 17. – P. 5112–5120.
17. *Navas-Molina J., Peralta-Sanchez M., Gonzales A., McMurdie P.J., Vazquez-Baeza Y., Xu Z., Ursell L.K., Lauber C., Zhou H., Song S.J.* Advancing Our Understanding of the Human Microbiome Using QIIME // *Methods in Enzymology*. – 2013. – V. 531. – P. 371–444.
18. *Pommier T., Canback L., Riemann., Bostrom K.H., Simu K., Lundberg P., Tunlid A., Hagstrom A.* Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton // *Mol Ecol*. – 2007. – 16. – P. 867–880.
19. *Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glockner F.O.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – P. 591–596.
20. *Sala M.M., Terrado R., Lovejoy C., Unrein F., Pedros-Alio C.* Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean // *Environ Microbiol*. – 2008. – V. 10. – P. 942–949.
21. *Tsyban A.V., Panov G.V., Ivanitsa V.A., Khudchenko G.V.* Taxonomic Composition of heterotrophic bacteria // In *Results of the Third Joint US-USSR Bering and Chukchi Seas Expedition (BERPAC), HUMMER, 1988.* – Nagel P.A. (ed.) US Fish and Wildlife Service, Washington, DC, – 1992. – P. 87–90.
22. *Urios L., Intertaglia L., Lesongeur F., Lebaron P.* *Haliea rubra* sp. nov., a member of the Gammaproteobacteria from the Mediterranean Sea // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2008. – V. 58, № 5. – P. 1233–1237.
23. *Vieira R., Gonzales A.M., Cardoso A.M., Oliveira D.N., Albano R.M., Clementino M.M., Martins O.B., Paranhos R.* Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro // *Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 10. – P. 189–199.
24. *Zhang J., Kobert K., Fluori T., Stamatakis A.* PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-end read merger // *Bioinformatics*. – 2013. – V. 30, № 5. – P. 614–620.

Стаття надійшла до редакції 06.05.2015 р.



УДК: 575.86+575.113:578.832(477)

**S.V. Babii², L.V. Leibenko¹, A.Yu. Fesenko¹, L.V. Radchenko¹,
O.Yu. Smutko², O.G. Boyalska³, A.P. Mironenko¹**

¹“L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine”, 5, M. Amosova Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.: +38 (044) 275 02 97, e-mail: ukrinfluenza@ukr.net

²ESC “Institute of Biology” Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2, Academic Glushkov Str., Kyiv, Ukraine, 03022

³Zhytomyr Regional Laboratory Center of the State Sanitary and Epidemiological Service of Ukraine, 64, Berdychivska Str., Zhytomyr, Ukraine, 10002

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF NEURAMINIDASE GENE OF INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES ISOLATED IN UKRAINE IN 2013–2014 SEASON

*Influenza remains a serious problem for the world. The accumulation of genetic changes (mutations) in influenza viruses leads to changes in their antigenic properties, the emergence of strains resistant to antiviral drugs and the emergence of new epidemics. The **aim** of recent study was to perform the phylogenetic analysis of neuraminidase gene of influenza A(H3N2) viruses isolated in Ukraine in 2013–2014 season. **Methods.** Molecular genetics, phylogenetic and statistical methods were used for this study. **Results.** High (94%) genetic similarity of Ukrainian isolates and isolates from other countries of 2013–2014 epidemic seasons demonstrates the stability of viral populations in Ukraine. The allocation of Ukrainian viruses to three different clusters points to different ways of their spread to Ukraine. The analysis of NA sequences revealed novel amino acid substitutions Y155F, D251V, S315G to the majority of Ukrainian isolates. None of virus isolates of season 2013–2014 in Ukraine contained an E119D mutation in NA sequence which is associated with oseltamivir resistance. **Conclusions.** The results of our work showed that influenza viruses isolated in 2013–2014 epidemic season had not specific mutations, associated with resistance to antiviral drugs such as oseltamivir.*

Key words: neuraminidase, mutation, isolate, phylogenetic analysis.

Influenza viruses are the main cause of respiratory diseases in humans. Despite significant scientific achievements of recent decades influenza becomes a serious problem for the entire world. The most dangerous phenomenon is the emergence of complications and chronic disease exacerbation after carried flu. The influenza virus surface proteins hemagglutinin and neuraminidase are highly variable, that's why virus could omit the host immune system [1]. Variability of influenza viruses is caused by the changes in gene sequences that occur due to mutations. In turn, the accumulation of genetic changes in viruses leads to changes in their antigenic properties [2].

The investigation of genetic changes among all influenza strains is necessary to reveal that some RNA segments of A (H3N2) influenza virus are originated from

© S.V. Babii, L.V. Leibenko, A.Yu. Fesenko, L.V. Radchenko, O.Yu. Smutko, O.G. Boyalska, A.P. Mironenko, 2015



viruses affecting different hosts. The phylogenetic analysis applied to new influenza isolates allows to monitoring the rate and direction of virus variations practically in real time. Furthermore, the comparative analysis of their protein sequences allows to reveal point amino acid substitution providing the mechanism of virus adaptation to human immune system. Sequences of surface antigens – hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) – are usually used for genetic analyses. Aminoacid substitution E119D of NA gene leads to development of resistance to antiviral drug oseltamivir (Tamiflu). Therefore, a comparative phylogenetic analysis of NA sequences of A (H3N2) influenza viruses circulating in Ukraine during epidemic season 2013–2014 was the aim of the study.

Materials and methods

Nasal-throat washes taken from influenza-affected individuals from the different regions of Ukraine during outbreak were used in the study. In total, 673 samples were analyzed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in 2013–2014 seasons. Preparation of reaction mixture for PCR was made according to recommended protocol “WHO. CDC protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1) revision 1” [3].

Sequencing of influenza viruses A (H3N2) genes, isolated in our laboratory, was performed in the World Influenza Center in London using the technology of RNA-SEQ, which allows sequencing coding and noncoding mRNA (<http://www.crick.ac.uk/research/science-technology-platforms/advanced-sequencing/>).

Neuraminidase (NA) gene sequences of influenza isolates A/Ukraine/77/2014 , (EPI_ISL_163129), A/Ukraine/218/2014 (EPI_ISL_162152), A/Ukraine/710/2013 (EPI_ISL_154035), A/Ukraine/728/2013 (EPI_ISL_154036), A/Dnipro/227/2014 (EPI_ISL_162105), A/Dnipro/229/2014 (EPI_ISL_162160), A/Dnipro/232/2014 (EPI_ISL_162107), A/Dnipro/234/2014 (EPI_ISL_162108), A/Dnipro/235/2014 (EPI_ISL_162109), A/Kharkov/201/2014 (EPI_ISL_163099), A/Kharkov/203/2014 (EPI_ISL_162113), A/Zhitomir/286/2014 (EPI_ISL_162157), A/Zhitomir/290/2014 (EPI_ISL_162159); A/Ukraine/6004/2013 (EPI_ISL_154034) and A/Ukraine/6161/2014 (EPI_ISL_163128), which were received from Ukrainian surveillance system; vaccine strain A/Texas/50/2012 (EPI_ISL_170149), reference strains A/Perth/16/2009 (EPI_ISL_87516), A/Victoria/361/2011 (EPI_ISL_158723), A/Stockholm/18/2011 (EPI_ISL_93712), A/Hong Kong/146/2013 (EPI_ISL_176514) and A/Samara/73/2013 (EPI_ISL_143568) and isolates from different countries were selected to perform phylogenetic comparisons. Phylogenetic analysis was performed using MEGA 5 software [4].

Sequences of influenza viruses from other countries were received from Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) and GISAID resource (<http://platform.gisaid.org/>), using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences were aligned using ClustalW algorithm. Phylogenetic trees were built by the nearest neighbor joining method [5] applying Kimura 2-parameter model [6]. Evolutional distances were calculated in terms of the number of base substitutions per site. A bootstrap technique with 1000



replications was used to test statistical validity of received data [7]. Nucleotide sequences were translated into amino acid sequences using MEGA 5 software [4].

Findings

In this study we compared nucleotide sequences encoding surface antigens of influenza viruses NA proteins because they are highly prone to mutation-related changes. The high similarity of HA and NA genes (94%) was observed for viruses isolated on the different continents already at the stage of BLAST system-assisted search and was confirmed by data obtained by other authors [8, 9]. Taking into account the considerable number (exceeding 1000) of available sequences of influenza viruses, the geographic location and date of material sampling from a sick person were chosen as the main criteria for search and selection.

The comparison of NA genes of influenza isolates demonstrated the high genetic similarity equal to 94%.

All influenza viruses A(H3N2) isolated during 2013–2014 outbreak season were found to be allocated to the subcluster 3C of the Victoria/208 cluster and retained mutation **S367N and K369T, which attributed to cluster 3, and also contained mutations L81P and N402D** (deletion/loss of glycosylation site [10]), which referred to subcluster 3C.

Phylogenetic data are presented in Fig. 1.

All discovered isolates from this season were genetically related to vaccine strain A/Texas/50/2012. According to the certain differences the isolates were divided into 3 genetic groups. Groups 1 and 2 are characterized by common substitution D93G (asparadic acid is replaced by glycine) for isolates from epidemic season 2012–2013. Also substitution E221D (glutamic acid is replaced by asparadic acid) has selected in this groups, compared with the previous season isolates.

Group 1 – viruses with substitution I392T. This group contained isolates from Kharkov – A/Kharkov/203/2014, which were the closest to isolate from Norway and were selected substitution V396I (valine is replaced by isoleucine), and A/Dnipro/234/2014 with substitution **L338S (leucine is replaced by serine)**. Dnepropetrovsk's isolate was the most related to strains from Turkey and France (fig. 1).

Group 2 – contained viruses with mutation **V412I (valine is replaced by isoleucine)**. Four Ukrainian isolates belong to this group. Strain A/Dnipro/227/2014 acquired substitution Q5K (glutamine is replaced by lysine). A/Moscow/137/2013 was the most similar to our isolate, both selected mutation S332F (serine is replaced by phenylalanine). Other three isolates A/Ukraine/710/2013, A/Ukraine/728/2013 i A/Dnipro/235/2014 carried mutations S44P and P45S. Those strains probably were introduced to the country in result of one entry during epidemic season. Strain A/Ukraine/728/2013 also confer mutation G40D (glycine is replaced by asparagines acid), and A/Dnipro/235/2014 – K75R (lysine is replaced by arginine). In general, this group was more numerous and contained isolates from the European region only.

Group 3 – is the largest group. Mainly Ukrainian isolates from different districts belonged to this group. Sequences of this group were more similar to reference strain A/Athens GR/112/2012 than to the newest reference viruses. Mutations



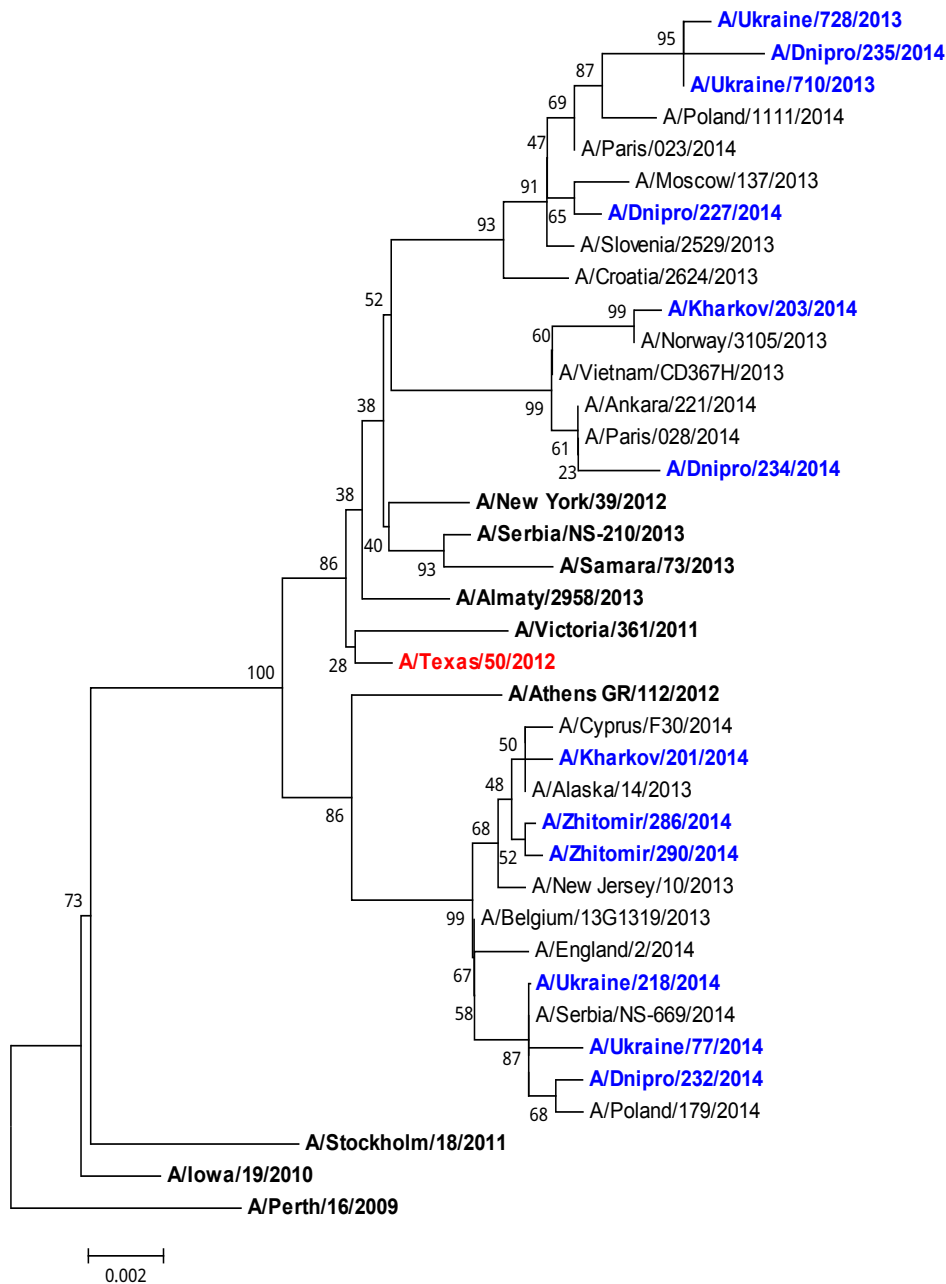


Fig. 1. Molecular phylogenetic analysis of NA nucleotide sequences for influenza viruses A(H3N2), NJ method Kimura 2-parameter model

Y155F, D251V and S315G were new. The third group was quite heterogeneous and contained strain from Alaska, USA and mainly from European country. Strain A/Kharkov/201/2014 was the closest to isolates from Cyprus and Alaska. Isolates A/Zhitomir/286/2014 and A/Zhitomir/290/2014 are placed next to each other on the phylogenetic tree (fig. 1). Even little group indicated the multiply entering of circulating influenza viruses to the Ukrainian territory. Isolates A/Ukraine/77/2014,

A/Dnipro/232/2014 and viruses from Poland and Serbia gained substitution I312T. Influenza isolate from Dnipropetrovsk and Poland also conferred mutation T434I.

In general, variability rate of NA genes was lower than in the HA genes in outbreak season 2013–2014. All discovered isolates had not conferred mutation associated with reduce susceptibility to oseltamivir.

Influenza viruses A (H3N2) from 2013–2014 outbreak season were genetically different. They were allocated in the subcluster 3C of cluster Victoria/208 and were related to vaccine strain A/Texas/50/2012.

According to the results there were identified 8 different pathways of influenza viruses' penetration on the territory of Ukraine.

The high (94%) genetic similarity observed of Ukrainian isolates to viruses isolated during epidemic season 2013–2014 in other countries. The allocation of Ukrainian viruses to three different clusters points to different ways of their spread to Ukraine. The analysis of NA sequences revealed novel amino acid substitutions Y155F, D251V, S315G to the majority of Ukrainian isolates. None of virus isolates of season 2013–2014 in Ukraine no contained E119D mutation in NA sequence associated with oseltamivir resistance.

**С.В. Бабій², Л.В. Лейбенко¹, А.Ю. Фесенко¹, Л.В. Радченко¹, О.Ю. Смутько²,
О.Г. Бояльська³, А.П. Міроненко¹**

¹ ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України»,
Україна, Київ, вул.Амосова 5, 03680, тел.: +38 (044) 275 02 97,
e-mail: ukrinfluenza@ukr.net

² ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Україна, Київ, вул. Глушкова 2, 03022

³ ДУ «Житомирський обласний лабораторний центр Держзпідслужби України»,
Україна, Житомир, вул. Бердичівська 64, 10002

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНУ НЕЙРАМІНІДАЗИ ВІРУСІВ ГРИПУ А(Н3N2), ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В СЕЗОНІ 2013–2014 рр.

Реферат

Метою даної роботи було проведення філогенетичного аналізу генів нейрамінідази вірусів грипу А(Н3N2), виділених в Україні в 2013–2014 сезоні. *Методи.* В роботі були використані методи молекулярної генетики, філогенії та математичної статистики. *Результати.* Висока (94%) генетична подібність українських ізолятів, виділених під час епідемічного сезону в інших країнах свідчить про стабільність вірусної популяції в Україні. Розміщення українських ізолятів вірусів грипу у трьох різних кластерах свідчить про різні шляхи занесення вірусів на територію України. Аналіз послідовностей NA виявив у більшості українських ізолятів нові заміщення амінокислот у положеннях Y155F, D251V, S315G. Жоден із досліджуваних ізолятів вірусу грипу не містив в послідовності NA мутації E119D, яку асоціюють із резистентністю до озельтамівіру. Більшість випадків респіраторних захворювань людини спричинені вірусами. Поверхневі глікопротеїни вірусу грипу є високо варіабельними, внаслідок чого



здатні уникати впливу імунної системи господаря. Дослідження генетичних змін серед всіх штамів вірусів грипу є важливим для визначення походження сегментів РНК вірусів грипу А(Н3N2) від одного чи декількох різних господарів. Застосування філогенетичного аналізу дозволяє проводити моніторинг рівня та напрямку мінливості вірусів грипу практично у реальному часі. Більш того, порівняння амінокислотних послідовностей робить можливим виявлення початку нових заміщень та спостерігати механізми адаптації вірусу до імунної системи людини. Зазвичай для філогенетичного аналізу використовують послідовності поверхневих антигенів – гемаглютинину (НА) та нейрамінідази (НА). Метою нашої роботи було провести філогенетичний аналіз послідовностей НА вірусів грипу А(Н3N2), виділених в Україні в 2013–2014 сезони.

Ключові слова: вірус грипу, грип, філогенетичний аналіз.

**С.В. Бабий², Л.В. Лейбенко¹, А.Ю. Фесенко¹, Л.В. Радченко¹, О.Ю. Смутько²,
О.Г. Бояльская³, А.П. Мироненко¹**

¹ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского Национальной академии медицинских наук Украины», 03680, Киев, ул. Амосова, 5, тел.: +38(044) 275 02 97, e-mail: ukrinfluenza@ukr.net

²УНЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, 03022, Киев, ул. Академика Глушкова, 2

³ГУ «Житомирский областной лабораторный центр Госэпидслужбы Украины», Украина, Житомир, ул. Бердичевская, 64, 10002

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ВЫДЕЛЕННЫХ В УКРАИНЕ В СЕЗОНЕ 2013–2014 гг.

Реферат

Целью представленной работы было проведение филогенетического анализа генов нейраминидазы вирусов гриппа А(Н3N2), выделенных в Украине в 2013–2014 сезоне. **Методы.** В работе были использованы методы молекулярной генетики, филогении и математической статистики. **Результаты.** Высокая (94%) генетическая схожесть украинских изолятов, выделенных в эпидемический сезон в других странах, свидетельствует о стабильности вирусной популяции в Украине. Расположение украинских изолятов вирусов гриппа в трех различных кластерах свидетельствует о различных путях попадания вирусов на территорию Украины. Анализ последовательностей НА выявил в большинстве украинских изолятов новые замещения аминокислот в положениях Y155F, D251V, S315G. Ни один из исследованных изолятов вируса гриппа не имел в последовательности НА мутации E119D, с которой ассоциируют резистентность к осельтамивиру. Большинство случаев респираторных заболеваний человека вызваны вирусами. Поверхностные гликопротеины вируса гриппа являются высоко вариабельными, вследствие чего способны избегать воздействия иммунной системы хозяина. Исследование генетических изменений среди всех штаммов вирусов гриппа является важным для определения происхождения сегментов РНК вирусов гриппа А(Н3N2) от одного или нескольких разных хозяев. Применение филогенетического анализа позволяет проводить мониторинг уровня и направления изменчивости вирусов гриппа практически в реальном времени. Более того, сравнение аминокислотных



последовательностей делает возможным выявление начала новых замещений и наблюдать механизмы адаптации вируса к иммунной системе человека. Обычно для филогенетического анализа используют последовательности поверхностных антигенов – гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (NA). Целью нашей работы было провести филогенетический анализ последовательностей NA вирусов гриппа А (H3N2), выделенных в Украине в 2013–2014 сезоне.

Ключевые слова: вирус гриппа, грипп, филогенетический анализ.

LITERATURE

1. Reichert T.A. The seasonality of human mortality: the role of influenza / Reichert T. A., Sharma A. // International Congress Series. – 2001. Vol. 1219. – P. 95–101.
2. Predicting influenza evolution: the impact of terminal and egg-adapted mutations / Bush R. M., Fitch W. M., Smith C.B. [et al.] // Excerpta Medica. International Congress Series. – 2001. – Vol. 1219. – P. 147–153.
3. WHO. CDC protocol of realtime RT-PCR for swine influenza A(H1N1) revision 1. April 2009. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>.
4. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol Biol Evol.–2011.– 28, N 10.– P. 2731–2739.
5. Saitou N. and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Molecular Biology and Evolution.– 1987. – 4, N 4.–P. 406–425.
6. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution.–1980.–16.–P. 111–120.
7. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution.–1985.–39, N 4.–P. 783–791.
8. Galiano M., Agapow P., Thompson C., Platt S. Underwood A., Ellis J., Myers R., Green J., Zambon M. Evolutionary Pathways of the Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 in the UK // PLoSOne.–2011.–6, N 8.– e23779.
9. Danishuddin M., Khan S., Khan A. Phylogenetic analysis of surface proteins of novel H1N1 virus isolated from 2009 pandemic // Bioinformation.–2009.– 4, N 2. – P. 94–97.
10. Genetic mutations in influenza H3N2 viruses from a 2012 epidemic in Southern China / J. Zhong, L. Liang, P. Huang et all // Virology Journal. – 2013. – V. 10. – P. 345–352.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2015 р.



N.V. Limanska, D.O. Babenko, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limanska@gmail.com

**DETECTION OF PLANTARICIN GENES IN STRAINS
OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* – ANTAGONISTS
OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA**

The **aim** of investigation was to detect the presence of genes responsible for bacteriocin synthesis in strains of *Lactobacillus plantarum* with the clear antagonistic effect against the gram-negative phytopathogens. **Methods.** To reveal eleven genes involved in plantaricin synthesis the polymerase chain reaction was used. To test the ability to synthesize bacteriocins as antagonistic compounds the experiments with the lawns of test-strains *Listeria ivanovii* INRA, *Rhizobium radiobacter* C58, *Ralstonia solanacearum* B-1109-UCM, *Erwinia carotovora* ZM1, *Rhizobium vitis* OHV 389, *R. vitis* OHV 388, *R. vitis* 379 and *R. rhizogenes* 15834 were used. **Results.** In genomes of the tested *L. plantarum* strains the genes *plnD*, *plnEF*, *plnG*, *plnI*, *plnN* were present, but the genes *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnW* were not revealed. Applying the cultural liquids of lactobacilli on the lawns of the test-strains has shown that the cell-free cultural liquid with the initially low pH (4.1–4.3) caused the zones of growth inhibition on the lawns of all test-strains. The neutralized cell-free cultural liquid did not affect the growth of the test-strains. **Conclusion.** Although the tested strains *L. plantarum* ONU 87, *L. plantarum* ONU 206 and *L. plantarum* ONU 991 possessed some genes of plantaricin regulon, in the investigations in vitro they caused the inhibition of the phytopathogens and listerias due to the low pH of the cell-free cultural liquids but not due to the synthesis of bacteriocins. The combination of the genes of plantaricin regulon of *L. plantarum* ONU 206 and *L. plantarum* ONU 991 resembled that in *L. plantarum* J23 described in literature.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, antagonists, bacteriocins, phytopathogens.

Lactobacillus plantarum bacteria isolated from plant surfaces and dairy products are characterized by the clear antagonistic activity against some phytopathogens [4]. The ability of *L. plantarum* to inhibit bacteria and fungi is strain-specific [15].

Antagonistic activity of lactobacilli is the result of the effects of organic acids, hydrogen peroxide, microbial competition and bacteriocin synthesis [14, 16]. Although the bacteriocin action is described in details only as an effect on gram-positive bacteria, the cases of inhibition of gram-negative bacteria are also known in literature [12, 13]. This makes lactobacilli especially perspective for plant protection as the majority of phytopathogens are the gram-negative bacteria.

In our previous investigation, the use of *Lactobacillus plantarum* ONU 87, *Lactobacillus plantarum* ONU 206 and *Lactobacillus plantarum* ONU 991 strains in plant protection on a model of *Kalanchoe daigremontiana* Mill. was described. Not only the supernatants with low pH but also the supernatant of *L. plantarum* ONU 206 culture



with pH 6.5 caused the inhibitory effect on tumor formation decreasing the amount of infected samples in 70.6% [8]. Basing on the results of investigation, it was supposed that the inhibitory effect of metabolism products from the cultural supernatant of lactobacilli was caused not only by lactic acid, but also by bacteriocins.

Several types of plantaricin regulons are described in literature [6; 11]. The most studied is the regulon of *L. plantarum* C11. The regulatory operon *plnABCD* encodes an inducible peptide-pheromone PlnA, a histidin-kinase PlnB and the response regulators PlnC and PlnD. The operons *plnEFI* and *plnJKLR* encode two-peptide bacteriocins PlnEF and PlnJK and the corresponding immunity proteins. Operon *plnGHSTUVW* encodes the proteins of ABC transport system necessary for the processing and secretion of a bacteriocin [1; 6; 13].

According to this, the aim of investigation was to detect the presence of genes responsible for bacteriocin synthesis in strains of *Lactobacillus plantarum* with the clear antagonistic effect against the gram-negative phytopathogens *Rhizobium radiobacter*, *R. vitis*, *R. rhizogenes*, *Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora*.

Materials and Methods

Strains from the Collection of Microbiology, Virology and Biotechnology Chair of Odesa National I.I. Mechnykov University – *L. plantarum* OHY 87, *L. plantarum* ONU 206, *L. plantarum* ONU 991 isolated from dairy products, were brought to the assays.

To test lactobacilli on the ability for the synthesis of bacteriocins, the test-strain

Listeria ivanovii INRA was used because listerias are the classical test-objects for the detection of bacteriocinogenic activity in lactic acid bacteria. The *Listeria ivanovii* strain was kindly provided by Dr. Thomas Haertle (INRA, Nantes, France). Phytopathogens *Rhizobium radiobacter* C58, *Ralstonia solanacearum* B-1109-UCM i *Erwinia carotovora* ZM1 were kindly provided by the Collection of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology (Kyiv, Ukraine), *Rhizobium vitis* ONU 389 and *R. vitis* OHY 388 – by the Collection of Microbiology, Virology and Biotechnology Chair of Odesa National I.I. Mechnykov University, *R. vitis* 379 and *R. rhizogenes* 15834 – by the Collection of Microorganisms of Institute of Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg, Russia.

Lactobacilli were cultivated overnight at 37 °C in MRS broth [5]. DNA was isolated by the kit “DNA sorb” (ZNII Epidemiology, Russia). The presence of *pln* locus genes was detected by the method of polymerase chain reaction (PCR): *plnA* [6; 10], *plnB*, *plnC*, *plnD* [6], *plnEF* [1; 6], *plnI*, *plnK* [6], *plnJ* [1; 6], *plnG*, *plnN* [6] and the structural plantaricin W gene [1]. Amplification was carried out by the parameters proposed by Ben Omar et al. (2008) [2]. PCR products were detected by electrophoresis in 1.5% agarose. The markers of molecular weight pUC19/MspI (501, 404, 331, 242, 190, 147, 111 b.p.) and pBR322 DNA/AluI (908, 659, 521, 403, 281, 257 b.p.) were used (Fermentas, Lithuania).

To reveal the antagonistic effect, the overnight cultures of lactobacilli were centrifuged and filtered through 0.22 µm Millipore filters. Phytopathogens and listerias were cultivated overnight at 37 °C in LB broth [3], and after used for the preparing of lawns and testing by the well-diffusion method. The cell-free supernatants both with the initial low pH and neutralized with 1 M NaOH were brought to the wells. The zones of growth inhibition were detected after the overnight cultivation at 37 °C.



Results and Discussion

The next results of the search for the genes responsible for bacteriocin synthesis in studied *L. plantarum* strains isolated from the home-made dairy products, were obtained (Tab. 1).

Table 1

Presence of the genes involved in plantaricin synthesis in *L. plantarum* strains from dairy products

Strain	plnA	plnB	plnC	plnD	plnEF	plnG	plnI	plnJ	plnK	plnN	plnW
<i>L. plantarum</i> OHY 87	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>L. plantarum</i> OHY 206	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>L. plantarum</i> OHY 991	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-

As the obtained data show, none of the studied strains possess all the tested genes of plantaricin regulon. Genes of the recognition system responsible for the synthesis of an inducible peptide-pheromone PlnA, a histidine protein kinase PlnB and a response regulator PlnC were absent. Also none of the strains contained the *plnW* gene. This gene was described in literature only for the one strain, and it was found out that this sequence is rare in *L. plantarum* [7]. Thus, our obtained data coincide with the data of literature.

All the strains possessed the genes of plantaricin synthesis *plnEF* and the gene encoding own immunity against it (*plnI*) [13], and that allowed us to suppose that the studied strains isolated from dairy products could produce the bacteriocin (Fig. 1).

In the strains isolated from dairy products, gene *plnK* was revealed only in one strain – *L. plantarum* ONU 87, but genes *plnD*, *plnEF*, *plnN*, *plnI* were found in all of the three strains mentioned in the table (Fig. 2).

Lack of genes *plnA*, *plnB*, *plnC* and *plnK*, but the presence of *plnD* allows to suppose that strains *L. plantarum* ONU 206 and *L. plantarum* ONU 991 are similar to the strain *L. plantarum* J23 described in the literature possessing operon *plnC8IF-NC8HK-D* encoding an inducible peptide PLNC8IF, a histidine kinase PLNC8HK and response regulator PlnD instead of the regulatory operon *plnABCD*. Besides, this strain lacks the gene *plnK* [11].

The presence of genetic sequences indicates the potential ability of *L. plantarum* strain to produce plantaricin, but in some cases a strain possessing all necessary genes does not secrete active bacteriocin in a medium, or its synthesis is non-regulatory [9]. To check the ability to synthesize bacteriocins as antagonistic compounds, tests on the lawns of indicator-strains were carried out. Applying cultural supernatants of the studied strains of *L. ivanovii* INRA, *Rhizobium radiobacter* C58, *Ralstonia solanacearum* B-1109-UCM, *Erwinia carotovora* ZM1, *Rhizobium vitis* ONU 389, *R. vitis* ONU 388, *R. vitis* 379 and *R. rhizogenes* 15834 we found out that only the supernatants with initial low pH (4.1–4.3) caused zones of growth inhibition on the lawns of all indicator-strains.

Neutralized cultural supernatant did not affect the growth of test-strains. This allowed us to make a conclusion that inhibition of phytopathogens and listerias was the result of low pH of cultural supernatants.



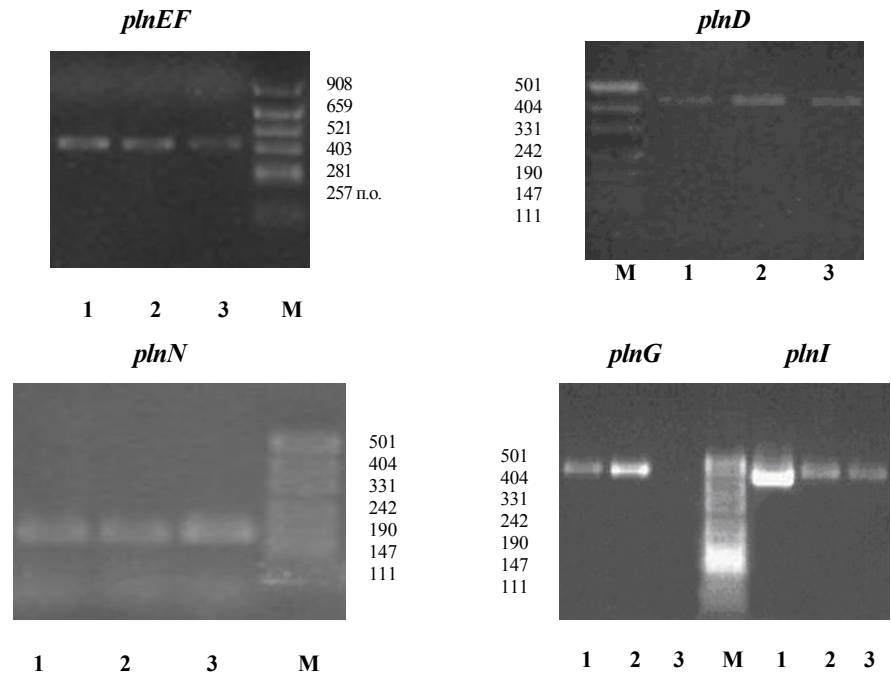


Fig. 1. Electrophoregram of amplification products of PCR with primers to genes *plnEF* (amplicon size 428 b.p., M – marker of molecular weight pBR322 DNA/AluI, Fermentas, Lithuania), *plnD* (amplicon size 414 b.p., M – marker of molecular weight pUC19/MspI, Fermentas, Lithuania), *plnN* (amplicon size 146 b.p., M – marker of molecular weight pUC19/MspI, Fermentas, Lithuania), *plnG* (amplicon size 453 b.p., M – marker of molecular weight pUC19/MspI, Fermentas, Lithuania) and *plnI* (amplicon size 450 b.p., M – marker of molecular weight pUC19/MspI, Fermentas, Lithuania), with DNA of the *Lactobacillus plantarum* strains: 1 – strain ONU 991; 2 – strain ONU 206; 3 – strain ONU 87.

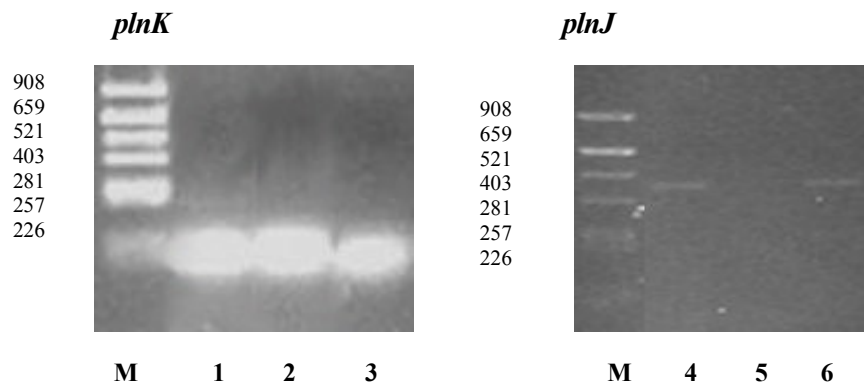


Fig. 2. Electrophoregram of amplification products of PCR with primers to gene *plnK* (amplicon size 246 b.p., M – marker of molecular weight pBR322 DNA/AluI, Fermentas, Lithuania) with DNA of the strains *Lactobacillus plantarum* (1 – strain ONU 87; 2 – strain ONU 206; 3 – strain ONU 991); gene *plnJ* (amplicon size 475 b.p., M – marker of molecular weight pBR322 DNA/AluI, Fermentas, Lithuania): 4 – strain ONU 87; 5 – strain ONU 991; 6 – strain ONU 206)



Thus, the presence of genetic sequences indicates the potential ability of the strain to synthesize bacteriocins but did not allow to make a preliminary conclusion about the active production of antagonistic substances into a medium.



Fig. 3. Zones of growth inhibition on *R. vitis* ONU 388 lawn caused by the supernatants of *L. plantarum* ONU 87, ONU 206 and ONU 991 (from left to right)

Although the tested strains *L. plantarum* ONU 87, *L. plantarum* ONU 206 and *L. plantarum* ONU 991 possessed some genes of plantaricin regulon, in investigations *in vitro* they caused the inhibition of the phytopathogens and listerias due to the low pH of the cell-free cultural liquids but not due to the synthesis of bacteriocins.

УДК 579.6:634.75

Н.В. Ліманська, Д.О. Бабенко, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, e-mail: limanska@gmail.com

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНІВ ПЛАНТАРИЦИНІВ У ШТАМІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* – АНТАГОНІСТІВ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

Реферат

Метою дослідження було виявити наявність генів синтезу бактеріоцинів у штамів *Lactobacillus plantarum*, які мають виражений антагоністичний вплив проти грамнегативних фітопатогенів. **Методи.** Для виявлення одинадцяти генів, задіяних у синтез плантарицинів, використовували полімеразну ланцюгову реакцію. Для перевірки здатності до синтезу бактеріоцинів як антагоністичних речовин здійснювали тестування на газонах тест-штамів *Listeria ivanovii* INRA, *Rhizobium radiobacter* C58, *Ralstonia solanacearum* B-1109-UCM, *Erwinia carotovora* ZM1, *Rhizobium vitis* ONU 389, *R. vitis* ONU 388, *R. vitis* 379 і *R. rhizogenes* 15834. **Результати.** В геномах досліджених штамів *L. plantarum* були відсутніми гени *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnW*, але присутні гени *plnD*, *plnEF*, *plnG*, *plnI*, *plnN*. Нанесення культуральних рідин лактобацил на газони тест-штамів показало, що лише культуральна рідина з первинним низьким рН (4,1–4,3) спричиняла зони затримки росту на газонах усіх тест-штамів. Нейтралізована культуральна рідина не впливала на ріст тест-штамів. **Висновок.** Досліджені штами *L. plantarum* ONU 87, *L. plantarum* ONU 206 і *L. plantarum* ONU 991, хоча й містили низку генів плантарицинового регулону, у дослідях *in vitro* спричиняли пригнічення фітопатогенів та лістерій за рахунок низьких значень рН культуральної рідини, а не за рахунок синтезу



бактеріоцинів. За складом генів плантарициновий регулон штаму *L. plantarum* ОНУ 206 та *L. plantarum* ОНУ 991 був найближче до описаного у літературі штаму *L. plantarum* J23.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, антагоністи, бактеріоцини, фітопатогени.

Н.В. Лиманская, Д.А. Бабенко, А.В. Ямборко, В.А. Иваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: limanska@gmail.com

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ПЛАНТАРИЦИНОВ У ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* – АНТАГОНИСТОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Целью исследования было выявление наличия генов синтеза бактериоцинов у штаммов *Lactobacillus plantarum*, которые имеют выраженный антагонистический эффект против грамотрицательных фитопатогенов. **Методы.** Для выявления одиннадцати генов, задействованных в синтезе плантарицинов, использовали полимеразную цепную реакцию. Для проверки способности к синтезу бактериоцинов как антагонистических веществ осуществляли тестирование на газонах тест-штаммов *Listeria ivanovii* INRA, *Rhizobium radiobacter* C58, *Ralstonia solanacearum* B-1109-UCM, *Erwinia carotovora* ZM1, *Rhizobium vitis* ОНУ 389, *R. vitis* ОНУ 388, *R. vitis* 379 и *R. rhizogenes* 15834. **Результаты.** В геномах исследованных штаммов *L. plantarum* отсутствовали гены *plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnW*, но были выявлены гены *plnD*, *plnEF*, *plnG*, *plnI*, *plnN*. Нанесение культуральных жидкостей лактобацилл на газоны тест-штаммов показало, что только культуральная жидкость с первичным низким рН (4,1–4,3) приводила к появлению зон задержки роста на газонах всех тест-штаммов. Нейтрализованная культуральная жидкость не влияла на рост тест-штаммов. **Вывод.** Исследованные штаммы *L. plantarum* ОНУ 87, *L. plantarum* ОНУ 206 и *L. plantarum* ОНУ 991, хотя и содержали ряд генов плантарицинового регулона, в опытах *in vitro* вызывали угнетение роста фитопатогенов и листерий за счет низких значений рН культуральной жидкости, а не в результате синтеза бактериоцинов. По составу генов плантарициновий регулон штаммов *L. plantarum* ОНУ 206 и *L. plantarum* ОНУ 991 был ближе к описанному в литературе штамму *L. plantarum* J23.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, антагонисты, бактериоцины, фитопатогены.

LITERATURE

1. Anderssen E.L., Diep D.B., Nes I.F., Eijsink V.G., Nissen-Meyer J. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A // Appl. Environm. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – P. 2269–2272.



2. Ben Omar N., Abriouel H., Keleke S., Valenzuela A.S., Martinez-Canamero M., Lopez R.L., Ortega E., Galvez A. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons // *Int J Food Microbiol.* – 2008. – Vol. 127. – P. 18–25.
3. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology.* – 1951. – Vol. 62. – P. 293–300.
4. Daeschel M.A., Andersson R.E., Fleming H.P. Microbial ecology of fermenting plant materials // *FEMS Microbiology Reviews.* – 1987. – Vol. 46. – P. 357–367.
5. de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *Journal of Applied Bacteriology.* – 1960. – Vol. 23. – P. 130–135.
6. Diep D.B., Havarstein L.S., Nes I.F. Characterization of the locus responsible for bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11 // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 4472–4483.
7. Holo H., Jeknic Z., Daeschel M., Stevanovic S., Nes I.F. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics // *Microbiology.* – 2001. – Vol. 147. – P. 643–651.
8. Limanska N.V., Korotaeva N.V., Yamborko G.V., Ivanytsia V.O. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* // *Microbiology and Biotechnology.* – 2014. – № 1 (25). – P. 8–18.
9. Noonpakdee W., Jumriangrit P., Wittayakom K., Zendo J., Nakayama J., Sonomoto K., Panyim S. Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product // *Asia Pasific Journal of Molecular Biology and Biotechnology.* – 2009. – Vol. 17, 1. – P. 19–25.
10. Remiger A., Ehrmann M.A., Vogel R.F. Identification of bacteriocin genes in lactobacilli by polymerase chain reaction (PCR) // *Systematic and Applied Microbiology.* – 1996. – Vol. 19. – P. 28–34.
11. Rojo-Bezarez B., Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must // *Food Microbiol.* – 2007. – Vol. 24. – P. 482–491.
12. Song D.-F., Zhu M.-Y., Gu Q. Purification and characterization of plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5 // *PLOS ONE.* – 2014. – DOI: 10.1371/journal.pone.0105549.
13. Todorov S.D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action // *Brazilian J of Microbiol.* – 2009. – Vol. 40. – P. 209–221.
14. Todorov S.D., Dicks L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria // *Enzyme Microbiol Technol.* – 2005. – Vol. 36. – P. 318–326.
15. Trias R., Bañeras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // *International Microbiology.* – 2008. – Vol. 11. – P. 231–236.
16. Xu J., Ran L., Yang B., Li Z. Inhibition of *Lactobacillus* species on the germination of *Aspergillus flavus* spore // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2002. – Vol. 31. – P. 47–49.

Стаття надійшла до редакції 07.05.2015 р.



O. Maslovska, S. Hnatush

Ivan Franko National University of Lviv 4, Hrushevskiy St.,
Lviv, 79005, Ukraine, e-mail: gnatuk88@ukr.net

**OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND
SPECIFIC SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY
OF *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*
IMV B-7384 BACTERIA UNDER THE INFLUENCE
OF FERRIC CITRATE**

***Aim.** Investigation of oxidative modification of proteins and specific superoxide dismutase activity of *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 bacteria under the influence of ferric citrate. **Methods.** Generation of protein carbonyl groups (CG) were determined in reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. Specific superoxide dismutase activity was measured by the ability of enzyme to inhibit autooxidation of quercetin at pH 10 in the presence of tetramethylethylenediamine. **Results.** The content of protein CG under the influence of ferric citrate changed in dependence of duration of bacterial cultivation. Under the influence of all investigated concentrations of ferric citrate on second and third days of cultivation no significant increase of protein CG in comparison with control sample was observed. The increase of content of protein CG by 2–4 times under the influence of metal salt was reached on the fourth day of cultivation. Addition of ferric citrate caused substantial enhancing of specific SOD activity. Under the influence of all investigated concentrations of ferric citrate specific SOD activity increased with enhancing of duration of cultivation. **Conclusions.** Accumulation of significant concentrations of CG in *D. acetoxidans* IMV-B7384 proteins under the influence of ferric citrate indicates free radical mechanism of damage of cell proteins. Under these conditions neutralization of reactive oxygen species in *D. acetoxidans* IMV-B7384 bacteria is evidently made by the enzymes of antioxidative defense system, including SOD.*

Key words: superoxide dismutase, oxidative modification of proteins, ferric citrate, *Desulfuromonas acetoxidans*.

Desulfuromonas acetoxidans is one of the first microorganisms which can receive energy needed for growth by the complete oxidation of organic compounds with simultaneous Fe (III) – and Mn (IV) – reduction [5]. The capability of *D. acetoxidans* to support Fe (III) – and Mn (IV) – reduction with simultaneous oxidation of organic compounds causes its favourableness in practical application since it could be used for creation of biotechnological methodologies for treatment of wastewater, which is polluted with heavy metals and organic compounds. Also Fe (III) – and Mn (IV) – dissimilative reduction is the basis for exoelectrogenic activity of described bacteria



which is highly favorable for microbial fuel cell construction [11]. Functional necessity of ferric ions as a factor playing the significant role in redox processes of the range of biochemical reactions is indisputable. Although ferric ions also possesses biologically dangerous properties since they catalyze generation of reactive oxygen species (ROS). Toxicity of ferric ions is based on Haber-Weiss and Fenton reactions [1]. Recently lipid peroxidation is considered as one of the main reasons of cell damage and death under the influence of ROS [3]. Equally significant violations are appeared under the oxidative modification of proteins (OMP). **Changes in their hydrophobicity, isoelectric point and thermal stability, increased sensitivity to proteolysis and lost enzymes activity could be observed under OMP [7].** It was shown recently that modification of protein molecules under the influence of ROS can be resulted in appearance of additional carbonyl groups (CG) in protein molecules. The content of CG in protein molecules mostly can be detected by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine [9]. Aerobic and facultative anaerobic microorganisms possess effective complex of defensive enzymatic and non enzymatic systems of ROS destruction. They synthesize enzymes of DNA repair (endonuclease III and endonuclease IV produced by *Escherichia coli*) and regulators of defense against oxidative stress. Similar mechanisms of antioxidative defense in anaerobic microorganisms have not been studied enough [1, 2]. Usually oxidative stress in anaerobic microorganisms is caused by the influence of superoxide anion radical (O_2^-). As a result superoxide dismutase (SOD) is one of the crucial enzymes of antioxidative defense [2]. The processes of OMP and activity of antioxidant system, especially SOD activity in the cells of anaerobic microorganisms at the influence of heavy metals is not enough investigated. Investigation of defense mechanisms of *D. acetoxidans* bacteria under stress conditions such as gradual increasing of heavy metals concentration is crucial for understanding the mechanisms of bacterial metabolism regulation during the process of wastewater treatment. Thus, the aim of our work was to investigate the oxidative modification of proteins and specific activity of superoxide dismutase of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria under the influence of various concentrations of ferric citrate.

Materials and methods

The object of investigations was *Desulphuromonas acetoxidans* IMV B-7384 bacterium. Bacteria were cultivated in the modified Postgate C medium for four days [10]. Sodium fumarate (6 g/l) was added as electron donor and its acceptor. Ferric citrate was added into the growth medium in concentration 10–20 mM. It was shown that these concentrations of ferric citrate caused decreasing of biomass by 20–50% [8]. Metal salt was not added into the control. After the second, third and fourth day of bacterial growth cells were disintegrated on the ultrasonic homogenizer at 22 kHz at 4 °C and cell-free extracts were obtained [8]. Protein concentration in cell-free extract was determined by Lowry method [6]. Appearance of additional carbonyl groups in the proteins was determined by the method indicated in [7]. Specific SOD activity was determined as described in [7]. Statistical calculation of results was carried out by application of the Origin and Excel programs [4] The crucial statistical



indexes were calculated on the basis of direct data, such as arithmetical mean (M) and standard deviation of arithmetical mean (m). Student coefficient was calculated for the estimation of validity of difference between statistical characteristics of five alternative blocks of data. The difference was claimed to be valid under the index of validity $P > 0.95$.

Results and its discussion

The highest content of CG in proteins of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria cultivated in the medium without ferric citrate was observed on the third day of growth (fig. 1). Continuation of cultivation time up to four days caused the decreasing of CG content. The CG content in proteins changed dependently on time of bacterial cultivation under the influence of ferric citrate. Slight increasing of CG content in bacterial proteins was observed on the second and third day of *D. acetoxidans* IMV B-7384 growth under the influence of all investigated concentrations of ferric citrate in comparison with control.

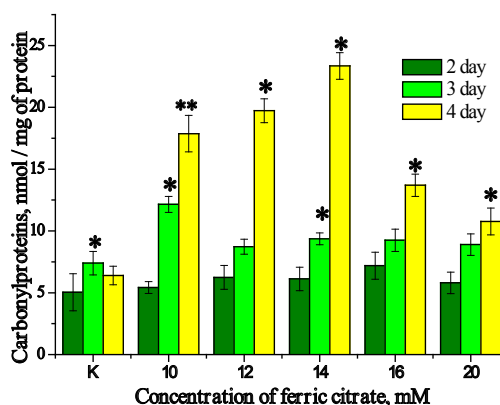


Fig. 1. The content of additional CG in proteins of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria under the influence of ferric citrate

(K – control; * – $p \geq 0.95$, $n=5$; ** – $p \geq 0.99$, $n=5$ – in comparison with control)

Significant increasing of carbonyl proteins under the influence of metal salt was observed on the fourth day of cultivation. Addition of ferric citrate in concentrations 10, 12 and 14 mM on the fourth day of cultivation caused enlargement of content of additional CG in proteins by 2.6; 3 and 3.5 times, respectively.

The content of CG in bacterial proteins also changed dependently on concentration of metal salt in cultural medium. Under the addition of ferric citrate in concentrations 10–14 mM the content of CG in proteins significantly increased on the fourth day of bacterial cultivation comparing with control. The raising of metal salt concentration up to 20 mM caused the decreased content of CG in comparison with content of CG in proteins under the influence of 14 mM of ferric citrate but it was higher than in control. In our previous studies it was shown that addition of ferric citrate into cultural medium of *D. acetoxidans* IMV B-7384 led to the increasing



content of lipid hydroperoxides, conjugated dienes and thiobarbituric reactive substances [8]. Accumulation of significant amounts of products of lipid peroxidation and additional CG in proteins in the cells of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria under the influence of ferric citrate confirms the free radical mechanism of oxidation of polyunsaturated fatty acids and cell proteins.

Antioxidative defense system supports cell protection against destructive influence of reactive oxygen species. SOD, catalase, peroxidase and oxidase provide the first stage of bacterial cell protection against reactive oxygen species [1]. Specific SOD activity changed dependently on growth phase of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria grown on the cultural medium without addition of ferric citrate. Activity of enzyme increased with continuation of duration of cultivation (fig. 2).

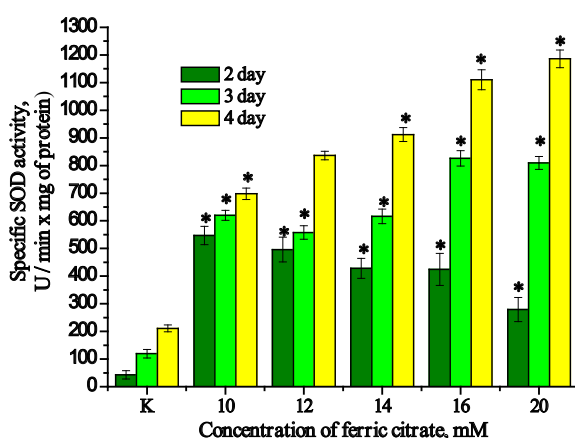


Fig. 2. Specific SOD activity of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria under the influence of ferric citrate

(K – control; * – $p \geq 0,95$ – compared with control)

Addition of ferric citrate caused significant increasing of specific enzyme activity. Specific SOD activity was also increased by 12 times on the second day of cultivation under the influence of 10 mM of ferric citrate in comparison with control. Significant raising specific SOD activity was observed under the influence of all investigated concentrations of ferric citrate. Specific SOD activity increased with continuation of duration of cultivation under the influence of investigated metal salt (fig. 2). On the second day of growth specific SOD activity equaled 546.8 ± 33.25 U/min \times mg of protein at the influence of 10 mM of ferric citrate. Increasing of concentration of metal salt up to 20 mM led to decreasing of specific enzyme activity. On the third day of cultivation enzyme activity remained at the level 580–605 U/min \times mg of protein under the addition of 10–14 mM of investigated metal salt. Addition of 16 and 20 mM of ferric citrate into the growth medium caused increasing of specific SOD activity in comparison with the influence of 10–14 mM of metal salt. On the fourth day of cultivation specific enzyme activity increased with enlarging of ferric

citrate concentration. Maximal specific SOD activity was observed on the fourth day of cultivation under the addition of 20 mM of ferric citrate.

The influence of several transition metals on specific SOD activity of *D. acetoxidans* under its growth in Postgate C medium that contains lactic acid as the electron donor and elemental sulfur as the electron acceptor has been previously determined [12]. It was shown that addition of various concentrations of ferric (III) chloride (0.5 – 2.0 mM) caused significant increase of specific enzyme activity starting from the second day of cultivation. Specific SOD activity decreased with the increasing of duration of cultivation to four days under the influence of all investigated ferric (III) chloride concentrations.

Changing conditions and growing bacteria in the medium with addition of sodium fumarate and without sulfur we did not observe hydrogen sulfide formation. Under this conditions metal ions are not precipitated in the forms of insoluble metal sulfides. Using ferric citrate as a component of the growing medium maintains the presence of Fe^{3+} ions. It is known that Fe^{3+} ions could stimulate formation in cells of microorganisms ROS [1].

The addition of ferric citrate in concentrations 10–20 mM caused the increase of additional carbonyl groups in proteins of *D. acetoxidans* IMV B-7384 bacteria by 1.5–3.5 times in comparison with control. Under those conditions specific SOD activity increased by 1.5–3.5 times. Thus, addition of ferric citrate into the growth medium of *D. acetoxidans* IMV B-7384 led to formation of active oxygen species that was confirmed by the appearance of additional carbonyl groups in proteins of bacteria. Superoxide dismutase is involved in neutralization of free radicals of oxygen under the influence of ferric citrate in *D. acetoxidans* IMV B-7384 cells.

О.Д. Масловська, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, e-mail: gnatuk88@ukr.net

ОКИСНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ ТА ПИТОМА АКТИВНІСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ БАКТЕРІЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ІМВ В-7384 ЗА ВПЛИВУ ФЕРУМ ЦИТРАТУ

Реферат

Мета. Дослідити окисну модифікацію білків та питому активність супероксиддисмутази бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* ІМВ В-7384 за впливу різних концентрацій ферум цитрату. **Методи.** Уворення додаткових карбонільних груп (КГ) у бічних ланцюгах амінокислот визначали у реакції з 2,4-динітрофенілгідразином. Питому активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за здатністю ферменту інгібувати автоокиснення кверцетину при рН 10 у присутності тетраметилетилендіаміну. **Результати.** Вміст КГ у білках за впливу ферум цитрату змінювався залежно від часу культивування бактерій. За



усіх досліджених концентрацій ферум цитрату на другу та третю добу культивування спостерігали незначне зростання вмісту КГ у білках бактерій, порівняно з вмістом цих груп у контрольному зразку. Зростання вмісту КГ у білках у 2–4 рази за впливу солі металу зафіксовано на четверту добу культивування. Внесення ферум цитрату зумовлювало суттєве зростання питомої активності СОД. За впливу усіх досліджених концентрацій ферум цитрату питома активність СОД зростала зі збільшенням часу культивування. **Висновки.** Нагромадження у клітинах значних кількостей додаткових КГ у білках бактерій *D. acetoxidans* ІМВ-В7384 за впливу ферум цитрату свідчить про вільнорадикальний механізм пошкодження клітинних білків. За цих умов знешкодження активних метаболітів оксигену у клітинах *D. acetoxidans* ІМВ-В7384 здійснюють, очевидно, ферменти системи антиоксидантного захисту, зокрема СОД.

Ключові слова: супероксиддисмутаза, окисна модифікація протеїнів, ферум цитрат, *Desulfuromonas acetoxidans*.

О.Д. Масловская, С.А. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина, e-mail: gnatuk88@ukr.net

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ И УДЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ БАКТЕРИЙ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS* ИМВ В-7384 ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЦИТРАТА ЖЕЛЕЗА

Реферат

Цель. Исследовать окислительную модификацию белков и удельную активность супероксиддисмутазы бактерий *Desulfuromonas acetoxidans* ИМВ В-7384 при воздействии различных концентраций цитрата железа. **Методы.** Образование дополнительных карбонильных групп (КГ) в боковых цепях аминокислот определяли в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Удельную активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли по способности фермента ингибировать автоокиснения кверцетина при рН 10 в присутствии тетраметилэтилендиамина. **Результаты.** Содержание КГ в белках при влиянии цитрата железа менялось в зависимости от времени культивирования бактерий. При влиянии всех исследуемых концентраций ферум цитрата на вторые и третьи сутки культивирования наблюдали незначительное повышение содержания КГ в белках бактерий по сравнению с содержанием данных групп в контрольном образце. Рост содержания КГ в белках в 2–4 раза при влиянии соли металла зафиксировано на четвертые сутки культивирования. Внесение цитрата железа приводило к значительному росту удельной активности СОД. При влиянии всех исследованных концентраций цитрата железа удельная активность СОД возрастала с увеличением времени культивирования. **Выводы.** Накопление в клетках значительных количеств дополнительных КГ в белках бактерий *D. acetoxidans* ИМВ В-7384 при влиянии цитрата железа свидетельствует о свободнорадикальном механизме повреждения клеточных белков. В этих условиях обезврежи-



вание активных метаболитов кислорода в клетках *D. acetoxidans* ИМВ В-7384 осуществляют, очевидно, ферменты системы антиоксидантной защиты, в частности СОД.

Ключевые слова: супероксиддисмутаза, окислительная модификация протеинов, цитрата железа, *Desulfuromonas acetoxidans*.

LITERATURE

1. Brioukhanov A., Netrusov A. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: a review // Appl. Biochem. Microbiol. – 2007. – 43, № 6. – P. 635–652.
2. Fareleira P., Santos B. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas* // Microbiol. – 2003. – 149. – P. 1513–1522.
3. Golovchak N., Tarnovs'ka A., Kocjumbas G., Sanagurs'kij D. Lipid peroxidation in living organisms. – L.: Ivan Franko national university of Lviv, 2012. – 250 p.
4. Lakin G. Biometrics. – M.: Vysshaja shkola, 1990. – 352 p.
5. Lovely D., Holmes D., Nevin K. Dissimilatory Fe (III) and Mn (IV) reduction // Advances in microbial physiol. – 2011. – 59, № 1. – P. 1–100.
6. Lowry O., Rosenbrough N, Farr L., Randall R. Protein measurement, with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 265–275.
7. Lushchak V., Bagnyukova T., Lushchak O. Indices of oxidative stress. 1. TBA-reactive substrates and carbonylproteins // Ukr. biochem. j. – 2004. – 76, № 3. – P. 136–141.
8. Maslovska O., Hnatush S. The intensity of lipid peroxidation and parameters of antioxidative defense system of *Desulfuromonas acetoxidans* IMV B-7384 under the influence of ferric (III) citrate // Visnyk of the Lviv University. Ser. Biol. – 2014. – 64. – P. 270–278.
9. Semchyshyn H.M., Lushchak V.I. Oxidative stress and control of catalase activity in *Escherichia coli* // Ukr. biochem. j. – 2004. – 76, № 3. – P. 31–42.
10. Postgate J. The sulfate-reducing bacteria. – C.: Cambridge University Press, 1984. – 208 p.
11. Vasylyv O., Bilyy O., Ferensovich Ja., Hnatush S. Electric current generation by sulfur-reducing bacteria in microbial-anode fuel cell // Proceedings of the SPIE, 2012. – P. 84720Z-1–7.
12. Vasylyv O., Hnatush S. Influence of transition metal compounds on superoxide dismutase activity of sulfur reducing *Desulfuromonas acetoxidans* bacteria // Microbiol. J. – 2013. – 75, № 2. – P. 37–44.

Стаття надійшла до редакції 26.12.2014 р.



О.О. Нечипуренко¹, М.А. Хархота¹, К.С. Бордунос², Л.В. Авдєєва¹

¹Інститут 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: ne4cipura@ukr.net

²Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагаріна, 72,
Дніпропетровськ, 49010, Україна

РІСТ І УТВОРЕННЯ КАРОТИНІВ ШТАМАМИ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 ТА *B. SUBTILIS* 1.1 В УМОВАХ ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ

Мета. Дослідити динаміку росту та утворення каротинів штамами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1 в умовах глибокого культивування. **Методи.** Бактерії культивували на синтетичному середовищі та середовищі з м'ясою у періодичних умовах. Кількість абсолютно сухої біомаси бактерій (г/л), загальний вміст каротиноїдів (мг/л) встановлювали спектрофотометрично за довжини хвилі 540 та 440 нм, відповідно. Екстракцію пігментів проводили з використанням суміші хлороформу та метанолу (2:1). **Результати.** Максимальні концентрації бактеріальних клітин штаму *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на середовищі з м'ясою становили $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ та $4,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, відповідно, що у 10 разів перевищувало значення, отримані на синтетичному середовищі. Вихід біомаси у штаму *B. subtilis* 1.1 на напівсинтетичному середовищі становив 4,5 г/л, а на синтетичному – 1,7 г/л; у штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 5,0 г/л та 2 г/л, відповідно. Загальний вміст каротиноїдів штаму *B. subtilis* 1.1 на розробленому середовищі складав 965 мг/л, на синтетичному – 197 мг/л; для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 1356 мг/л та 173 мг/л, відповідно. **Висновки.** Для отримання високої кількості біомаси і каротиноїдних пігментів досліджених штамів бактерій необхідно використовувати напівсинтетичне середовище з м'ясою. Кількість життєздатних клітин штаму *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування бактерій на такому середовищі була більшою ніж на синтетичному у 10 разів, накопичена біомаса – у 3 та 2,5 рази, загальний вміст каротиноїдів – у 5 та 8 разів, відповідно.

Ключові слова: каротин, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, пігментоутворення.

Інфекційні захворювання шлунково-кишкового тракту та дефіцит вітаміну А призводять до значних втрат поголів'я птиці, зниження приросту маси птиці та яйценосності тощо. У зв'язку з цим вже створено ряд ветеринарних препаратів на основі каротинсинтезувальних стрептоміцетів і дріжджів, пробіотичних штамів бактерій, проте жоден з них не поєднує у собі якості каротинвмісної добавки та пробіотичного препарату [1, 6]. Використання каротинсинтезувальних бактерій



роду *Bacillus*, які характеризуються пробіотичними властивостями є перспективним напрямком вирішення цієї проблеми [11, 13].

Відомо, що за глибинного культивування бактерій максимальної продуктивності можливо досягнути у певній фазі їх росту, однак, дані щодо динаміки синтезу каротиноїдів, взаємозв'язку їх утворення з накопиченням біомаси та спороутворенням бактерій роду *Bacillus* представлені лише у поодиноких публікаціях [11, 13].

З огляду на вищевикладене, метою роботи було дослідити динаміку росту та пігментоутворення каротинсинтезувальних штамів *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 та *B. subtilis* 1.1 в умовах глибинного культивування.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були каротинсинтезувальні штами *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 з музею відділу антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Раніше нами було показано, що зазначені культури бактерій здатні синтезувати пігменти каротиноїдної природи, а штам *B. subtilis* 1.1 крім цього характеризується пробіотичними властивостями [3, 4].

Бактерії вирощували на синтетичному середовищі (рН = 7,0±0,3) (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, KH_2PO_4 – 9,60, MgSO_4 – 0,18, глюкоза – 20,00 та напівсинтетичному середовищі (рН = 7,5±0,2) (г/л): м'яса (ДСТУ 3696-98) – 23; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6; K_2HPO_4 – 2,0; FeSO_4 – 0,035. Норма внесення інокуляту кожної культури бактерій складала 5 об. %, що відповідало 10^6 – 10^7 колонієутворювальних одиниць на 1 мл середовища (КУО/мл). Культивування бактерій здійснювали на качалках (n = 200 об/хв) за температури 37 С протягом 36 год. Параметри росту (фази росту, питомо швидкість росту, час генерації) обраховували згідно до рекомендацій Перт С. Дж. [5].

Кількість життєздатних клітин бактерій у середовищі визначали шляхом висіву 0,1 мл з десятикратних розведень суспензії на м'ясо-пептонний агар. Екстракцію пігментів проводили шляхом гомогенізації сухої біомаси штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 у ступці з поступовим додаванням суміші хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 [11, 13]. Кількість абсолютно сухої біомаси (АСБ) бактерій (г/л), загальний вміст каротиноїдів (мг/л) встановлювали спектрофотометрично з перерахунком за калібрувальними кривими, що отримані шляхом вимірювання оптичної густини культуральної рідини та екстрактів пігментів за довжини хвилі 540 та 440 нм, відповідно. Спори фарбували за методикою Шеффера-Фултона [12].

Для оцінки достовірності експериментальних даних, використовували параметричні критерії нормального розподілу, обчислюючи середнє арифметичне ($X_{\text{сєр}}$), середню квадратичну похибку ($S_{x_{\text{сєр}}}$) за кількості повторів дослідів n = 6 та рівнях значимості 0,05 [2].



Результати та їх обговорення

Простим у приготуванні та дешевим у виробництві є середовище з мелясою, яку бактерії використовують як основне джерело карбону та енергії [7]. Тому нами було досліджено ростові показники та рівень пігментоутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на синтетичному та напівсинтетичному середовищах. Встановлено, що вищезгадані штами за культивування на синтетичному та напівсинтетичному середовищах характеризувалися типовими S-подібними кривими росту (рис. 1).

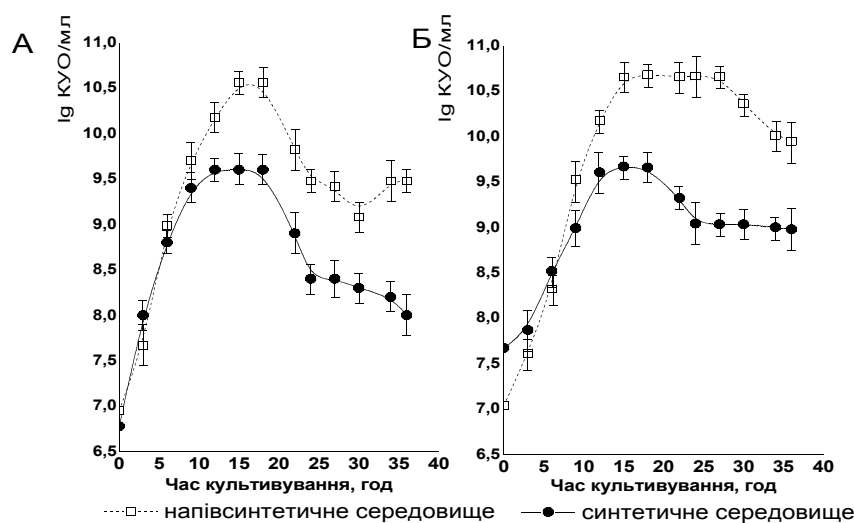


Рис. 1. Динаміка росту бактерій штамів *B. subtilis* 1.1 (А) та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 (Б) за культивування на напівсинтетичному та синтетичному середовищах

Fig. 1. Dynamics of bacteria growth of the strains *B. subtilis* 1.1 (A) and *B. amyloliquefaciens* UCM В-5113 (Б) during cultivation on semi-synthetic and synthetic media

На середовищі з мелясою максимальна концентрація бактерій *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 становили $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ та $4,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, відповідно, що у 10 разів перевищує значення, отримані за культивування бактерій на синтетичному середовищі.

Слід зазначити, що протягом 36 годин культивування штамів рН синтетичного і напівсинтетичного середовищ знижувалося від $7,0 \pm 0,3$ і $7,5 \pm 0,2$ до $6,3 \pm 0,2$ та $6,5 \pm 0,2$, відповідно, що вказує на розкладання вуглеводів з утворенням органічних кислот. Спороутворення штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 розпочиналося на 19 та 21 годину культивування, відповідно. На 36 годину культивування 15% бактерій утворювали ендоспори, тоді як відомо, що для більшості пробіотичних бактерій роду *Bacillus* відповідний показник становить близько 90%. Виявлені відмінності можливо пов'язані з різним рівнем експресії генів спороутворення або особливостями умов культивування [10].

Показники росту штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування на синтетичному та напівсинтетичному середовищах представлені в таблиці.

Таблиця

Показники росту штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 у логарифмічній фазі росту

Table

Growth parameters of the strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 during logarithmic growth phase

Штам	Середовище культивування	Кількість життєздатних клітин, КУО/мл	Число клітинних поділів	Час генерації, год.	Питома швидкість росту, год ⁻¹
<i>B. subtilis</i> 1.1	Синтетичне	4,3±0,2×10 ⁸	4,85±0,15	1,28±0,06	0,56±0,01
	Напівсинтетичне	3,7±0,3×10 ¹⁰	8,36±0,20	1,11±0,10	0,64±0,02
<i>B. amyloliquefaciens</i> УКМ В-5113	Синтетичне	4,7±0,1×10 ⁹	5,78±0,08	1,61±0,08	0,45±0,02
	Напівсинтетичне	4,8±0,2×10 ¹⁰	10,10±0,20	1,23±0,07	0,58±0,02

На складному середовищі ростова активність (питома швидкість росту) штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 була більшою, ніж на синтетичному на 14 та 28%, відповідно. Окрім цього, питома швидкість росту обох досліджуваних культур перевищувала на 0,09–0,13 год⁻¹ зазначений показник пробіотичного штаму *B. subtilis* 534 за його культивування на середовищі подібному до напівсинтетичного [6]. Отримані ростові параметри досліджених культур є характерними для бактерій роду *Bacillus* з високим рівнем ростової активності [9].

Основними показниками продуктивності каротинсинтезувальних штамів є вихід АСБ та кількість каротиноїдних пігментів [5]. Тому нами було досліджено динаміку накопичення каротиноїдних пігментів. Встановлено, що синтез каротиноїдних пігментів штамми *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за вирощування на синтетичному та напівсинтетичному середовищах починався у кінці експоненційної фази росту, що характерно також для синтезу лікопіну у *Streptomyces globisporus* 1912 та апокаротиноїдів у *Bacillus indicus* NU36 [1, 13].

Показано, що на середовищі з м'ясою максимальний вихід біомаси штаму *B. subtilis* 1.1 становив 4,5±0,2 г/л, що у 3 рази перевищувало накопичену біомасу на синтетичному середовищі. До того ж найбільше значення загального вмісту каротиноїдів штаму *B. subtilis* 1.1 на середовищі з м'ясою становило 965±45 мг/л, що майже у 5 разів більше за кількість каротиноїдів отриманих на синтетичному середовищі (рис. 2).



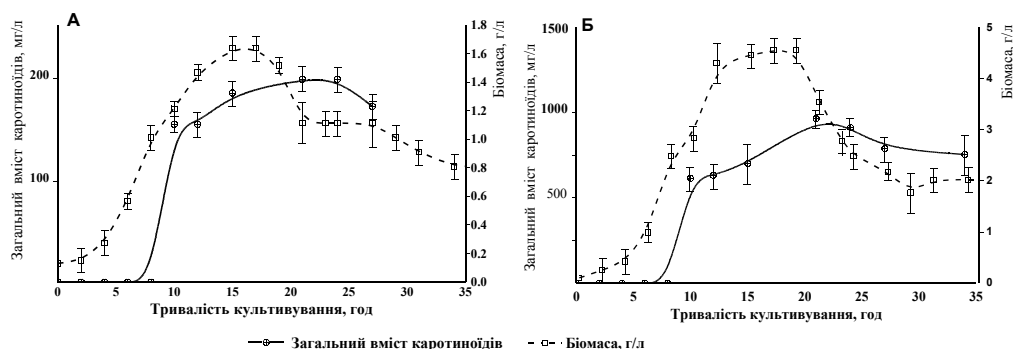


Рис. 2. Динаміка синтезу каротиноїдів штамом *B. subtilis* 1.1 на синтетичному (А) та напівсинтетичному (Б) середовищах

Fig. 2. Dynamics of carotenes synthesis by the strain *B. subtilis* 1.1 on synthetic (A) and semi-synthetic (B) mediums

Для штаму *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 максимальна накопичена біомаса та загальний вміст каротиноїдів при культивуванні на напівсинтетичному середовищі були більшими у 2,5 та 8 разів відповідно, за показники отримані на синтетичному середовищі, і становили $5,0 \pm 0,2$ г/л та 1356 ± 86 мг/л (рис. 3).

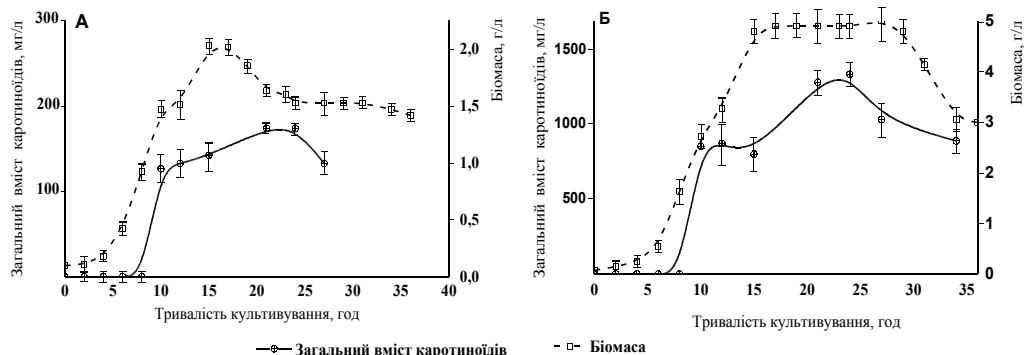


Рис. 3. Динаміка синтезу каротиноїдів штамом *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 на синтетичному (А) та напівсинтетичному (Б) середовищах

Fig. 3. Dynamics of carotenes synthesis by the strain *B. amyloliquefaciens* UCM В-5113 on synthetic (A) and semi-synthetic (B) mediums

Ростова активність та продуктивність досліджених культур були більшими на середовищі з мелясою, ніж на синтетичному, оскільки, меляса окрім цукрів (цукрози, глюкози, фруктози) містить вітаміни та амінокислоти, що можуть покращувати ріст і пігментоутворення штамів; йони заліза індують спороутворення та каротиногенез у зв'язку з тим, що вони є кофакторами ферментів і здатні виступати індукторами антиоксидантних систем захисту мікробної клітини [8, 14].



Слід зазначити, що у всіх варіантах культивування штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 відмічено наявність двох максимумів накопичення каротиноїдних пігментів. Так, перший максимум припадав на кінець експоненційної фази росту, другий – на кінець стаціонарної чи фазу старіння культур. Можливо, в першому випадку каротиноїди переважно асоційовані з молодими вегетативними клітинами, а в другому – зі спорами. Таке припущення ґрунтується на тому, що каротиноїдні пігменти захищають молоді клітини, які швидко діляться, від окисного стресу, а у складі спор – підвищують їх резистентність до несприятливих чинників [13].

Таким чином, для отримання високої кількості біомаси і каротиноїдних пігментів досліджених штамів бактерій роду *Bacillus* доцільно використовувати напівсинтетичне середовище з мелясою. Кількість життєздатних клітин штамів *B. subtilis* 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 за культивування бактерій на такому середовищі була більшою, ніж на синтетичному у 10 разів, питома швидкість росту – на 14 та 28%, накопичена біомаса – у 3 та 2,5 рази, загальний вихід каротиноїдів – у 5 та 8 разів, відповідно. Біотехнологічні показники для обох штамів були максимальними з 18 по 24 годину культивування.

UDC 579.243+579.222.3:579.66

О. Nechypurenko¹, M. Kharkhota¹, K. Bordunos², L. Avdeeva¹

¹Zabolotny 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

²Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, 72, Gagarin str., Dnipropetrovsk, 49010

GROWTH AND CAROTENE SYNTHESIS BY THE STRAINS *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* UCM B-5113 AND *B. SUBTILIS* 1.1 AT SUBMERGED CULTIVATION

Summary

Aim. The aim was to study the dynamics of the growth and carotene synthesis by the strains *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 and *Bacillus* 1.1 at submerged cultivation.

Methods. Bacteria were cultured on synthetic medium and medium with molasses in periodic conditions. The amount of absolutely dry bacterial mass (g/l), the total content of carotenoids (mg/l) were determined spectrophotometrically at a wavelength of 540 and 440 nm, respectively. The pigments extraction was carried out with the use of mixture of chloroform and methanol (2:1). **Results.** The maximum bacterial cells concentration of the strains *B. subtilis* 1.1 *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 after cultivation on medium with molasses were $3.6 \pm 0.2 \times 10^{10}$ and $4.5 \pm 0.3 \times 10^{10}$ CFU/ml, respectively, and 10 times higher than the values obtained in the synthetic medium. Biomass yield of the strain *B. subtilis* 1.1 on complex medium was 4.5 g/l, and on synthetic – 1.7 g/l; the data for *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 – 5.0 g/l and 2 g/l, respectively. Total carotenoid content of the strain *B. subtilis* 1.1 on complex medium was 965 mg/l of completely dry biomass (CDB), on the synthetic – 197 mg/l; the data for the strain *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 – 1356 mg/l and 173 mg/l, respectively. **Conclusion.** The complex medium with molasses needs to be used to obtain a high amount of bacterial biomass and carotenoid pigments of investigated strains.



*The quantity of viable cells of the strains *B. subtilis* 1.1 and *B. amyloliquefaciens* UCM B-5113 after cultivation on medium with molasses was 10 times higher than on synthetic, the maximum biomass – 3 and 2.5 times higher, the total carotenoid content – 5 and 8 times higher, respectively.*

*Key words: carotene, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, pigment production.*

УДК 579.243+579.222.3:579.66

А.А. Нечипуренко¹, М.А. Хархота¹, Е.С. Бордунос², Л.В. Авдеева¹

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина,
тел.:+38 (093) 762 30 83, e-mail: ne4urura@ukr.net

²Днепропетровский национальный университет имени О. Гончара, пр. Гагарина, 72,
Днепропетровск, 49010, Украина

РОСТ И ОБРАЗОВАНИЕ КАРОТИНОВ ШТАММАМИ *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* УКМ В-5113 И *B. SUBTILIS* 1.1 ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Реферат

Цель. Исследовать динамику роста и образования каротинов штаммами *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 и *B. subtilis* 1.1 в условиях глубинного культивирования. **Методы.** Бактерии культивировали на синтетической среде и среде с меласой в периодических условиях. Количество абсолютно сухой биомассы бактерий (г/л), общее содержание каротиноидов (мг/л) определяли спектрофотометрически при длине волны 540 и 440 нм, соответственно. Экстракцию пигментов осуществляли с использованием смеси хлороформа и метанола (2:1). **Результаты.** Максимальные концентрации бактериальных клеток штаммов *B. subtilis* 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 при культивировании на среде с меласой составляли $3,6 \pm 0,2 \times 10^{10}$ и $4,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$ КУО/мл, соответственно, что в 10 раз превышало значения, полученный на синтетической среде. Выход биомассы штамма *B. subtilis* 1.1 на полусинтетической среде составил 4,5 г/л, а на синтетической – 1,7 г/л; у штамма *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 5,0 г/л и 2 г/л, соответственно. Общее содержание каротиноидов у штамма *B. subtilis* 1.1 на полусинтетической среде составило 965 мг/л, на синтетической – 197 мг/л; у штамма *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 – 1356 мг/л и 173 мг/л, соответственно. **Выводы.** Для получения большого количества биомассы и каротиноидных пигментов исследуемых штаммов бактерий необходимо использовать полусинтетическую среду с меласой. Количество жизнеспособных клеток штаммов *B. subtilis* 1.1 и *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113 при культивировании бактерий на такой среде было больше чем на синтетической в 10 раз, накопление биомассы – в 3 и 2,5 раза, общее содержание каротиноидов – в 5 и 8 раз, соответственно.

Ключевые слова: каротин, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, пигментобразование.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продукування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912. // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 45–50.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 350 с.
3. Нечипуренко О.О. Природа та фізико-хімічні властивості каротиноїдних пігментів штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. // XI Український біохімічний конгрес (6–10 жовтня 2014 року, Київ) : тез. доп. – Київ, 2014. – С. 34.
4. Нечипуренко О.О. Пробиотичні властивості каротинсинтезувальних штамів *Bacillus* sp. 1.1 та *B. amyloliquefaciens* УКМ В-5113. // XIII З'їзд Товариства Мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (1–6 жовтня 2013 р., Ялта) : тез. доп. – Ялта, 2013. – С. 499.
5. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 116 с.
6. Похиленко В.Д., Перельгин В.В. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – № 2. – С. 20–41.
7. Царенко И.Ю., Рой А.А., Кудриш И.К. Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Мікробіологічний журнал. – 2011. – Т. 73, № 2. – С. 13–19.
8. Banna A.A., Razeq 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.
9. Carvalho A.L., Corrêa F.H., Mariano R.R. Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14 // Brazilian archives of biology and technology. – 2010. – Vol. 53 – P. 643–652.
10. Errington J. Regulation of endospores formation in *Bacillus subtilis* // Nature reviews. Microbiology. – 2003. – Vol. 1. – P. 117–126.
11. Khaneja R., Perez-Fons L., Fakhry S. Carotenoids found in *Bacillus* // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – № 108. – P. 1889–1902.
12. Mormak D.A., Casida L.E. Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain // Applied and environmental microbiology. – 1985. – Vol. 49, № 6. – P. 1356–1360.
13. 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.
14. Sibtain A., Fayyaz A., Saeed H. Production of microbial biomass protein by sequential culture fermentation of *Arachniotus* sp., and *Candida utilis* // Pak. J. Bot. – 2010. – Vol. 42. – P. 1225–1234.

Стаття надійшла до редакції 27.02.2015 р.



ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИРОДИ АНТАГОНІСТИЧНОЇ ДІЇ ШТАМІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ЩОДО УМОВНО-ПАТОГЕННИХ ТА ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета. Вивчити природу антагоністичної дії штамів *L. plantarum*, що були виділені з ферментованих продуктів, дослідити їх здатність до продукції перексиду водню, а також залежність спектру антагоністичної активності щодо умовно патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів від наявності в поживному середовищі глюкози та твін-80. **Методи.** Продукцію перексиду водню штамми *L. plantarum* вивчали на середовищі MRS, що містить перексидазу хрому та тетраметилбензидин. Антагоністичну активність визначали методом відстроченого антагонізму, використовуючи середовища: традиційне MRS, MRS без глюкози, MRS без твін-80. **Результати.** З 109-ти використаних штамів, лише три (2,75%) продукували перексид водню. Більшість штамів *L. plantarum* (53–68%) зберігали антагоністичну активність щодо 14-ти із 17-ти використаних тест-культур на середовищі MRS без глюкози. Відсутність глюкози у середовищі майже не впливала на антагоністичну активність штамів *L. plantarum* щодо *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis* та *Candida albicans*, пригнічувальну дію зберігали близько 75% штамів. Найбільш залежною від наявності твін-80 виявилась активність до *Clavibacter michiganensis*, найменш залежною – до *Pseudomonas aeruginosa* (активність зберігали 26% і 92% штамів, відповідно). Пригнічувальну дію зберігали 67–88% штамів *L. plantarum* щодо решти тест-культур на середовищі без твін-80. **Висновки.** Молочна кислота та перексид водню не є основними чинниками антагоністичної дії більшості досліджених штамів *L. plantarum*. Залежність спектру антагоністичної дії від наявності глюкози чи твін-80 у середовищі культивування може свідчити про синтез бактеріоциноподібних речовин як з широким, так і з вузьким спектром дії. Спектр антагоністичної активності є штамоспецифічним і різниться щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, антагоністична активність, перексид водню, умовно патогенні і фітопатогенні мікроорганізми.

Однією з важливих властивостей молочнокислих бактерій (МКБ) є їх антагоністична активність щодо збудників захворювань людини, тварин, а також рослин [5, 13]. Вивченню природи чинників антагоністичної дії присвячено багато наукових робіт. Основними речовинами з антагоністичною активністю

є органічні кислоти, зокрема молочна кислота, яка є основним метаболітом при зброджуванні вуглеводів молочнокислими бактеріями. Крім цього, МКБ здатні до продукції інших речовин з антимікробною дією, таких як пероксид водню, діацетил, а також бактеріоцинів [4, 5, 10]. Відомо, що антагоністична активність може змінюватися залежно від умов культивування, зокрема важливу роль відіграє склад поживного середовища. Так, продукція молочної кислоти залежить від вмісту вуглеводів у середовищі. Крім того, багатьма дослідниками була встановлена важлива роль твін-80 у середовищі для синтезу бактеріоцинів штамами МКБ [12].

Раніше нами було вивчено антагоністичну активність штамів *L. plantarum* щодо тест-культур умовно-патогенних мікроорганізмів (УПМ) людини і тварин та фітопатогенних мікроорганізмів (ФПМ) [1].

Метою даної роботи було вивчити природу антагоністичної дії штамів *L. plantarum*, що були виділені з ферментованих продуктів, дослідити їх здатність до продукції перексиду водню, а також залежність спектру антагоністичної активності щодо умовно патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів від наявності в поживному середовищі глюкози та твін-80.

Матеріали і методи

В роботі використані 109 штамів *L. plantarum*, що були ізольовані з ферментованих овочевих та кисломолочних продуктів. Попередньо культури активізували шляхом двох пересівів на середовищі MRS [3].

Продукцію перексиду водню (H_2O_2) штамами *L. plantarum* вивчали за описаною методикою [4].

Антагоністичну активність щодо тест-культур УПМ та ФПМ досліджували методом перпендикулярних штрихів [1]. Штами *L. plantarum* культивували на традиційному середовищі MRS, а також на середовищі MRS, що не містило глюкозу та на середовищі MRS без твін-80. Відмічали наявність чи відсутність зони затримки росту тест-культур. Тест-культурами слугували 11 референс-штамів умовно-патогенних мікроорганізмів: *Pseudomonas aeruginosa* УКМ ІМВ В-900, *Staphylococcus epidermidis* УКМ ІМВ В-119, *Shigella flexneri* ГИСК 337, *S. sonnei* ГИСК 233169, *Proteus vulgaris* УКМ ІМВ В-905, *Escherichia coli* УКМ ІМВ В-906, *Bacillus cereus*. УКМ В-908, *S. aureus* УКМ ІМВ В-904, *Klebsiella pneumoniae* УКМ ІМВ В-920, *Salmonella enterica* УКМ ІМВ В-921, *Candida albicans* УКМ ІМВ Y-2681, та шість штамів фітопатогенних мікроорганізмів: *Pseudomonas syringae* УКМ ІМВ В-1027⁷, *P. fluorescens* УКМ ІМВ 8573, *Pectobacterium carotovorum* УКМ ІМВ В-1095[†], *Agrobacterium tumefaciens* УКМ ІМВ В-1000, *Xanthomonas campestris* УКМ ІМВ В-1049 (8003_с), *Clavibacter michiganensis* УКМ ІМВ 10₂.

Статистичне опрацювання даних проводили за загально прийнятими методами. Кластерний аналіз проводили з використанням програми Statistica 7.0.



Результати досліджень та їх обговорення

При культивуванні на традиційному середовищі MRS переважна більшість штамів *L. plantarum* виявили антагоністичну активність щодо всіх використаних тест-культур умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів (рис. 1). Однак на середовищі MRS, що не містило глюкози, кількість штамів *L. plantarum* з антагоністичною дією зменшувалася, порівняно з традиційним середовищем MRS. Так, тільки третина штамів зберегли свою активність щодо *P. fluorescens*. Близько половини штамів зберігали активність щодо *P. syringae*, *P. carotovorum* та *S. aureus*. Відсутність глюкози у середовищі найменше впливала на антагоністичну активність штамів щодо *S. flexneri*, *S. epidermidis* та *C. albicans*. Пригнічувальну дію зберігали близько 75% штамів. Антагоністичну активність щодо інших використаних тест-культур зберігали 53-68% штамів *L. plantarum*.

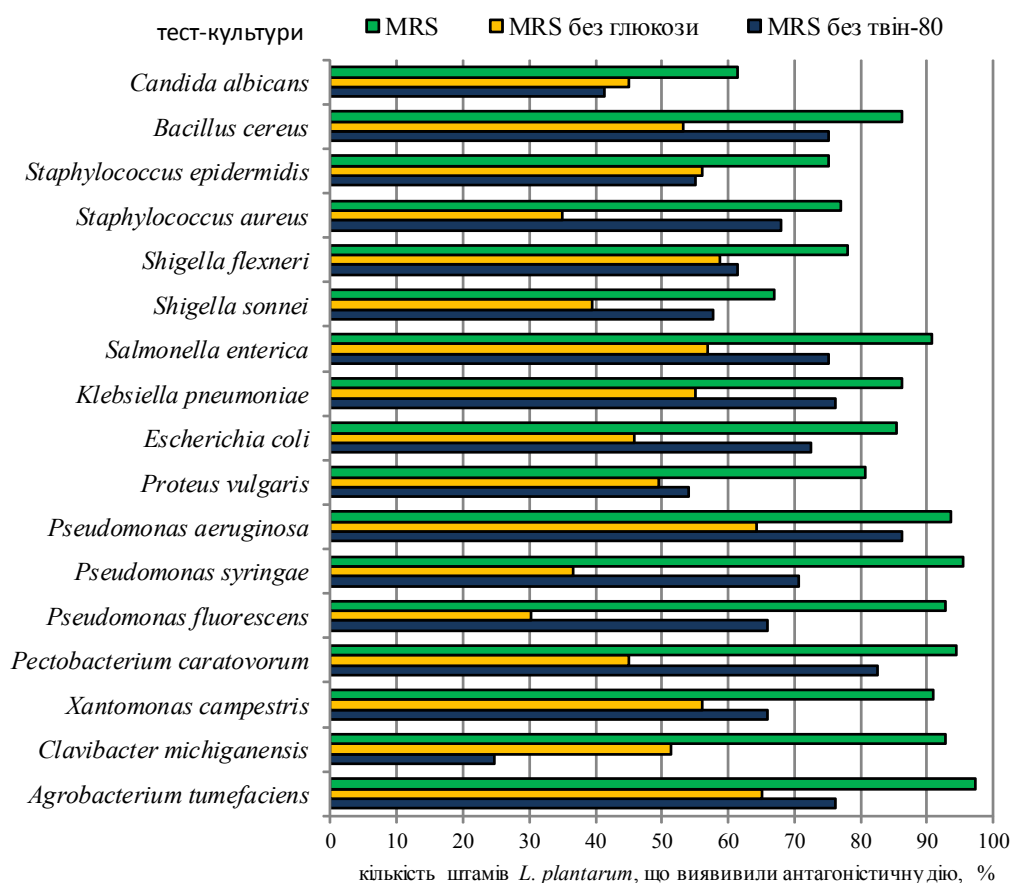


Рис. 1. Антагоністична активність штамів *Lactobacillus plantarum* щодо умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів на середовищах різного складу

Fig. 1. Antagonistic action of strains of *Lactobacillus plantarum* to opportunistic and phytopathogenic microorganisms on the culture medium of the different composition

Виключення з середовища MRS твін-80 призводило до зникнення антагоністичної дії до окремих тест-культур у деяких штамів *L. plantarum* (рис. 1). Найбільш залежною від наявності твін-80 виявилася активність щодо *C. michiganensis*, найменш залежною – щодо *P. aeruginosa* (активність зберігали 26% і 92% штамів, відповідно). Щодо інших тест-культур пригнічувальну дію на середовищі без твін-80 зберігали 67–88% штамів *L. plantarum*.

Пригнічення росту тест-культур УПМ при вирощуванні МКБ на середовищі без вуглеводів може свідчити про продукцію інших антибактеріальних чинників, зокрема пероксиду водню чи бактеріоцинів [7]. За деякими даними продукція пероксиду водню є більш характерною ознакою й основним чинником антагонізму у видів лактобацил, що є переважальними у ґрунті [8]. У той же час було показано що 38,88% штамів *L. plantarum*, ізольованих з козячого сиру, продукували пероксид водню [7].

Дослідження здатності штамів *L. plantarum* до продукції пероксиду водню показало, що тільки три штами (2,75%) виявили таку властивість (штами *L. plantarum* 2я, 969к, 321а т).

За наявністю зони затримки росту кожної тест-культури, при вирощуванні штамів лактобацил на різних середовищах, було виділено 8 профілів зміни антагоністичної дії (табл. 1).

Таблиця 1

Профілі антагоністичної активності штамів *L. plantarum* щодо тест-культур УПМ та ФПМ на середовищах різного складу

Table 1

Profiles antagonistic action of the strains *Lactobacillus plantarum* on opportunistic and phytopathogenic microorganisms on the culture medium of the different composition

Середовище	Профілі антагоністичної дії штамів <i>L. plantarum</i> («+» – є активність, «-» – немає активності)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
MRS традиційне (глюкоза – 2%, твін-80 – 1%)	-	-	-	-	+	+	+	+
MRS без глюкози	-	-	+	+	+	-	-	+
MRS без твін-80	-	+	+	-	+	+	-	-

Тридцять штамів (27,5%) не виявили активності на трьох використаних середовищах (профілі 1) хоча б до однієї з сімнадцяти тест-культур. Для інших штамів навпаки, виключення з середовища MRS глюкози чи твін-80 призводило до появи антагоністичної активності щодо окремих тест-культур. Так, 23 штами пригнічували ріст тест-культур при виключенні з середовища твін-80 (профілі 2), найчастіше це були *Staphylococcus aureus* та *Shigella sonnei*. За відсутності у середовищі глюкози у 21 штаму з'являлася антагоністична активність (профілі 4) щодо 10 тест-культур, в основному щодо *C. albicans*



(у 8 з 21 штамів). У 32 штамів спостерігали появу активності щодо окремих тест-культур як на середовищі без глюкози, так і на середовищі без твіну-80 (профіль 3), причому найчастіше це спостерігалось для *S. flexneri*, *S. epidermidis*, *S. sonnei*, *C. albicans* (у 16,5–18,3% штамів).

Серед штамів *L. plantarum*, що пригнічували ріст тест-культур на традиційному середовищі MRS частина з них втрачали антагоністичну дію на середовищі без глюкози (профіль 6) чи на середовищі без твіну-80 (профіль 8). У 65 штамів спостерігали втрату активності щодо тест-культур як на середовищі без глюкози, так і на середовищі без твіну-80 (профіль 7). В той же час практично всі досліджені штами *L. plantarum* зберігали антагоністичну дію щодо різних тест-культур при виключенні із складу середовища глюкози чи твіну-80 (профіль 5). Слід зазначити, що кожен штам *L. plantarum* має як однакові, так і різні профілі до окремих тест-культур.

На рис. 2 наведено дендрограми подібності штамів *L. plantarum* за профілями антагоністичної активності щодо УПМ, ФПМ на традиційному середовищі MRS та на середовищах MRS без глюкози, чи без твін-80 (рис. 2а), а також подібність тест-культур за чутливістю до антагоністичної дії штамів *L. plantarum* (рис. 2б).

Кластер 1 включає 11 штамів *L. plantarum* (6 штамів з ферментованих овочів, 5 – з кисломолочних продуктів). Перш за все, вони відрізнялися від інших штамів активністю щодо *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, *P. vulgaris*, *S. epidermidis*, *C. albicans*, *X. campestris*, *P. fluorescens* і *C. michiganensis*, що виявлялася виключно на традиційному середовищі MRS (профілі 6, 7 і 8). Штами кластеру 2 були поділені на три підкластери: підкластер 2.1 включає 52 штами (28 штамів – з кисломолочних продуктів, 24 – з овочевих); до підкластеру 2.2 віднесено 25 штамів, переважно овочевого походження (19 з 25 штамів), у підкластері 2.3 об'єднано 21 штам, переважно ізольованих з кисломолочних продуктів (14 штамів). Штами підкластеру 2.1 в переважній більшості мали активність на всіх середовищах (профіль 5) щодо *P. carotovorum*, *B. cereus*, порівняно з штамами підкластеру 2.2 і 2.3, *P. syringae* – порівняно з кластером 2.2, і *S. aureus*, *P. aeruginosa* – порівняно з підкластером 2.3.

В залежності від зміни чутливості до антагоністичної дії штамів *L. plantarum* тест-культури були об'єднані у кластери, до першого увійшли всі ФПМ (кластер А), до другого – *S. sonnei*, *S. flexneri*, *P. vulgaris*, *S. epidermidis* та *C. albicans* (кластер Б), до третього – *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* (кластер В). Слід зазначити, що поява антагоністичної активності на модифікованих середовищах (профілі 2, 3, 4) до тест-культур кластеру Б, за винятком *P. vulgaris*, частіше була характерною для ізолятів з ферментованих овочів.

Можна припустити що, за зміною спектру антагоністичної дії, штами *L. plantarum* продукують декілька чинників антагонізму щодо використаних тест-культур. Так, у штамів кластеру 1 основним чинником антагонізму, найвірогідніше, є молочна кислота, оскільки вони проявляли активність лише на традиційному середовищі MRS. Але в той же час деякі з них (штами *L. plan-*



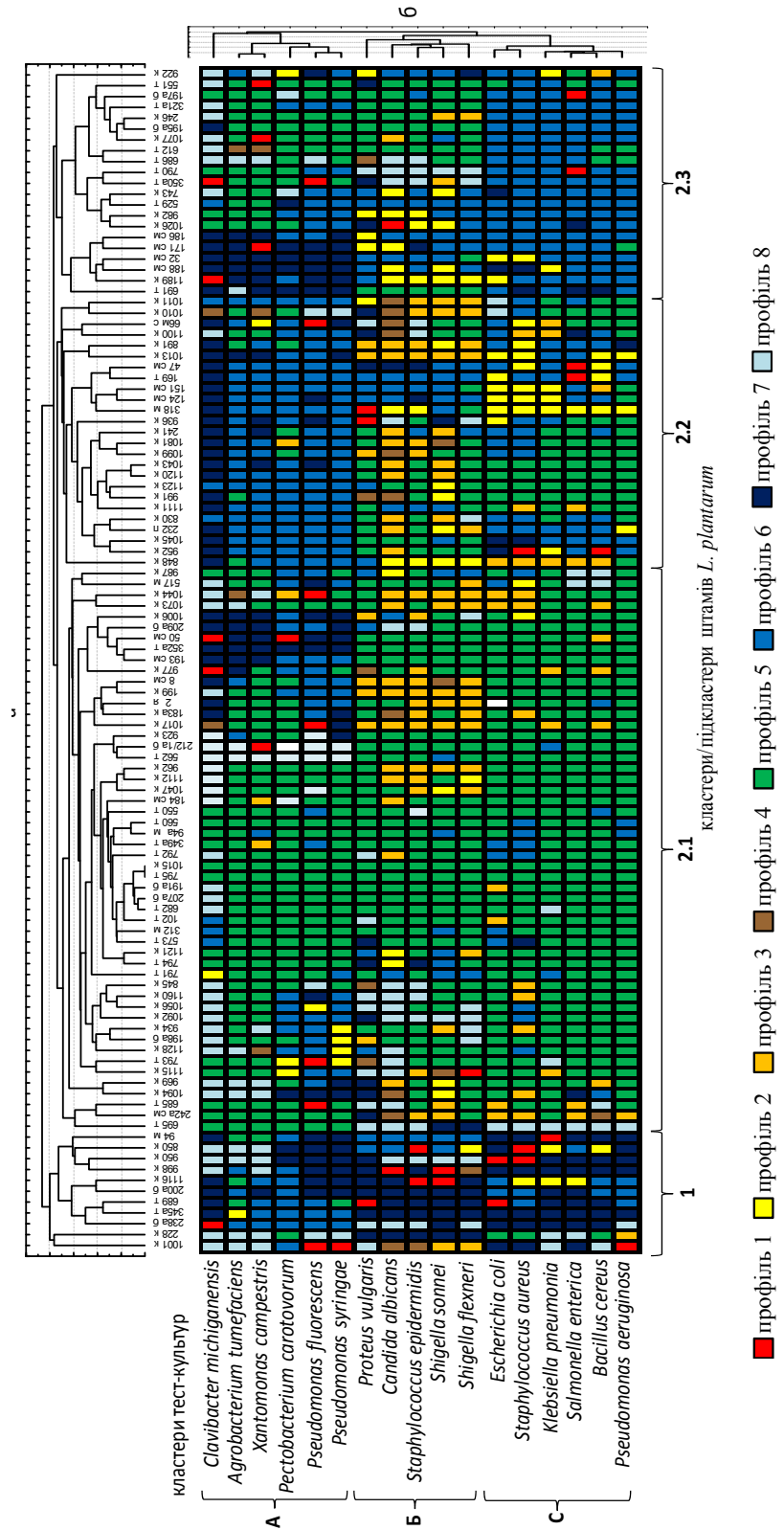


Рис. 2. Подібність штамів *L. plantarum* за спектром антагоністичної активності на середовищах різного складу (а) та (б) – подібність тест-культур за чутливістю до антагоністичної дії

Fig. 2. Similarity of *Lactobacillus plantarum* strains of the spectrum of antagonistic activity on the culture medium of the different composition (a) and (b) – the similarity of test cultures for sensitivity to antagonistic action



tarum 228к, 689т, 1116к, 94м) зберігали активність щодо деяких тест-культур за відсутності глюкози у середовищі (профіль 5, рис. 2а). У штамів підклас-теру 2.2. активність відносно фітопатогенів виявлялася за наявності глюкози у середовищі, тоді як до умовно-патогенних тест культур більшість штамів зберігали пригнічувальну дію за відсутності глюкози. Для штамів підклас-теру 2.3 залежність антимікробної дії щодо ФПМ та УПМ від наявності глюкози у середовищі була протилежною. На особливу увагу заслуговують штами, що по різному діють на ФПМ та УПМ. Штами 1015к та 795т виявили антагоні-стичну активність щодо всіх тест-культур УПМ та ФПТ на всіх використаних середовищах.

Відомо, що за наявності глюкози у середовищі внаслідок її зброджуван-ня молочнокислими бактеріями утворюється молочна кислота, яка є одним із основних чинників антагоністичної дії молочнокислих бактерій. З метою визначення продукції інших метаболітів, що можуть мати антагоністичну ак-тивність, зазвичай використовують середовища без вуглеводів, що практично унеможлиблює утворення молочної кислоти.

В багатьох роботах було показано, що твін-80 є необхідним фактором для продукції бактеріоцинів завдяки своєму впливу на структуру бактеріальної мембрани [11, 14]. Наявність твін-80 в середовищі MRS підвищувала продук-цію бактеріоцину штамом *L. plantarum* ST13BR на 50% [12]. Ця стимуляція може бути пояснена тим, що твін-80 знижує адсорбцію бактеріоцину на клі-тинах продуцента [2, 6]. Крім того, показано, що твін-80 підсилює активність бактеріоцину чи чутливість індикаторного штаму [6]. З іншого боку відомо, що бактеріоцини МКБ адсорбуються як на клітинах штаму-продуцента, так і інших грам-позитивних бактерій при нейтральному значенні рН і навпаки, витісняється при кислих значеннях рН [15]. Таким чином, дія бактеріоцинопо-дібних речовин також може залежати від наявності вуглеводів у середовищі.

Особливу зацікавленість викликають штами, у яких не було зареєстровано антагоністичної дії на традиційному середовищі MRS. **В той же час виключен-ня** глюкози чи твіну-80 призводило до появи активності щодо окремих тест-культур. Це може бути пов'язано зі стимуляцією продукції антимікробних речо-вин при вирощуванні на глюкозо- та твін-80-дефіцитних середовищах. Зокрема є повідомлення щодо стимуляції продукції бактеріоцинів при субоптимальних умовах росту штаму-продуцента. Умови найвищої продукції бактеріоцинів можуть відрізнятися від оптимальних для росту клітин та продукції лактату [9].

Таким чином, досліджені штами *L. plantarum* є продуцентами комплексів метаболітів з антагоністичною активністю щодо УПМ та ФПМ. Молочна кис-лота і перекис водню є основними чинниками антагоністичної дії більшості досліджених в роботі штамів *L. plantarum*. Залежність спектру антагоністичної дії від наявності глюкози чи твін-80 у середовищі культивування може свідчити про синтез бактеріоциноподібних речовин як з широким, так і з вузьким спек-тром дії. Спектр антагоністичної активності є штамоспецифічним і різниться щодо УПМ та ФПМ.



Автори висловлюють щире подяку за надані тест-культури умовно-патогенних та фітопатогенних мікроорганізмів співробітникам відділу антибіотиків та відділу фітопатогенних мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України.

УДК 576.8.095.38

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

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, ул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна, тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: olyav345@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИРОДЫ АНТАГОНИСТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* В ОТНОШЕНИИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Цель. Изучить природу антагонистического действия штаммов *Lactobacillus plantarum*, выделенных из ферментированных продуктов, исследовать их способность к продукции перекиси водорода, а также зависимость спектра антагонистической активности в отношении условно-патогенных (УПМ) и фитопатогенных микроорганизмов (ФПМ) от наличия в питательной среде глюкозы и твин-80. **Методы.** Продукцию перекиси водорода штаммами *L. plantarum* изучали на среде MRS, которая содержит пероксидазу хрена и тетраметилбензидин. Антагонистическую активность определяли методом отсроченного антагонизма, используя среды: традиционную MRS, MRS без глюкозы, MRS без твин-80. **Результаты.** Из 109-ти использованных, три штамма (2,75%) продуцировали перекись водорода. 53–68% штаммов *L. plantarum* сохраняли антагонистическую активность в отношении 14-ти из 17-ти использованных тест-культур на среде MRS без глюкозы. Отсутствие глюкозы в среде практически не влияло на антагонистическую активность штаммов *L. plantarum* в отношении *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis* и *Candida albicans*, угнетающее действие сохраняли около 75% штаммов. Наиболее зависимой от наличия твин-80 оказалась активность в отношении *Clavibacter michiganensis*, наименее зависимой – в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (активность сохранили 26% и 92% штаммов, соответственно). Угнетающее действие сохраняли 67–88% штаммов *L. plantarum* в отношении других тест-культур на среде без твин-80. **Выводы.** Молочная кислота и перекись водорода не являются основными факторами антагонистического действия большинства изученных в работе штаммов *L. plantarum*. Зависимость спектра антагонистического действия от наличия глюкозы или твин-80 в среде культивирования может свидетельствовать о синтезе бактериоциноподобных веществ как с широким, так и с узким спектром действия. Спектр антагонистической активности является штаммоспецифическим и отличается в отношении условно-патогенных и фитопатогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, антагонистическая активность, перекись водорода, условно-патогенные и фитопатогенные микроорганизмы.



УДК 576.8.095.38

I.L. Harmasheva, O.M. Vasulyk, N.K. Kovalenko, L.T. Oleshchenco

Danylo Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine, 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine, e-mail: olyav345@gmail.com

STUDY OF THE ANTAGONISTIC ACTION NATURE OF STRAINS OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* TO OPPORTUNISTIC AND PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS

Aim. To study the nature of the antagonistic action of the strains *Lactobacillus plantarum*, isolated from fermented foods, to determine their ability to produce hydrogen peroxide and the dependence of the spectrum of antagonistic activity against opportunistic and phytopathogenic microorganisms from the presence of glucose and Tween-80 in culture medium. **Methods.** The ability of the strains *L. plantarum* to synthesize hydrogen peroxide was studied on MRS medium, which comprised horseradish peroxidase and tetramethylbenzidine. Antagonistic activity was determined by the deferred antagonism using the medium: the basic MRS, MRS without glucose, MRS without Tween-80. **Result.** Among 109 used strains only three (2.75%) produced hydrogen peroxide. The absence of glucose in the medium had practically no effect on the antagonistic activity of the strains of *L. plantarum* against *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* and inhibitory effect had about of 75% the strains. The antagonistic activity retained 53–68% of strains *L. plantarum* against other test cultures. The antagonistic activity against *Clavibacter michiganensis* was very dependent of the presence of tween-80 and not dependent – against *Pseudomonas aeruginosa* (26% retained activity and 92% of the strains, respectively). For other test cultures inhibitory effect on the medium without Tween-80 retained 67–88% of strains of *L. plantarum*. **Conclusions.** Lactic acid and hydrogen peroxide are not the major factors of antagonistic activity in the most examined *L. plantarum* strains in this study. Antagonistic action spectrum dependence of the presence of glucose or Tween-80 in the culture medium, may be indicative synthesis of bacteriocin-like substances with a broad or narrow spectrum of action. The spectrum of antagonistic activity is strain-specific and differs with against opportunistic and phytopathogenic microorganisms.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, antagonistic activity, hydrogen peroxide, opportunistic and phytopathogenic microorganisms.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Василюк О.М., Коваленко Н.К., Гармашева І.Л. Антагоністичні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів України // Мікробіологічний журнал . – 2014. – 76, № 3. – С. 24–30.
2. Aymerich T., Artigas M. G., Garriga M., Monfort J. M., Hugas M. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages // J. Appl. Microbiol. – 2000. – 88. – P. 686–694.



3. De Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E. Medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – 23. – P. 130–135.
4. Fontaine E.A., Taylor-Robinson D. Comparison of quantitative and qualitative methods of detecting hydrogen peroxide produced by human vaginal strains of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1990. – 69 (3). – P. 326–331.
5. Gayathri A., Gayathri D. Antagonistic potential of *Lactobacillus* spp against enteropathogenic bacteria: purification and characterization of their bacteriocins // Advance J. Food Sci Technol. – 2012. – 4 (5). – P. 265–269.
6. Keren T., Yarmus M., Halevy G., Shapira R. Immunodetection of the bacteriocin lacticin RM: analysis of the influence of temperature and Tween 80 on its expression and activity // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70(4). – P. 2098–2104.
7. Lavilla-Lerma L., Pérez-Pulido R., Martínez-Bueno M., Maqueda M., Valdivia E. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses // Int. J. Food Microbiol. – 2013. – 163. – P. 136–145.
8. Martín R., Soberón N., Vanechoutte M., Flórez A.B., Vázquez F., Suárez J.E. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates // Int. Microbiol. – 2008. – 11. – P. 261–266.
9. Matsusaki H.N., Endo K., Ishizaki S.A. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* 10-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – 45. – P. 36–40.
10. Pakdeeto A., Naranong N., Tanasupowat S. Diacetyl of lactic acid bacteria from milk and fermented foods in Thailand // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2003. – 49. – P. 301–307.
11. Rajaram G., Manivasagan P., Thilagavathi B., Saravanakumar A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment // Adv. J. Food Sci. Technol. – 2010. – 2. – P. 138–144.
12. Todorov S.D., van Reenen C.A., and Dicks L.M.T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2004. – 50. – P. 149–157.
13. Tras R., Banaras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // Int. Microbiol. – 2008. – 11. – P. 231–236.
14. Trinetta V., Rollini M., Manzoni M. Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei* // Process Biochem. – 2008. – 43. – P. 1275–1280.
15. Yang R., Johnson M.C., Ray B. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – 58. – P. 3355–3359.

Стаття надійшла до редакції 07.04.2015 р.



Л.Л. Сіда, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко,
А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

ВПЛИВ АНТИСЕПТИКІВ І ДЕЗІНФЕКЦІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ НА ПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНІ БАКТЕРІЇ

Мета. Вивчити ефективність дії неспецифічних антибактеріальних препаратів на біоплівки, утворені бактеріями, що виділені з поверхонь приміщень, відпрацьованих медичних матеріалів та шкіри рук. **Методи.** Бактерії для дослідження ізолювали з поверхонь службових приміщень, відпрацьованого інструментарію, а також зі шкіри рук 11 осіб-добровільців. Здатність до плівкоутворення виділених ізолятів та їх стійкість до різних неспецифічних антибактеріальних препаратів вивчали в пластикових планшетах за умов інкубації біоплівок з антисептиками та дезінфектантами. **Результати.** Виділено 179 штамів бактерій, які було ідентифіковано як *Bacillus spp.* – 53,6%, *S. epidermidis* – 17,3%, *S. aureus* – 3,4%, *E. coli* – 12,3%, *Acinetobacter spp.* – 8,4%, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* та *Pseudomonas spp.* – по 1,1%, *Enterobacteriaceae* – 3,4%. 62% зразків отримано з поверхонь приміщень, 12,3% – з рук, 25,7% – з використаного медичного інструментарію. Показано, що 93,5% штамів *S. epidermidis* володіли здатністю до утворення біоплівки, що було одним з найвищих показників серед досліджених штамів. Після інкубації 3-добової біоплівки цих штамів з різними антибактеріальними препаратами для понад 60% культур встановлено відсутність росту, а для інших – кількість бактерій, що вирости з гомогенату не перевищувала 10^3 КУО/мл. Максимальний ефект пригнічення плівкового росту виявлено при застосуванні дезінфектанту дезактив-хлор. При використанні антисептика хлоргексидину у концентрації 5% чутливими у плівковому стані виявилися 84,6% штамів. **Висновки.** При використанні антибактеріальних препаратів проти 3-добових біоплівок виживання бактерій при 2-годинній інкубації з досліджуваними препаратами не перевищувала 40%, що вказує на можливість ефективного застосування досліджуваних неспецифічних антибактеріальних препаратів для боротьби з поширенням біоплівкоутворювальних штамів.

Ключові слова: біоплівка, бактерії, чутливість, антибактеріальні препарати.

Сьогодні вважається, що переважна більшість ускладнень при інфекційних захворюваннях асоційована зі здатністю збудників формувати біоплівку [8, 12, 15], у стані якої мікроорганізми стають більш стійкими до дії факторів довкілля, що частково сприяє їх поширенню [5, 17]. Вивчення факторів, що впливають на розвиток біоплівки, дозволяє розробити профілактичні заходи



зادля упередження початку розвитку біоплівки, що особливої актуальності набуває при дезінфекції приміщень, відпрацьованого медичного інструментарію та рук персоналу лікувальних закладів, які є потенційними джерелами поширення плівкоутворювальних штамів.

Сучасні дезінфекційні засоби, представлені широким спектром хімічних сполук різних класів, поєднані загальною здатністю до знищення мікроорганізмів навіть у невисоких концентраціях. Однак, ці засоби застосовні лише для обробки поверхонь об'єктів, а не шкіри людини, хоча персонал, що пересувається лікарняним закладом вважається одним з джерел поширення госпітальних штамів. Крім того, застосування більшості з дезінфекційних протимікробних засобів розраховане для неплівкових культур мікроорганізмів [1, 2]. Для обробки шкіри існує низка засобів, але питання про їх ефективність стосовно біоплівки також потребує вивчення.

Відомо [10, 16, 18], що плівкоутворювальні штами бактерій у біоплівці проявляють посилену стійкість до антибіотиків, що значно ускладнює лікування.

Метою роботи було вивчити ефективність дії неспецифічних антибактеріальних препаратів на біоплівки, утворені бактеріями, що виділені з поверхонь приміщень, відпрацьованих медичних матеріалів та шкіри рук.

Матеріали і методи

У роботі вивчали ефективність впливу неспецифічних антибактеріальних засобів на біоплівки штамів бактерій, які були виділені з поверхні медичного інструментарію (відпрацьовані уретральні катетери), з рук 11 осіб-добровільців (2 – молодший медичний персонал лікарні, 5 – працівники комунального закладу «Профдезінфекція», 4 – добровільці з числа осіб, що не працюють у вказаних організаціях) та поверхонь (підлога, стіни, підвіконня) службових приміщень комунального закладу «Профдезінфекція».

Виділення та ідентифікацію мікроорганізмів здійснювали відповідно до ознак, наведених у визначнику бактерій Берджі [9]. Всього було отримано 153 зразки матеріалу, з яких виділено 179 штамів.

Здатність до плівкоутворення визначали на пластикових планшетах, у лунки яких вносили 0,5 мл поживного середовища (м'ясо-пептонний бульйон) та 50 мкл суспензії добової культури клітин виділених штамів, що містили 1×10^5 КУО/мл. Планшети інкубували протягом 3–5 діб, після чого шприцем відбирали середовище. При зависанні на стінках або дні планшета помітної плівки штаму вважали плівкоутворювальним [6, 11].

Для визначення ефективності впливу на біоплівкоутворювальні штами антибактеріальних засобів використовували чисті культури виділених бактерій. Для досліджень використовували добові агарові культури мікроорганізмів.

Оскільки переважну більшість дезінфектантів застосовують у вигляді водних розчинів, функціональні властивості яких визначаються концентрацією присутньої у їх складі активної діючої речовини, об'єктивною характеристикою чутливості до препарату служить концентрація дезінфектанту, що викликає загибель 100% внесених бактерій у фіксований час [1, 3, 7].



Для досліджень використовували антибактеріальні препарати: 4%-й розчин лізетолу, 10%-й розчин «Гігасепту», 5%-й розчин «Гексакварт форте», 1-, 2- та 5%-ві розчини хлоргексидину, 0,11%-й розчин «Дезактив-хлору», що дозволені до використання в Україні згідно Державного реєстру дезінфікувальних засобів на 2014 рік [4]. Для вивчення впливу перелічених засобів проводили дослідження наявності росту після їх внесення у вказаній концентрації. До лунки планшета з 3-добовою плівкою (вирощували в одному мл МПБ) вносили вносили 1 мл препарату у робочій дозі. Після інкубації протягом 2-х годин плівку відбирали з лунки, переносили у скляний гомогенізатор для подрібнення та стандартизували до концентрації 10^5 КУО/мл. Гомогенат клітин висівали на щільне поживне середовище.

Вплив різних концентрацій хлоргексидину вивчали на 3-добовій біоплівці штамів *S. epidermidis*. При цьому визначали зміну кількості бактерій, що росли в гомогенаті біоплівки після 2 год інкубації за умов впливу різних концентрацій дезінфектанта – 0,5; 1,0; 2,0 та 5,0%.

Результати та їх обговорення

Вивчення 179 виділених штамів дозволило ідентифікувати їх як: *S. epidermidis* – 31 (17,3%), *S. aureus* – 6 (3,4%), *Bacillus spp.* – 96 (53,6%), *E. coli* – 22 (12,3%), *Acinetobacter spp.* – 15 (8,4%), *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* та *Pseudomonas spp.* – по 2 (1,1%). Три штами (3,4%) ідентифіковані лише до родини *Enterobacteriaceae* (рис. 1).

Для виділених штамів вивчали здатність до утворення біоплівки. З отриманих даних можна побачити (рис. 2), що найбільша частка здатних до плівкоутворення штамів була виявлена серед псевдомонад (100%) та стафілококів (епідермальний стафілокок – 93,5% та золотистий стафілокок – 66,7% штамів). Серед інших штамів здатність до плівкоутворення траплялася рідше.

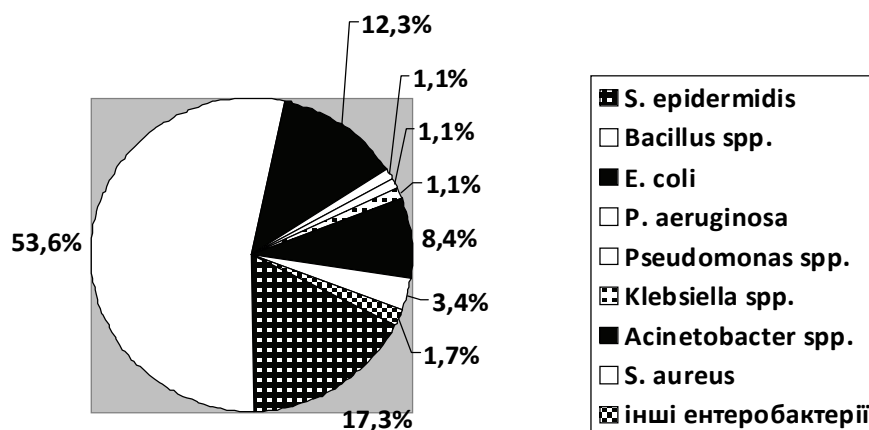


Рис. 1. Спектр бактерій, виділених з поверхонь приміщень, інструментарію та рук осіб-добровольців

Fig. 1. The spectrum of bacteria isolated from the surfaces of rooms, instrumentals and skin of volunteers

Для подальших досліджень з вивчення дії неспецифічних антибактеріальних засобів на біоплівку використовували лише штами епідермального стафілококу (26 штамів), що були виділені з використаного медичного інструментарію (катетери). Цю групу штамів обрано з огляду на те, що за існуючими даними [13, 14] стафілококи є одними з найбільш відомих, здатних до утворення біоплівки мікроорганізмів.

Для обраних штамів стафілококів проведено аналіз кількості бактерій у 3-добовій біоплівці після її інкубації з досліджуваними препаратами протягом 2 год (рис. 3). Результати представлено у порівнянні з контролем – 3-догова плівка тієї ж культури, але без додавання препаратів.

Відповідно до отриманих результатів можна побачити, що в усіх контрольних зразках мав місце ріст від 10^7 до 10^{10} КУО/мл (найбільше культур – 20 (76,9%) – давали ріст у межах 10^9 КУО/мл), у той час як у жодному з дослідних зразків кількісний показник росту не перевищував 10^3 КУО/мл (єдина культура). Для більшості дослідних культур (понад 60%) після інкубації з антибактеріальними препаратами протягом 2 год зафіксовано відсутність росту при використанні будь-якого з них.

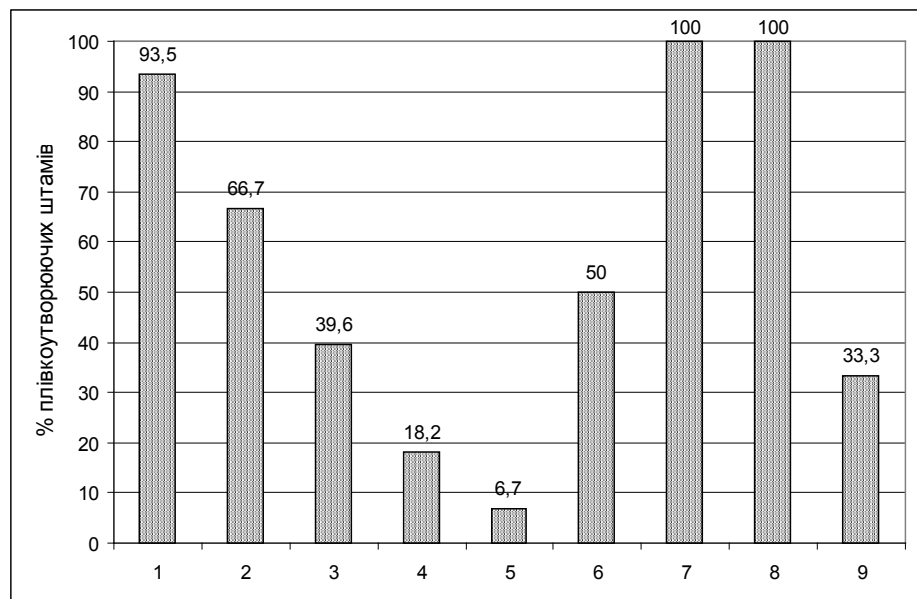


Рис. 2. Частота виявлення здатності до плівкоутворення серед досліджуваних штамів бактерій:

1 – *S. epidermidis*, 2 – *S. aureus*, 3 – *Bacillus spp.*, 4 – *E. coli*,
5 – *Acinetobacter spp.*, 6 – *Klebsiella spp.*, 7 – *P. aeruginosa*, 8 – *Pseudomonas spp.*,
9 – інші ентеробактерії

Fig. 2. The frequency of determination of filmforming ability among isolated strains of bacteria:

1 – *S. epidermidis*, 2 – *S. aureus*, 3 – *Bacillus spp.*, 4 – *E. coli*,
5 – *Acinetobacter spp.*, 6 – *Klebsiella spp.*, 7 – *P. aeruginosa*, 8 – *Pseudomonas spp.*,
9 – another enterobacteria



Найбільшу ефективність виявлено при використанні препарату Дезактив-хлор, що містить активні сполуки хлору: відмічено 100% пригнічення плівкового росту, що свідчить на найкращі перспективи використання цього препарату для дезінфекційної обробки приміщень.

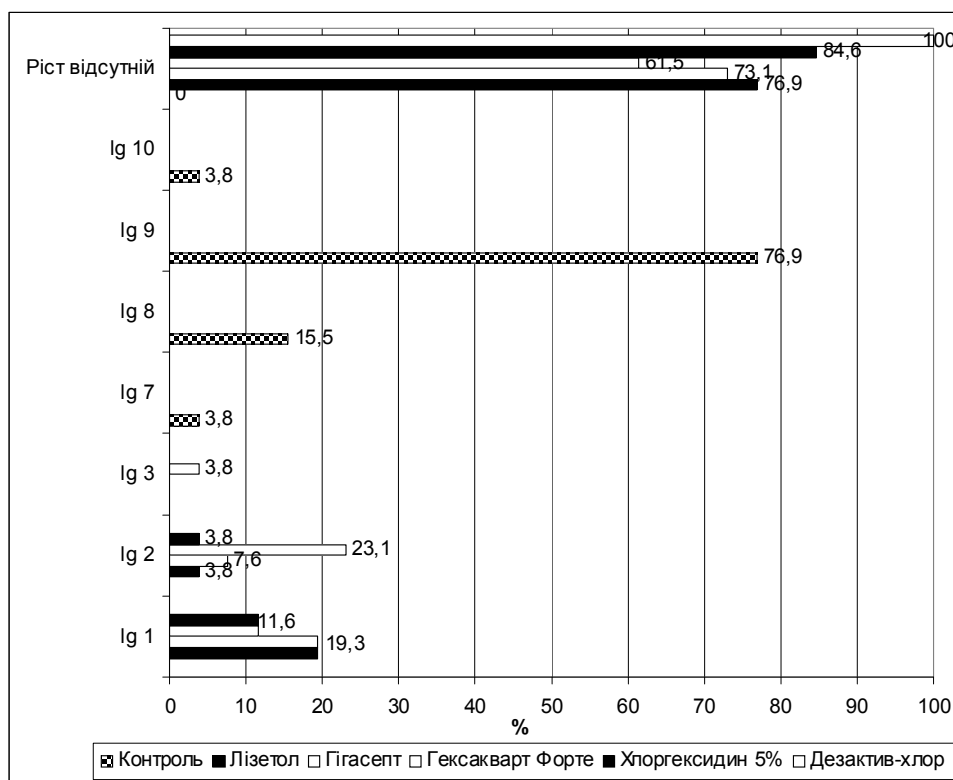


Рис. 3. Частка культур з різною інтенсивністю росту при використанні різних неспецифічних антибактеріальних препаратів

Fig. 3. The percent of the cultures with different intensity of growth under use of different non-specific antibacterial preparates

Другим за ефективністю виявився хлоргексидин, чутливими до дії якого у концентрації 5% виявилися 84,6% штамів, а решта давала ріст поодиноких колоній. Використана концентрація препарату не є рекомендованою для обробки біологічних тканин. Зазвичай для обробки уражених тканин використовують концентрацію 0,1–0,2%. Натомість, зважаючи на підвищену стійкість бактерій у складі біоплівки до факторів довкілля, доцільним було дослідити і вплив більших концентрацій. Тому у наступній експериментальній серії вивчали вплив концентрацій від 0,5 до 5%. Після 2-годинної інкубації 3-добових біоплівки з антисептиком у різних концентраціях визначали зниження кількості клітин, що вижили. Встановлено, що зі зростанням концентрації відбувалося зниження кількості культур, що давали ріст. Максимальне значення було отримано для

концентрації 5%, що було показано вище. Ефективність менших концентрацій практично була близькою до ефекту максимальної з застосованих. Так, при застосуванні 0,5%-вого розчину хлоргексидину найбільший кількісний показник росту становив 10^3 КУО/мл для 2 культур (7,6%), 10^2 КУО/мл – для 3 культур (11,5%), 10^1 КУО/мл – для 6 культур (23,1%), для 15 (57,7%) – росту не визначено взагалі. При застосуванні 1%-вого розчину хлоргексидину 10^2 КУО/мл мали 4 культури (15,4%), 10^1 КУО/мл – 3 культури (11,5%), 19 (73,1%) – не давали росту. При використанні 2%-вого розчину хлоргексидину кількість колоній сягала від 10^0 та 10^2 КУО/мл для 2 (разом 15,2%) культур, для 22 (84,6%) культур росту виявлено не було. Тобто ефект концентрації у 2% цілком порівняний із дією 5%-вого розчину хлоргексидину. Отримані результати вказують на потребу у проведенні подальших досліджень із визначення ефекту дії антисептиків, що використовуються як профілактичні та лікувальні препарати, на біоплівкоутворення у мікроорганізмів.

У результаті досліджень встановлено, що зі 179 ідентифікованих штамів найвищий відсоток здатних до плівкоутворення був серед штамів *S. epidermidis* – 93,5%.

При обробці культур плівкоутворювальних штамів *S. epidermidis* робочими розчинами показано, що для понад 60% культур після інкубації з антибактеріальним засобом протягом 2 год зафіксовано відсутність росту.

Найбільшу ефективність серед дезінфекційних препаратів виявлено при використанні препарату Дезактив-хлор: відмічено 100% загибелі плівкового росту. При використанні антисептиків найбільш ефективним було застосування хлоргексидину у концентрації 5%, чутливими до дії якого виявилися 84,6% штамів. Практично такий самий ефект давала концентрація розчину хлоргексидину 2%.

Л.Л. Седая, О.С. Воронкова, Е.А. Сірокваша, Т.Н. Шевченко,
А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

ВЛИЯНИЕ АНТИСЕПТИКОВ И ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИЕ БАКТЕРИИ

Реферат

Цель. Изучить эффективность действия неспецифических антибактериальных препаратов на биопленки, образованные бактериями, выделенными с поверхностей помещений, отработанных медицинских материалов и кожи рук.

Методы. Бактерии для исследования изолировали с поверхностей служебных помещений, отработанного инструментария, а также с кожи рук 11 лиц-добровольцев. Способность к пленкообразованию выделенных изолятов и их устойчивость к разным неспецифическим антибактериальным препаратам



изучали в пластиковых планшетах при условии инкубации биопленок с антисептиками и дезинфектантами. **Результаты.** Выделено 179 штаммов бактерий, которые были идентифицированы как: *Bacillus spp.* – 53,6%, *S. epidermidis* – 17,3%, *S. aureus* – 3,4%, *E. coli* – 12,3%, *Acinetobacter spp.* – 8,4%, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* и *Pseudomonas spp.* – по 1,1%, *Enterobacteriaceae* – 3,4%. 62% образцов получены с поверхностей помещений, 12,3% – с рук, 25,7% – с использованного медицинского инструментария. Показано, 93,5% штаммов *S. epidermidis* обладали способностью к образованию биопленки, что было одним из наиболее высоких показателей среди изученных штаммов. После инкубации 3-х суточной биопленки этих штаммов с различными антибактериальными препаратами для более чем 60% культур выявлено отсутствие роста, а для других – количество выросших из гомогената клеток не превышало 10^3 КОЕ/мл. Максимальный эффект угнетения пленочного роста выявлен при использовании дезинфектанта дезактив-хлор. При использовании антисептика хлоргексидина в концентрации 5% чувствительными к нему в пленочном состоянии оказались 84,6% штаммов. **Выводы.** При использовании антибактериальных препаратов против 3-хсуточных бактериальных биопленок выживаемость бактерий при 2-хчасовой инкубации биопленки с исследуемыми препаратми не превышала 40%, что указывает на возможность эффективного применения изученных неспецифических антибактериальных препаратов для борьбы с распространением пленкообразующих штаммов бактерий.

Ключевые слова: биопленка, бактерии, чувствительность, антибактериальные препараты.

L.L. Sedaya, O.S. Voronkova, E.A. Sirokvasha, T.N. Shevcheno, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarin av., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine,
e-mail: voronkova_olga@inbox.ru

INFLUENCE OF ANTISEPTIC AND DESINFECTIVE PREPARATES ON FILMFORMING BACTERIA

Summary

Aim. Study the efficacy of action of non-specific antibacterial agents on biofilm, formed by bacteria, isolated from the surface facilities, waste materials and the skin. **Methods.** Bacteria for research were isolated from the surfaces of stuff rooms, used instruments and also from the skin of 11 volunteers-patients hands. The ability to biofilmformation of isolated strains and their resistance to different antibacterial preparates under incubation with antiseptics and disinfectants were studied on plastic plates. **Results.** 179 strains were isolated and identified as: *Bacillus spp.* – 53.6%, *S. epidermidis* – 17.3%, *S. aureus* – 3.4%, *E. coli* – 12.3%, *Acinetobacter spp.* – 8.4%, *Klebsiella spp.*, *P. aeruginosa* and *Pseudomonas spp.* – 1.1%, *Enterobacteriaceae* – 3,4%. 62% of isolates were received from the surfaces of stuffrooms, 12.3% – from the skin, 25.7% – from used instruments. It was shown, that 93.5% of *S. epidermidis* strains can form biofilm, that was one of the highest range between studied strains. After incubation of 72 h. biofilms of these strains with different antibacterial preparates for more than 60% of cultures shown absence of growth, for another – number of cells, that grew from homogenates, were no high as 10^3 CFU/ml. Maximal effect on inhibition of film growth was shown under use of disinfectant desactive-chlor. Under using of antiseptic



chlorhexidin in concentration 5% sensitive to them in film were 84.6% of the strains.

Conclusion. *Under using of antibacterial preparates against 72 h. bacterial biofilm survivance of cells after 2 h. incubation of films with studied preparates was not more than 40%, that indicated on possibility of effective use of studied non-specific antibacterial agents against the spread of filmforming strains.*

Key words: biofilm, bacteria, sensitivity, antibacterial preparates.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Афиногенова Г.Е.* Чашечный метод оценки эффективности дезинфектантов и антисептиков: методическое пособие. – СПб; 2000. – 98 с.
2. *Галынкин В.А., Заикина Н.А., Потехина Т.С.* Дезинфекция и антисептика в промышленности и медицине. – СПб, 2004. – 96 с.
3. *Горбунов В.А., Гудкова Е.И.* Микробиологические основы противомикробных мероприятий: учеб.-метод. пособие. – Минск: БГМУ, 2006. – 38 с.
4. *Державний реєстр дезінфекційних засобів (07.03.2014 р.).* Режим доступу: <http://www.dsesu.gov.ua/ua/normativna-pravova-baza/bazi-ta-reestri/reiestr-dezinfektsiinykh-zasobiv/item/539-derzhavnyi-reiestr-dezinfektsiinykh-zasobiv-2014-rik/539-derzhavnyi-reiestr-dezinfektsiinykh-zasobiv-2014-rik>.
5. *Заславская Н.В., Артеменко Н.К., Чижевская М.М., Тец В.В.* Особенности выживаемости бактерий в микробных сообществах // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – № 2. – С. 19–20.
6. *Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В.* Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 17–22.
7. *Морозова Н.С., Мариевский В.Ф.* Основы дезинфектологии. Дезинфекция и стерилизация. – К.: «Ателье «Полиграфический комплекс», 2009. – 144 с.
8. *Мясникова А.В., Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Нагорнов Ю.С.* Морфологический состав биопленки биотопа влагалища при воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта женщин // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – № 4. – С. 21–24.
9. *Определитель бактерий Берджи:* Пер. с англ. / Под ред. Хоулта Дж., Криля Н., Синта П. и др. в 2-х тт. – М: Мир, 1997. – Т. 1 – 430 с.; Т. 2 – 368 с.
10. *Тец В.В., Заславская Н.В.* Эффективность действия антибиотиков на бактерии в биопленках // ЖМЭИ. – 2005. – № 5. – 24–26 с.
11. *Чеботарь И.В., Гурьев Е.Л.* Лабораторная диагностика клинически значимых биоплёночных процессов // Вопр. диагностики в педиатрии. – 2012. – № 4. – С. 15–20.
12. *Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 1318–1322.
13. *Donlan R.M., Costerton J.W.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 167–193.



14. *Gotz F.* Staphylococcus and biofilms // *Mol. Microb.* – 2002. – Vol. 43 (6). – P. 1367–1378.

15. *Hall S.L., Costerton J.W., Stoodley P.* Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // *Nat. Rev. Microb.* – 2004. – Vol. 2. – № 2. – P. 95–108.

16. *Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O.* Antibiotic resistance of bacterial biofilms // *Int. J. of Antimic. Agents.* – 2010. – Vol. 35 (4). – P. 322–332.

17. *Lewis K.* Riddle of Biofilm Resistance // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – № 4. – P. 999–1007.

18. *Olson M.E., Ceri H., Morck D.W., Buret A.G., Read R.R.* Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility of antibiotics // *Can. J. Vet. Res.* – 2002. – Vol. 66 (2). – P. 86–92.

Стаття надійшла до редакції 11.02.2015 р.



УДК 612.398:577.121.3

Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»
2а, вул. Осиповського, 04123, Київ-123, Україна, тел.: +38 (044) 434 45 77,
e-mail: Shulga5@i.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМУ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* ІМВ В-7446 ТА ОПТИМІЗАЦІЯ БІОСИНТЕЗУ ТРЕОНІНУ

Мета. Ідентифікація та оптимізація процесу біосинтезу мутантного штаму-продуцента треоніну *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446. **Методи.** Штам *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 досліджували за допомогою стандартних мікробіологічних та біохімічних методів. Фрагмент геномної ДНК виділяли з агарозного гелю за допомогою набору «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» згідно з інструкцією фірми-виробника та сиквенували. Порівняльний аналіз здійснено методом оцінки статистичної значимості вирівнювань нуклеотидних послідовностей з використанням програми ClustalW. Філогенетична дендрограма створена з використанням методів поєднання найближчих сусідів та максимальної подібності. **Результати.** Досліджено вплив різних технологічних параметрів культивування на синтез треоніну мутантним штамом *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 та його стабільність. Оптимізацію синтезу було досягнуто за рахунок внесення ростових факторів у середовище культивування. Побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків досліджуваних штамів та споріднених з ними штамів бревібактерій із бази даних «GenBank». **Висновки.** Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК з послідовностями, включеними до бази даних GenBank, показав, що вихідний та мутантний штами мають належати до роду *Corynebacterium*. Мутантний штам мав найвищий відсоток подібності (98%) з видом *C. glutamicum*. Проведено оптимізацію середовища для культивування продуцента та визначено оптимальні параметри культивування (температура, рН, кількість розчиненого кисню, кількість внесеного інокуляту, ростових факторів, різні джерела вуглецю). В оптимізованих умовах культивування штам продукував треонін у кількості 11,9 г/дм³.

Key words: *Brevibacterium flavum*, треонін, 16S рРНК, мутантний штам, оптимізація біосинтезу.

L-треонін (α -аміно- β -гідроксимаєляна кислота), в основному, отримують мікробіологічним способом, тому інтенсифікація процесу біосинтезу може здійснюватися за рахунок підвищення продуктивності штамів-продуцентів або оптимізації процесу біосинтезу [3, 4, 10].

Інтенсифікацію біосинтезу можна досягнути як за рахунок безпосереднього впливу на штами-продуценти, для створення штамів з підвищеною продуктивністю, так і шляхом розширення спектру використання субстратів,

© Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга, 2015



оптимізацією умов культивування, вдосконаленням масообмінних процесів та технологічного обладнання [3,13].

Одним із методів одержання високопродуктивних штамів мікроорганізмів є селекція клонів при дії різних мутагенів [1, 15]. Спонтанні мутанти зазвичай виявляють з частотою 10^{-6} – 10^{-8} , яку можна суттєво підвищити, обробивши клітини мутагенами.

Для одержання продуцентів треоніну із родини корінебактерій використовують селекцію регуляторних мутантів, у яких гомосериндегідрогеназа не чутлива до треоніну. Як селективний агент використовують аналог треоніну β -оксинорвалін (2-аміно-3-оксивалеріанова кислота). Мутанти *Brevibacterium flavum*, стійкі до β -оксинорваліну, мають дві регуляторні мутації, які порушують ретроінгібування як гомосериндегідрогенази, так і аспартаткінази. У таких штамів одночасно виділялися у середовище і треонін, і лізин. Дуже рідко вдається виділити мутанти, у яких десенсибілізована тільки гомосериндегідрогеназа і які накопичують у середовищі 10–12 г/дм³ треоніну без домішок лізину [3].

Метою дослідження була ідентифікація мутантного штаму-продуцента треоніну та визначення оптимальних параметрів культивування. Завдання: провести аналіз нуклеотидних послідовностей за геном 16S рРНК та філогенетичний аналіз мутантного штаму з використанням методів поєднання найближчих сусідів та максимальної подібності; дослідити вплив різних технологічних параметрів культивування (температури, рН, кількості розчиненого кисню, кількості внесеного інокуляту, ростових факторів, різних джерел вуглецю) на синтез треоніну мутантним штамом та його стабільність.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були вихідний штам *Brevibacterium flavum* ТН7, з якого отримано мутантний штам *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 [1] з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України (далі Колекція).

Для вирощування вихідного та отриманого штамів-продуцентів використовували повноцінні поживні середовища м'ясо-пептонний агар (МПА) та м'ясо-пептонний агар збагачений (МПА зб.) [1]. Ідентифікацію проводили за результатами культурально-морфологічного та фізіолого-біохімічного аналізу згідно [2].

Для визначення накопичення треоніну культивування проводили на м'ясному середовищі: (г/дм³): м'яса – 160,0, кукурудзяний екстракт – 40,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 15,0; KH_2PO_4 – 0,5; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; біотин – $3,0 \times 10^{-4}$; лейцин – $2,0 \times 10^{-4}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,001; CuSO_4 – 0,2; NiCl_2 – 0,02.

Після стерилізації вносили стерильну крейду в кількості 10 г/дм³ для створення буферності середовища в процесі метаболізму бактерій. Глибинне культивування здійснювали в колбах Ерленмейера об'ємом 0,25 дм³ з поживним середовищем об'ємом 0,03 дм³ за температури $31 \pm 1^\circ\text{C}$ при 240 хв⁻¹



в шейкері-інкубаторі “BIOSAN” ES-20 протягом трьох-чотирьох діб. Процес культивування контролювали безпосередньо за допомогою мікроскопії живих препаратів та біохімічних аналізів культуральної рідини (КР) та оцінювали на рідких поживних середовищах вимірюванням концентрації клітин в культуральній рідині за оптичною густиною (ОГ); за зміною рН середовища, за використанням цукрів – резорциновим методом [12]. Кількість синтезованих цільових амінокислот визначали за допомогою амінокислотного аналізатору «AAA-400» (Ingos, Чехія).

Вміст різних компонентів середовища змінювали в залежності від поставленого завдання. Джерела вуглецю – глюкозу, фруктозу, сахарозу вносили в середовище із розрахунку 40 г/дм³. Концентрація Na₂CO₃ варіювала від 0,1 до 0,5 г/дм³; проліну від 0,4 до 2,0 мг/дм³; тіаміну HCl 1–5×10⁻³ г/дм³; біотину 1–5×10⁻⁴ г/дм³; дріжджового екстракту 0,5–2,5 г/дм³; ізолейцину та метіоніну від 0,1 до 0,5 мкг/дм³. Розчини амінокислот (наважка амінокислоти масою 0,19 г в 0,025 дм³ дистильованої води) стерилізували протягом 15 хв за тиску 0,5 атм.

Для визначення ефективності альтернативних джерел вуглецю використовували бурякову мелясу, молочну сироватку і синтетичне середовище. Бактерії вирощували на поживному м'ясному середовищі (% на 0,1 дм³ водопровідної води): м'яса – 16,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,5; KH₂PO₄ – 0,05; K₂HPO₄ – 0,05; дріжджовий екстракт (ДЕ) – 0,25; а також сироватковому середовищі (% на 100 мл молочної сироватки): глюкоза – 8,0; (NH₄)₂SO₄ – 1,5; пептон – 0,1; ДЕ – 0,25.

В середовища додатково вносили амінокислоти у кількості 2,5 мкг/0,1 дм³: метіонін, лізин, ізолейцин, або біотин в кількості 200 мкг на 0,1 дм³.

У роботі використано набір незамінних амінокислот (Shanghai Seebio Biotech. Inc., КНР). Приготування реагентів для біохімічних та електрофоретичних досліджень здійснювали на основі очищеної деіонізованої води «DIRECT Q3», Millipore, США. Виділення ДНК проводили відповідним набором реагентів GeneJET Genomic DNA Purification Kit (cat.No 0721) «Fermentas», Литва-США. Для електрофорезу використовували агарозу, бромід етидію (базовий розчин у концентрації 10 г/дм³) та бромфеноловий синій (всі реактиви виробництва «Sigma», США).

Для виділення ДНК клітини бактерій брали з однодобової культури, отриманої на МПБ зб. за температури 31±1 °С в умовах аерації за 220 хв⁻¹. ДНК виділяли за стандартною процедурою для грампозитивних бактерій [14]. Для ефективнішого лізису клітин додавали 1% лізоциму (10 мг/мл). Виділену ДНК досліджували за допомогою горизонтального електрофорезу та ПЛР [6]. Електрофоретичне розділення виділеної ДНК проводили в 1%-му агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі. Молекулярну масу фрагментів ДНК визначали за їх електрофоретичною рухливістю, використовуючи як маркери 1kb – ДНК маркер (1kb Fermentas SM1163).

Ампліфікацію гену 16S рРНК здійснювали за допомогою універсальних бактеріальних праймерів 27f та 1492r (27F 5'-AGA GTT TGA TGG CTC AG-3'; 1492r 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'). ПЛР проводили на ампліфікаторі «Mastercycler personal 5332» (Eppendorf, Велика Британія). Реакційна



суміш складалася з однократного ПЛР-буфера з сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 од. Таq-полімерази (Fermentas, Литва-США), 2,0 мМ хлориду магнію, 10–50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші дорівнював 200 мкл.

Умови ампліфікації: початкова денатурація за $T=95^{\circ}\text{C}$ – 3 хв; 32 цикли ампліфікації ($T=94^{\circ}\text{C}$ – 30 с, $T=57^{\circ}\text{C}$ – 45 с, $T=72^{\circ}\text{C}$ – 30 с); кінцева елонгація відбувалася за $T=72^{\circ}\text{C}$ протягом 5 хв [7]. Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ампліфікації проводили в тріс-ацетатному буфері. Отриманий фрагмент виділяли з агарозного гелю за допомогою набору «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» згідно з інструкцією фірми-виробника та сиквенували послідовності на автоматичному сиквенаторі «ABI PRISM 310 Genetic Analyser» (Applied Biosystems, США). Результуючий контиг сиквенування отримували шляхом порівняння прямої та зворотньокомплементарної послідовностей з використанням програми CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологічні послідовності відбирали з бази даних «GenBank» [5].

Порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей. Філогенетичний аналіз. З бази даних «GenBank» було відібрано послідовності гена 16S рРНК різних представників родини бревібактерій, що мають найбільший рівень нуклеотидної подібності до сиквенованих фрагментів гена 16S рРНК досліджуваних штамів-продуцентів лізину. Для з'ясування систематичного положення досліджуваних штамів зі спорідненими було проведено вирівнювання відповідних нуклеотидних послідовностей в програмі ClustalW [11] та побудовано дендрограму філогенетичних зв'язків. Філогенетичний аналіз був проведений в програмі MEGA6 [9].

Статистичне опрацювання даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 3 повтореннях. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною при $p<0,05$.

Результати та обговорення

Штам-продуцент треоніну *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446, який здатний накопичувати треонін в 4 рази більше ніж вихідний штам *Brevibacterium flavum* ТН7, був отриманий за допомогою УФ опромінення [1]. Для підтвердження таксономічного положення отриманого мутантного штаму проведено аналіз його культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних особливостей.

Отриманий мутантний штам (після 24 годин росту на МПА) виявився аеробом, грампозитивним мікроорганізмом і мав вигляд аспорогенних, часто розташованих під кутом паличок розміром (0,7–1,0 x 2,0–4,0) мкм. Клітини з часом вкорочувались до коковидних. При рості на МПА колонії були круглі, блискучі, непрозорі, жовтого кольору.

Штам засвоював азот у вигляді солей амонію. Утворював кислоту в середовищі з глюкозою, арабінозою і манітом. На середовищі різного складу, де джерелом вуглецю була глюкоза або сахароза клітини, штам синтезував треонін. Ріст клітин відбувався за температури від 20 до 40 °C ($T^{\circ}_{\text{опт.}} 31\pm 1^{\circ}\text{C}$), при рН від 4 до 9 ($\text{pH}_{\text{опт.}} 7,0$).



Для підтвердження таксономічного положення отриманого мутантного штаму визначили послідовності гену 16S рРНК штамів-продуцентів треоніну з Колекції та встановили їх філогенетичне положення в межах найбільш споріднених штамів роду *Brevibacterium* з бази даних «GenBank» [5].

Ампліфікацію гену 16S рРНК здійснювали з використанням універсальних бактеріальних праймерів 27f та 1492r з подальшим сиквенуванням.

Для визначення родинних зв'язків був проведений філогенетичний аналіз і побудовано філогенетичне дерево. Мірою відповідності набору вирівняних послідовностей даної топології вважається міра (критерій), заснована на принципі найбільшої правдоподібності. Була досліджена дендрограма філогенетичних зв'язків штамів *B. flavum* TH7 (вихідний штам), *B. flavum* IMV B-7446 з Колекції та філогенетично близьких представників родів *Brevibacterium* і *Corynebacterium*.

Нижче наведено філогенетичне дерево з найвищим значенням логарифму подібності (log-likelihood value) – 2171,38, побудоване за допомогою методу максимальної правдоподібності (maximum likelihood) з використанням моделі Tamura-Nei для оцінки еволюційної відстані. Кількість повторів (bootstrap) – 1000 (рис. 1). Філогенетичне дерево, побудоване іншим статистичним методом – приєднання сусідів (Neighbor-joining), мало таку саму топологію.

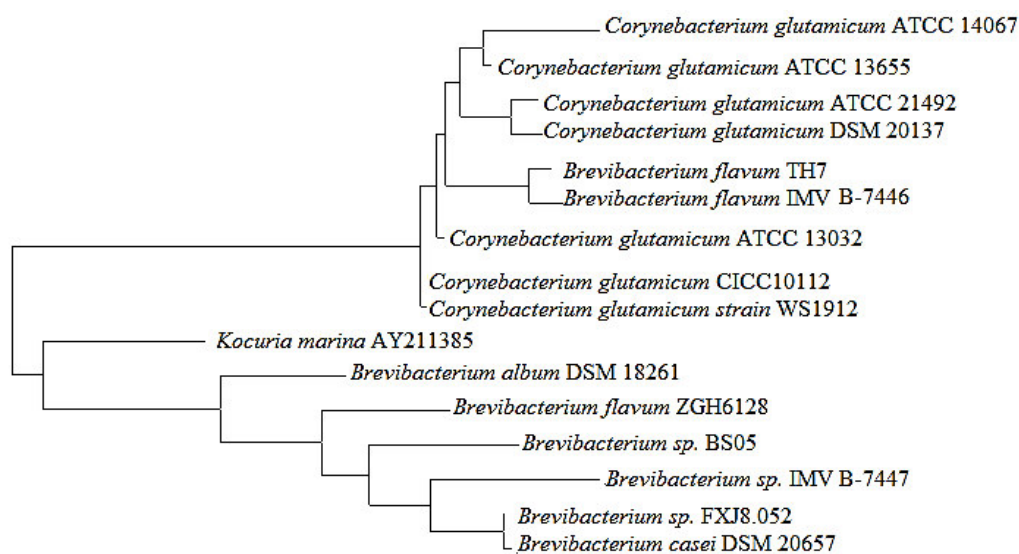


Рис. 1. Філогенетичне положення штамів *Brevibacterium flavum* TH7 та *Brevibacterium flavum* IMV B-7446 серед представників родів *Brevibacterium*, *Kocuria* та *Corynebacterium* на основі послідовності гену 16S рРНК

Fig. 1. Phylogenetic position of *Brevibacterium flavum* TH7 and *Brevibacterium flavum* IMV B-7446 strains among representatives of *Brevibacterium*, *Kocuria* and *Corynebacterium* genera on the basis of 16S rRNA gene nucleotide sequences

Досліджувані штами знаходяться на дендрограмі в одній групі з типовими штамами виду *Corynebacterium glutamicum*. Ця група виділена з 100% вірогідністю (Bootstrap аналізу) від іншої групи, утвореної представниками родів *Brevibacterium* і *Kocuria*. Таким чином, проведений аналіз показав, що штами *Brevibacterium flavum* TH7 та *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 мають бути віднесені до виду *Corynebacterium glutamicum*.

Необхідно звернути увагу, що штами, які відносилися до родів *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* або *Artrobacter*, та ін., *Brevibacterium chang-fua*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium glutamigenes*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium seonmiso*, *Brevibacterium sp.*, *Brevibacterium taipei*, *Brevibacterium thiogenitalis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium herculis*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Microbacterium sp.*, *Micrococcus maripunicenus*, *Artrobacter sp.*, після чисельних таксономічних досліджень виявилися в кластері *Corynebacterium glutamicum* [13].

Важливо відзначити, що жоден з продуцентів амінокислот, виду *Brevibacterium*, не є справжнім членом роду *Brevibacterium* [8]. Отже, численні штами були перекласифіковані як *C. glutamicum*. Вміст нуклеотидів (G + C) для штамів *C. glutamicum* знаходиться в інтервалі від 53 до 58% mol. Вміст нуклеотидів (G + C) штаму *C. glutamicum* ATCC 13032 склав 53,8% mol., вміст (G + C) для мутантного штаму *B. flavum* IMB B-7446 склав 55,4% mol.

Невідповідність, виявлену в ідентифікації на основі комплексу культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних особливостей та аналізування сиквенування гену 16S рРНК можна пояснити здійсненою нещодавно рекласифікації деяких видів *Brevibacterium* як *Corynebacterium* [8]. Таким чином, в подальшому має бути проведений більш детальний аналіз (повний сиквенс) для точної ідентифікації отриманого штаму.

Оптимізація умов культивування мутантного штаму

Для забезпечення підвищення накопичення амінокислот в процесі синтезу необхідно змінити систему регуляції обміну. Для цього потрібно або стимулювати споживання субстрату в деяких шляхах біосинтезу і виділення амінокислот в середовище або пригнічувати побічні реакції і процеси деградації амінокислот [3].

При оптимальних умовах культивування швидкість накопичення біомаси та швидкість утворення продуктів життєдіяльності залежать від кількості інокуляту. Тому було вивчено вплив концентрації посівного матеріалу на приріст бактеріальної популяції та на синтез треоніну (рис. 2). Встановлено, що найвищі показники відносної швидкості синтезу біомаси та треоніну спостерігалися при внесенні у середовище 20% інокуляту.



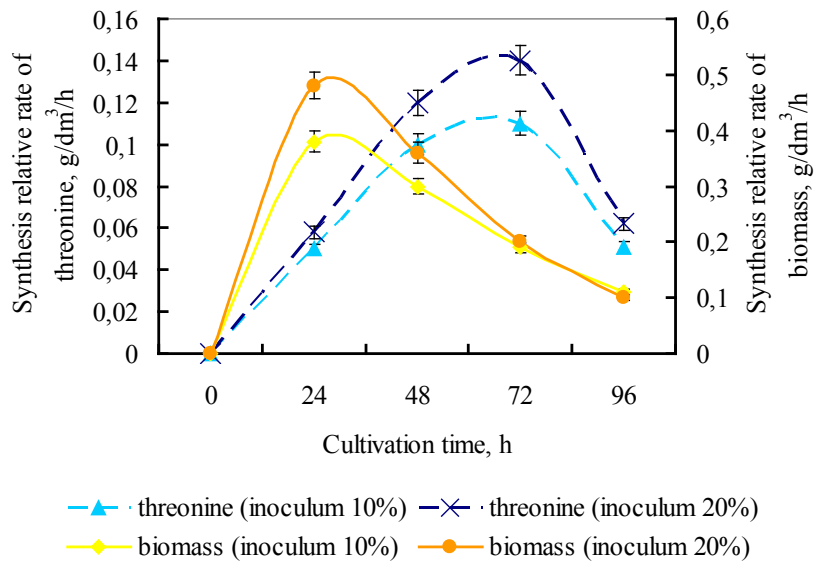


Рис. 2. Відносна швидкість синтезу біомаси та треоніну

Fig. 2. Synthesis rate of biomass and threonine

Одним із факторів, що впливає на ріст мікроорганізмів та їх фізіологічну активність, є температура культивування мікроорганізмів. Накопичення біомаси та синтез треоніну штамом *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) в залежності від температури культивування показано на рис. 3.

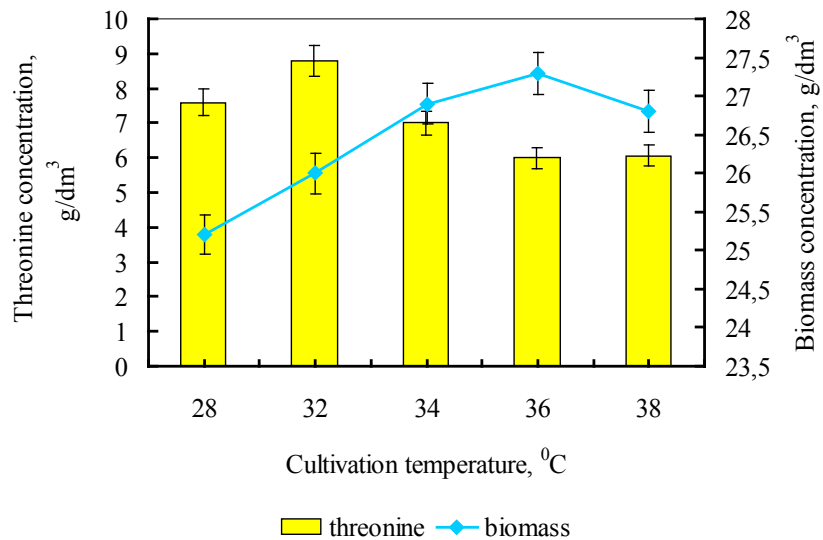


Рис. 3. Вплив температури культивування на синтез біомаси та треоніну

Fig. 3. Temperature cultivation effect on the synthesis of biomass and threonine



Підвищення температури з 28 до 36 °С збільшувало накопичення біомаси. Подальше підвищення температури до 38 °С зменшувало накопичення біомаси. Синтез треоніну при зміні температури з 28 до 32 °С зростав до 8,8 г/дм³, з подальшим зростанням температури синтез знижувався до 6,0 г/дм³. Подальші дослідження проводили за температури 32 °С.

Суттєвий вплив на накопичення біомаси та синтез треоніну має рН середовища [3]. Для стабілізації рН при синтезі треоніну використовували буферний агент Na₂CO₃. Культивування продуценту треоніну проводили при рН 7.

Динаміка утворення біомаси та треоніну бактеріями *B. flavum* ІМВ В-7446 (*C. glutamicum*) залежно від зміни швидкості розчинення кисню представлена на рис. 4. Максимальне накопичення біомаси відбувалося при швидкості розчинення кисню 10 г_{O₂}/дм³/год, а максимальна кількість накопичення треоніну при 11 г_{O₂}/дм³/год. Збільшення швидкості розчинення кисню пригнічувало ріст біомаси та треоніну. В подальших дослідженнях використовували швидкість розчинення кисню 11 г_{O₂}/дм³/год.

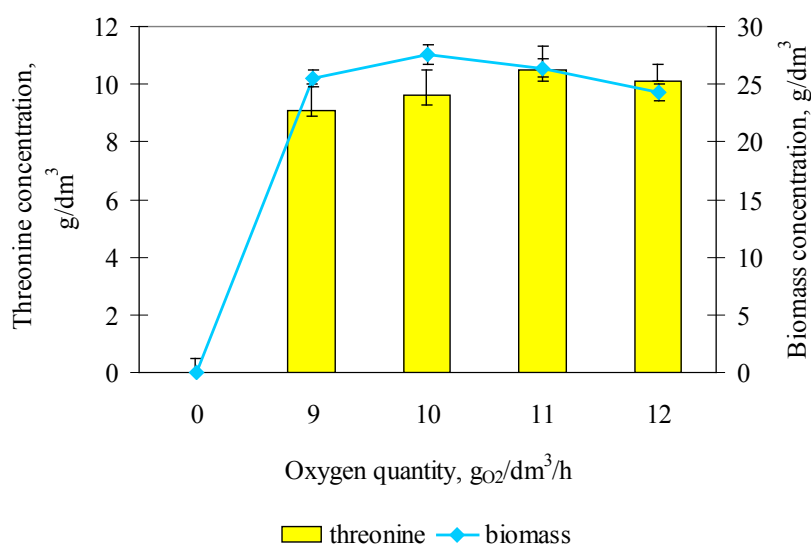


Рис. 4. Вплив швидкості розчинення кисню на синтез біомаси та треоніну

Fig. 4. Influence of oxygen on the dissolution rate of biomass accumulation and threonine synthesis

Для оптимізації умов культивування досліджували залежність концентрації треоніну від внесених у середовище різних ростових факторів. Було знайдено їх оптимальні концентрації (г/дм³): проліну – 0,8; тіаміну – 0,002; біотину – 2,0·10⁻⁴; дріжджового екстракту – 1,0; суміші ізолейцину та метіоніну (0,4 г/дм³ кожної амінокислоти).

Досліджено вплив альтернативних джерел вуглецю (бурякова меляса, молочна сироватка, синтетичне середовище) на синтез треоніну. Кращі по-

казники синтезу були на комплексному мелясовому середовищі порівняно з синтетичним та сироватковим. Процес культивування отриманого мутантного штаму за умов визначених оптимальних параметрів проводили на мелясовому середовищі з додаванням макроелементів (табл. 1).

Таблиця 1

Синтез цільової амінокислоти

Table 1

The synthesis of target amino acid

Продуценти	Показники культуральної рідини				
	pH	ОГ (1:10), λ_{440}	Концентрація сахарози, %	Концентрація треоніну, г/дм ³	Конверсія цукру в цільову амінокислоту, %
Вихідне середовище (без продуценту)	7,0±0,1	0,2±0,1	8,2±0,5	0,9±0,1	-
<i>B. flavum</i> TH 7 (<i>C. glutamicum</i>)	6,6±0,1	1,1±0,1	5,4±0,2	2,0±0,2	3,92±0,1
<i>B. flavum</i> IMB B-7446 (<i>C. glutamicum</i>)	6,7±0,1	1,4±0,1	1,4±0,3	11,9±0,3	16,2±0,2

Вихідний штам мав низький рівень синтезу треоніну на мелясовому середовищі і в незначній кількості споживав цукор (конверсія – 3,92%) (табл. 1). Мутантний штам при культивуванні продукував у 6 разів більше треоніну на мелясових середовищах ніж вихідний та інтенсивно споживав цукор (конверсія – 16,2%).

Таким чином, порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК з послідовностями, включеними до бази даних GenBank, показав, що вихідний та мутантний штами мають належати до роду *Corynebacterium*. Мутантний штам мав найвищий відсоток подібності (98%) з видом *C. glutamicum*, хоча надалі необхідно провести додатковий аналіз (повний сиквенс) для визначення точної видової приналежності. Проведено оптимізацію середовища для культивування продуцента та визначено оптимальні параметри культивування (температура 32 °С, pH 7,0, кількість розчиненого кисню – 11 Г_{О₂}/дм³/год, кількість внесеного інокуляту 20%), ростові фактори, джерело вуглецю. В оптимізованих умовах культивування мутантний штам продукував треонін у кількості 11,9 г/дм³.



УДК 612.398:577.121.3

А.С. Андрияш, Г.М. Заболотная, А.Ф. Ткаченко, С.М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,
ул. Осиповского, 2а, Киев-123, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА *BREVIBACTERIUM FLAVUM* IMB B-7446 И ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА ТРЕОНИНА

Реферат

Цель. Идентификация и оптимизация процесса биосинтеза мутантного штамма-продуцента треонина *Brevibacterium flavum* IMB B-7446. **Методы.** Штамм *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 исследовали с помощью стандартных микробиологических и биохимических методов. Фрагмент геномной ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» согласно инструкции фирмы-производителя и секвенировали. Сравнительный анализ осуществляли методом оценки статистической значимости выравненных нуклеотидных последовательностей с использованием программы ClustalW. Филогенетическая дендрограмма создана с использованием методов сочетания ближайших соседей и максимального сходства. **Результаты.** Исследовано влияние различных технологических параметров культивирования на синтез треонина мутантным штаммом. Интенсификацию синтеза достигнуто за счет внесения ростовых факторов в среду культивирования. Построена дендрограмма филогенетических связей исследуемых штаммов и родственных им штаммов бревибактерий из баз данных «GenBank». **Выводы.** Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рДНК с последовательностями, включенными в базу данных GenBank, показал, что исходный и мутантный штаммы могут принадлежать к роду *Corynebacterium*. Мутантный штамм имел высокий процент сходства (98%) с видом *C. glutamicum*. Проведена оптимизация среды для культивирования продуцента и определены оптимальные параметры культивирования (температура, pH, количество растворенного кислорода, количество внесенного инокулята, ростовых факторов, различные источники углерода). В оптимизированных условиях культивирования штамм производил треонин в количестве 11,9 г/дм³.

Ключевые слова: треонин, 16S рРНК, мутантный штамм, оптимизация.

УДК 612.398:577.121.3

G.S. Andriiash, G.M. Zabolotna, A.F. Tkachenko, S.M. Shulga

State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics»
of National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osypovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine,
tel.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

THREONINE MUTANT STRAIN-PRODUCER *BREVIBACTERIUM FLAVUM* IMB B-7446 CHARACTERISTICS AND OPTIMIZATION PROCESS OF ITS BIOSYNTHESIS

Summary

Aim. Identification and optimization process of biosynthesis threonine of mutant strain-producer *Brevibacterium flavum* IMB B-7446. **Methods.** The strain



Brevibacterium flavum IMB B-7446 was studied using standard microbiological and biochemical methods. A fragment of genomic DNA isolated from agarose gel using a set of «Macherey-Nagel NucleoSpin Extract» according to the instructions of the manufacturer and sequenced. A comparative analysis was done by evaluation of statistical significance adjustment nucleotide sequences using the program ClustalW. Phylogenetic dendrogramm was created using a combination of techniques nearest neighbors and maximum likelihood. **Results.** The influence of different process parameters on the synthesis of cultivation threonine mutant strain and stability. Intensification synthesis was achieved by introducing growth factors in the culture medium. Powered dendrogramm of phylogenetic relationships investigated the strains and related the strains of *Brevibacterium* databases «GenBank». **Conclusions.** Comparative analysis of nucleotide sequences of gene 16S rRNA sequences included in the database GenBank, showed that the mutant and parent strains may belong to the genus *Corynebacterium*. Mutant strain had a high percentage of similarity (98%) with a species *C. glutamicum*. Optimization of the medium for culturing and producing the optimal cultivation parameters (temperature, pH, dissolved oxygen, the amount of inoculation, growth factors, various carbon sources) was established. Threonine strain was produced 11,9 g/dm³ by optimized cultivation conditions.

Key words: threonine, 16S rRNA, mutant strain, optimization.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрияш Г.С., Заболотна Г.М., Шульга С.М. Мутантні штами-мікроорганізми – продуценти лізину та треоніну // *Biotechnology Acta.* – 2014. – Т. 7, № 3. – С. 95–101.
2. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.
3. Debabov V.G. The threonine story // *Biochem. Engineer. Biotechnol.* – 2003. – V. 79. – P. 113–136.
4. Dong X., Quinn P.J., Wang X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of L-threonine // *Biotechnol. Adv.* – 2010. – P. 1–13.
5. GenBank (Base sequences of DNA) URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
6. Griffith A.J.F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C., Gelbart W.M. An introduction to genetic analysis. – N.Y., W.H. Freeman. – 2000. – 306 p.
7. Guttel R., Larsen N., Woese C. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective // *Microbiol. Review.* – 1994. – 8 (1). – P. 10–24.
8. Liebl W. *Corynebacterium* taxonomy. In: Eggeling E., Bott M. *Handbook of Corynebacterium glutamicum: Chapter 2. Corynebacterium taxonomy.* US, Boca Raton, Florida: CRC Press. – 2005. – P. 9–37.
9. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // *Mol. Biol. Evol.* – 2013. – 30. – P. 2725–2729.



10. Tessaeraud S., Everaert N., Boussaid-Om Ezzine S., Collin A., Metayer-Coustard S. and Berri C. Manipulating tissue metabolism by amino acids // *World's Poultry Sci. J.* – 2011. – Vol. 67. – P. 382–385.

11. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* – 1994. – 22(22). – P. 4673–4680.

12. Vagner de Alencar Arnaut de Toledo, Maria Claudia Colla Ruvolo-Takasukuki, Arildo José Braz de Oliveira, Emerson Dechechi Chambó and Sheila Mara Sanches Lopes. Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees: Reducing sugar determination. In: Dr. Jamal Uddin (Ed.), *Macro to Nano Spectroscopy: Spectrophotometry as a Tool for Dosage Sugars in Nectar of Crops Pollinated by Honeybees*. InTech. – 2012. – P. 269–290.

13. Vertes A., Inui M., Yukawa H. The biotechnological potential of *Corynebacterium glutamicum*, from Umami to Chemurgy. In: Yukawa H, Inui M.. *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology: The biotechnological potential of Corynebacterium glutamicum, from Umami to Chemurgy*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. – 2013. – P. 1–51.

14. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // *Current protocol in Mol. Biol.* – 2001. – 2.4.1–2.4.5.

15. Yetti M.I., Pudjiraharti S. Strain improvement of *Brevibacterium sp* ATCC 21866 for L-lysine production using ultra violet irradiation // *Technology Indonesia*. – 2004. – № 27. – P. 9–16.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2015 р.



Є.П. Копилов, Г.В. Цехмістер

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97, Чернігів, 14027, Україна

ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНІСТЬ ГРИБА *ACREMONIUM* SP. 502, ВИДІЛЕНОГО З УРАЖЕНИХ РОСЛИН ОГІРКІВ

Метою роботи було дослідження целюлазної активності штаму гриба *Acremonium* sp. 502 в залежності від рН середовища, як одного із визначальних факторів проникнення його в рослини. **Методи.** Штам гриба *Acremonium* sp. 502, виділений з хворих рослин огірків, культивували на середовищі суцільний агар. Швидкість росту визначали за розміром діаметру колонії. Для визначення целюлазної, екзоглюканазної, ендоглюканазної та глюкозидазної активності використовували фільтрувальний папір, мікрокристалічну целюлозу, карбоксиметил-целюлозу, целобіозу відповідно. Кількість редуруючих цукрів визначали методом Шомоді-Нельсона. **Результати.** Досліджено динаміку целюлазної активності гриба *Acremonium* sp. 502, виділеного з уражених рослин огірків, за різних значень рН поживного середовища. Максимальні значення ферментативної активності були зафіксовані через 6 тижнів культивування гриба за рН середовища 8,5. При цьому загальна целюлазна активність складала 1,95 од/мл, екзоглюканазна – 3,23, ендоглюканазна – 2,85 і β -глюкозидазна – 2,39 од/мл. **Висновки.** Встановлено, що *Acremonium* sp. 502 здатний до синтезу ендо-, екзоглюканази та β -глюкозидази. Найвищу целюлозолітичну активність гриб виявляв через 6 тижнів культивування з показником рН середовища – 8,5. Можна припустити, що утворення целюлазних ферментів грибом *Acremonium* sp. 502 необхідно для його проникнення в рослину з подальшим розвитком захворювання.

Ключові слова: загальна целюлазна, екзоглюканазна, ендоглюканазна і β -глюкозидазна активності, *Acremonium* sp.

Мікроорганізми-продуценти целюлазних ферментних комплексів відіграють важливу роль в біодеструкції рослинних решток. Не менш важливою є роль целюлаз в патогенезі рослин. Відомо, що деякі бактерії та гриби, виділені з уражених рослин реалізують свою целюлазну активність на перших етапах інфікування рослин шляхом гідролізу клітинної стінки [10]. Для розщеплення кристалічної целюлози вони продукують низку целюлозолітичних ферментів (ендо-, екзоглюканази та β -глюкозидази). З фітопатогенних грибів ізольовані целюлазні ферменти які сприяють проникненню в тканини рослини-хазяїна і дозволяють грибам використовувати тканини рослин як джерело вуглецю [12]. Існує думка, що утворення целюлазних ферментів у *Fusarium oxysporum* Schltdl. відіграє певну роль в патогенезі захворювання [13].



Для кожного мікроорганізму наявні оптимальні межі рН, які визначають ступінь активності ферменту. Так, у збудника захворювання квасолі *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) deBary оптимум рН целюлазної активності становить 3,0 [15], а очищений препарат целюлази *F. oxysporum* Schltdl., який викликає в'янення томатів, характеризувався високим ступенем активності і вже через 20 годин викликав майже необоротне в'янення, при цьому целюлази гриба проявляють активність за рН від 2,0 до 9,0 з оптимумом 6,0 [14].

Представники роду *Acremonium* є сапротрофами, але за певних умов можуть змінювати тип живлення на біотрофний. Відомо, що *Acremoniums clerotigenum* Gams при підвищеному вмісті солей у ґрунті може рости в судинах рослин огірків. Гриби роду *Acremonium* були виділені з хворих рослин динь та кавунів в Іспанії [11], Італії [9] та США [7, 8]. Літературні дані щодо виділення представників роду *Acremonium* з хворих рослин на території України відсутні.

Зважаючи на вищезазначене, метою нашої роботи було дослідження целюлазної активності штама гриба *Acremonium* sp. 502 в залежності від рН середовища, як одного із визначальних факторів проникнення його в рослини.

Матеріали і методи

В роботі був використаний штамп гриба *Acremonium* sp. 502, виділений С.П. Надкерничним з хворих рослин огірків, які вирощувались в умовах закритого ґрунту. Опис культурально-морфологічних особливостей гриба наведено нами раніше [5]. Культуру гриба підтримували на сушловому агарі (4–5% сухих речовин).

Ріст гриба визначали за розміром колонії. [1, 6]. Гриб культивували на середовищі сушловий агар (4–5% сухих речовин) у діапазоні рН 3,5–12,0 за температури 26 ± 2 °С без світла, в чашках Петрі. Діаметр колонії визначали в трьох напрямках щодобово, протягом 10 діб. На основі отриманих даних визначали радіальну швидкість росту.

Для вивчення целюлазної активності *Acremonium* sp. 502 поверхнево культивували в пробірках з 5 мл синтетичного середовища Чапека (г/л: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2,5, K_2HPO_4 – 1,0, MgSO_4 – 0,5, KCl – 0,5, FeSO_4 – 0,01) зі значеннями рН – 5,5, 7,0 та 8,5, де єдиним джерелом карбону була смужка фільтрувального паперу (Фільтрак) масою 50 мг. Посівний матеріал *Acremonium* sp. 502 отримували шляхом змиву конідій і фрагментів гіфів гриба з середовища сушловий агар (4–5% сухих речовин). Для визначення титру приготовленої суспензії використовували камеру Горяєва і проводили висів на щільне поживне середовище сушловий агар (4–5% сухих речовин) за методом ґрунтових розведень Ваксмана. Висів проводили суспензією спор ($T = 1 \times 10^6$ КУО), в кількості 5% від об'єму поживного середовища. Термін культивування складав 56 діб за 26 ± 2 °С.

Целюлазну активність визначали згідно [1, 2] протягом 8 тижнів культивування (строк дослідження обумовлений появою симптомів захворювання на рослинах). Культуральну рідину отримували шляхом фільтрування міцелію гриба через скляний фільтр. Повторність дослідів триразова.



Для визначення загальної целюлазної активності до 50 мг фільтрувального паперу (Фільтрак) додавали один мл культуральної рідини, один мл 0,05 М натрій-цитратного буфера та інкубували протягом однієї години за 40 °С. За одиницю загальної целюлазної активності приймали таку кількість фермента, яка за 60 хв утворює один мг редукуючих цукрів [1, 2].

Екзоглюканазну активність визначали на мікрокристалічній целюлозі (Авіцел “Евалар”). Для цього до 50 мг мікрокристалічної целюлози додавали один мл культуральної рідини, один мл 0,05 М натрій-цитратного буфера та інкубували протягом однієї години за 40 °С. За одиницю екзоглюканазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 60 хв утворює один мг редукуючих цукрів [1, 2].

Ендоглюканазну активність визначали дією ферментів на карбоксиметилцелюлозу (КМЦ): один мл 0,5%-го розчину Na-КМЦ в 0,05 М натрій-цитратному буфері та один мл фільтрату культуральної рідини інкубували протягом 30 хв за 40 °С. За одиницю ендоглюканазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 30 хв дії утворює один мг редукуючих цукрів [1, 2].

Для визначення β-глюкозидазної (целобіазної) активності до одного мл 0,025%-го розчину целобіози (“Merck”) в 0,05 М натрій-цитратному буфері додавали 1 мл фільтрату культуральної рідини та інкубували протягом 30 хв за 40 °С. За одиницю β-глюкозидазної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 30 хв дії утворює один мг редукуючих цукрів [1].

Кількість редукуючих цукрів визначали методом Шомоді-Нельсона [1]. Для цього до 2 мл дослідного розчину додавали по 1 мл реактиву Шомоді та інкубували протягом 15 хв за 100 °С. Потім суміш швидко охолоджували на льодяній бані та додавали один мл реактиву Нельсона. Об’єм доводили дистильованою водою до 25 мл. Розчин ретельно перемішували. Контролем слугували зразки, де замість культуральної рідини додавали один мл поживного середовища.

Визначення редукуючих цукрів проводили на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 560 нм.

Розрахунки та статистичне опрацювання результатів проводили з використанням прикладних програм Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення

Культуру гриба зберігали в пробірках на середовищі сушений агар (4–5% сухих речовин) за температури 4–6 °С. Суттєвих змін морфолого-культуральних характеристик гриба при зберіганні не виявлено. При вивченні впливу рН середовища на ріст гриба було встановлено, що *Acremonium* sp. 502 на поживному середовищі сушений агар розвивається в діапазоні рН від 3,5 до 12,0, оптимальна реакція середовища для росту гриба – слабо лужна (рН 8,5). Діаметр колонії на 10-ту добу при цьому становив 24,75 мм. Швидкість лінійного росту варіювала від 0,05 при рН – 3,5 до 0,10 мм/год при рН – 8,5. Втім, навіть нижній і верхній показники рН не були критичними для гриба, оскільки ріст міцелію не зупинявся [5].



Залежність загальної целюлазної активності від рН середовища представлена на рис. 1. Максимальна целюлазна активність була зафіксована через 6 тижнів культивування (за рН середовища 8,5) і становила $1,95 \pm 0,11$ од/мл. При вирощуванні *Acremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 цей показник був значно нижчим. Необхідно зазначити, що у контрольних зразках, в яких замість культуральної рідини додавали один мл поживного середовища, також фіксували незначну целюлазну активність ($0,43 \pm 0,05$ од/мл) внаслідок руйнації фільтрувального паперу під впливом реакції поживного середовища.

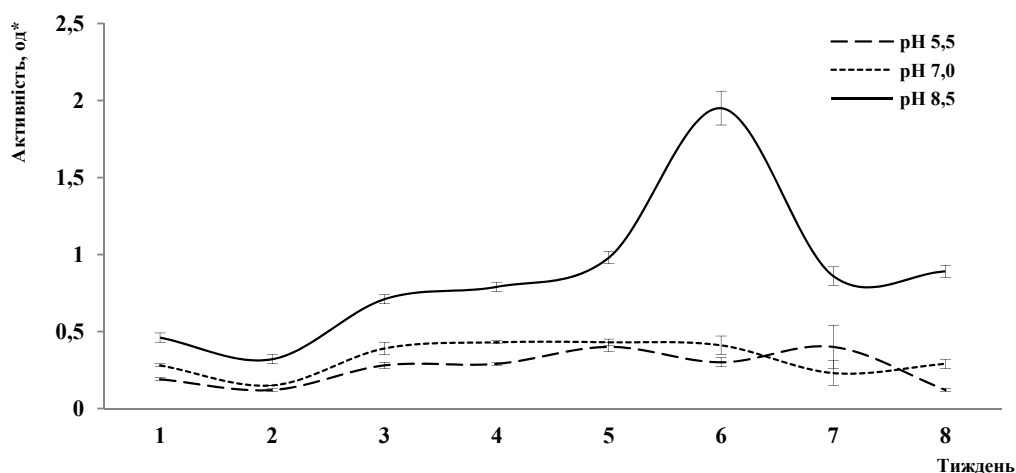


Рис. 1. Загальна целюлазна активність гриба *Acremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 1. General cellulase activity of *Acremonium* sp. 502 at different pH values

На початковому етапі гідролізу целюлози до глюкози беруть участь ендо- та екзоглюкозидази, які діють синергічно. Наявність екзоглюкозидази в культуральній рідині гриба є свідченням того, що він здатний деградувати кристалічну форму целюлози. Більшість грибів екзоглюкозидазною активністю не володіють і здатні гідролізувати тільки аморфні форми целюлози [3]. Одержані нами дані свідчать, що найвища екзоглюкозидазна активність *Acremonium* sp. 502 реєструвалась через 6 тижнів культивування і становила $3,23 \pm 0,02$ од/мл (рис. 2). При вирощуванні *Acremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 цей показник був значно нижчим.

Ендоглюкозидази забезпечують гідроліз аморфної целюлози до целобіози. Найвища кількість редуруючих цукрів була виявлена через 6 тижнів культивування, при цьому ендоглюкозидазна активність становила $2,85 \pm 0,21$ од/мл. При вирощуванні *Acremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 цей показник був значно нижчим (рис. 3).

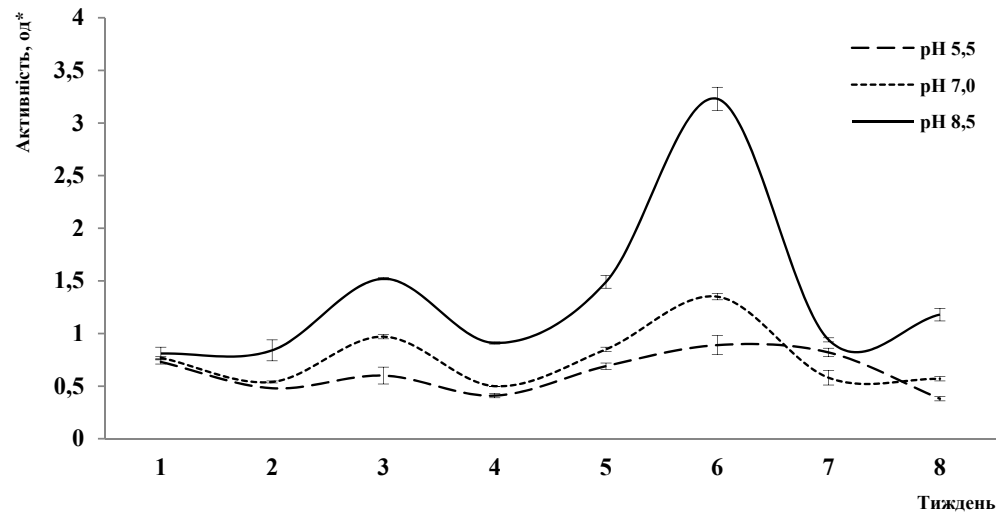


Рис. 2. Екзоглюканазна активність гриба *Accremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 2. Exoglucanase activity of *Accremonium* sp. 502 at different pH values

Фермент β -глюкозидаза завершує розщеплення целюлози і забезпечує гідроліз целобіози до глюкози. Залежність β -глюкозидазної активності *Accremonium* sp. 502 від рН середовища представлена на рис. 4. Найвищий показник був зафіксований на середовищі з рН – 8,5 через 6 тижнів культивування і становив $2,39 \pm 0,10$ од/мл. При вирощуванні *Accremonium* sp. 502 на середовищах з рН 5,5 та 7,0 β -глюкозидазна активність була на рівні контролю.

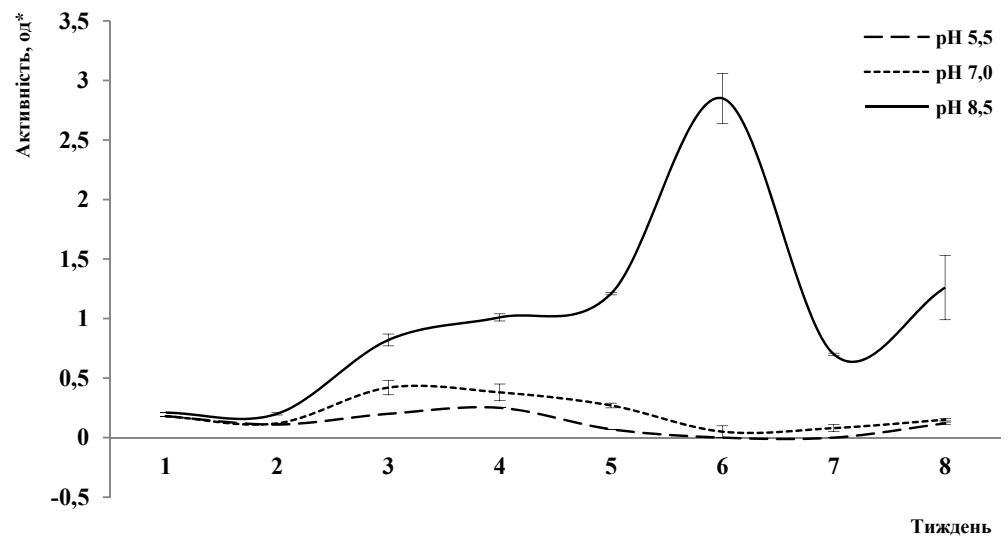


Рис. 3. Ендоглюканазна активність гриба *Accremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 3. Endoglucanase activity of *Accremonium* sp. 502 at different pH values



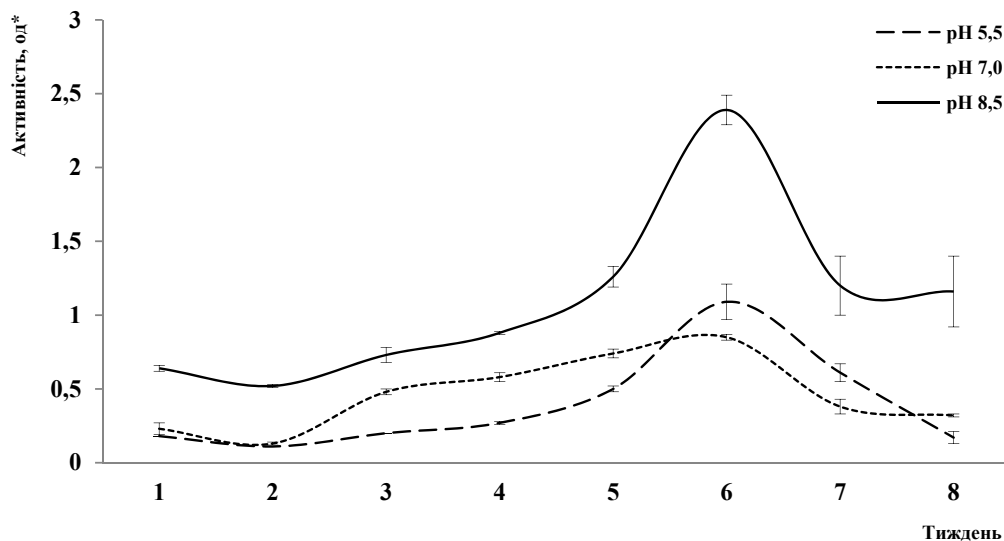


Рис. 4. β -глюкозидазна активність гриба *Acremonium* sp. 502 за росту при різних значеннях рН

Fig. 4. β -glucosidase activity of *Acremonium* sp. 502 at different pH values

Таким чином, встановлено, що *Acremonium* sp. 502 здатний до синтезу ендо-, екзоглюканаз та β -глюкозидази. Найвищу целюлозолітичну активність гриб виявляв через 6 тижнів культивування з рН середовища – 8,5. При цьому загальна целюлозолітична активність складала 1,95 од/мл, екзоглюканазна активність – 3,23, ендоглюканазна – 2,85 та β -глюкозидазна активність – 2,39 од/мл. Слід відмітити, що крива синтезу целюлазних ферментів має хвилеподібний характер, що є свідченням використання грибом редуруючих цукрів як джерела вуглецю, тому незначне підвищення целюлазної активності фіксували також і через 3 тижні культивування.

Раніше нами було показано, що розвиток симптомів захворювання огірків спостерігається, починаючи з фази справжніх листків, тобто через 5–7 тижнів після появи сходів. Симптоми хвороби проявляються у пожовтінні прожилків та країв листової пластинки з подальшим побурінням, з'являються жовтуваті краплі на поверхні листка з подальшим їх відмиранням [4]. Зважаючи на вищевикладене, можна припустити, що утворення целюлазних ферментів грибом *Acremonium* sp. 502 необхідно для його проникнення в рослину що призводить до розвитку захворювання.

Е.П. Копылов, А.В. Цехмістер

Институт сельскохозяйственной микробиологии и
агропромышленного производства НААН Украины,
ул. Шевченко, 97, Чернигов, 14027, Украина

ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГРИБА *ACREMONIUM SP. 502*, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОРАЖЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОГУРЦОВ

Реферат

*Целью работы было изучить целлюлазную активность штамма гриба *Acremonium sp. 502* в зависимости от pH среды, как одного из определяющих факторов его проникновения в растения. **Методы.** Штамм гриба *Acremonium sp. 502*, выделенный из больных растений огурцов, культивировали на среде сусловый агар. Скорость роста гриба определяли по диаметру колоний. Для определения целлюлазной и экзоглюканазной активности использовали фильтровальную бумагу, микроскопическую целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, целобиозу соответственно. Количество редуцирующих сахаров определяли методом Шомоди-Нельсона. **Результаты.** Исследована динамика целлюлазной активности гриба *Acremonium sp. 502*, выделенного из пораженных растений огурцов, при различных значениях pH питательной среды. Максимальные значения ферментативной активности были зафиксированы через 6 недель культивирования гриба при pH среды 8,5. При этом общая целлюлазная активность составляла 1,95 ед/мл, экзоглюканазная – 3,23, эндоглюканазная – 2,85 и β -глюкозидазная – 2,39 ед/мл, что свидетельствует в пользу ферментативного механизма проникновения гриба внутрь тканей растений с последующим развитием заболевания. **Выводы.** Установлено, что *Acremonium sp. 502* способен к синтезу эндо-, экзоглюканазы и β -глюкозидазы. Наибольшую целлюлозолитическую активность гриб проявлял через 6 недель культивирования с показателем pH среды – 8,5. Можно предположить, что образование целлюлазных ферментов грибом *Acremonium sp. 502* необходимо для его проникновения в растение с последующим развитием заболевания.*

Ключевые слова: общая целлюлазная, экзоглюканазная, эндоглюканазная и β -глюкозидазная активности, *Acremonium sp.*

E.P. Kopylov, G.V. Tsehmister

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS,
97, Shevchenko st., Chernihiv, Ukraine

CELLULOLYTIC ACTIVITY OF STRAIN OF THE FUNGUS *ACREMONIUM SP. 502* PICKED UP FROM AFFECTED CUCUMBER PLANTS

Summary

*The aim of the work was to study the cellulase activity of the strain *Acremonium sp. 502* depending on medium pH, as a determinant of its penetration into the plant. **Methods.** The strain *Acremonium sp. 502* was cultivated on wort agar. The optimal pH was detected by growth diameter of the mold colony. We used filter paper, microcrystalline*



cellulose, carboxymethyl cellulose and cellobiose to fix cellulase, exoglucanase, endoglucanase and β -glucosidase activity. The amount of reducing sugars was determined by Somogyi-Nelson method. **Results.** It was investigated the dynamics of cellulase activity at different pH values of culture medium of the mold *Acremonium* sp. 502 isolated from stroked cucumber plants. Maximal enzyme activity values were detected after 6 weeks of mold cultivating at pH 8.5. Herewith the general cellulase activity was 1.95 u/ml, exoglucanase – 3.23, endoglucanase – 2.85, and β -glucosidase – 2.39 u/ml, which evidences in favor of the enzymatic mechanism of mold penetration into the plant tissues and the subsequent development of the disease. **Conclusions.** It was established that *Acremonium* sp. 502 is capable to synthesize exo-, endoglucanase and β -glucosidase. The most cellulolytic activity was detected after 6 weeks of mold cultivating at pH 8.5. It can be assumed that formation of cellulase enzymes with the mold is necessary for its penetrating in plant followed by the development of the disease.

Key words: the main cellulase, exoglucanase, endoglucanase and β -glucosidase activity, *Acremonium* sp.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Методы* экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В.И. Билай. – Київ.: Наук. думка, 1982. – 549 с. [5]
2. Пат. 2029784 Российская Федерация, МПК⁶ C12P21/00, C12N9/14, C12N1/14; C12R1:66. Штамм гриба *Aspergillus species* – продуцент белка и целлюлаз / Назаренко А.В., Соколов В.Н., Соколова Л.Н., Гинак А.И.; заявитель и патентообладатель Санкт-Петербургский технологический институт им. Ленсовета. № 5031953/13, заявл. 12.03.1992; опубл. 27.02.1995.
3. Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно-функціональні особливості // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2, № 2. – С. 23–41.
4. Цехмістер Г.В. Акремоніозне в'янення огірків // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві (Чернігів, 26–27 листопада 2013 р): Збірник тез ІХ наукової конференції молодих вчених. – Чернігів: ІСМАПВ НААН, 2013. – С. 35–37.
5. Цехмістер Г.В. Вивчення культурально-морфологічних особливостей фітопатогенного гриба *Acremonium* sp. 502 // С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: Сівер-Друк, 2014. – Вип. 20. – С. 49–53.
6. Шендрік К.М. Вплив екологічних факторів на розвиток збудників кореневих гнилей сої / Захист і карантин рослин. – 2007. – № 53. – С. 189–194.
7. Aegerter B.J. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California // Plant Disease. – 2000. – Vol. 84, № 3. – P. 224–230.
8. Bruton B.D. Disease reaction among selected *Cucurbitaceae* to an *Acremonium cucurbitacearum* isolate from Texas // Hortscience. – 2000. – Vol. 35, № 4. – P. 677–680.
9. Chilosi G. Fungi associated with root rot and collapse of melon in Italy // OEPP/EPPO Bulletin. – 2008. – Vol. 38. – P. 147.



10. *Ebel J.* Oligoglucoside elicitor mediated activation of plant defense // *Bioessays*. – 1998. – 20, N 7. – P. 569–576.
11. *Iglesias A.* Pathogenicity of fungi associated with melon vine decline and selection strategies for breeding resistant cultivars // *Annals of Applied Biology*. – 2000. – V. 137. – P. 141–151.
12. *McDougall J.M.* Purification and characterization of the (1→3)- β -glucanases from *Acremonium* sp. IMI 383068 // *FEMS Microbiology Letters*. – 2004. – Vol. 230. – P. 259–264.
13. *Modafar C.El.* Relationship between Cell Wall Susceptibility to Cellulases and Pectinases of *Fusarium oxysporum* and Susceptibility of Date Palm Cultivars // *Biologia Plantarum* – 2000. – № 4, V. 43. – P. 571–576.
14. *Ramanathan G.* Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation // *Journal of Scientific & Industrial Research*. – 2010. – V. 69. – P. 454–459.
15. *Sclerotinia* Diseases of Crop Plants: Biology, Ecology and Disease Management / G. S. Saharan, Naresh Mehta – Springer Science & Business Media, 2008 – 486 p.

Стаття надійшла до редакції 18.09.2014 р.



А.В. Путніков¹, Ю.В. Голота¹, Т.М. Сергійчук¹, А.М. Остапчук²,
Л.В. Закордонєць³, Л.І. Остапченко¹, Г.М. Толстанова¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»,
вул. Володимирська 64/13, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38 (044) 521 35 98, e-mail: steling@bigmir.net

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна, тел.: +38 (044) 526 11 89

³Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, бульвар Т. Шевченка, 13,
Київ, 01601, Україна

КІЛЬКІСНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ КИШКОВОЇ НОРМОБІОТИ ЩУРІВ

Мета. Метою даної роботи було визначити референс-діапазони мікробіологічних показників фекального та пристінкового кишкового біотопу лабораторних щурів та провести порівняльний аналіз з існуючими даними для показників людини. **Методи.** Мікробіологічний аналіз фекалій (КУО/г) та пристінкового (КУО/см²) біотопу щурів самців лінії Вістар (170–200 г, n=31) здійснювали шляхом висіву відповідних розведень на елективно-диференційні середовища, спектр та концентрацію коротко-ланцюгових жирних кислот (КЛЖК) визначали методом газо-рідинної хроматографії. **Результати.** У фекаліях щурів кількість мікроорганізмів роду *Bifidobacterium* висівалася в межах 10⁶–10⁹ КУО/г, *Propionibacterium* – 10⁵–10⁹ КУО/г, *Lactobacillus* – 10⁶–10⁸ КУО/г. Встановлено майже рівне співвідношення між *E. coli* з нормальними (10⁴–10⁷ КУО/г) та зміненими (10²–10⁵ КУО/г) ферментативними властивостями. Кількість умовно-патогенних бактерій (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* та ін.) не перевищувала 10³ КУО/г, *Clostridium spp.* – 10²–10⁴ КУО/г, сапрофітних представників роду *Staphylococcus* – 0–10⁷ КУО/г, *S. aureus* – 10³–10⁵ КУО/г, гриби роду *Candida* – 0–10³ КУО/г. Гемолітичних штампів не виявляли. У пристінковому біоптаті товстої і термінального відділу тонкої кишок щурів не було виявлено представників родів *Clostridium* та *Candida*. Анаеробні цукролітичні бактерії родів *Bifidobacterium* (10³–10⁶ КУО/см²), *Lactobacillus* (10²–10⁶ КУО/см²), *Propionibacterium* (10³–10⁶ КУО/см²) висівалися у 100% тварин. Склад КЛЖК фекалій щурів подібний до такого у людини, і містить: оцтову (С2), пропіонову (С3), масляну та ізомасляну (С4, іС4), валеріанову та ізовалеріанову (С5, іС5), а також капронову та ізокапронову (С6, іС6) кислоти. **Висновки.** Для щурів лінії Вістар визначено референс-діапазони основних груп мікроорганізмів фекального біоптату, які враховують при оцінці стану нормобіоти кишечника людини. Вперше визначено референс-діапазони мікробіоти пристінкового біоптату товстої та тонких кишок щурів. Співвідношення КЛЖК у фекаліях щурів лінії Вістар (С2:С3:С4) становить 41,9:32,2:20,9%.

Ключові слова: нормобіота, референс-діапазони, коротколанцюгові жирні кислоти, тонка кишка, товста кишка.



Проблема необхідності аналізу стану мікробіоти шлунково-кишкового тракту (ШКТ) набула особливого значення у зв'язку з ростом гострих та хронічних захворювань органів травлення, негативних наслідків антибіотикотерапії та неефективності методів профілактики та терапії цих станів. Слід зауважити, що проблема наслідків антибіотикотерапії залишається найбільш обговорюваним і, в той же час, найбільш суперечливим питанням сучасної медицини. В Україні та в світі, антибактеріальна терапія займає друге місце за частотою призначень в схемах лікування хворих на різні патології [1, 2]. Емпіричне призначення антибіотиків, а також швидкий ріст бактеріальної резистентності часто вимагає корекції терапії, іноді до трьох змін антибіотику [3].

Порушення кількісного та якісного складу нормобіоти при дисбіозах пов'язано зі змінами метаболічної активності анаеробної цукролітичної мікробіоти, яка відповідальна за розщеплення клітковини до коротко-ланцюгових жирних кислот (КЛЖК). Зниження рівня КЛЖК призводить до дистрофічних змін покривного епітелію, підвищується проникність кишкового бар'єру, порушується всмоктування води та електролітів [4]. Можна вважати, що дослідження кількісного співвідношення КЛЖК є одним з критеріїв оцінки стану мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту.

На сьогодні лабораторні щури є найбільш вживаним експериментальним об'єктом для проведення доклінічних досліджень препаратів, скерованих на відновлення мікробіоценозу організму, в тому числі кишечника. Проведення повноцінного експерименту та порівняльного аналізу отриманих результатів передбачає знання широкого спектру нормативних показників піддослідних тварин. Існує досить багато публікацій щодо референтних значень фізіологічних показників гомеостазу: біохімії крові, абсолютній та відносній масі і розмірам внутрішніх органів і багатьом іншим показникам, проте існують лише обмежені повідомлення щодо якісних та кількісних показників нормобіоти кишечника щурів та їх співвідношення з рівнем їх метаболітів, КЛЖК [5].

Експериментальні дані вказують на провідну роль в розвитку патологій мікробіоти, що колонізує пристінковий шар муцину [16]. Дані щодо особливостей змін пристінкової мікробіоти ШКТ у лабораторних тварин обмежені.

Метою даної роботи було визначити референс-діапазони мікробіологічних показників фекального та пристінкового кишкового біотопу лабораторних щурів та провести порівняльний аналіз з існуючими даними для показників людини.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження була мікробіота фекального та пристінкового біоптату товстої кишки, та пристінкового біоптату тонкої кишки.

Експериментальні дослідження проведені на 31 щурі (самці) лінії Вістар (масою 170–200 г). Утримання, харчування та проведення експерименту здійснювали згідно Наказу про Порядок проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах [6].



Всіх тварин утримували за стандартних умов температурного режиму (21 °С), освітлення (12/12 год), вологості та раціону харчування (повноцінний корм для лабораторних тварин К – 12-4, „Різан-1”, Україна).

Для мікробіологічного аналізу збирали 1 г фекалій, та ділянки слизової оболонки (1 см²) товстої кишки на відстані 2 см від анального отвору та тонкої кишки на відстані 2 см від ілеоцекальної заслінки.

1 г фекалій відбирали у пробірку з 9 мл фізіологічного розчину, після чого здійснювали серію розведень з 10⁻¹ до 10⁻⁹ (фекальний біоптат).

Виявлення основних груп мікроорганізмів здійснювали шляхом висіву відповідних розведень на елективно-диференційні середовища (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Індія). Подальшу ідентифікацію виділених мікроорганізмів здійснювали за морфологічними, тинкторіальними та фізіолого-метаболічними показниками.

Аналіз спектру КЛЖК здійснювали на газовому хроматографі Trace GC Ultra (Thermo Finnigan USA) [7].

КЛЖК ідентифікували шляхом порівняння з часом утримання стандартів (оцтова, масляна, ізомасляна, пропіонова, валер'янова, ізовалер'янова, гексанова) (Sigma-Aldridi, Німеччина). Кількісну оцінку спектру КЛЖК проводили за методом нормування площин їх піків і визначали у відсотках та мг/г фекалій.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми SPSS 17. Кореляційний зв'язок між представниками нормобіоти та спектром КЛЖК розраховано за допомогою коефіцієнта Пірсона. Для розрахунку числа тварин з мінімальною, середньою та максимальною кількістю певного виду мікроорганізмів, вираховували відсоток тварин з мінімальним, середнім чи максимальним показником відносно всього масиву даних, приймаючи загальну кількість тварин за 100%. Дані представлені у вигляді середнього значення \pm стандартна помилка середнього ($M \pm m$).

Результати та їх обговорення

Експериментальним шляхом були адаптовані основні розведення для засіву на відповідні елективно-диференційні середовища (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd, Індія).

При дослідженні складу нормобіоти людини за характером метаболізму, в першу чергу, звертають увагу на дві основні групи: цукролітичні та протеолітичні мікроорганізми.

Цукролітичні мікроорганізми (біфідобактерії, лактобацили, лактококи, пропіонібактерії та інші) спрямовують свій метаболізм на ферментацію вуглеводів, що надходять в організм з їжею, і олігоцукридів слизу (муцинів), що синтезуються келихоподібними епітеліоцитами кишечника. За літературними даними референс-показники фекального біоптату людини для *Bifidobacterium* становлять 10⁹–10¹² КУО/г, *Lactobacillus* – 10⁷–10¹⁰ КУО/г, *Propionibacterium* – 10⁷–10¹⁰ КУО/г [1]. За результатами наших досліджень кількість анаеробних цукролітичних мікроорганізмів в 1 г фекалій щурів є на 1–2 порядки нижчою в порівнянні з нормобіотою людини (табл. 1). Так, кількість мікроорганізмів роду



Bifidobacterium висівалась в межах 10^6 – 10^9 КУО/г, *Propionibacterium* – 10^5 – 10^9 КУО/г, *Lactobacillus* – 10^6 – 10^8 КУО/г фекального біоптату. При цьому переважна більшість тварин (71,4%) мала середні значення кількості цукролітичних анаеробних представників на 1 г біоптату: *Bifidobacterium* – $\lg 8,5 \pm 0,5$ КУО/г, *Lactobacillus* – $\lg 7,5 \pm 0,5$ КУО/г, *Propionibacterium* – $\lg 8,2 \pm 0,7$ КУО/г (табл. 2).

Таблиця 1

Референс-діапазони кількісних показників нормобіоти фекалій

Table 1

Reference ranges for quantitative characteristics of faeces normobiota

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів у щурів, КУО/г	Кількість мікроорганізмів у людини, КУО/г [11]
<i>Bifidobacterium</i>	$10^6 - 10^9$	$10^9 - 10^{12}$
<i>Lactobacillus</i>	$10^6 - 10^9$	$10^7 - 10^{10}$
<i>Propionibacterium</i>	$10^5 - 10^9$	$10^7 - 10^{10}$
<i>E. coli</i> з нормальними ферментатив вл-ми	$10^4 - 10^7$	$10^6 - 10^8$
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними вл-ми	$10^2 - 10^5$	Не більше 10 %
Умовно-патогенні ентеробактерії	$0 - 10^3$	$0 - 10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$10^3 - 10^5$	$10^3 - 10^5$
<i>Staphylococcus sp.</i>	$0 - 10^7$	-
<i>Clostridium sp.</i>	$10^2 - 10^4$	$10^2 - 10^5$
<i>Candida sp.</i>	$0 - 10^3$	$10^2 - 10^4$

Відмінності, у порівнянні з фекальною мікробіотою кишечника людини, виявлені щодо кількісного співвідношення *E. coli* з нормальними та зміненими ферментативними властивостями. «*E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями» – кишкові палички зі зниженою здатністю ферментувати лактозу та лактозо-негативні форми. При оцінці мікробного пейзажу біоти товстої кишки для *E. coli* оцінюється здатність ферментувати лактозу, загальноприйнятим є можливість об'єднувати в термін «... зі зміненими ферментативними властивостями» такі форми, які зовсім або частково втратили здатність до ферментації лактози.

Якщо для нормобіоти людини кількість *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями не перевищує 10% від загальної кількості кишкових паличок [11], то для щурів характерним є майже рівне їх співвідношення. Так у більшості тварин значення для *E. coli* з нормальними ферментативними властивостями були в межах $\lg 4,5 \pm 0,5$ КУО/г, а зі зміненими $\lg 3,2 \pm 0,8$ КУО/г.



Таблиця 2

Видовий та кількісний ($M \pm m$) склад нормобіоти фекального біоптату товстої кишки щурів ($n=21$)

Table 2

Species and quantitative composition ($M \pm m$) of normobiota of rats fecal biopsy colon ($n=21$)

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів, lg КУО/г (число тварин, %)		
	мінімальні значення	середні значення	максимальні значення
<i>Bifidobacterium</i>	$6,8 \pm 0,1$ (14,3)	$8,5 \pm 0,5$ (71,4)	$9,0 \pm 0,3$ (14,3)
<i>Lactobacillus</i>	$6,5 \pm 0,4$ (19,0)	$7,5 \pm 0,5$ (66,7)	$8,5 \pm 0,1$ (14,3)
<i>Propionibacterium</i>	$5,5 \pm 0,2$ (14,3)	$8,2 \pm 0,7$ (71,4)	$9,2 \pm 0,1$ (14,3)
<i>E. coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	$3,9 \pm 0,1$ (9,5)	$4,5 \pm 0,5$ (76,2)	$6,8 \pm 0,2$ (14,3)
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	$1,7 \pm 0,4$ (14,3)	$3,2 \pm 0,8$ (57,1)	$4,7 \pm 0,3$ (28,6)
Умовно-патогенні ентеробактерії	$0,0 \pm 0,0$ (14,3)	$2,4 \pm 0,3$ (47,6)	$3,0 \pm 0,2$ (38,1)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2,0 \pm 0,1$ (9,5)	$3,5 \pm 0,3$ (47,6)	$4,5 \pm 0,2$ (42,8)
<i>Staphylococcus sp.</i>	$0,0 \pm 0,0$ (23,8)	$4,5 \pm 0,8$ (61,9)	$6,6 \pm 0,2$ (14,3)
<i>Clostridium sp.</i>	$1,8 \pm 0,2$ (9,5)	$2,0 \pm 0,1$ (61,9)	$3,0 \pm 0,6$ (28,6)
<i>Candida sp.</i>	$0,0 \pm 0,0$ (14,3)	$1,8 \pm 0,3$ (57,1)	$2,8 \pm 0,2$ (28,6)

У фекаліях щурів виявляли умовно-патогенні бактерії (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* та ін.), проте їх кількість не перевищувала 10^3 КУО/г. Середні показники висівання зазначених представників, становили $\lg 2,4 \pm 0,3$ КУО/г.

При ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus* кількість сапрофітних представників досягала 10^7 КУО/г, а кількість представників виду *S. aureus* коливалась в межах 10^3 – 10^5 КУО/г. Гемолітичних штамів не виявляли.

Представників роду *Clostridium* відносять до умовно-патогенних бактерій, а *C. difficile* вважають одним з факторів розвитку псевдомембранозного коліту [8]. З іншого боку з'являється все більша кількість повідомлень про необхідність їх присутності у складі біотопу шлунково-кишкового тракту. Їх позитивну роль пов'язують з тим, що вони є найбільш активними продуцентами бутирату (масляна кислота), який є найкращим енергетичним субстратом

для клітин епітелію товстої кишки та відіграє суттєву роль в їх проліферації і диференціації [9, 10]. В наших дослідженнях представники роду *Clostridium* висівались у 100% тварин, а межі їх висівання були від $\lg 1,8 \pm 0,2$ КУО/г до $\lg 3,0 \pm 0,6$ КУО/г (табл. 2).

Гриби роду *Candida* висівались у 85,7% досліджуваних тварин, а їх титри не перевищували 10^3 КУО/г.

Фекальну мікробіоту не можна вважати як таку, що повноцінно відображає мікробний пейзаж слизової оболонки товстої кишки. Пристінкова мікробіота більш стабільна і фізіологічна, так як щільно зв'язана з муциновим шаром слизової оболонки. Вона існує у вигляді мікроколоній і у фізіологічному, структурному і функціональному відношенні є невід'ємним компонентом приепітеліальних біологічно активних плівок. За нормальних умов вона представлена доміантними мікроорганізмами, які в синергізмі з іншими компонентами біоплівки (імуноглобулінами, імунними клітинами, ферментами, полісахаридами, та ін.) виконує найбільш значимі фізіологічні функції. Отже пристінкова мікробіота для макроорганізму є найбільш цінною частиною мікробіоти, зміни якої найбільш суттєво відображаються на всіх процесах, що відбуваються у макроорганізмі [10,12]. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження кількісного та якісного складу пристінкової біоплівки товстої кишки умовно-здорових щурів (табл. 3).

На відміну від фекального біоптату в пристінковому не було виявлено представників родів *Clostridium* та *Candida*. Анаеробні цукролітичні бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* висівались у 100% тварин. Так *Bifidobacterium* та *Propionibacterium* висівались в межах 10^3 – 10^6 КУО/см², а *Lactobacillus* – 10^2 – 10^4 КУО/см².

Лактозопозитивні *E. coli* не висівались у 14,3% тварин, а у 71,4% їх кількість становила $\lg 1,7 \pm 0,2$ КУО/см².

В епітеліальному біоптаті умовно-патогенні бактерії висіяно у 14,3% тварин у титрі $\lg 1,4 \pm 0,3$ КУО/см².

Представники виду *Staphylococcus aureus* висівались у 28,6% тварин в кількості $\lg 1,9 \pm 0,4$ КУО/см², а титр сапрофітних стафілококів досягав $\lg 2,7 \pm 0,1$ КУО/см² (28,6% тварин).

За аналізу стану мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту традиційно враховують лише зміни, що відбуваються у товстій кишці, і практично ніколи не береться до уваги мікробіота тонкої кишки, зміни якої (перш за все підвищення бактеріального обсіменіння тонкої кишки) відіграють суттєву роль в патології травного тракту [13].

Мікробіота, що була виділена нами з пристінкового біоптату дистального відділу тонкої кишки майже не відрізнялась від такої товстої кишки (табл. 4). Основну її масу складали представники анаеробних цукролітичних бактерій. В тонкій кишці зовсім не було виявлено умовно-патогенних бактерій, клостридій та грибів роду *Candida*.



Таблиця 3

Видовий та кількісний ($M \pm m$) склад нормобіоти пристінкового біоптату товстої кишки щурів ($n = 21$)

Table 3

Species and quantitative composition ($M \pm m$) of normobiota of wall surface biopsy of rats colon ($n = 21$)

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів, lg КУО/см ² (число тварин, %)			Референс-діапазон (КУО/см ²)
	мінімальні значення	середні значення	максимальні значення	
<i>Bifidobacterium</i>	2,7 ± 0,3 (14,3)	4,0 ± 0,3 (42,8)	5,7 ± 0,1 (42,8)	10 ³ – 10 ⁶
<i>Lactobacillus</i>	2,0 ± 0,9 (14,3)	3,0 ± 0,2 (28,6)	3,6 ± 0,4 (57,1)	10 ² – 10 ⁴
<i>Propionibacterium</i>	2,9 ± 0,1 (14,3)	4,2 ± 0,7 (57,1)	5,7 ± 0,4 (28,6)	10 ³ – 10 ⁶
<i>E. coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (14,3)	1,7 ± 0,3 (71,4)	3,0 ± 0,5 (14,3)	0 – 10 ³
<i>E. coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (28,6)	0,7 ± 0,2 (57,1)	1,6 ± 0,3 (14,3)	0 – 10 ²
Умовно-патогенні ентеробактерії	0,0 ± 0,0 (71,4)	- (0,0)	1,4 ± 0,3 (28,6)	0 – 10 ²
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0 ± 0,0 (71,4)	- (0,0)	1,9 ± 0,4 (28,6)	0 – 10 ²
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,0 ± 0,0 (57,1)	0,7 ± 0,4 (28,6)	2,7 ± 0,1 (14,3)	0 – 10 ³
<i>Clostridium sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0
<i>Candida sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0

Примітка: «-» – показники в даному діапазоні відсутні

Note: «-» – indices in given range are absent

Виявлений в останні роки фундаментальний факт обміну низькомолекулярними метаболітами між індигенною мікробіотою і макроорганізмом послугував основою для створення принципово нових методів оцінки стану мікробіоценозу та участі її метаболітів у забезпеченні локальних і системних функцій макроорганізму. Встановлено, що до метаболітів, відповідальних за енергозабезпечення епітелію, постачання субстратів ліпо- і гліюконеогенезу, підтримання іонного обміну, активації місцевого імунітету, регуляції та диференціювання епітелію, тощо, відносять КЛЖК, які продукуються мікроорганізмами товстої кишки. Вивчення КЛЖК при патології ШКТ має більш високу чутливість і специфічність у порівнянні з традиційним бактеріологічним дослідженням та дозволяє розглянути стан мікробіоценозу на молекулярно-біохімічному рівні. [4, 14].



Видовий та кількісний ($M \pm m$) склад нормобіоти пристінкового біоптату тонкої кишки лабораторних щурів ($n = 21$)

Species and quantitative composition ($M \pm m$) of normobiota of wall surface biopsy of laboratory rats colon ($n = 21$)

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів, lg КУО/см ² (число тварин, %)			Референс-діапазон (КУО/см ²)
	мінімальні значення	середні значення	максимальні значення	
<i>Bifidobacterium</i>	4,0 ± 0,3 (21,4)	5,3 ± 0,3 (78,6)	6,0 ± 0,1 (7,1)	10 ⁴ – 10 ⁶
<i>Lactobacillus</i>	4,0 ± 0,3 (36,4)	5,0 ± 0,3 (45,4)	6,2 ± 0,1 (18,0)	10 ⁴ – 10 ⁶
<i>Propionibacterium</i>	3,1 ± 0,2 (33,3)	4,0 ± 0,1 (11,1)	5,0 ± 0,1 (55,6)	10 ³ – 10 ⁵
<i>E.coli</i> з нормальними ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (57,1)	2,7 ± 0,3 (28,6)	5,0 ± 0,7 (14,3)	0 – 10 ⁶
<i>E.coli</i> зі зміненими ферментативними властивостями	0,0 ± 0,0 (71,4)	- (0,0)	2,7 ± 0,4 (28,6)	0 – 10 ³
Умовно-патогенні ентеробактерії	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,0 ± 0,0 (85,7)	- (0,0)	3,3 ± 0,5 (14,3)	0 – 10 ⁴
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,0 ± 0,0 (57,1)	2,9 ± 0,1 (14,3)	4,9 ± 0,2 (28,6)	0 – 10 ⁵
<i>Clostridium sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0
<i>Candida sp.</i>	0,0 ± 0,0 (100,0)	- (0,0)	- (0,0)	0

Примітка: «-» – тварини з показниками в даному діапазоні відсутні
 Note: «-» – animals with characteristics in given range are absent

Нами показано, що склад КЛЖК фекалій щурів подібний до такого у людини [15], і містить: оцтову (С2), пропіонову (С3), масляну та ізомасляну (С4, іС4), валеріанову та ізовалеріанову (С5, іС5), а також капронову та ізокапронову (С6, іС6) кислоти. Найбільша кількість, так само як і у людини [15], припадала на оцтову кислоту (0,211–0,923 мг/г), дещо меншою є кількість пропіонової (0,159–0,897 мг/г) та масляної (0,071–0,633 мг/г) кислот (табл. 5)

У процентному співвідношенні склад зазначених КЛЖК (С2:С3:С4) для дорослої людини дорівнює 63,6 : 19,2 : 17,2% [7]. В наших дослідженнях, для щурів лінії Вістар він становив 41,9 : 32,2 : 20,9 %. Інші КЛЖК (С5, С6), аналогічно для людей [4], присутні у слідових кількостях.



Кореляційний аналіз не виявив чіткої закономірності між складом фекальної нормобіоти та вмістом КЛЖК. Тому, для більш реальної оцінки картини стану мікробіоти кишкового тракту клініцисти пропонують комплексне використання методів оцінки показників мікробного гомеостазу (класичного бактеріологічного та сучасного біохімічного – визначення КЛЖК) [4]. На нашу думку вони є взаємодоповнюючими, а не виключаючими один одного.

Таблиця 5

**Вміст коротко-ланцюгових жирних кислот (мг/г)
у фекальному біоптаті щурів та людини**

Table 5

Contents of short-chain fatty acids (mg/g) in rats and humans fecal biopsy

Жирні кислоти	Власні дослідження (щурі)		Літературні відомості [15]		
	M±m n=31	Референс- діапазон	Щури		Люди
			M±m	Референс- діапазон	M±m
Оцтова	0,455± 0,170	0,211-0,923	2,818± 0,720	1,523-3,587	0,634± 0,004
Пропіонова	0,374± 0,164	0,159-0,897	0,268± 0,073	0,145- 0,364	0,189± 0,001
Масляна	0,252± 0,132	0,071-0,633	1,387± 0,613	0,286-0,155	0,176± 0,004
Валер'янова	0,021± 0,019	0,008-0,035	0,053± 0,022	0,022-0,092	-
Ізо-валер'янова	0,018± 0,162	0,005-0,030	0,041± 0,017	0,018-0,062	-

Примітка: «-» – не зазначено

Note: «-» – are absent

Таким чином, не зважаючи на те, що щурів не можна вважати цілком адекватною моделлю організму людини у зв'язку з відмінностями у анатомічній будові ШКТ і особливостями фізіології (криса є копрофагом), проте знання про відмінності кількісних та функціональних показників мікробіоти лабораторних щурів та людини можуть бути використані для подальших досліджень впливу різноманітних факторів на мікроекологічний статус ШКТ.

Висновки: Для щурів лінії Вістар визначено референс-діапазони основних груп мікроорганізмів фекального біоптату, які враховують при оцінці стану нормобіоти кишечника людини. Вперше визначено референс-діапазони мікробіоти пристінкового біоптату товстої та тонкої кишок щурів. Основними КЛЖК, які виявляються у фекальному біоптаті щурів, є оцтова (C2), пропіонова (C3) та масляна (C4) кислоти. Їх співвідношення становить (C2:C3:C4) 41,9:32,2:20,9%.



А.В. Путніков¹, Ю.В. Голота¹, Т.М. Сергійчук¹, А.Н. Остапчук²,
Л.В. Закордонець³, Л.И. Остапченко¹, А.Н. Толстанов¹

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ОНЦ «Институт биологии», ул. Владимирская 64/13, Киев, 01601, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина

³Национальный медицинский университет имени О.О. Богомольца, бульвар Т. Шевченко, 13, Киев, 01601, Украина

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КИШЕЧНОЙ НОРМОБИОТЫ КРЫС

Реферат

Цель. Целью данной работы было определить референс-диапазоны микробиологических показателей фекального и пристеночного кишечного биотопа лабораторных крыс и провести сравнительный анализ с существующими данными для показателей человека. **Методы.** Микробиологический анализ фекалий (КОЕ/г) и пристеночного (КОЕ/см²) биотопа крыс самцов линии Вистар (170–200 г, n = 31) осуществляли путем высева соответствующих разведений на селективные-дифференциальные среды, спектр и концентрацию коротко-цепочечных жирных кислот (КЦЖК) определяли методом газо-жидкостной хроматографии. **Результаты.** В фекалиях крыс количество микроорганизмов рода *Bifidobacterium* высевались в пределах 10⁶–10⁹ КОЕ/г, *Propionibacterium* – 10⁵–10⁹ КОЕ/г, *Lactobacillus* – 10⁶–10⁸ КОЕ/г. Установлено почти равное соотношение между *E. coli* с нормальными (10⁴–10⁷ КОЕ/г) и измененными (10²–10⁵ КОЕ/г) ферментативными свойствами. Количество условно-патогенных бактерий (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и др.) не превышало 10³ КОЕ/г, *Clostridium* sp. – 10²–10⁴ КОЕ/г, сапрофитных представителей рода *Staphylococcus* – 0–10⁷ КОЕ/г, *S. aureus* – 10³–10⁵ КОЕ/г, грибы рода *Candida* – 0–10³ КОЕ/г. Гемолитических штаммов не выявляли. В пристеночном биоптате толстой и терминальном отделе тонкой кишки крыс не было обнаружено представителей родов *Clostridium* и *Candida*. Анаэробные сахаролитические бактерии родов *Bifidobacterium* (10³–10⁶ КОЕ/см²), *Lactobacillus* (10²–10⁶ КОЕ/см²), *Propionibacterium* (10³–10⁶ КОЕ/см²) высевались у 100% животных. Состав КЦЖК фекалий крыс подобен таковому у человека, и содержит: уксусную (С2), пропионовую (С3), масляную и изомаляную (С4, iС4), валерьяновую и изовалериановую (С5, iС5), а также капроновую и изокапроновую (С6, iС6) кислоты. **Выводы.** Для крыс линии Вистар определены референс-диапазоны основных групп микроорганизмов фекального биоптата, которые учитывают при оценке состояния нормобиоты кишечника человека. Впервые определены референт диапазоны микробиоты пристеночного биоптата толстой и тонкой кишок крыс. Соотношение КЦЖК в фекалиях крыс линии Вистар (С2: С3: С4) составляет 41,9: 32,2: 20,9%.

Ключевые слова: нормобиота, референс-диапазон, коротко-цепочечные жирные кислоты, тонкая кишка, толстая кишка.



A.V. Putnikov¹, Yu.V. Holota¹, T.M. Sergeychuk¹, A.M. Ostapchuk²,
L.V. Zakordonets³, L.I. Ostapchenko¹, G.M. Tolstanova¹

Kyiv National Taras Shevchenko University, Educational and Scientific Center "Institute of Biology",
64/13 Volodymyrska str., Kyiv, 03022, Ukraine

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
154, akad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine

Bogomolets National Medical University, 13, Bulvar Shevchenko, Kyiv, 01601, Ukraine

QUANTITATIVE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF RAT INTESTINAL MICROBIOTA

Summary

Aim. The aim of this study was to determine reference ranges of microbiological parameters of laboratory rats faecal and parietal intestinal biotope and a comparative analysis of existing data for the human indicators. **Methods.** Study was done on male Wistar rats (170–200 g, n=31). The fecal (CFU/g) and parietal (CFU/cm²) microbiota have been analyzed by bacteriological culture methods, levels of SCFA – by gas chromatography. **Results.** Rat feces contained 10⁶–10⁹ CFU/g, *Bifidobacterium* sp. 10⁵–10⁹ CFU/g, *Propionibacterium* sp. 10⁵–10⁹ CFU/g and *Lactobacillus* 10⁶–10⁸ CFU/g. There were determined almost equal ratio between lactose (+) *E. coli* (10⁴–10⁷ CFU/g) and lactose (-) *E. coli* (10²–10⁵ CFU/g). Quantity of conditionally-pathogenic bacteria (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, etc.) did not exceed 10³ CFU/g, *Clostridium* sp. – 10²–10⁴ CFU/g, *Staphylococcus* sp. – 0–10⁷ CFU/g, *S. aureus* – 10³–10⁵ CFU/g, *Candida* spp. – 0–10³ CFU/g. Hemolytics trains were not detected. Mucosa of the colon and the terminal ileum was not colonized by *Clostridium* spp. and *Candida* spp. But 100% of investigated animals were colonized with *Bifidobacterium* (10³–10⁶ CFU/cm²), *Lactobacillus* (10²–10⁶ CFU/cm²), *Propionibacterium* (10³–10⁶ CFU/cm²). The composition of rat's SCFA in faeces is similar to human's and contains: acetic (C2), propionic (C3), butyric and isobutyric (C4 iS4) valeric and isovaleric (C5 iC5) hexanoic and isocaproic (C6 iC6) acids. **Conclusion.** Wistar rats were determined with reference ranges of major groups of microorganisms fecal biopsies, which are taken into account when assessing the state of human intestinal normobiota. For the first time reference ranges of rats colon and small intestine parietal microbiota biopsies are defined. The ratio of SCFA of Wistar rats feces (C2: C3: C4) is 41.9: 32.2: 20.9%.

Key words: normobiota, reference-range, short chain fatty acids, small intestine, colon.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Корнеева О.Н., Ивашкин В.Т. Антибиотико-ассоциированный колит: патоморфология, клиника, лечение // РЖГТК. – 2007. – № 3. – С. 65–70.
2. Cho J., Yamanishi S., Cox L. et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity // Nature. – 2012. – 7413, N 488. – P. 621–626.
3. Blaser M. Antibiotic overuse: Stop the killing of beneficial bacteria // Nature. – 2011. – 476, N 24. – P. 393–396.
4. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. д-ра. биол. наук. – Москва, 2003. – 45 с.



5. *Mikelssaar M., Siigur U.* Metronidazole and the Intestinal Microecology of Rats // *Microbial ecology in health and disease.* – 1992, № 5. – P. 139–146.
6. *Наказ* Міністерства освіти і науки молоді та спорту України від 01.03.2012 №249 «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів та експериментів на тваринах» Зареєстровано в Міністерстві юстиції України 16 березня 2012 р. за № 416/20729.
7. *Sheveleva M.A., Ramenskaya G.V.* Gas chromatographic analysis of short-chain fatty acids in the standartization of medicinal formulations based on bacterial substrates // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* – 2010. –44, N 6. – P. 334–336.
8. *McFarland L.V.* Alternative treatments for Clostridium difficile disease: what really works? // *J. Med. Microbiol.* – 2005. –54 – P. 101–111.
9. *Головенко О.В., Халиф И.Л. Головенко А.О.* Роль масляной кислоты в лечении органических и функциональных заболеваний толстой кишки // *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии.* – 2011. – № 3. – С. 20–29.
10. *Watnick P., Kolter R.* Biofilm, City of Microbes // *J. Bacteriol.* – 2000. – 182, N 10. – P. 2675–2679.
11. *Янковский Д.С., Дымент Г.С.* Микрофлора и здоровье человека. – Київ: ТОВ «Червона Рута-Турс», 2008. – 552 с.
12. *Macfarlane S., Dillon F.* Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract // *J. Appl Microbiol.* – 2012. – 12, N 1 – P. 47–55.
13. *Белюсова Е.А.* Синдром избыточного бактериального роста тонкой кишки в свете общей концепции о дисбактериозе кишечника. Взгляд на проблему // *Фарматека.* – 2009 – № 2 – С. 116–122.
14. *Topping D.I., Clifton P.M.* Short-Chain Fatty Acids and Human Colonic Function: Roles of Resistant Starch and Nonstarch Polysaccharides // *Physiological Reviews.* – 2001. – 81. N 3. – P. 1031–1064.
15. *Rocio Garcia-Villalba Juan A., Gimenez-Bastida Maria T., Garcia-Conesa Francisco A. et al.* Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of shot-chain fatty acids in faecal samples. // *J. Sep. Sci.* – 2012. – 35, – P. 1906–1913.
16. *Sekirov I., Russell S. L., Antunes L.C.M., Finlay B.B.* Gut Microbiota in Health and Disease // *Physiological Reviews.* – 2010. – 90. – P. 859–904.

Стаття надійшла до редакції 07.07.2014 р.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють 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 дисківі (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 абревіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

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.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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

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



На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения 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 11.06.2015 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 8,5. Тираж 100 пр.
Зам. № 1163.

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