

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Засновано у липні 2006 року
Виходить 4 рази на рік

№ 1(21)
2013

Одеса
2013

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), Ю.Л. Волянський (Харків, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), 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), Б.Н. Мілкус (Одеса, Україна), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немялтовський (Варшава, Польща), В.П. Патица (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), Ю.М. Сиволап (Одеса, Україна), І.Г. Скрипаль (Київ, Україна), М.Я. Співак (Київ, Україна), Ф.І. Товчак (Київ, Україна), В.М. Тоцький (Одеса, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна), І.С. Щербатенко (Київ, Україна)

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

Свідоцтво: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

Затверджено до друку Вченою радою

Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

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

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.: 723-28-39,

e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2013

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

I.V. Dovgal (Kyiv, Ukraine), V.O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B.M. Galkin (Odesa, Ukraine), 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), B.N. Milkus (Odesa, Ukraine), G.G. Minicheva (Odesa, Ukraine), M. Niemialtowsky (Warsaw, Poland), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S.A. (Odesa, Ukraine), V.S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), V.P. Polishuk (Kyiv, Ukraine), V.K. Pozur (Kyiv, Ukraine), I.S. Sherbatenko (Kyiv, Ukraine), I.G. Skrypal (Kyiv, Ukraine), M.Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A.A. Sybirny (Lviv, Ukraine), Yu.M. Sivolap (Odesa, Ukraine), V.M. Totsky (Odesa, Ukraine), F.I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L.D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A.I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), Yu.L. Volyanskiy (Kharkiv, Ukraine), Yu.P. Zaytsev (Odesa, Ukraine)

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.

Registration certificate: KV № 19409. Date of issue 17.08.2012.

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

Tel.: 723-28-39, e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov
University, 2013

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ	
Є.С. Воробей, О.С. Воронкова, І.В. Маліновська, А.І. Вінніков БАКТЕРІОФАГИ ТА ЇХ ВПЛИВ НА БАКТЕРІАЛЬНІ БІОПЛІВКИ	6
Е К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н І П Р А Ц І	
О.О. Юрченко, Д.О. Дубіна, Н.О. Виноград МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ КЛІЩОВОГО ЕНЦЕФАЛУ, ЯКІЙ ЦИРКУЛЮЄ В ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОМУ ПРИЧОРНОМОР'І	20
М.Б. Галкін, В.О. Іваниця СИНТЕЗ ПІОЦІАНІНУ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ЗА ВПЛИВУ ВІСМУТОВИХ МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ ПОРФІРИНІВ ТА АУТОІНДУКТОРІВ СИСТЕМИ <i>QUORUM SENSING</i>	29
Л.В. Лейбенко, В.П. Полішук, Л.В. Радченко, А.П. Міроненко ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ ЛЮДЕЙ A(H ₃ N ₂), ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В ЕПІДЕМІЧНОМУ СЕЗОНІ 2011–2012 РОКІВ	37
Г.О. Іутинська, В.А. Циганкова, Л.О. Білявська, В.Є. Козирицька ВПЛИВ НОВИХ БІОПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ АВЕРКОМУ НА РОЗВИТОК І ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ СИНТЕЗУ si/miРНК	48
І.О. Скороход, І.К. Курдиш ВПЛИВ НАНОЧАСТОЧОК ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ ТА ВЕРМИКУЛІТУ НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> IMB B-7023	59
Т.Є. Волошко, О.В. Федотов ВПЛИВ ДЕЯКИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ БАЗИДІОМІЦЕТІВ	68
С.О. Білоіваненко, А.Є. Бухтіяров РЕЗИСТЕНТНІСТЬ <i>RHODOTORULA RUBRA</i> G2/1 ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ЇХ АДСОРБЦІЯ	81
Н.В. Тряпціна, К.М. Удовиченко, С.О. Васюта, Т.В. Медведєва, В.В. Ярушников, В.М. Удовиченко ВИЯВЛЕННЯ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ШАРКИ СЛИВИ В НАСАДЖЕННЯХ СХІДНОГО СТЕПУ УКРАЇНИ	89
АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2012 РОЦІ	99
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	106

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- E.S. Vorobey, O.S. Voronkova, I.V. Malinovska, A.I. Vinnikov**
BACTERIOPHAGES AND THEIR EFFECT ON BACTERIAL BIOFILMS6

EXPERIMENTAL WORKS

- O.A. Yurchenko, D.A. Dubina, N.A. Vynograd**
MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS
OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS CIRCULATING IN THE
NORTHWEST BLACK SEA COAST..... 20

- M.B. Galkin, V.O. Ivanytsia**
PSEUDOMONAS AERUGINOSA PYOCYANIN BIOSYNTHESIS
IN PRESENCE OF PORPHYRINES BISMUTH COMPLEXES AND
QUORUM SENSING AUTOINDUCERS..... 29

- L.V. Leibenko, V.P. Polischuk, L.V. Radchenko, A.P. Mironenko**
PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN INFLUENZA VIRUSES
A(H₃N₂), ISOLATED IN UKRAINE DURING THE 2011–2012
EPIDEMIC SEASON 37

- H.O. Iutinska, V.A. Tsygankova, L.O. Beljavaska, V.E. Kozyritska**
INFLUENCE OF NEW BIOPREPARATIONS BASED ON AVERKOM
ON DEVELOPMENT AND PRODUCTIVITY OF THE PLANTS AND
ON EXPRESSION OF GENES OF si/miRNA SYNTHESIS 48

- I.O. Skorochoch, I.K. Kurdish**
ВПЛИВ НАНОЧАСТОЧОК ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ
ТА ВЕРМИКУЛІТУ НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ *BACILLUS SUBTILIS*
IMB B-7023 59

- T. Voloshko, O. Fedotov**
INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF SILICA AND VERMICULITE
ON ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENCE 68

- S.O. Biloivanenko, A.Y. Bukhtiyarov**
RESISTANCE OF *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 TO HEAVY METALS
AND THEIR ADSORPTION..... 81

- N.V. Triapitsyna, K.M. Udovychenko, S.O. Vasyuta,
T.V. Medvedyeva, V.V. Yarushnikov, V.M. Udovychenko**
DETECTION OF *PLUM POX VIRUS* ISOLATES IN THE ORCHARDS
OF THE EASTERN STEPPE OF UKRAINE 89

- АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У
ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2012 РОЦІ..... 99

- INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 110

УДК 615.371:578.7

Є.С. Воробей, О.С. Воронкова, І.В. Маліновська, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр-т Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, Україна, тел.: +38(056) 374 97 34,
e-mail: elizaveta.vorobey@mail.ru

БАКТЕРІОФАГИ ТА ЇХ ВПЛИВ НА БАКТЕРІАЛЬНІ БІОПЛІВКИ

Огляд присвячено питанням взаємодії бактеріофагів і бактеріальних клітин у біоплівці та можливостям регулювання росту біоплівки за участі бактеріофагів. Необхідність вирішення даної проблеми виникає через значне поширення стійкості клінічних ізолятів бактерій до антибіотиків, що визначає зниження ефективності антибіотичної терапії в цілому. У сучасній клінічній практиці виявлено зростання кількості захворювань, зумовлених розвитком біоплівки, у складі якої бактерії отримують додаткові переваги, у тому числі і підвищення резистентності до дії антибіотиків. Показано особливості фагової інфекції по відношенню до вільних клітин бактерій та до клітин у складі мікроколоній у біоплівці. Представлені дані розкривають можливості бактеріофагів у боротьбі з бактеріальними біоплівками, що складаються з умовно-патогенних бактерій. Наведено дані про механізм взаємодії фагів з клітинами бактерій у біоплівці та можливості руйнування фаговими ферментами міжклітинного матриксу.

Ключові слова: бактеріофаги, мікробні біоплівки, регуляція росту біоплівки, біологічні властивості бактерій.

В останній час відмічається підвищення інтересу до дослідження вірусів бактерій — бактеріофагів та їх використання як допоміжних засобів для лікування інфекційних захворювань. У ряді досліджень [8, 12, 18, 24] встановлено, що за розвитку інфекції відбувається утворення біоплівок, до складу яких входять умовно-патогенні та патогенні бактерії, і утворення таких угруповань призводить до посилення прояву їх факторів патогенності. У зв'язку із поширенням антибіотико-резистентності патогенних мікроорганізмів, різким зниженням темпів розробки та комерціалізації нових антибактеріальних препаратів та відкриттям ролі

© Є.С. Воробей, О.С. Воронкова, І.В. Маліновська, А.І. Вінніков, 2013



біоплівок, які містять стійкі до класичних антибіотиків бактерії, у розвитку хронічних інфекцій в останні 20 років інтерес до фаготерапії різко зріс, як у вітчизняній, так і в західній медицині [29, 31]. Антибактеріальний ефект препаратів вірулентних бактеріофагів зумовлений проникненням фага у бактеріальну клітину з подальшим його розмноженням і лізисом інфікованої клітини. Бактеріофаги, які виходять у зовнішнє середовище в процесі лізису, у свою чергу інфікують і лізують інші бактеріальні клітини, діючи до повного знищення патогенних бактерій у вогнищі запалення [13].

У межах даного напрямку досліджень проводиться виділення вірулентних бактеріофагів та вивчення їх біологічних властивостей з метою вибору вірусів ефективних проти плівкоутворювальних штамів патогенних бактерій.

Метою роботи було проаналізувати інформацію про взаємодію бактеріофагів з бактеріями, що утворюють біоплівки.

Біологічні властивості бактерій у складі біоплівки

Сучасними дослідженнями показано, що більшість бактерій існують у природних екосистемах не у вигляді вільноплаваючих (планктонних) клітин, а у вигляді специфічно організованих і прикріплених до субстратів співтовариств — біоплівок, утворення яких є складнорегульованим біологічним процесом [11]. Як приклад плівкоутворювальних бактерій можна навести *S. epidermidis*, який входить до складу нормальної мікробіоти тіла людини, але при цьому здатен викликати важкі ураження всіх органів та систем.

Мікроорганізми утворюють біоплівки на будь-яких біотичних та абіотичних поверхнях, що створює великі проблеми у різних сферах господарської діяльності, в тому числі і у медичній практиці. Як тепер встановлено, біоплівки є одним з патогенетичних чинників формування хронічних інфекційних процесів [19].

Протягом довгого часу вважалося, що мікробні біоплівки утворюються тільки на поверхні виробів медичного призначення, таких як сечові катетери, ендотрахеальні трубки, ортопедичні і грудні імпланти, контактні лінзи, внутрішньоматкові пристосування та хірургічні нитки. Але біоплівки є основними джерелами захворювань, які характеризуються важкими бактеріальними інфекціями і хронічним запаленням, наприклад захворювання періодонта, фібрози сечового міхура, хронічні акне і остеомієліти. Біоплівки також утворюються в ранах, що уповільнює процес загоєння. Так, електронна мікроскопія біоптатів з хронічних ран показала, що 60% зразків містили біоплівки, на відміну від 6% зразків біоптатів зі свіжих ран [4, 18, 19, 35].

На сьогоднішній день роль бактеріальних біоплівок в інфекційній патології, ймовірно, до кінця ще не оцінена, однак висловлюється при-

пушення, що до 80% всіх інфекційних хвороб пов'язано з утворенням біоплівки [18].

Відкриття бактеріальних біоплівок, що утворюються практично за будь-якого інфекційного процесу, виявило невідомі раніше чинники недостатньої ефективності використання антибіотиків.

Дослідження останніх років свідчать, що дія антибіотиків на бактерії в співтовариствах залежить не тільки від властивостей мікроба і антибіотика, але й від будови і складу біоплівки. У біоплівках бактерії виживають в присутності антибіотиків, доданих у кількості набагато більшій, ніж їх мінімальна пригнічувальна концентрація. Встановлено, що в основі підвищеного виживання лежать властивості клітин і позаклітинного матриксу [19].

На сьогодні встановлено низку чинників, відповідальних за такий важливий для клінічного застосування феномен, як резистентність біоплівок до антибіотиків. До них, зокрема, належать: інактивація антибіотиків позаклітинними полімерами чи ферментами; сповільнення метаболізму і, відповідно, зменшення швидкості росту мікроорганізмів в умовах лімітування поживних речовин у біоплівці, через що антибактеріальний препарат дифундує з біоплівки швидше, ніж встигає на неї подіяти; експресія можливих генів резистентності до антибіотиків; поява в біоплівці під дією антибіотиків мікроорганізмів-персистерів [20].

Показано, що для підвищення ефективності дії антибіотиків можна впливати не тільки на самі бактерії, але і на компоненти матриксу — білки, ліпіди і нуклеїнові кислоти, наприклад, використовуючи ферменти: протеази, ліпази, нуклеази. Раніше проведені дослідження показали низку невідомих ефектів ферментів: здатність змінювати морфологію та властивості мікробних біоплівок, зменшувати кількість матриксу і оптичну густину колоній, а також посилювати гальмівну дію антибактеріальних препаратів [21, 24].

У складі біоплівки знижується доступ антибіотиків до бактеріальних клітин: частина їх зв'язується у матриксі, а частина — взаємодіє з крайніми клітинами мікроколонії, забезпечуючи виживання внутрішніх її членів. Отже, існування мікроорганізмів у спільноті екологічно вигідніше, ніж існування у формі окремих клітин. Екологічні переваги існування мікроорганізмів у біоплівках полягають у прискоренні доступу до органічних речовин через метаболічну кооперацію клітин; у захисті від негативного впливу багатьох екологічних загроз, включаючи біоциди, антибіотики, антитіла, поверхнево-активні речовини, бактеріофаги, фагоцити, ультрафіолетове опромінення, зміна рН, висушування [11]; у набутті резистентності до бактерицидних агентів. Так, концентрація антибіотиків для впливу на бактерії біоплівки в окремих випадках може бути за різними даними у 10–100 [35] та навіть 500–1000 [19] разів вища,



ніж для планктонних форм цих бактерій. Отже, стандартне лікування антибіотиками знищує планктонні клітини, але меншою мірою впливає на бактерії у біоплівці. Тому після закінчення лікування можливий рецидив патологічного процесу [35].

Сьогодні можна зробити припущення, що для більшості бактерій стан біоплівки, прикріпленої до поверхні, є базовим, виробленим протягом мільйонів років під впливом природного відбору в умовах, які постійно змінювалися. Звідси випливає, що ефективність будь-яких антимікробних препаратів (лікувальних, дезінфікувальних, мийно-дезінфікувальних) необхідно визначати за їх дією на мікроорганізми у біоплівці та вважати ефективними не мінімальні концентрації, що пригнічують ріст планктонних культур, а ті, що діють на мікроорганізми у складі біоплівок [18].

Перспективи та можливості застосування фагових препаратів для лікування уражень, викликаних плівкоутворювальними штамми

Поширення антибіотикостійкості бактерій, а також відкриття ролі біоплівок, стійких до класичних антибіотиків, у розвитку хронічних інфекцій відродили інтерес до терапії бактеріофагами [10]. Використання препаратів бактеріофагів стимулює активізацію факторів специфічного і неспецифічного імунітету [2, 40]. Тому препарати бактеріофагів застосовуються не тільки для лікування і профілактики інфекційних захворювань, але і використовуються також для контролю стану імунної системи у пацієнтів з імунодефіцитами [22]. Так, наприкінці 2009 р. у Стокгольмі відбулася конференція «Інноваційні завдання в області ефективності антибактеріальних препаратів». У межах цього заходу фахівцями було повідомлено, що в країнах ЄС від інфекцій, спричинених бактеріями, які мають множинну стійкість до антибіотиків, помирає більше 25 000 пацієнтів на рік. Розробка нових антибіотичних препаратів, їх клінічні випробування та реєстрація займають багато років і обходяться у надмірно великі суми. Застосування антибіотиків у клінічній практиці, крім загальновідомих побічних ефектів, призводить до виникнення форм бактерій, стійких до нових синтезованих препаратів. У листопаді 2009 р. в Москві у рамках круглого столу «Ера антибіотиків закінчується: альтернативні можливості антибактеріальної терапії» представником об'єднаної робочої групи Європейського центру з контролю і профілактики захворювань (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) і Європейського агентства з оцінки лікарських засобів (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMA) було особливо відзначено той факт, що в період з 70-х по 90-ті рр. минулого століття не відкрито жодного нового класу антибіотиків. Лише у 2000-х рр. з'явилися препарати класу циклічних ліпопептидів і оксазолідинонів. Як наслідок, кількість нових препаратів антибіотиків також неухильно скорочується

[13]. Так, у США за період з 1991 по 1995 рр. Управлінням з контролю за продуктами і ліками США (US Food and Drug Administration, FDA) було схвалено 26 препаратів, у той час як з 2000 по 2003 рр. — всього 3 [36]. Множинна резистентність до антибіотиків у бактерій зумовила необхідність пошуку та застосування альтернативних засобів лікування, серед яких використання фагів виявилось найефективнішим [38].

Звичайно, що антибіотикотерапія є і буде основним заходом для лікування бактеріальних уражень у людини та водночас є потреба у використанні ефективних допоміжних терапевтичних засобів, які не шкодитимуть людині та її мікробіоті і будуть високоспецифічними до патогенів.

Одним з напрямів пошуку перспективних препаратів для пригнічення мікроорганізмів є вивчення геномів мікроорганізмів і виявлення у їх складі послідовностей, відповідальних за стійкість до антибіотиків та будь-якого іншого зовнішнього впливу, а також можливостей регуляції функціонування цих генів з метою їх пригнічення. Проводиться це з метою вивчення молекулярних основ патогенності, що відкріє нові шляхи лікування інфекційних захворювань, але цей підхід занадто вартісний і потребує багато часу.

Альтернативою до антибіотиків і хімотерапевтичних препаратів є лікувальні бактеріофаги, на ефективність дії яких не мають впливу чутливість або резистентність бактерій до антибіотиків [7]. Цикли репродукції специфічних бактеріофагів з їх накопиченням в місці локалізації запального процесу є важливою особливістю фаготерапії, що відрізняє її від застосування суто хімотерапевтичних засобів, з широким антимікробним спектром, який часто порушує і склад нормальної мікробіоти організму хазяїна [34].

За сучасними нормами з метою фагової терапії використовуються тільки вірулентні бактеріофаги, тобто такі, розмноження яких відбувається шляхом літичного циклу. При цьому кожна інфікована клітина після певного проміжку часу, так званого латентного періоду, лізується, звільняючи 50–200, а іноді і більше часток бактеріофага. Таким чином концентрація фагових часток постійно збільшується, що призводить до повного знищення чутливого мікроорганізму. Однак в реальних системах процесу розмноження вірусу протистоять процеси руйнування вірусних часток та їх виведення з досліджуваної системи [13]. У разі фагової терапії найбільше значення в цьому сенсі мають поглинання фагів клітинами ретикуло-ендотеліальної системи, зниження їх кількості за рахунок зв'язування з еритроцитами, клітинами тканин або міжклітинним матриксом, руйнування в результаті адсорбції на мертвих клітинах або таких, що мають специфічні системи стійкості, а також виведення з організму із сечею або калом. Важливо також зазначити, що розмноження фагів у більшості випадків локалізовано у вогнищі інфекції,



тоді як розсіювання потомства фагів часто відбувається у масштабі всього організму. Якщо швидкість розмноження бактеріофагів *in situ* перевищує швидкість їх розсіювання та/або руйнування, то концентрація фагів буде рости до вичерпання доступних клітин хазяїна. У цьому випадку говорять про активну фагову терапію [23]. Ймовірно, саме такий сценарій реалізується при фаготерапії ряду кишкових інфекцій, у тому числі експериментальних. У цих випадках достатньо одного або декількох прийомів фага, щоб добитися одужання [14]. У випадку ж, коли для підтримки концентрації фагів, необхідної для пригнічення бактеріального росту, необхідно введення значних кількостей фага ззовні, як це буває при лікуванні більшості хронічних інфекцій, можна говорити про пасивну терапію [23].

За реальної фагової терапії більшість бактеріальних популяцій колонізують лише обмежені ніші в організмі, при цьому значна частина бактерій може перебувати у фізіологічних станах, несприятливих для розмноження фага, наприклад у складі біоплівок [33].

Взаємодія бактеріофагів із бактеріальними клітинами у складі біоплівок

Бактерії, що колонізують організм, згруповані у високогідратований екзополіцукридно-муциновий матрикс. Спостережувані під мікроскопом бактерії у біоплівках розподілені нерівномірно. Вони утворюють мікроколонії, оточені обволікаючим міжклітинним матриксом, який є внутрішнім середовищем біоплівки з регульованим мікроелементним складом і сигнальними речовинами, що продукуються мікроорганізмами одного виду і регулюють розвиток плівки, а також здійснюють вплив на всіх симбіонтів плівки, незалежно від того, який характер цього впливу — позитивний чи негативний [15].

Зростає інтерес до природної ролі бактеріофагів в модуляції розвитку біоплівок і, особливо, до потенційної можливості використання бактеріофагів для контролю утворення біоплівок в різних умовах [5].

Взаємодія фага з біоплівкою може бути диференційована за категоріями. Наприклад, фаги, поряд з іншими вірусами можуть потрапляти у біоплівку і залишатися у неспецифічній позаклітинній полімерній речовині (EPS), не потрапляючи до клітин бактерій. Внаслідок розвитку фагової інфекції вірогідна деградація цих полімерів і перешкоджання подальшому формуванню біоплівки через масову загибель, а отже неможливість агрегації планктонних клітин [21]. На рис. 1 представлений сценарій взаємодії фага з біоплівкою, що призводить до літичної інфекції, тобто фаг виступає як деградуючий EPS деполімеризаційного фактора.

Біоплівки також можуть чинити опір фаговій інфекції [21].

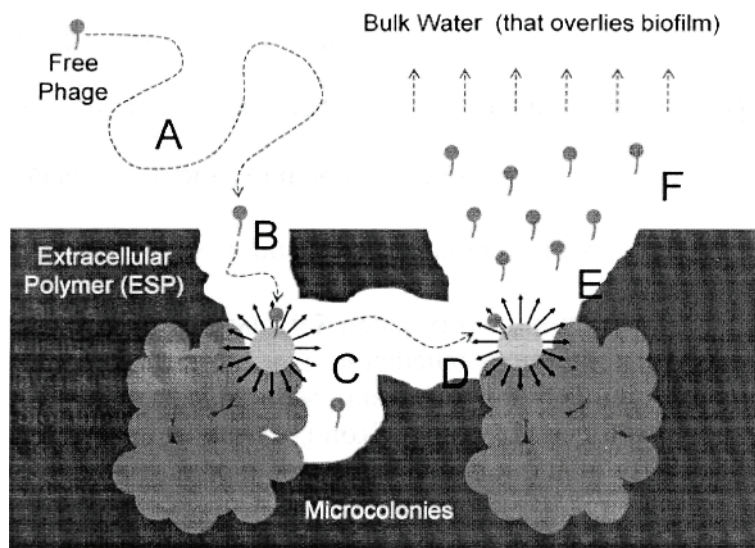


Рис. 1. Знищення біоплівки фагом.

A — розповсюдження вільного фага вище поверхні біоплівки. B — зіткнення вільного фага з біоплівкою, що завершується поглинанням бактеріофага позаклітинною полімерною речовиною. C — проникнення бактеріофага у чутливу бактерію, що супроводжується розвитком інфекційного процесу та вивільненням фагового потомства. Наступна додаткова деполімеризація EPS зустрічається наряду з поширенням фагового потомства (початкові стадії останнього вказані як чорні стрілки). D — простежується шлях єдиного бактеріофага, який зтикається з бактерією, пов'язаною із сусідньою мікроколонією. Це супроводжується її інфекцією та розривом. E — розрив та вивільнення бактеріофагів до поверхні біоплівки. F — поширення вільного бактеріофага у рідину із подальшим поглинанням біоплівкою (за Stephen T. Abedon) [21]

Fig. 1. Exploitation of a biofilm by a phage.

(A) Free phage diffusion above the biofilm. (B) Free-phage encounter with biofilm EPS resulting in local EPS digestion. (C) Phage encounter with a susceptible bacterium that is followed by phage burst and phage progeny release. Subsequent additional EPS depolymerization occurs along with dissemination of released free phages (the initial stages of the latter is shown as black arrows). (D) The path of a single phage is traced, which encounters a bacterium associated with a nearby microcolony. This is followed by infection and burst. (E) Burst proceeds as previously indicated except that here the path of released phages toward the biofilm surface is indicated. (F) Free-phage dissemination into bulk water toward subsequent biofilm acquisition [21]

Протистояння біоплівкових бактерій фагам відбувається завдяки природним асоціаціям бактерій, які впродовж свого існування продукують не однотипові, а різноманітні асоціативні екзополімерні комплекси, які перешкоджають з'єднанню фагової деполімерази та проникненню фагів всередину біоплівкового матриксу [25, 39]. Однак геном бактеріофага містить гени, експресія яких приводить до синтезу специфічних ферментів фагової інфекції — поліцукридеполімерази, завдяки яким може руйнувати



захисний шар екзополімеру і діставатися поверхні бактерій. Показано [21], що відбувається руйнація полімеру, протягом якої взаємодія деполімерази фага з клітиною за рахунок гліканази призводить до поєднання бактеріофага з первинним рецептором клітини. Процес призводить до ураження клітин біоплівки та їх загибелі.

Важливо, що фагова інфекція викликає порушення структури біоплівки, роблячи клітини, які залишилися там, доступними для імунної системи. Бактеріофаги, вочевидь, здатні інфікувати і клітини-персистери, які багато в чому зумовлюють невдачі антибактеріальної хіміотерапії такого роду інфекцій [30]. Просторова неоднорідність структури біоплівок, а також багатьох мікросередовищ у організмі людини і тварин може призводити до того, що хвилеподібне поширення фагової інфекції у популяції бактерій поволі затихає [14].

Передбачається, що деякі фаги можуть нести «вторинні» білки адгезії, не пов'язані безпосередньо з апаратом, що забезпечує проникнення ДНК всередину клітини. Багато таких можливих вторинних адгезинів несуть імуноглобулін-подібні домени, експоновані на поверхні головок, на скорочуваних чохлах хвостового відростка або на кінці комірцевих ниток фагів [26]. Деякі фаги можуть нести на комірцевих нитках домени, схожі з адгезинами, які не подібні до імуноглобулінів [26].

Дані про те, що подібні структури можуть бути суттєвими для культивування фагів у лабораторних умовах, поки відсутні, проте у певній екосистемі, наприклад, подібній як у кишечнику тварин, їх роль може бути помітною, зокрема за рахунок збільшення ймовірності конвертованої адсорбції при зіткненні фагової частки з потенційно придатною клітиною-хазяїном. Збільшення швидкості адсорбції, проте, «вигідне» далеко не у всіх випадках [14]. При вирощуванні фагів на культурі хазяїв з високою кількістю клітин, імобілізованих у в'язкому агаризованому середовищі (наприклад, при посіві двошаровим методом), мутанти, що мають нижчу константу адсорбції, отримують значну перевагу і утворюють бляшки більшого розміру і з великим вмістом вірусних часток [27]. Це пов'язано із збільшенням швидкості дифузії вірусу як в межах в'язкого середовища, насиченого клітинами хазяїв, так і в навколишню рідку фазу. Аналогічні переваги фаги, що повільно адсорбуються, можуть мати при розвитку всередині біоплівок і при поширенні на нові ділянки [14]. Механізми, що призводять до зворотної втрати другорядних адгезинів (наприклад, частини хвостових фібрил багатьох фагів) можуть мати, таким чином, істотне значення при адаптації фага до зростання на біоплівках бактерій або на планктонних клітинах [27].

Сучасні лікувально-профілактичні бактеріофаги являють собою комплекс поліклональних високовірулентних бактеріальних вірусів, спеціально підібраних проти груп збудників бактеріальних інфекцій, що найчастіше зустрічаються [1]. Сьогодні номенклатура розроблених

препаратів бактеріофагів налічує понад десяток найменувань. Враховуючи широкий спектр їх лікарських форм та численність торгівельних марок, під якими вони випускаються, їх кількість збільшується до 3–4 десятків. Серед цих препаратів виділяють монофаги (стафілококовий, стрептококовий, ешерихіозний, протейний, псевдомонадний, клебсієльозний) та комбіновані фаги [3]. Відомі комбіновані препарати з декількох видів бактеріофагів: колі-протейний, піобактеріофаг (проти стафілококів, стрептококів, клебсієл, протеїв, синьогнійної і кишкової палички), інтесті-фаг (проти шигел, сальмонел, стафілококів, ентерококів, протеїв, кишкової і синьогнійної палички) [7], секстафаг для лікування гнійно-септичних захворювань [9]. Для лікування захворювань вірусно-бактеріального походження виготовлено комплексний препарат Інтерфаг, який містить інтерферон та фаг. Для лікування опікових ран розроблено Bioderm, виготовлений з полімеру, до якого входять бактеріофаг і інші ліки [3].

Здатність вірулентних фагів при взаємодії з бактеріями інтегрувати власну геномну ДНК і експоненційно реплікуватися призводить до знищення патогенних бактерій, а отже, вказує на те, що вони можуть грати важливу роль у боротьбі з інфекційними захворюваннями, у тому числі і зумовленими розвитком біоплівки [16].

Бактеріофаги мають високий терапевтичний потенціал і використовуються як антибактеріальні агенти для терапії вже багато років. Однак ефективність бактеріофагів є нижчою через їх високу специфічність до хазяїв, ніж у хімічних антибіотиків, у зв'язку з чим терапевтичні бактеріофаги залишаються допоміжними засобами при бактеріальних інфекціях [10].

Відзначені позитивні якості бактеріофагів: відсутність токсичної дії на організм, розвиток алергійних реакцій, дисбактеріозів. Протипоказань до застосування бактеріофагів нема [6].

Препарати бактеріофагів періодично збагачуються новими фаговими клонами, що дозволяє їм відповідати змінам рецепторної структури збудників. У зв'язку з небезпекою поширення внутрішньолікарняних інфекцій, резистентних до більшості або до всіх відомих антибіотиків, ведуться роботи по виділенню з бактеріофагів компонентів, які згубно діють на бактеріальні клітини, а також з отримання ділянок ДНК бактеріофагів, відповідальних за синтез бактерицидних агентів; створюються комплексні препарати бактеріофагів для застосування у лікувальних і діагностичних цілях [17].

Наукова методологія може бути спрямована на терапію фагами як автономну терапію для інфекцій, які є повністю стійкими до антибіотиків [28, 32, 37].



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Акимкин В.Г., Дарбеева О.С., Колков В.Ф.* Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы // Клиническая практика. — 2010. — № 4. — С. 48–54.
2. *Алсынбаев М.М., Медведев Ю.А., Туйгунов М.М.* Биопрепараты и ведущие направления их лечебно-профилактического применения. — Уфа: РИО филиала “Иммунопрепарат” ФГУП “НПО “Микроген” МЗ РФ, 2008. — 100 с.
3. *Асланов Б.И., Яфаев Р.Х., Зуева Л.П.* Пути рационального использования синегнойных бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2003. — № 5. — С. 72–77.
4. *Афиногенова А.Г., Грабовская К.Б., Кулешевич Е.В., Суворов А.Н., Афиногенов Г.Е.* Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека // Инфекции в хирургии. — 2011. — Т. 9, № 1. — С. 5–13.
5. *Бактериофаги: биология и практическое применение* / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. — М.: Научный мир, 2012. — 640 с.
6. *Бондарев Р.В., Бондарев В.И., Селиванов С.С., Орехов А.А.* Применение адаптированных бактериофагов в комплексном лечении больных острым гнойным холангитом // Український журнал хірургії. — 2011. — № 5. — С. 150–154.
7. *Бондаренко В.М.* Клинический эффект и пути рационального использования лечебных бактериофагов в медицинской практике // Журнал инфектологии. — 2011. — Т. 3, № 3. — С. 15–19.
8. *Вознесенский Н.А.* Биопленки — терапевтическая мишень при хронических инфекциях // Пульмонология и алергология. — 2008. — № 3. — С. 56–64.
9. *Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Цирульникова О.М.* Возможности использования бактериофагов в хирургии и трансплантологии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2012. — Т. XIV, № 1. — С. 106–113.
10. *Дятлов И.А., Светоч Э.А.* Новации в борьбе с антибиотикоустойчивыми штаммами бактериальных инфекций // Современные медицинские технологии. — 2011. — № 6. — С. 32–36.
11. *Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л.* Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. — 2004. — Т. 40, № 11. — С. 1445–1456.
12. *Коцар О.В.* Аналіз проблеми антибіотико- та фаготерапії захворювань, зумовлених патогенною та умовно-патогенною мікрофлорою // Буковинський медичний вісник. — 2009. — Т. 13, № 3. — С. 123–127.



13. Красильников И.В., Лыско К.А., Отрашевская Е.В. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития // Сибирский медицинский журнал. — 2011. — Т. 26, № 2. — С. 33–37.
14. Летаров А.В., Голомидова А.К., Тарасян К.К. Экологические основы рациональной фаговой терапии // Acta Naturae. — 2010. — Т. 2, № 1. — С. 66–79.
15. Микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. В.Н. Царёва. — М.: Практическая медицина, 2009. — 581 с.
16. Мирошников К.А., Чертков О.В., Назаров П.А., Месянжинов В.В. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов — перспективные противобактериальные агенты // Успехи биологической химии. — 2006. — Т. 46. — С. 65–98.
17. Романова С. Бактериофаги ... или перспективные вирусы // Ремедиум. — 2009. — № 11. — С. 54–55.
18. Сидоренко С.В. Роль бактериальных биопленок в патологии человека // Инфекции в хирургии. — 2004. — Т. 2, № 3. — С. 16–20.
19. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. — 2010. — Т. 79, № 4. — С. 435–446.
20. Тодосійчук Т.С., Стрелець Т.І., Конопатська С.В. Підвищення стійкості мікробних патогенів як фактор розробки нових антисептиків // Наукові вісті НТУУ «КПІ». — 2011. — № 3. — С. 90–97.
21. Abedon S.T. Bacteriophages and Biofilms: Ecology, Phage Therapy, Plaques / S.T. Abedon. — New York: Nova Science Publishers, Hauppauge, 2011. — 131 p.
22. Brockstedt D.G., Bahjat K.S., Giedlin M.A., Liu W., Leong M., Lockett W., Gao Y., Schnupf P., Kapadia D. & other authors. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity // Nature Med. — 2005. — V. 11. — P. 853–860.
23. Cairns B.J., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., Payne R.J.H. (2009) Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy // PLoS Pathog. — 2009. — V. 5(1): e1000253. doi:10.1371/journal.ppat.1000253.
24. Costerton J.W., Montanaro L., Aciola C.R. Biofilm in implant infections: its production and regulation // Int. J. Artif. Organs. — 2005. — № 28. — P. 1062–1068.
25. Davey M.E., O'Tool G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiology and molecular biology reviews. — 2000. — V. 64, № 4. — P. 847–867.
26. Fraser J.S., Maxwell K.L., Davidson A.R. Immunoglobulin-like domains on bacteriophage: Weapons of modest damage? // Curr. Opin.



Microbiol. — 2007. — V. 10. — P. 382–387.

27. *Gallet R., Shao Y., Wang I.* High adsorption rate is detrimental to bacteriophage fitness in a biofilm-like environment // BMC Evolutionary Biology. — 2009. — V. 9. — P. 241–252.

28. *Harper D.R., Enright M.C.* Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections // Appl. Microbiol. — 2011. — V. 111 (1). — P. 1–7.

29. *Hawkey P.M., Jones A.M.* The changing epidemiology of resistance // J Antimicrob Chemother. — 2009. — V. 64. — P. 3–10.

30. *Lewis K.* Multidrug tolerance of biofilms and persister cells // Curr. Top. Microbiol. Immunol. — 2008. — V. 322. — P. 107–131.

31. *Livermore D.M.* Has the era of untreatable infections arrived? // J Antimicrob Chemother. — 2009. — V. 64. — P. 29–36.

32. *Loeffler J.M., Djurkovic S., Fischetti V.A.* Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia // Infect. Immun. — 2003. — V. 71. — P. 6199–6204.

33. *Macfarlane S., Dillon J.F.* Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract // J. Applied Microbiology. — 2007. — V. 102. — P. 1187–1196.

34. *Matsuzaki S., Rashel M., Uchiyama J., Sakurai S., Ujihara T., Kuroda M., Ikeuchi M., Tani T., Fujieda M., Wakiguchi H., Imai S.* Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases // J. Infect. Chemother. — 2005. — V. 11. — P. 211–219.

35. *Rodney M.* Biofilms formation a clinically relevant microbiological process // Healthcare epidemiology. — 2001. — V. 33. — P. 1387–1392.

36. *Veiga-Crespo P., Barros-Velazquez J., Villa T.G.* What can bacteriophages do for us? // Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology. — Spain : Formatex, 2007. — V. 2. — P. 885–893.

37. *Vinodkumar C.S., Makari H.K., Srinivasa H., Basavarajappa K.G., Kalsurmath S.* Bacteriophage therapy: A potential use of phages in medical field // Res. Rev. BioSciences. — 2009. — V. 12 (1). — P. 22–28.

38. *Vinodkumar C.S., Kalsurmath S., Neelagund Y.F.* Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrugresistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice // Indian. J. Pathol. Microbiol. — 2008. — V. 51. — P. 360–366.

39. *Webb J.S., Lau M., Kjelleberg S.* Bacteriophage and Phenotypic Variation in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development // J. Bacteriol. — 2004. — V. 186. — P. 8066–8073.

40. *Weber-Dabrowska B., Zimecki M., Kruzel M., Kochanowska I., Lusiak-Szelachowska M.* Alternative therapies in antibiotic-resistant infection // Advances in Medical Sciences. — 2006. — V. 51. — P. 242–244.

Стаття надійшла до редакції 25.01.2013 р.



Є.С. Воробей, О.С. Воронкова, І.В. Малиновская, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара,
пр-т Гагарина, 72, Днепропетровск, Украина, тел.: +38(056) 374 97 34,
e-mail: elizaveta.vorobey@mail.ru

БАКТЕРИОФАГИ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПЛЕНКИ

Реферат

Обзор посвящен вопросам взаимодействия бактериофагов и бактериальных клеток в биопленке и возможностям регулирования роста биопленки при участии бактериофагов. Необходимость решения данной проблемы возникает из-за значительного распространения устойчивости клинических изолятов бактерий к антибиотикам, что определяет снижение эффективности антибиотической терапии в целом. В современной клинической практике установлено возрастание количества заболеваний, обусловленных развитием биопленки, в составе которой бактерии получают дополнительные преимущества, в том числе и повышение резистентности к действию антибиотиков. Показаны особенности фаговой инфекции по отношению к свободным клеткам бактерий и клеткам в составе микроколоний в биопленке. Представленные данные раскрывают возможности бактериофагов в борьбе с бактериальными биопленками, состоящими из условно-патогенных бактерий. Приведены данные о механизме взаимодействия фагов с клетками бактерий в биопленке и возможности разрушения фаговыми ферментами межклеточного матрикса.

Ключевые слова: бактериофаги, микробные биопленки, регуляция роста биопленки, биологические свойства бактерий.



E.S. Vorobey, O.S. Voronkova, I.V. Malinovska, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dniepropetrovsk National University, 72, Gagarin ave., Dniepropetrovsk,
Ukraine, tel.: +38(056) 374 97 34, e-mail: elizaveta.vorobey@mail.ru

BACTERIOPHAGES AND THEIR EFFECT ON BACTERIAL BIOFILMS

Summary

The review is devoted to the questions of bacteriophages and bacterial cells interaction in a biofilm and to opportunities of regulation of biofilm growth by bacteriophages. Wide spread of antibioticresistance of clinical isolates of bacteria and decreasing of antibiotic therapy efficacy requires a new solution. In modern clinical practice there were observed increasing of number of the infections caused by bacterial biofilm, besides bacteria, as a part of this structure, possess some advantages, including resistance to antibiotics. The features of phage infection in plankton culture and in biofilm are shown. Submitted data describe possibilities of bacteriophages used against bacterial biofilms, which consist of conditionally-pathogenous bacteria. Data on the mechanism of interaction of phages with cells of bacteria are provided in a biofilm as well as possibility to destruct intercellular matrix by phage encoded enzymes.

Key words: bacteriophages, microbial biofilms, regulation of biofilm growth, biological properties of bacteria.



УДК 578.833.26:578.53|.083.2:577.21.08

О.А. Юрченко¹, Д.А. Дубина¹, Н.А. Виноград²

¹ГУ «Украинский научно-исследовательский противочумный институт имени И.И. Мечникова МЗ Украины», ул. Церковная, 2/4,

Одесса, 65003, Украина, тел.: +38 (095) 844 66 12, e-mail: oksyurch@ukr.net

²Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого, ул. Пекарская, 69, Львов, 79010, Украина, тел.: +38 (032) 276 28 35,

e-mail: vynogradNO@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В СЕВЕРО-ЗАПАДНОМ ПРИЧЕРНОМОРЬЕ

Проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена белка оболочки E штаммов вируса клещевого энцефалита 150, 70, 120 и Саврань 160, изолированных в Северо-Западном Причерноморье в 1988–1990 гг. На основе филогенетического анализа расшифрованных последовательностей подтверждена циркуляция в Северо-Западном Причерноморье европейского (западного) генотипа вируса. Проведенный анализ аминокислотных последовательностей выявил у штаммов вируса клещевого энцефалита 150, 70, 120 и Саврань 160 наличие четырех маркерных аминокислотных замещений – 67(N), 266(R), 306(V) и 407(R), в доменах II и III эктодомена и трансмембранном сегменте.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, ген белка оболочки E, секвенирование.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) — передающийся иксодовыми клещами арбовирус, вместе с вирусами Западного Нила, желтой лихорадки, японского энцефалита и денге относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* [17]. ВКЭ — один из основных патогенных для человека флавивирусов, эндемичен в северной части Евразии, где ежегодно регистрируется до 14000 случаев заболевания [13].

Развитие молекулярно-генетических технологий позволило расшифровать структуру генома (полипротеина) ВКЭ и дифференцировать 3 основных генотипа — дальневосточный (генотип 1), европейский, или западный (генотип 2) и сибирский (генотип 3) [6]. Специфичные для



каждого генотипа участки расположены в генах белка оболочки E [10], неструктурных белков NS1 [7] и NS5 [2]. Как правило, генотип вируса определяет форму и тяжесть течения клинически выраженного заболевания [3] и экологически связан с одним из основных видов клещей-переносчиков: *Ixodes persulcatus* (сибирский и дальневосточный), *Ixodes ricinus* (европейский) [10]. Каждый из генотипов вируса, как правило, доминирует на определенной территории, где в то же время могут циркулировать штаммы, относящиеся к другим генотипам [5].

К настоящему времени данные о генетических особенностях популяции ВКЭ в Украине ограничены изучением пяти штаммов. Штамм Семекс, изолированный в Волынской области, был отнесен к сибирскому генотипу ВКЭ [1], а изолированный в Крыму штамм Сгітеа — к дальневосточному [10]. Нашими предыдущими исследованиями было установлено, что в Крыму, наряду с дальневосточным, циркулировал европейский (западный) генотип ВКЭ (штаммы 80, 85 и 290) [8].

Целью настоящей работы явилось изучение молекулярной структуры гена белка оболочки E штаммов ВКЭ, изолированных в Северо-Западном Причерноморье (СЗП) в 1988–1990 годах.

Материалы и методы

Изоляцию и поддержание жизнеспособности штаммов ВКЭ проводили по стандартной методике [4]. Характеристика исследованных штаммов представлена в таблице.

Таблица

Характеристика исследуемых штаммов ВКЭ, выделенных из иксодовых клещей в СЗП

Table

Characteristic of the studied tick-borne encephalitis virus strains isolated from ticks in the North-West Black Sea Coast

Название штамма	Вид, количество и фаза развития клещей, способ сбора	Место сбора	Дата сбора
120	<i>Dermacentor marginatus</i> , 26 имаго, на флаг	Одесская область, Кикийский район, с. Приморское, 42 км трассы Кикия-Вилково	13-14.05.1988
Саврань 160	<i>Ixodes ricinus</i> , 35 имаго, на флаг	Одесская область, Савранский район, лес	11-16.05.1989
150	<i>Dermacentor marginatus</i> , 53 имаго, с КРС*	Херсонская область, Генический район, остров Бирючий	10-13.04.1990
70	<i>Dermacentor marginatus</i> , 35 имаго, с КРС*	Херсонская область, Генический район, остров Бирючий	12-14.04.1989

Примечание: * — КРС — крупный рогатый скот.



Секвенирование, выравнивание и сборку консенсусных последовательностей гена белка оболочки E, оценку филогенетических взаимоотношений изучаемых штаммов с известными геномными последовательностями 111-ти штаммов, изолированных в разные годы из различных источников (база данных GenBank), и трех прежде секвенированных нами штаммов ВКЭ 80, 85 и 290 проводили по методике, описанной ранее [8]. При построении филогенетического дерева в качестве внешней группы использовали геномные последовательности вирусов комплекса клещевого энцефалита. Статистическую оценку филогенетического дерева проводили с помощью бутстрэп-анализа с созданием 1000 случайных выборок [16].

Результаты и их обсуждение

В результате секвенирования определены нуклеотидные последовательности гена белка оболочки E штаммов ВКЭ 120, 150, 70 и Саврань 160, изолированных из иксодовых клещей в Одесской и Херсонской областях в 1988-1990 гг. Анализ нуклеотидных последовательностей выявил 100% идентичность гена E у всех четырех изучаемых штаммов, а также ранее секвенированных нами штаммов ВКЭ 80, 85 и 290, изолированных из иксодовых клещей в Крыму в 1989-1990 гг.

Расчет генетических или эволюционных дистанций показал более высокий уровень идентичности изучаемых штаммов со штаммами европейского генотипа — от 93,20% (штамм 12-8 изолирован из клещей *I. ricinus* в Италии в 2006 г., FJ917370.1 [9]) до 97,18% (штамм Рап изолирован от человека в Московской области в 1957 г., AF091015.1 [10]). При этом идентичность нуклеотидных последовательностей с сибирским и дальневосточным генотипами составила от 75,45% (штамм Usen-1 изолирован из клещей в России в 1986 г., EU072444.1 [1]) до 84,83% (штамм Vologda-2 изолирован из клещей *I. persulcatus* в России в 1990 г., AF229364.1 [18]).

Принадлежность штаммов 120, 70, 150, Саврань 160 к европейскому генотипу подтверждена данными филогенетического анализа (рис.) и наличием сигнатурных аминокислот 47(A), 88(G), 115(A), 178(E), 206(V), 267(A), 277(E), 317(A), 426(A), 431(S), 433(I) и 437 (V), характерных для штаммов европейского генотипа ВКЭ [10]. Данными филогенетического анализа установлено, что все изученные нами штаммы ВКЭ, изолированные на юге Украины, вместе со штаммом Рап формируют внутри европейского генотипа филогенетический кластер, обособленный от всех остальных штаммов европейского генотипа. Эволюция штаммов ВКЭ, изолированных на юге Украины, проходила независимо от остальных штаммов европейского генотипа ВКЭ и их дивергенция от общего со штаммом Рап предка произошла уже после разделения штаммов европейского генотипа на 2 кластера (рис.).





Рис. Фрагмент филогенетического дерева (NJ, Kimura 2-parameter model), иллюстрирующего генетическое родство южноукраинских изолятов ВКЭ (штаммы 80, 85, 290, 120, 70, 150, 160) и 111-ти прототипных штаммов ВКЭ, построено на основе нуклеотидных последовательностей целого гена белка оболочки E. Шкала показывает количество нуклеотидных замен на один сайт. Штаммы, секвенированные авторами, обозначены (●).

Fig. A fragment of a phylogenetic tree (NJ, Kimura 2-parameter model) illustrating the genetic relationships of the South Ukrainian TBEV isolates (strains 80, 85, 290, 120, 70, 150, 160) and 111 prototype strains of TBEV, constructed based on the nucleotide sequence of an envelope (E) protein gene. The scale indicates the number of nucleotide substitutions per site. Strains sequenced by the authors are indicated (●).

Анализ аминокислотных последовательностей показал наличие у южноукраинских штаммов четырех аминокислотных замещений — 67(N), 266(R), 306(V) и 407(R). Уникальное 67(N) и редко встречающееся 266(R) аминокислотные замещения расположены в домене II (аминокислотные остатки 52-136 и 190-284), выступающем над поверхностью вириона и, предположительно, участвующем в слиянии с клеточной мембраной [14]. Аргинин в позиции 266 обнаружен только у 2-х штаммов, изолированных из клещей *I. ricinus* в Швейцарии в 2009 г. (ZH Langnau a.A.1, HM468187.1 и ZH Langnau a.A.2, HM468188.1 [11]). У остальных анализируемых штаммов независимо от генотипа в позиции 67 находилась аспарагиновая кислота (D), а в позиции 266 — лизин (K).

Аминокислотное замещение 306(V), отличающее штаммы, изолированные на юге Украины от большинства анализируемых штаммов ВКЭ, расположено в домене III (аминокислотные остатки 303-395), который предположительно считается участком связывания с клеточным рецептором [14]. Валин (V) в позиции 306 обнаружен также у штаммов Pan (AF091015.1) и ZZ9 (изолирован из клещей *I. ricinus* в Австрии в 1985 г., AF091020.1) европейского генотипа [10], штаммов Oshima 5-10 (изолирован от человека в Японии в 1993 г., AB001026.1 [15]) и 178-79 (изолирован из клещей *I. persulcatus* в России в 1979 г., EF469661.1 [12]) дальневосточного генотипа и штаммов сибирского генотипа. У остальных анализируемых штаммов в позиции 306 находился метионин (M).

В трансмембранном сегменте за пределами эктодомена (аминокислотные остатки 1-395) у штаммов 120, 150, 70, 80, 85, 290 и Саврань 160 обнаружено аминокислотное замещение 407(R), характерное для штаммов сибирского и дальневосточного (в т.ч. штамм Crimea) генотипов и выявленное только у 2-х штаммов европейского генотипа — Pan (AF091015.1) и Stara Ves (изолирован в Хорватии, AF091018.1) [10].

Биологическая роль аминокислотных замещений до настоящего времени не ясна, но тот факт, что три из четырех маркерных аминокислот находятся на вирусной поверхности (67(N) и 266(R) — в домене II, 306(V) — в домене III эктодомена), может служить косвенным доказательством вовлечения этих маркерных аминокислот в процессы функционирования вируса.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили циркуляцию в СЗП европейского генотипа ВКЭ. Сравнительный филогенетический анализ гена белка оболочки E штаммов ВКЭ, изолированных в СЗП, показал гомогенность популяции европейского генотипа вируса на изучаемой территории. Установлено, что штаммы 120, 150, 70, 80, 85, 290 и Саврань 160 наиболее родственны штамму Pan и формируют с ним отдельный филогенетический кластер внутри европейского генотипа вируса. Вместе с тем, выявленная в СЗП циркуляция двух генотипов вируса — европейского и дальневосточного, свидетельствует о гетерогенности популяции ВКЭ в регионе.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адельшин Р.В., Злобин В.И., Беликов С.И. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита в европейской части России и некоторых странах Балтии, Восточной и Юго-Восточной Европы // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2006. — № 2. — С. 27–34.
2. Верховина М.М., Злобин В.И., Козлова И.В. и др. Эколого-эпидемиологический и молекулярно-генетический анализ популяции вируса клещевого энцефалита на территории Иркутской области // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. — 2008. — № 1. — С. 12–18.
3. Гратц Н. Трансмиссивные инфекционные заболевания в Европе. Их распространение и влияние на общественное здравоохранение // Европейское региональное бюро ВОЗ. — 2005. — 158 с.
4. Громашевский В.Л. Методы изоляции арбовирусов / Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований). — М., 1986. — С. 90–93.
5. Злобин В.И., Верховина М.М., Демина Т.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. — 2007. — № 6. — С. 4–13.
6. Локтев В.Б., Терновой В.А., Нетесов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита // Вопр. вирусол. — 2007. — № 5. — С. 10–16.
7. Погодина В.В., Карань Л.С., Колясникова Н.М. и др. Эволюция клещевого энцефалита и проблема эволюции возбудителя // Вопр. вирусол. — 2007. — № 5. — С. 16–21.
8. Юрченко О.А., Виноград Н.А., Дубина Д.А. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита в Крыму // Вопросы вирусологии. — 2012. — Т. 57, № 3. — С. 40–43.
9. Carpi G., Bertolotti L., Rosati S., Rizzoli A. Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy // J. Gen. Virol. — 2009. — Vol. 90, PT 12. — P. 2877–2883.
10. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // J. Gen. Virol. — 1999. — Vol. 80. — P. 179–185.
11. Gaumann R., Muhlemann K., Strasser M., Beuret C.M. High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 76, № 13. — P. 4241–4249.
12. Karan L.S., Zlobin V.I., Danchinova G.A. et al. Sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses // GenBank. — 2008. — Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF469661.1>.
13. Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus — a review of an emerging zoonosis // Journal of General Virology. — 2009. — Vol. 90. — P. 1781–1794.

14. *Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C., Kunz C., Harrison S.C.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature*. — 1995. — Vol. 375. — P. 291–298.

15. *Takashima I., Morita K., Chiba M. et al.* A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus // *J. Clin. Microbiol.* — 1997. — Vol. 35, № 8. — P. 1943–1947.

16. *Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. — 2011. — Vol. 28. — P. 2731–2739.

17. *Yun S.-M., Kim S.-Y., Han M.G. et al.* Analysis of the envelope (E) protein gene of tick-borne encephalitis viruses isolated in South Korea // *Vector-borne and zoonotic disease*. — 2009. — Vol. 9, № 3. — P. 287–293.

18. *Zlobin V.I., Mamaev L.V., Butina T.V. [et al.]* Sequence analysis of tick-borne encephalitis viruses for genetic typing // *GenBank*. — 2000. — Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF229364.1>.

Стаття надійшла до редакції 11.03.2013 р.

О.О. Юрченко¹, Д.О. Дубіна¹, Н.О. Виноград²

¹ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут імені І.І. Мечникова МОЗ України», вул. Церковная, 2/4, Одеса, 65003, Україна, тел.: +38 (095) 844 66 12, e-mail: oksyurch@ukr.net

²Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, тел.: +38 (032) 276 28 35, e-mail: vynogradNO@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ КЛІЩОВОГО ЕНЦЕФАЛІТУ, ЯКИЙ ЦИРКУЛЮЄ В ПІВНІЧНО-ЗАХІДНОМУ ПРИЧОРНОМОР'І

Реферат

Вивчення молекулярної структури гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліту, ізолюваних в Північно-Західному Причорномор'ї — мета дослідження.

Секвенування нуклеотидних послідовностей гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліту 150, 70, 120 і Саврань 160, ізолюваних із іксодових кліщів в Одеській і Херсонській областях в 1988-1990 роках, проводили методом «термінаторів» (за Сенгером). Філогенетичний аналіз отриманих послідовностей здійснювали методом приєднання сусідів. Генотип штамів визначали на основі даних філогенетичного аналізу і за наявністю сигнатурних амінокислот.



Секвеновано нуклеотидні послідовності гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліту 150, 70, 120 і Саврань 160. На основі філогенетичного аналізу підтверджено циркуляцію в Північно-Західному Причорномор'ї європейського (західного) генотипу вірусу. Показана ідентичність гену білка оболонки Е у ізольованих в регіоні штамів європейського генотипу вірусу кліщового енцефаліту. Встановлена найбільша спорідненість штамів, що вивчали, зі штамом Рап, з яким вони складають окрему від решти штамів європейського генотипу вірусу філогенетичну групу. Проведений аналіз амінокислотних послідовностей виявив у штамів вірусу кліщового енцефаліту 150, 70, 120 і Саврань 160 наявність чотирьох маркерних амінокислотних заміщень — 67(N), 266(R), 306(V) і 407(R), в доменах II і III ектодомену і трансмембранному сегменті.

Визначена молекулярна структура гену білка оболонки Е штамів вірусу кліщового енцефаліта, ізольованих в Північно-Західному Причорномор'ї. Поряд з далекосхідним, встановлена циркуляція в регіоні європейського (західного) генотипу вірусу кліщового енцефаліту.

Ключові слова: вірус кліщового енцефаліту, ген білка оболонки Е, секвенування.

O.A. Yurchenko¹, D.A. Dubina¹, N.A. Vynograd²

¹SB «Mechnikov Ukrainian Anti-Plague Research Institute of the Ministry of Health of Ukraine», 2/4, Tserkovnaya str.,

Odessa, 65003, Ukraine, tel.: +38 (095) 844 66 12, e-mail: oksyurch@ukr.net

²Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69, Pekarska str.,

Lviv, 79010, Ukraine, tel.: +38 (032) 276 28 35,

e-mail: vynogradNO@ukr.net

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS CIRCULATING IN THE NORTHWEST BLACK SEA COAST

Summary

Aim. To study the molecular structure of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains isolated in the Northwest Black Sea Coast.

Materials and methods. Nucleotide sequencing of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains 150, 70, 120 and 160 Savran, isolated from ticks in Odessa and Kherson regions in 1988-1990, was carried out by chain-termination method (by F. Sanger). Phylogenetic analysis of these sequences was performed by neighbor-joining method.



Strains genotype was determined on the basis of phylogenetic analysis and presence of the signature amino acids.

Results. Nucleotide sequencing of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains 150, 70, 120 and 160 Savran was carried out. Based on phylogenetic analysis the circulation of the European (Western) genotype of tick-borne encephalitis virus in the Northwest Black Sea Coast was confirmed. The identity of the envelope (E) protein gene in the tick-borne encephalitis virus strains of the European genotype isolated in the region was shown. The tick-borne encephalitis virus strains studied were the most related to Pan strain and formed with it the phylogenetic group separated from the other tick-borne encephalitis virus strains of the European genotype. The analysis of amino acid sequences of the tick-borne encephalitis virus strains 150, 70, 120 and Savran 160 revealed presence of four marker amino acid replacements — 67 (N), 266 (R), 306 (V) and 407 (R), in domains II and III of the ectodomain and in the transmembrane segment.

Conclusions. The molecular structure of the envelope (E) protein gene of the tick-borne encephalitis virus strains isolated in the Northwest Black Sea Coast was determined. Along with the Far Eastern, the circulation of the European (Western) genotype of tick-borne encephalitis virus in the region was revealed.

Key words: tick-borne encephalitis virus, envelope (E) protein gene, sequencing.



М.Б. Галкін, В.О. Іваниця

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

СИНТЕЗ ПІОЦІАНІНУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЗА ВПЛИВУ ВІСМУТОВИХ МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ ПОРФІРИНІВ ТА АУТОІНДУКТОРІВ СИСТЕМИ *QUORUM SENSING*

Показано, що самі по собі вісмутові комплекси порфіринів знижують синтез піоціаніну *P. aeruginosa* пропорційно до їх концентрації у середовищі. Найбільшу інгібуючу активність виявляє *Vi(III)*-ТПП, найменшу – *Vi(III)*-ПП IX. За присутності 0,4 мкМ *Vi(III)*-ТПП кількість піоціаніну у добовій культурі зменшується у 1,8 разу від контролю. При 40 мкМ *Vi(III)*-ТПП кількість пігменту була нижчою у 2,3 разу, а при 80 мкМ – у 3,1 разу. 3-оксо- C_{12} -АГЛ удвічі знижує вміст піоціаніну у культурі без порфіринів і потенціює інгібувальний вплив вісмутових комплексів на синтез пігменту. У присутності C_4 -АГЛ спостерігається помірне (на 10–20%) збільшення вмісту піоціаніну у контрольній культурі і за сумісного впливу з порфіринами. *PQS* повністю відновлює до контрольного рівня синтез пігменту за присутності *Vi(III)*-ТХП та *Vi(III)*-ПП IX і підвищує його у 1,3–3,0 рази за дії *Vi(III)*-ТПП. В культурі без порфіринів вміст піоціаніну за впливу цього аутоіндуктора збільшувався на 20%.

Ключові слова: піоціанін, вісмутові комплекси порфіринів, аутоіндуктори системи *quorum sensing* *Pseudomonas aeruginosa*.

Quorum sensing (QS) є глобальною системою регуляції у бактерій, яка забезпечує експресію численних ознак і внутрішньо- та міжвидову комунікацію [4, 5]. Під контролем цієї системи знаходяться гени, що відповідають за синтез факторів патогенності та деяких вторинних метаболітів бактерій [7]. Активація системи *quorum sensing* відбувається після досягнення бактеріальною культурою певної щільності та початку синтезу сигнальних молекул або аутоіндукторів. Кожна з трьох ланок QS *Pseudomonas aeruginosa*, які ієрархічно зв'язані між собою, використовує специфічний аутоіндуктор: N-(3-оксодеканойл)-гомосерин лактон (*las*-система), N-бутирил-гомосерин лактон (*rhl*-система) та 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон (*pqs*-система) [12]. Аутоіндуктори зв'язуються в клітинах зі специфічними білками, які завдяки цьому набувають транскрипційної активності та зумовлюють експресію генів-мішеней [11].



Раніше нами було встановлено, що вісмуткові комплекси порфіринів є ефективними інгібіторами синтезу аутоіндукторів і QS-залежних вторинних метаболітів, зокрема, піоціаніну у *P. aeruginosa* [3,9,10]. Інгібувальний вплив порфіринів може бути зумовлений їх здатністю до інтеркаляції у ДНК і блокуванням деяких генів системи міжклітинної комунікації, що кодуєть синтез сигнальних молекул та/або їх рецепторів.

Метою даної роботи було дослідження синтезу піоціаніну за сумісного впливу вісмуткових комплексів і екзогенних аутоіндукторів QS *P. aeruginosa*.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізм використовували колекційний штам *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (ONU 300). Досліджені порфірини і 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон (PQS) були синтезовані у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова [1]. У роботі використано комерційні препарати N-(3-оксо-додеканоїл)-гомосерин лактону, N-бутирил-гомосерин лактону виробництва Sigma Aldrich.

Культивування здійснювали у 48-лункових планшетах «Nuclon». У кожену лунку поміщали 1 мл середовища Гіса з глюкозою без індикатора Андреде і вносили добову культуру *P. aeruginosa* до кінцевої концентрації 10^3 клітин в 1 мл. Вісмуткові комплекси порфіринів додавали до кінцевих концентрацій 0,4; 40 та 80 мкМ.

При визначенні впливу аутоіндукторів системи *quorum sensing* у дослідні проби додавали, крім вісмуткових комплексів, N-(3-оксо-додеканоїл)-гомосерин лактон, N-бутирил-гомосерин лактон або 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолон. Кінцеві концентрації гомосеринлактонів становили 10 мкМ, а PQS — 50 мкМ.

Планшети інкубували в термостаті за температури 37 °С впродовж 24 годин. Для визначення вмісту піоціаніну рідку культуру з лунок переносили у пробірки і осаджували клітини центрифугуванням при 1200 g впродовж 15 хв. Піоціанін екстрагували з надосадової рідини (5 мл) хлороформом (3 мл). Хлороформну фазу реекстрагували 1 мл 0,2 М HCl до виникнення червоного забарвлення [8]. Оптичну густину розчину піоціаніну вимірювали на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 510 нм.

Всі експерименти проводили тричі з 5 повторами в кожному.

Статистичне опрацювання результатів досліджень провадили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну похибку ($S_{\bar{X}}$). Достовірність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Excel [2].



Результати та їх обговорення

Дослідження сумісного впливу 3-оксо-С₁₂-АГЛ та вісмутових комплексів порфіринів на синтез піоціаніну виявило не зовсім передбачувані результати (рис. 1).

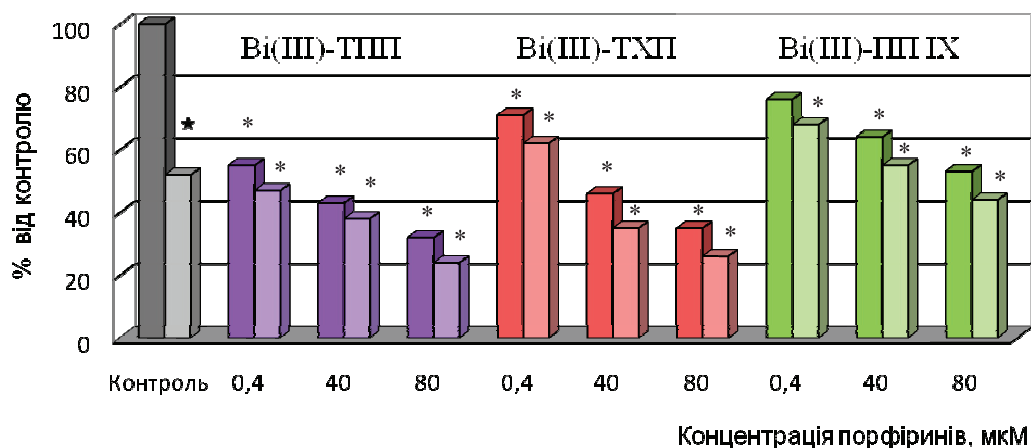


Рис. 1. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* PA01 без та з додаванням N-(3-оксододеканоїл)-гомосерин лактону

■, ■, ■ – порфірин; □, □, □ – порфірин та 10 мкМ 3-оксо-С₁₂-АГЛ
 ■ – контроль; □ – контроль та 10 мкМ 3-оксо-С₁₂-АГЛ
 * – різниця достовірна порівняно з контролем

Fig. 1. Porphyrins bismuth complexes action on pyocyanin biosynthesis with or without N-(3-oxo-dodecanoil)-homoserin lacton adding

До таких даних, перш за все, слід віднести дворазове зниження синтезу досліджуваного пігменту в культурі без порфіринів. Щодо сумісного впливу даного аутоіндуктора і вісмутових комплексів порфіринів виявилось, що 3-оксо-С₁₂-АГЛ потенціє інгібувальну дію цих сполук на синтез піоціаніну. Причому, незалежно від концентрації порфіринів вміст пігменту був нижчим на 5–10% відносно рівня, що досягався при застосуванні тільки вісмутового комплексу. Тому виявилось, що ефект аутоіндуктора на тлі меншої з використаних концентрацій порфіринів був нижчим у разі Ві(III)-ТХП та Ві(III)-ПП IX і практично однаковим у разі Ві(III)-ТПП, ніж за його окремого застосування.

Дослідження сумісного впливу С₄-АГЛ та вісмутових комплексів порфіринів на інтенсивність синтезу піоціаніну показало, що аутоіндуктор *rhl*-ланки QS помірно (на 10–20%) збільшує синтез пігменту (рис. 2).

Продукція піоціаніну за присутності тільки С₄-АГЛ була вищою за контроль на 15,5%.

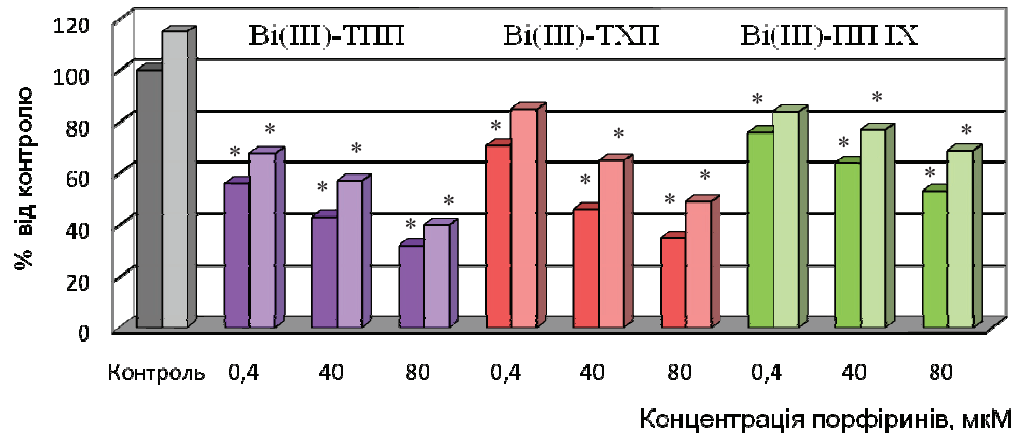


Рис. 2. Вплив вісмуткових комплексів порфіринів на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* PA01 без та з додаванням N-бутирил-гомосерин лактону

■, ■, ■ – порфірин; ■, ■, ■ – порфірин та 10 мкМ C₄-АГЛ
 ■ – контроль; ■ – контроль та 10 мкМ C₄-АГЛ
 * – різниця достовірна порівняно з контролем

Fig. 2. Porphyrins bismuth complexes action on pyocyanin biosynthesis with or without N-butiryl-homoserin lacton adding

На відміну від ацильованих гомосерин лактонів, сигнальний хінолон суттєво відновлює синтез піоціаніну (рис. 3).

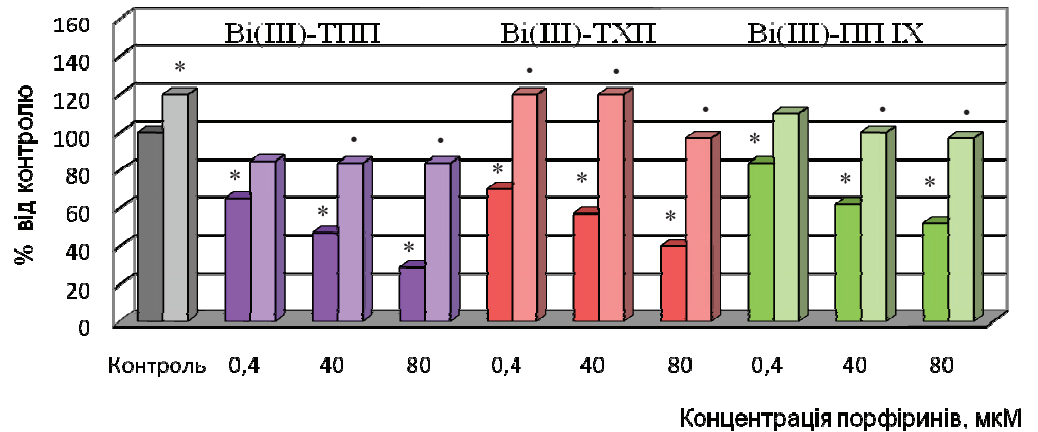


Рис. 3. Вплив вісмуткових комплексів порфіринів на синтез піоціаніну *P. aeruginosa* PA01 без та з додаванням 2-гептил-3-гідрокси-4-хінолону (PQS)

■, ■, ■ – порфірин; ■, ■, ■ – порфірин + 50 мкМ PQS
 ■ – контроль; ■ – контроль + 50 мкМ PQS
 • – різниця достовірна порівняно з контролем
 * – різниця достовірна порівняно з дією тільки порфірину

Fig. 3. Porphyrins bismuth complexes action on pyocyanin biosynthesis with or without 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolon (PQS) adding



За відсутності порфіринів у середовищі PQS підвищує вміст пігменту в 1,2 рази. На тлі інгібувальної дії вісмутових комплексів його вплив на синтез піоціаніну є більш значним: рівень пігменту збільшується у 1,5–3 рази. Причому найбільше зростання вмісту піоціаніну спостерігається у разі використання порфіринів в концентрації 80 мкМ.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що інгібувальний вплив вісмутових комплексів порфіринів на систему *quorum sensing* обумовлюється не тільки блокуванням синтезу сигнальних молекул. Можна припустити, що вісмутові комплекси пригнічують також синтез відповідних рецепторів досліджуваних аутоіндукторів, зокрема, 3-оксо- C_{12} -АГЛ та C_4 -АГЛ. Зменшення вмісту піоціаніну за присутності екзогенного 3-оксо- C_{12} -АГЛ пов'язано, скоріше за все, зі здатністю даного гомосерин лактону негативно впливати на *rhl*-ланку QS, яка відповідає за синтез пігменту [13]. Відомо, що екзогенний PQS активує експресію *rhl*-системи [6], що призводить до зростання синтезу численних вторинних метаболітів, зокрема, піоціаніну. Однак за умов дефіциту аутоіндуктора цієї ланки QS (C_4 -АГЛ), викликаного вісмутовими комплексами порфіринів, імовірнішим є механізм прямого впливу сигнального хінолону на синтез піоціаніну [8].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ишков Ю.В., Жилина З.И., Водзинский С.В. Порфирины и их производные. XXI // Журн. орг. химии. — 2000. — Т. 36, вып. 4. — С. 609–612.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Пахомова Є.Ю., Галкін М.Б., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Вплив вісмутових комплексів порфіринів і бактеріофага на формування біоплівки та синтез піоціаніну *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2012. — № 3(19). — С. 55–64.
4. Bassler B.L. Small talk: cell-cell communication in bacteria // Cell. — 2002. — V. 109. — P. 421–424.
5. Camilli A, Bassler B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways // Science. — 2006. — V. 311. — P. 1113–1116.
6. Diggle, S.P., Cornelis P., Williams P., Camara M. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives // Int. J. Med. Microbiol. — 2006. — V. 296. — P. 83–91.
7. Diggle S.P., Winzer K., Lazdunski A., Williams P., Camara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression // J. Bacteriol. — 2002. — V. 184, № 10. — P. 2576–2586.
8. Jensen V., Löns D., Zaoui C., Bredenbruch F., Meissner A., Dieterich G., Münch R., Häussler S. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent



and -independent pathways // *J. Bacteriol.* — 2006. — V. 188, № 24. — P. 8601–8606.

9. *Galkin M.B., Ivanytsia V.O.* Antibiofilm activity of porphyrines bismuth complexes in presence of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing autoinducers // *Sepsis.* — 2011. — V. 4, № 1. — P. 106–107.

10. *Galkin M.B., Filipova T.O., Ivanytsia V.O.* Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* intercellular signaling pathway (quorum sensing) functioning in presence porphyrins bismuth complexes // Збірник тез 3-го з'їзду Українського товариства клітинної біології, Ялта 16–20 травня 2012 р. — С. 14.

11. *Galloway W.R.J.D., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R.* Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways // *Chem. Rev.* — 2011. — V. 111, № 1. — P. 28–67.

12. *McGrath S., Wade D.S., Pesci E.C.* Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2004. — V. 230. — P. 27–34.

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

Стаття надійшла до редакції 18.03.2013 р.

Н.Б. Галкин, В.А. Иваница

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

СИНТЕЗ ПИОЦИАНИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ПРИ ВЛИЯНИИ ВИСМУТОВЫХ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ И АУТОИНДУКТОРОВ СИСТЕМЫ *QUORUM SENSING*

Цель работы — исследование синтеза пиоцианина при совместном влиянии висмутовых комплексов порфиринов и экзогенных аутоиндукторов системы *quorum sensing Pseudomonas aeruginosa*.

Клетки *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (ONU 300) инкубировали 24 часа в 48-луночных планшетах «Nucloп» в присутствии висмутовых комплексов мезо-тетра(4-N-метил-пиридил)порфирина, мезо-тетра(6-N-метил-хинолинил) порфирина и протопорфирина IX (Ві (III)-ТПП, Ві (III)-ТХП и Ві (III)-ПП IX). Конечные концентрации соединений составили 0,4,



40 или 80 мкМ. Аутоиндукторы использовали в концентрациях: 3-оксо-С₁₂-АГЛ и С₄-АГЛ — 10 мкМ, PQS — 50 мкМ. Содержание пиоцианина определяли по методу Essar et al.

Показано, что сами по себе висмутовые комплексы порфиринов снижают синтез пиоцианина *P. aeruginosa* пропорционально их концентрации в среде. Наибольшую ингибирующую активность проявил Bi(III)-ТПП, наименьшую — Bi(III)-ПП IX. В присутствии 0,4 мкМ Bi(III) ТПП количество пиоцианина в суточной культуре уменьшается в 1,8 раза от контроля. При 40 мкМ Bi (III)-ТПП количество пигмента было ниже в 2,3 раза, а при 80 мкМ — в 3,1 раз. 3-оксо-С₁₂-АГЛ вдвое снижает содержание пиоцианина в культуре без порфиринов и потенцирует ингибирующее влияние висмутовых комплексов на синтез пигмента. В присутствии С₄-АГЛ наблюдается умеренное (на 10–20%) увеличение содержания пиоцианина в контрольной культуре и при совместном влиянии с порфиринами. PQS полностью восстанавливает до контрольного уровня синтез пигмента в присутствии Bi (III)-ТХП и Bi (III)-ПП IX и повышает его в 1,3–3 раза при действии Bi (III)-ТПП. В культуре без порфиринов содержание пиоцианина при влиянии этого аутоиндуктора увеличивалось на 20%.

Экзогенный сигнальный хинолон (PQS) восстанавливает синтез пиоцианина *P. aeruginosa*, который существенно подавлен в присутствии висмутовых комплексов порфиринов. Ацилированные гомосерин лактоны вызывают разнонаправленные эффекты: 3-оксо-С₁₂-АГЛ потенцирует действие порфиринов, а С₄-АГЛ умеренно увеличивает содержание пиоцианина при действия этих соединений.

Ключевые слова: пиоцианин, висмутовые комплексы порфиринов, аутоиндукторы системы *quorum sensing Pseudomonas aeruginosa*.

M.B. Galkin, V.O. Ivanytsia

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

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PYOCYANIN
BIOSYNTHESIS IN PRESENCE OF PORPHYRINES
BISMUTH COMPLEXES AND QUORUM SENSING
AUTOINDUCERS**

Aim. Study of the pyocyanin biosynthesis in presence of the porphyrins bismuth complexes and *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing autoinducers.

Material and methods. *Pseudomonas aeruginosa* PA01(ONU 300) cells were incubated for 24 hours in 48-well plates «Nuclon» in presence of the



meso-tetra(4-N-methyl-pyridyl)porphyrine, *meso*-tetra(6-N-methyl-quinoliny) porphyrine and protoporphyrine IX bismuth complexes (Bi(III)-TPP, Bi(III)-TQP та Bi(III)-PP IX). The final concentrations of the substances were 0,4; 40 або 80 μM . The autoinducers were used in concentrations: 3-oxo-C₁₂-HSL and C₄-HSL – 10 μM , PQS – 50 μM . Pyocyanin containment was measured by Essar et al. method.

Results. It was shown, that porphyrins bismuth complexes decrease pyocyanin biosynthesis by *P. aeruginosa* in proportion to their concentrations in culture medium. The highest activity was showed by Bi(III)-TPP, the lowest – Bi(III)-PP IX. In presence of 0,4 μM Bi(III)-TPP pyocyanin concentration in the overnight culture decreases in 1,8 times compare with the control. In presence of 40 μM Bi(III)-TPP pigment concentration was lower in 2,3 times, and in presence of 80 μM – in 3,1 times. 3-oxo-C₁₂-HSL in two times decreases pyocyanin concentration in culture without porphyrines and enhance inhibitory action of bismuth complexes onto pigment biosynthesis. In presence of C₄-HSL there were detected the moderate (in 10–20%) increase of pyocyanin content in control, and in mixture with porphyrines. PQS completely restores pyocyanine biosynthesis to the control value in presence of Bi(III)-TQP and Bi(III)-PP IX and increases their biosynthesis in 1,3-3 times, in presence Bi(III)-TPP. In culture without porphyrines pyocyanin content in presence of this autoinducer increase by 20%.

Conclusions. Exogenic signal quinolon (PQS) restores pyocyanin biosynthesis by *P. aeruginosa*, which is greatly inhibited in presence of the porphyrines bismuth complexes. Acelated homoserin lactones cause multidirectional effects: 3-oxo-C₁₂-HSL enhance porphyrines action, and C₄-HSL moderately increases pyocyanin content in presence of these compounds.

Key words: pyocyanin, porphyrines bismuth complexes, *quorum sensing* system autoinducers, *Pseudomonas aeruginosa*.



Л.В. Лейбенко^{1,2}, В.П. Поліщук¹, Л.В. Радченко², А.П. Міроненко²

¹ННЦ «Інститут біології» Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64/13, Київ, Україна, 01601

²ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського»
НАМН України, вул. Амосова, 5, Київ, Україна, 03680, тел.: +38 (044) 275 02 97,
e-mail: leiblu@mail.ru

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСІВ ГРИПУ ЛЮДЕЙ A(H₃N₂), ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ В ЕПІДЕМІЧНОМУ СЕЗОНІ 2011–2012 РОКІВ

Метою роботи було провести генетичний аналіз сегментів, що кодують гемаглютинін (HA) та нейрамінідазу (NA) вірусів грипу типу A(H3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011–2012 років. У даному дослідженні були використані методи: real-time RT-PCR, робота з культурою клітин MDCK-siat, секвенування і філогенетичний аналіз. Проаналізовані генетичні сегменти HA і NA українських вірусів грипу A(H3N2), виділених у епідемічному сезоні 2011–2012 рр. та побудовані відповідні філогенетичні дерева методом об'єднання найближчих сусідів (Neighbor-Joining) з використанням моделі Kimura 2-parameter. Статистична оцінка філогенетичного аналізу проведена із застосуванням методу бутстреп-аналізу (Bootstrap). Проаналізована генетична подібність досліджуваних ізолятів до вакцинного штаму та вірусів виділених у світі. Детально проаналізовані всі генетичні групи кластеру Victoria/208, куди увійшли виділені нами ізоляти. Описані ключові мутації в амінокислотних послідовностях HA і NA. В роботі були виявлені множинні шляхи заносу епідемічних вірусів грипу A(H3N2) в сезоні 2011–2012 рр. в Україну. Мутації в гемаглютиніні українських ізолятів знаходились у високоваріабельних ділянках і не були пов'язані зі зміною властивостей вірусів. Аналіз амінокислотних послідовностей NA показав відсутність мутацій E119V, E119V+I222V, R292K і N294S, з якими асоціюють появу резистентності до озельтамівіру та занамівіру.

Ключові слова: віруси грипу A(H3N2), нуклеотидні послідовності, філогенетичний аналіз.

Два підтипи вірусу грипу А — H1N1 і H3N2, ко-циркулюють в людській популяції протягом останніх трьох десятиліть [22]. Від часу, коли у 1968 році стався спалах “Гонконгського” грипу [21], віруси A(H3N2) залишаються найбільш частою причиною захворювань на грип.

Інформативним методом спостереження за динамікою еволюційного процесу у вірусів грипу є філогенетичний аналіз, що базується на встановленні еволюційних зв'язків між досліджуваними вірусами на основі



порівняння їх геномів [2]. Вибір оптимального набору програм для філогенетичного порівняння забезпечує високу точність та адекватність аналізу [4]. Генетичний аналіз вірусів грипу проводять за сегментами, що кодують поверхневі антигени вірусу грипу: гемаглютинін (HA) та нейрамінідазу (NA) [5–7, 13, 17].

Ген гемаглютиніну кодує однойменний білок, який забезпечує проникнення вірусу до чутливої клітини. Також HA є основною мішенню для вірус-нейтралізуючих антитіл [16]. Зважаючи на високий рівень мутацій гемаглютиніну, він є цільовим геном молекулярного аналізу вірусів грипу.

Основною функцією нейрамінідази є руйнування сіалової кислоти на поверхні клітин, і вихід вірусу у міжклітинний простір. Антитіла проти NA можуть зменшувати тяжкість захворювання на грип, відіграючи таким чином додаткову роль у боротьбі з вірусом [10]. Нейрамінідаза постійно змінює амінокислотну послідовність для уникання від імунного нагляду хазяїна. Змінам в АК складі NA передують мутації в нуклеотидній послідовності кодуючого гену. Деякі точкові мутації в нейрамінідазі здатні призводити до резистентності вірусу до основних етіотропних хіміопрепаратів озелтамівіру та занамівіру. На сьогодні, відомі «гарячі позиції» в білку нейрамінідази, заміщення в яких призводить до появи резистентних штамів [11, 14]. Виявлення мутацій резистентності є важливим етапом при дослідженні чутливості вірусів грипу до хіміопрепаратів.

Метою роботи було провести генетичний аналіз сегментів, які кодують гемаглютинін та нейрамінідазу вірусів грипу типу A(H3N2), виділених в Україні в епідемічному сезоні 2011–2012 років.

Матеріали і методи

В роботі були використані носогорлянкові змиви від хворих, отримані з різних областей України під час епідемії. Дослідження клінічних зразків, типування та субтипуювання проводили методом real-time RT-PCR. Виділення та накопичення вірусів проводили на культурі клітин MDCK-siat [15]. Секвенування виділених нами вірусів грипу проводилось у двох світових центрах грипу — в Лондоні (Великобританія) та Атланті (США). Для генетичного аналізу були взяті послідовності генів гемаглютиніну (HA) та нейрамінідази (NA) виділених в Україні вірусів грипу типу A(H3N2). Пошук подібних генетичних сегментів вірусів грипу здійснювали з використанням веб-ресурсу GISAID (<http://platform.gisaid.org/>). Ідентифікацію та порівняння послідовностей проводили за допомогою BLAST аналізу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Вирівнювання послідовностей проводили із застосуванням алгоритму ClustalW. Філогенетичні дерева будували у програмі MEGA5 [20], методом Neighbor-Joining (об'єднання найближчих сусідів) [19], із застосуванням моделі Кімури (Kimura 2-parameter) [12]. Метод бутстреп-аналізу (Bootstrap) з числом реплікацій



1000 використовували для статистичної оцінки значущості отриманих результатів [9]. Переведення нуклеотидних послідовностей в амінокислотні для пошуку заміщень проводили з використанням веб-ресурсу EMBOSSTranseq translates (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

Результати та їх обговорення

За результатами real-time RT-PCR аналізу, де було протестовано 401 клінічний зразок, відібраний в чотирьох дозорних центрах [1] України, віруси грипу А(Н₃Н₂) склали переважну більшість (207 із 209 позитивних зразків). Два зразки дали позитивний результат на грип В. Схожа картина спостерігалась по всьому європейському регіоні. За даними Європейського центру по контролю за інфекціями, в період з 1 вересня 2011 по 1 березня 2012 років більшість досліджених зразків (86%) були вірусами грипу А(Н₃Н₂), 6% — віруси грипу В лінії В/Yamagata, 4% — віруси грипу А(Н₁Н₁)pdm, і 3% — віруси грипу В лінії В/Victoria. В епідемічному сезоні 2011–12 рр. віруси грипу А(Н₃Н₂) домінували як в Україні, так і по всьому світі — 67% (http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim_Report_September_2012_2.pdf), хоча в епідсезоні 2010–2011 рр. нами було виділено лише 2 ізоляти даного субтипу [3]. Нагадаємо, що для сезону 2011–2012 рр. у Північній півкулі прогнозували циркуляцію вірусів грипу А/Каліфорнія/7/09 (Н₁Н₁); А/Перт/16/09 (Н₃Н₂) та В/Брізбен/60/08, які увійшли до складу актуальних сезонних вакцин [18].

Генетичний аналіз проводили за генами гемаглютиніну (НА) та неїрамінідази (НА) вірусів грипу А(Н₃Н₂).

Філогенетичне порівняння генів гемаглютиніну (НА). Для генетичного аналізу було відібрано 15 послідовностей генів гемаглютиніну у вірусів, виділених нами у 2012 році з чотирьох дозорних центрів [11], а саме А/Ukraine/38/12, А/Ukraine/78/12, А/Ukraine/96/12, А/Ukraine/114/12, А/Ukraine/131/12, А/Ukraine/155/12, А/Ukraine/209/12, А/Ukraine/248/12, А/Ukraine/250/12, А/Dnipro/183/12, А/Dnipro/194/12 А/Odessa/288/12, А/Odessa/300/12, А/Odessa/312/12 та А/Khmelnytsky/484/12. Також були взяті два ізоляти з рутинного нагляду — А/Ukraine/5381/12, А/Ukraine/5339/12.

З веб-ресурсу GISAID за допомогою BLAST аналізу, були відібрані найбільш подібні ізоляти сезону 2011–2012 рр. та віруси, що відрізнялись значно. Відмінні послідовності взяті для аналізу картини мутаційної мінливості грипу у світі. Для відтворення еволюційних зв'язків з вірусами минулих епідемічних сезонів, взяті ізоляти А/Iowa/19/10, А/Alabama/5/10, А/Victoria/208/09, А/Victoria/210/09, А/Brisbane/10/07 та вакцинні штами А/Perth/16/09 (діючий) і А/Victoria/361/11 (новий, актуальний для сезону 2012–2013).

На етапі BLAST аналізу було помічено, що всі ізоляти сезону 2011–2012 рр. були подібними за генами НА на рівні 95% і більше. Про-

вівши генетичне порівняння 39 послідовностей генів НА, ми отримали філогенетичне дерево, показане на рисунку 1. Всі виділені віруси грипу були більш подібними до референс вірусу A/Victoria/208/09, а ніж до вакцинного штаму A/Perth/16/09 (рис. 1). Це дозволило віднести їх до Victoria/208 кластеру.

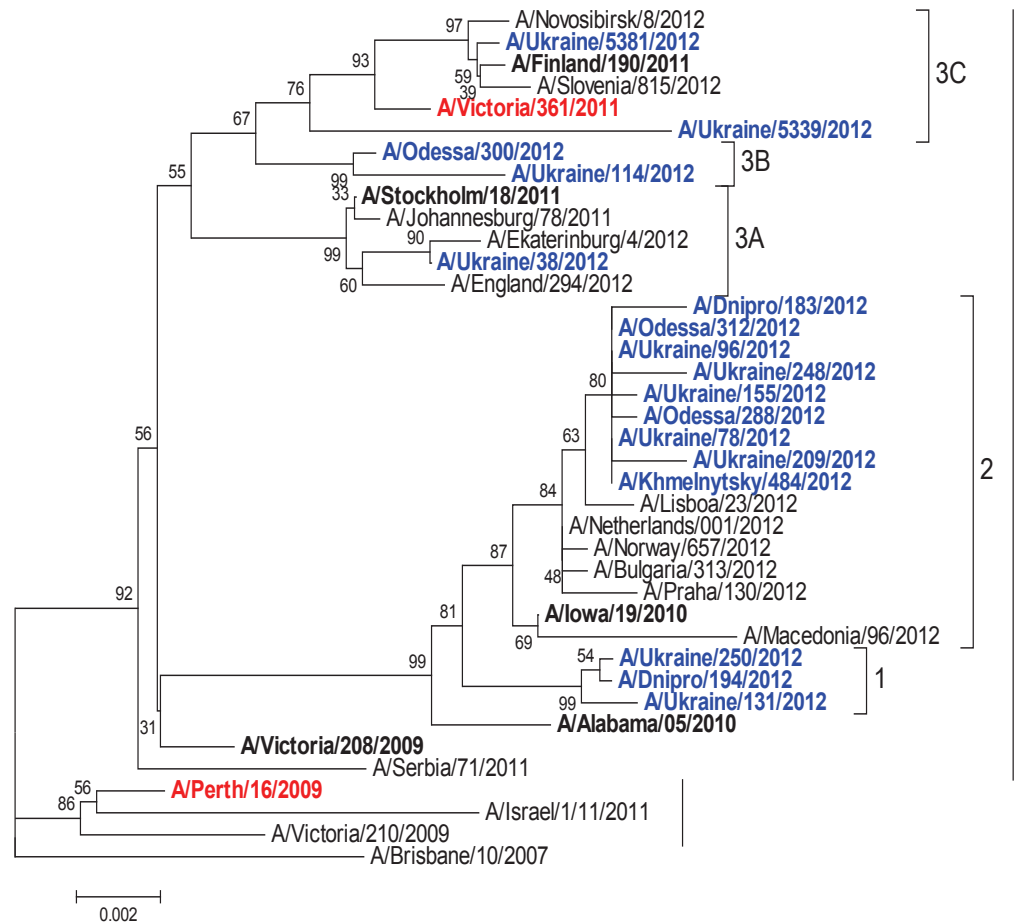


Рис. 1. Філогенетичний аналіз генів НА вірусів грипу А (H3N2) сезону 2011–2012 рр., проведений в програмі MEGA5. Еволюційна історія була відтворена методом NJ з 1000 бутстреп реплікацій. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу Kimura 2-parameter.

Fig. 1. Phylogenetic analysis of HA genes influenza A (H3N2) viruses, isolated in 2011–2012 season, conducted in MEGA5. Evolutionary history was reconstructed by NJ with 1000 BOOTSTRAP replications. Evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter.

Віруси даного кластеру набули нового заміщення T212A в АК послідовності гемаглютиніну, і ревертували до A/Brisbane/10/07, за заміщеннями K62E, K144N (набуття сайту глікозилювання [8]), порівняно з Perth/16-подібними вірусами. Частина ізолятів сезону 2010–2011 рр.



також належала до кластеру Victoria/208. Така спрямованість мутаційного добору показала необхідність вибору нового кандидата у вакцинні штами. Для сезону 2012–2013 таким став ізолят A/Victoria/361/11.

В межах кластеру Victoria/208 ізоляти розділились на 5 груп: 1, 2, 3А, 3В і 3С, детальний аналіз антигенних змін в гемаглютиніні яких подано далі (рис. 1):

1 група — віруси з заміщеннями D53N, Y94H, I230V та E280A. До даної групи увійшли наші ізоляти A/Ukraine/250/12, A/Ukraine/131/12 та A/Dnipro/194/12, а також референс-штам 2010 року — A/Alabama/5/10. Українські ізоляти A/Ukraine/250/12 і A/Dnipro/194/12 додатково набули заміщення R201K. А вірус A/Ukraine/250/12 також набув заміщення E344D.

2 група виявилась найчисленнішою, в межах якої розташувалась більшість українських вірусів грипу, виділених з усіх чотирьох дозорних центрів. Ізоляти групи характеризувались як заміщеннями D53N, Y94H, I230V, E280A, спільними з групою 1, так і додатковою мутацією S199A. Найближче до українських ізолятів на філогенетичному дереві розташувався вірус, виділений в Лісабоні, порівняно з яким наші 9 ізолятів набули одне заміщення — A212S. Це дає підстави говорити про одноразове занесення даної групи вірусів на територію країни. Ізолят A/Dnipro/183/12 набув АК заміщення P103L, а A/Ukraine/248/12 — I522K. Референс-штамом для даної групи був ізолят A/Iowa/19/10.

Всі віруси груп 3А, 3В та 3С показали заміщення V223I. Також ізоляти груп 3А і 3В набули заміщення N145S та D487N, а груп 3В і 3С — A198S і N312S.

3А група — віруси із заміщенням N144D (призводить до втрати сайту глікозилування) [13]. В межах даної групи розташувався досліджуваний ізолят A/Ukraine/38/2012. Референс-штамом для даної групи був A/Stockholm/18/2011.

3В група — об'єднала віруси A/Ukraine/114/2012 та A/Odessa/300/2012.

3С група — віруси з заміщеннями T48I та S45N (з'явився сайт глікозилування). До даної групи увійшли ізоляти A/Ukraine/5381/12 та A/Ukraine/5339/12. Вірус A/Ukraine/5381/12 разом з ізолятами з Новосибірську, Фінляндії і Словенії селектували АК заміщення Q33R та N278K. Ізолят A/Ukraine/5339/12 набув ряд АК заміщень: I58V, I223V, S262N, V347M та V490I. Отже, українські ізоляти з групи 3С A/Ukraine/5381/12 і A/Ukraine/5339/12 були занесені до країни з різних джерел.

При аналізі НА генів виділених в Україні вірусів грипу А(Н₃Н₂) в епідсезоні 2011–2012 років, в першу чергу привертає увагу факт розташування їх в усіх філогенетичних групах (рис. 1). Таким чином, в досліджуваному сезоні населення країни перехворіло всіма можливими варіантами вірусів грипу А(Н₃Н₂). Що свідчить про високу інтенсивність перетину кордону інфікованими людьми з множинним занесенням вірусів грипу на територію України та навпаки.

Філогенетичне порівняння генів нейрамінідази (NA). Порівнюючи гени нейрамінідази, ми спостерігали за інтенсивністю їх змін та кореляцією зі змінами в гемаглютиніні. Однак, не у всіх вірусів, взятих для аналізу, були секвеновані NA сегменти. Тому штамове різноманіття досліджуваних за генами NA та NA вірусів грипу дещо відрізняється. Для генетичного аналізу були взяті послідовності 13 виділених нами ізолятів поточної епідемії: A/Ukraine/78/12, A/Ukraine/96/12, A/Ukraine/114/12, A/Ukraine/131/12, A/Ukraine/155/12, A/Ukraine/209/12, A/Ukraine/248/12, A/Ukraine/250/12, A/Dnipro/183/12, A/Dnipro/194/12, A/Odessa/288/12, A/Odessa/300/12, A/Khmelnysky/484/12, ізолятів з рутинного нагляду — A/Ukraine/5329/12, A/Ukraine/5381/12 і A/Ukraine/5422/12. За результатами бласт-аналізу були відібрані ізоляти з інших країн, включаючи вакцинні штами A/Perth/16/09 і A/Victoria/361/11.

Як і при порівнянні генів NA, за генами NA всі виділені в епідемічний сезон 2011–2012 рр. віруси грипу А(Н3N2) знаходились в межах вікторіанського кластеру і були подібними до вакцинного штаму A/Perth/16/2009 (рис. 2). Українські ізоляти також були в різних філогенетичних групах. Майже всі віруси сезону 2011–2012 рр., також були більш подібними до нового вакцинного штаму A/Victoria/361/11, а ніж до діючого A/Perth/16/09. Це були віруси з груп 1, 2, 3B, 3C та ізолят з минулого епідемічного сезону A/Ukraine/175/11. Також групи 1, 2, 3B, 3C мали спільне заміщення N402D (рис. 2).

Віруси досліджуваного сезону (групи 1, 2, 3A, 3B і 3C) селектували заміщення S367N, K369T і I464L, порівняно зі штамми A/Perth/16/09 і A/Victoria/208/09. Групи були названі тими ж номерами, що і при порівнянні NA. Характеристика груп філогенетичного порівняння подана далі (рис. 2.).

1 група характеризувалась заміщеннями Y40C, I176M, G401S, та спільно зі штамом A/Ukraine/175/11 — R210K. В межах групи розташувались ізоляти A/Ukraine/131/12, A/Ukraine/250/12, A/Dnipro/194/12 та віруси, виділені в США і Естонії. Штам A/Ukraine/131/12 набув додатково мутацію K296R. Українські ізоляти показали високу однорідність, тому найвірогідніше поширились внаслідок разового занесення на територію країни.

2 група найчисельніша — в її межах розташувались українські ізоляти, виділені з усіх чотирьох дозорних регіонів у 2012 році. Більшість з них були ідентичними за АК послідовністю NA, але вірус A/Ukraine/5329/12 набув заміщень K415R, S416G і E435G, які віддалили його на філогенетичному дереві. Найбільш подібним до українських ізолятів виявився вірус, виділений в Лісабоні на початку лютого. Аналогічна картина спостерігалась при порівнянні генів NA. Тому з високою ймовірністю можна говорити, що дана популяція вірусів грипу, що циркулювали в Україні була занесена з Лісабону (Португалія) або навпаки.



3А група характеризувалась тим, що нейрамінідаза її вірусів зберегла подібність до «старого» вакцинного штаму А/Perth/16/09, хоча більшість з них було виділено навесні 2012 року. Віруси групи набули заміщень E221D, T238A і S416N. А ізоляти 2012 року також – S335G і I469V, серед них і ізолят з рутинного нагляду А/Ukraine/5422/12, який виявився подібним до вірусів з Англії, Ірландії та Росії. Референс-штамом для групи 3А став А/Stockholm/18/11.

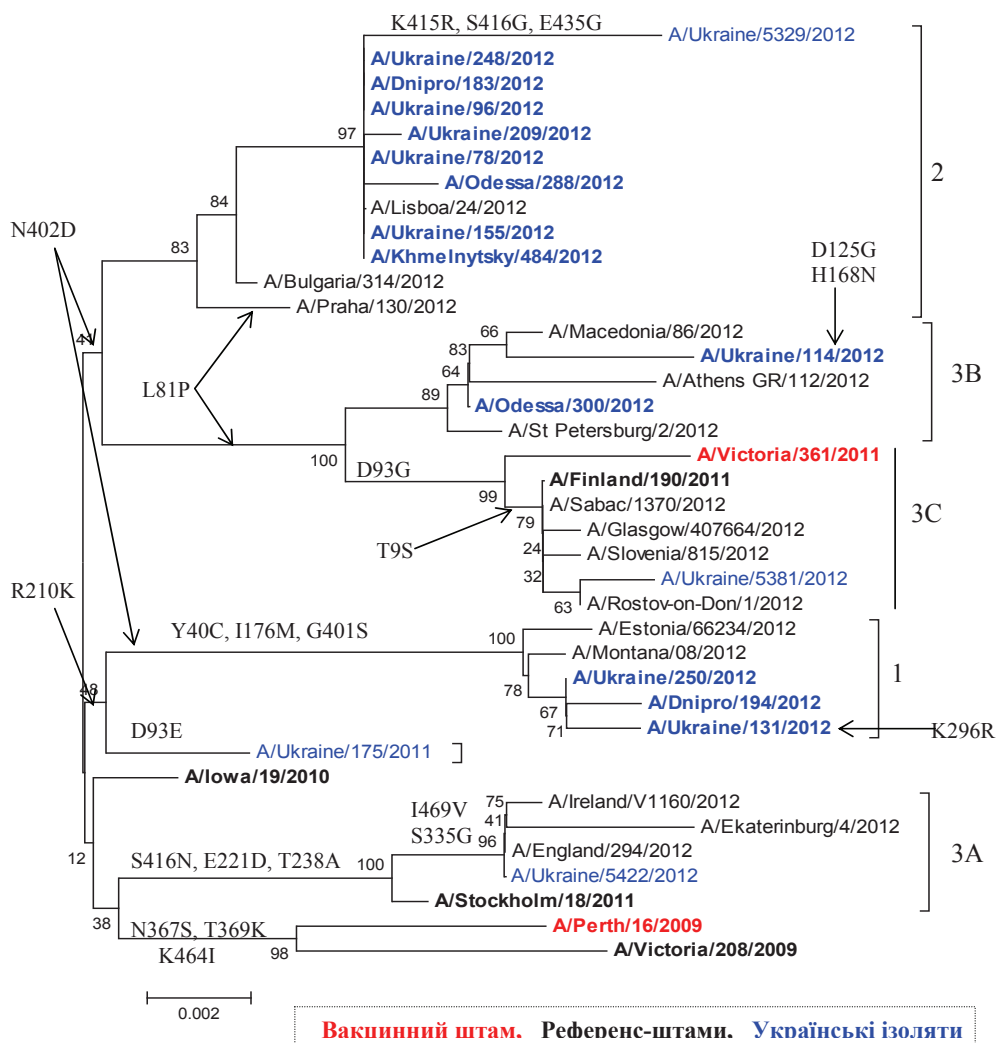


Рис. 2. Філогенетичний аналіз генів NA вірусів грипу А(Н₃Н₂) сезону 2011–2012 рр., проведений в програмі MEGA5. Еволюційна історія була відтворена методом NJ з 1000 бутстреп реплікацій. Еволюційні відстані були розраховані з використанням методу Кімура 2-parameter.

Fig. 2. Phylogenetic analysis of NA genes influenza A(H3N2) viruses, isolated in 2011–2012 season, conducted in MEGA5. Evolutionary history was reconstructed by NJ with 1000 BOOTSTRAP replications. Evolutionary distances were calculated using the Kimura 2-parameter.

ЗВ група об'єднала віруси, виділені в 2012 році, які спільно з групою ЗС селектували заміщення L81P. Сюди ввійшли досліджувані ізоляти А/Ukraine/114/12 та А/Odessa/300/12. Штам А/Ukraine/114/12 показав мутації D125G і H168N. Найбільш подібними до Київського штаму виявився вірус з Македонії. Одеський ізолят менш еволюціонував від батьківського штаму. З великою вірогідністю віруси другої групи були занесені до України неодноразово.

ЗС група включила новий вакцинний штам А/Victoria/361/11, референс-штам А/Finland/190/11 та ізоляти 2012 року, зокрема вірус з рутинного нагляду в Україні А/Ukraine/5381/12. Всі вони мали характерне заміщення D93G.

Таке різноманіття за генами нейрамінідази вірусів грипу, виділених в Україні, ще раз підтверджує їх множинне занесення на територію країни, з подальшим поширенням та набуттям нових генетичних змін.

Враховуючи важливість етіотропного лікування грипу, ми проаналізували АК послідовності нейрамінідази на присутність резистентних мутацій до оселтамівіру чи занамівіру [11, 14], і виявили, що всі досліджувані віруси грипу А(Н3N2), не показали жодного заміщення (E119V, E119V+I222V, R292K, N294S), яке призводить до появи резистентності до згаданих хіміопрепаратів.

Головним збудником епідемії грипу 2011–2012 років в Україні були віруси грипу типу А(Н3N2), які склали 99% усіх виділених вірусів грипу. За генетичними характеристиками поверхневих антигенів — HA та NA, віруси грипу А(Н3N2), виділені в Україні, розташувались в межах усіх п'яти генетичних груп кластеру Victoria/208. Всі виділені нами віруси грипу А(Н3N2) не селектували мутацій, з якими асоціюють появу резистентності до озельтамівіру і занамівіру. За результатами філогенетичного аналізу, в сезоні 2011–2012 рр. були виявлені множинні шляхи заносу епідемічних вірусів грипу А(Н3N2) до країни — як з Європи (в тому числі — Балтії), так і з Росії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Голубка О.С., Онищенко О.В., Міроненко А.П. Оцінка ефективності дозорного епіднагляду за грипом в Україні // Профілактична Медицина. — №4(16). — 2011. — С. 25–32.
2. Кумар Н.М. Молекулярная эволюция и филогенетика / Ней М. Кумар; [под ред. Г. В. Глазко]. — К.: КВШ. — 2004. — 333 с.
3. Лейбенко Л., Онищенко О., Голубка О., Бабій С., Міроненко А. Генетичний моніторинг циркулюючих в Україні вірусів грипу людей сезону 2010-2011 років // Вісник КНУ ім. Т.Шевченка. Біологія. — 2012. — 62. — С. 19–23.
4. Лукашов В.В. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ Учебное пособие. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. — 2009. — 256 с.



5. *Bush R.M., Fitch W.M., Bender C.A., Cox N.J.* Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol and Evol.* — 1999. — 16. — P. 1457–1465.

6. *Chen R., Holmes E.C.* Hitchhiking and the population genetic structure of avian influenza virus // *J.Mol.Evol.* — 2010. — 70. — P. 98–105.

7. *Danishuddin M., Khan S., Khan A.* Phylogenetic analysis of surface proteins of novel H1N1 virus isolated from 2009 pandemic // *Bioinformatics.* — 2009. — 4, N 2. — P. 94–97.

8. *Das S.R., Hensley S.E., David A., Schmidt L., Gibbs J.S., Puigbm P., Ince W.L., Bennink J.R., Yewdell J.W.* Fitness costs limit influenza A virus hemagglutinin glycosylation as an immune evasion strategy // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2011. — 108, N 51. — E1417–E1422.

9. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution.* — 1985. — 39, N 4. — P. 783–791.

10. *Gamblin S.J., Skehel J.J.* Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins // *J Biol Chem.* — 2010. — 285, N 37.— P. 28403–28409.

11. *Gubareva L.V.* Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors // *Virus Research.* — 2004. — 103, N 1–2. — P. 199–203.

12. *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.

13. *Lin P., Gregory V., Bennett M., Hay A.* Recent changes among human influenza viruses // *Virus Res.* — 2004. — 103. — P. 47–52.

14. *Mishin V.P., Hayden F.G., Gubareva L.V.* Susceptibilities of antiviral-resistant influenza viruses to novel neuraminidase inhibitors // *Antimicrob Agents Chemother.* — 2005. — 49, N 11. — P. 4515–4520.

15. *Oh D.Y., Barr I.G., Mosse J.A., Laurie K.L.* MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells // *J Clin Microbiol.* — 2008. — 46, N 7. — P. 2189–94.

16. *Okada J., Ohshima N., Kubota-Koketsu R. et al.* Localization of epitopes recognized by monoclonal antibodies that neutralized the H3N2 influenza viruses in man // *J Gen Virol.* — 2011. — 92 — P. 230–241.

17. *Plotkin J.B., Dushoff J., Levin S.A.* Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus // *Proc Natl Acad Sci USA.* — 2002. — 99, N 9. — P. 6263–6268.

18. *Recommended* composition of influenza virus vaccines for use in the 2011–2012 northern hemisphere influenza season (available at: www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/recommendations_2011_12north/en/index.html).



19. 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.

20. 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.

21. Viboud C.C., Grais R.F., Lafont B.A., Miller M.A., Simonsen L. Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: evidence for a smoldering pandemic // *J Infect Dis*. — 2005. — 192, N 2. — P. 233–48.

22. *Virus Taxonomy*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [King M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.]. — London: Academic Press. — 2011. — P. 749–758.

Стаття надійшла до редакції 04.03.2013 р.

Л.В. Лейбенко^{1, 2}, В.П. Полищук¹, Л.В. Радченко², А.П. Мироненко²

¹УНЦ «Институт биологии» Киевский национальный университет имени Т. Шевченко, ул. Владимирская, 64/13, Киев, Украина, 016012

²ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В. Громашевского» НАМН Украины, ул. Амосова, 5, Киев, Украина, 03680, тел.: +38 (044) 275 02 97, e-mail: leiblu@mail.ru

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ГРИППА ЛЮДЕЙ А(Н₃Н₂), ВЫДЕЛЕННЫХ В УКРАИНЕ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2011–2012 ГОДОВ

Реферат

Целью работы было провести генетический анализ сегментов, кодирующих гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (НА) вирусов гриппа типа А(Н₃Н₂), выделенных в Украине в эпидемическом сезоне 2011–2012 годов. В данном исследовании были использованы методы: real-time RT-PCR, работа с культурой клеток MDCK-siat, секвенирования и филогенетический анализ. Проанализированы генетические сегменты НА и НА украинских изолятов вирусов гриппа А(Н₃Н₂) и построены соответствующие филогенетические деревья методом объединения ближайших соседей (Neighbor-Joining) с использованием модели Kimura 2-parameter. Статистическая оценка филогенетического анализа проведена с использованием бутстреп-анализа (Bootstrap). Проанализировано генетическое сходство исследуемых изолятов к вакцинному штамму и вирусам выделенным в мире. Подробно проанализированы все генетические группы кластера Victoria/208, куда вошли выделенные нами изоляты. Описаны ключевые мутации в аминокислотных последовательностях НА и НА. Описаны ключевые мутации в аминокислотных последовательностях НА и НА.



В работе были выявлены множественные пути заноса эпидемических вирусов гриппа A(H3N2) в сезоне 2011–2012 гг. в Украину. Мутации в гемагглютинине украинских изолятов находились в высоковариабельных участках и не были связаны с изменением свойств вирусов. Анализ аминокислотных последовательностей NA показал отсутствие мутаций E119V, E119V + I222V, R292K и N294S, с которыми ассоциируют появление резистентности к озельтамивиру и занамивиру.

Ключевые слова: вирусы гриппа А (H3N2), нуклеотидные последовательности, филогенетический анализ.

L.V. Leibenko^{1,2}, V.P. Polischuk¹, L.V. Radchenko², A.P. Mironenko²

¹ESC “Institute of Biology” Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64/13, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 016012

²L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases” NAMS of Ukraine
5, Amosova Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.: +38 (044) 275 02 97, e-mail: leiblu@mail.ru

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF HUMAN INFLUENZA VIRUSES A(H₃N₂), ISOLATED IN UKRAINE DURING THE 2011–2012 EPIDEMIC SEASON

Summary

Aim. To perform the phylogenetic analysis of segments, encodes hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) of A (H3N2) influenza viruses, isolated in Ukraine during the 2011–2012 epidemic season. **Methods.** In this study there were used the real-time polymerase chain reaction (real-time RT-PCR), sequencing and phylogenetic analysis methods. **Results.** The genetic segments HA and NA of Ukrainian influenza isolates of A (H3N2) influenza were analyzed. Appropriate phylogenetic trees were constructed by Neighbor-Joining method using the Kimura 2-parameter model. The statistical evaluation of phylogenetic analysis has been performed by using the bootstrap test (1000 replicates). The genetic similarity of ukrainian isolates, vaccine strain and viruses all over the world were analyzed. All genetic groups of Victoria/208 cluster included our isolates were described. The key mutations in amino acid sequences in HA and NA proteins were identified. **Conclusions.** The multiple ways of entering the epidemic strains of influenza A (H3N2) viruses 2011–2012 season in Ukraine were identified as well. The mutations in hemagglutinin of Ukrainian isolates were located in highly variable regions and weren't associated with significant changes in viruses. No selection of resistant mutations (E119V, E119V + I222V, R292K and N294S) to oseltamivir and zanamivir in NA proteins was observed.

Key words: A(H3N2) influenza viruses, nucleotide sequence, phylogenetic analysis.



УДК 631. 811. 98

Г.О. Іутинська¹, В.А. Циганкова², Л.О. Білявська¹, В.Є. Козирицька¹

¹Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, Д03680, ДСП, Україна,
e-mail: galyna.iutynska@gmail.com

²Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,
вул. Мурманська, 1, Київ, 02660, Україна, тел.: +38(068) 122 46 73
e-mail: vTsygankova@ukr.net

ВПЛИВ НОВИХ БІОПРЕПАРАТІВ НА ОСНОВІ АВЕРКОМУ НА РОЗВИТОК І ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН ТА ЕКСПРЕСІЮ ГЕНІВ СИНТЕЗУ si/miРНК

*Мета роботи – підсилити стійкість рослин огірків і картоплі до нематод за допомогою нових ефективних мікробних препаратів на основі авермектинів та визначити молекулярно-генетичні механізми їх захисної дії. Застосовані методи польових і молекулярно-генетичних досліджень: виділення si/miРНК з клітин рослин, Дот-блот гібридизація si/miРНК з популяціями цитоплазматичних мРНК, дослідження функціональної активності si/miРНК у безклітинній системі білкового синтезу. В польових та тепличних дослідах у оброблених новими мікробними препаратами Аверком (продуцент штам *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179) та його модифікаціями рослин огірків і картоплі встановлені зменшення ураження нематодами і збільшення врожайності культур. Методом Дот-блотингу встановлено різницю (6–23%) у ступеню гомології si/miРНК та мРНК між дослідними та контрольними рослинами. У безклітинній системі білкового синтезу з проростків пшениці підтверджено високий рівень (38–65%) антинематодної сайленсингової активності малих регуляторних si/miРНК із клітин дослідних рослин. Підвищення стійкості до паразитичних нематод інфікованих рослин огірків і картоплі за обробки препаратами на основі Аверкому та встановлені різниці у відсотку гомології між популяціями малих регуляторних si/miРНК, виділеними з цих рослин, свідчать, що імунomodulatory дія препаратів виявляється в напрямку індукції в клітинах рослин синтезу антинематодних si/miРНК, унаслідок цього знижується їх ураження паразитичними нематодами та підвищується урожайність.*

Ключові слова: авермектини, стійкість рослин до паразитичних нематод, малі регуляторні si/miРНК, Дот-блот гібридизація.

Перспективним напрямком розвитку сільського господарства України є підвищення врожайності рослин та посилення їх стійкості до фітопаразитичних організмів з використанням екологічно безпечних біопрепаратів [1]. Паразитичні нематоди рослин відносять до шкодочинних факторів, серед яких найбільш шкідливими та небезпечними є галова нематода

© Г.О. Іутинська, В.А. Циганкова, Л.О. Білявська, В.Є. Козирицька, 2013



Meloidogyne incognita, що уражує широке коло важливих для сільського господарства культур, та стеблова нематода картоплі *Ditylenchus destructor* Thorne, що пошкоджує бульби картоплі та надземні органи [2]. В останні десятиліття в практику сільського господарства впроваджуються антинематодні препарати на основі макролідного антибіотика авермектину — продукту метаболізму ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis*. До нових вітчизняних ефективних мікробних препаратів належить Аверком, створений співробітниками ІМВ НАНУ на основі високопродуктивного варіанту *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 [3]. До складу препарату входять антибіотик авермектин, фосфоліпіди, ненасичені жирні кислоти, фітогормони (індолілоцтова кислота, ізопентіладенін, зеатин, зеатинрибозид, брасиностероїди), амінокислоти, вітаміни групи В. Завдяки комплексу біологічно активних речовин препарат виявляє високу нематотичну, рістстимулювальну і фітозахисну дію [3, 4].

Раніше нами були проведені дослідження з вивчення генетичних механізмів посилення за допомогою нових мікробних субстанцій, створених на основі Аверкому, стійкості рослин пшениці ярої сорту Грізо та огірків сорту Ніжинський проти фітопатогенних грибів та галової нематої *Meloidogyne incognita*. Було встановлено, що їх біозахисна дія зумовлена стимуляцією синтезу цими субстанціями у клітинах інфікованих рослин малих регуляторних si/miРНК, з антигрибковою та антинематодною специфічністю, які шляхом посттранскрипційного сайленсингу генів інгібують трансляцію або власних мРНК-транскриптів генів (що відповідають за інфекційне ураження рослин патогенами), або молекул-мішеней мРНК патогенних і паразитичних організмів [5].

Мета даної роботи — перевірити антинематодну дію нових мікробних препаратів Аверком та його похідних за показниками зниження ураження рослин огірків та картоплі фітонематодами і підвищення їх урожайності, а також за генетичними показниками — різницею у ступеню гомології між мРНК та малими регуляторними si/miРНК та перевіркою антинематодної сайленсингової активності si/miРНК у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці.

Матеріали і методи

Досліджували ефективність біозахисної дії таких мікробних препаратів: Аверком, отриманий етанольною екстракцією з міцелію 7-добової культури *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 (вміст авермектинів 100 µg/мл) та його модифікації: Аверком нова-1 (50 мл Аверкому з концентрацією антибіотика авермектину 100 µg/мл та 50 мл супернатанту рідкої культури *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 та 0,05 мМ саліцилової кислоти; загальний вміст авермектину 50 µg/мл) і Аверком нова-2 (50 мл Аверкому з концентрацією антибіотика авермектину 100 µg/мл та 50 мл супернатанту рідкої культури *S. avermitilis* УКМ Ас-2179 та 0,01 мМ хітозану водорозчинного фірми «Sigma»; загальний вміст авермектину складав 50 µg/мл).



Рослини огірка сорту Гравіна вирощували в умовах теплиці на тлі штучного зараження нематодою *Meloidogine incognita* Chitwood, 1949 в кількості 700 личинок і яєць в 100 см³ ґрунту. Через 7 діб після зараження у субстраті робили лунки, в які вносили по 100 мл 2%-вих розчинів одного з біопрепаратів; через 2 доби було висаджено розсаду, коріння якої перед тим було занурено на 5 хв у розчини відповідних біопрепаратів. Бали ураження рослин нематодами визначали за методичними вказівками [6].

Експерименти з рослинами картоплі сорту Беллароза проводили за польових умов Лісостепу України у дрібноділянкових дослідах на природному та на штучному інвазійному тлі, створеному шляхом внесення в лунки перед посадкою по 50 г бульб картоплі вражених нематодою *Dithylenchus destructor*. Дози препаратів: для обробки 1 т посадкового матеріалу брали по 0,4 л кожного з біопрепаратів і розводили у 20 л води. Дію біопрепаратів порівнювали з дією хімічного препарату «Антихруш», — контактно-системним інсектоакарицидом (імідаклоприд + біфентрин), доза якого становила 3 л на 1 т посадкового матеріалу.

Польові досліді проведені у 4 повторностях. Статистичне опрацювання даних польових досліджень проводили дисперсійним методом, розраховували найменшу істотну різницю (HP_{05}) [7].

У молекулярно-генетичних дослідях виділення si/miРНК з клітин дослідних рослин здійснювали розробленим нами оригінальним методом [8]. Дот-блот гібридизацію низькомолекулярних si/miРНК (які мітили *in vivo* за допомогою $Na_2HP^{33}O_4$) дослідних з фракцією мРНК контрольних рослин проводили згідно [9, 10]. Радіоактивність гібридних молекул визначали (за показником кількості імп/хв/20мкг мРНК) на склофільтрах «Millipore» AP-15 в толуольному сцинтиляторі, що містив флуоресцентний реагент 2,5-дифенілоксазол (ППО) в сцинтиляційному лічильнику LS 100С фірми «Beckman». Відсоток гомології визначали за різницею показників гібридизації мРНК із si/miРНК, отриманих у дослідних рослин щодо контрольних рослин.

Досліді з перевірки ефективності сайленсингової (що інгібує трансляцію мРНК з клітин інфікованих рослин) активності si/miРНК проводили у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці [11]. У цих експериментах використовували немічену si/miРНК, міченою амінокислотою для синтезу поліпептидів на матриці мРНК був S^{35} метионін [9]. Радіоактивність синтезованих у безклітинній системі поліпептидів визначали за кількістю включення S^{35} метионіну у синтезовані поліпептиди (за показником імп/хв/мг білка) на склофільтрах «Millipore» AP-15 у толуольному сцинтиляторі, що містив ППО у сцинтиляційному лічильнику LS 100С (Beckman). Рівень функціональної сайленсингової активності si/miРНК (%) визначали за різницею показників радіоактивності синтезованих поліпептидів, отриманих у дослідних щодо контрольних рослин. Статистичне опрацювання даних лабораторних дослідів проводили методом дисперсійного аналізу за Стьюдентом.

Результати та обговоренн.



У дослідях з рослинами огірків сорту Гравіна в умовах теплиці на тлі штучного зараження нематодою *M. incognita* проведені біометричні дослідження показали, що наприкінці продуктивної вегетації висота рослин огірків за дії препаратів перевищувала висоту рослин у контролі на 10–24% (табл. 1). Найвищі рослини було відмічено за дії Аверкому нова-1. Наприкінці досліду відмічені хворі рослини: ураження рослин нематодою *M. incognita* на контрольній ділянці досліду було оцінено 3,4 балами. В той же час за дії біопрепаратів відмічено різке зниження ступеню ураження рослин нематодою. За обробки рослин Аверкомом нематодного ураження не виявлено, за дії модифікацій Аверкому ураження рослин не перевищувало 0,2–1,0 балу.

Таблиця 1

Біометрична характеристика і ступінь ураження рослин огірків сорту Гравіна за дії біопрепаратів

Table 1

Biometric characteristics and degree of attacking cucumbers variety Gravina at action of biopreparations

Варіант досліду	Висота рослини		Ураження рослин нематодою <i>M. incognita</i> , бал
	см	% від контролю	
Контроль без застосування біопрепаратів	168±5,9	100	3,4
Аверком	197±6,9	117	0
Аверком нова-1	208±7,3	124	0,2
Аверком нова-2	184±6,4	110	1,0

Урожай огірка сорту Гравіна за дії біопрепаратів вищий порівняно з контролем на 16–26%. Найбільший урожай було зібрано на ділянці, де був застосований Аверком (табл. 2).

Таблиця 2

Урожай огірків сорту Гравіна за дії біопрепаратів

Table 2

Crop of cucumbers of variety Gravin at action of biopreparations

Варіант досліду	Урожай, кг/м ²	Приріст урожаю	
		кг/м ²	% від контролю
Контроль, без застосування біопрепаратів	6,8	0	100
Аверком	8,6	1,8	126
Аверком нова-1	8,3	1,5	122
Аверком нова -2	7,9	1,1	116
НІР ₀₅	0,2		



Досліди з картоплею сорту Беллароза, проведені на природному інвазійному тлі та на штучно створеному за умов зараження посадкового матеріалу стебловою нематодою картоплі *Dithylenchus destructor* показали, що використані в досліді біопрепарати впливали на рівень ураження бульб картоплі дитиленхозом і продуктивність культури (табл. 3).

Таблиця 3

Ураження дитиленхозом і продуктивність рослин картоплі за різних умов вирощування

Table 3

Spreading of potato ditylenchosis and productivity of potato plants under different conditions of growing

Варіант досліді	Ураження дитиленхозом		Продуктивність культури		
	Кількість хворих бульб, %	Біологічна ефективність препарату, %	Урожай, ц/га	Приріст урожаю	
Природне тло					
Контроль (без обробки)	40,1	-	165	0	100
Антихрущ, к.с.	27,9	30,4	172	7	4,2
Аверком	11,8	70,5	185	20	12,1
Аверком нова-1	24,7	38,4	170	5	3,0
Аверком нова-2	34,4	14,2	175	10	6,1
НІР ₀₅	5,1	-	8,0		
Штучне інвазійне тло					
Контроль (без обробки)	48,0	-	154	0	100
Антихрущ, к.с.	37,0	22,9	158	4	2,6
Аверком	21,5	55,2	170	16	10,4
Аверком нова-1	34,0	29,2	166	12	7,8
Аверком нова-2	44,0	8,3	161	7	4,5
НІР ₀₅	5,1	-	7,0		

У варіанті із застосуванням Аверкому статистично достовірно знижувалася кількість хворих на дитиленхоз бульб: на 28,3% без інвазії і на 26,5% на інвазійному тлі порівняно з контролем. Біологічна ефективність Аверкому сягала більше як 70% у досліді на природному нематодному тлі та 55% за умов штучного інфікування нематодами; на другому місці за біологічною ефективністю був Аверком нова-1 — відповідно 38,4% і



29,2%. Хімічний препарат «Антихрущ» виявив меншу ефективність порівняно з зазначеними вище біопрепаратами.

На природному нематодному тлі найбільшої статистично достовірної прибавки урожаю картоплі було досягнуто за дії Аверкому 12,1% порівняно з контролем. На штучно створеному інвазійному тлі Аверком сприяв зростанню на 10,4% урожаю картоплі сорту Беллароза.

Методом Дот-блот гібридизації порівняно ступені гомології між популяціями цитоплазматичних мРНК та si/miРНК, виділеними з контрольних та дослідних рослин картоплі сорту Беллароза та рослин огірків сорту Гравіна, що вирощувалися у польових умовах на штучному інфекційному тлі та оброблялися препаратами Аверкомом та його модифікаціями (табл. 4).

Таблиця 4

Ступінь (%) гомології між мРНК контрольних рослин та si/miРНК дослідних рослин картоплі та огірків, оброблених біозахисними препаратами та інфікованих паразитичною галловою нематодою *M. incognita* і стебловою нематодою картоплі *Diethylenchus destructa*

Table 4

The degree (%) of homology between mRNA of the control plants and si/miRNA of experimental plants of potato and cucumber, treated with bioprotective preparations and infected by parasitic gallic nematode *M. incognita* and stem nematode of potato *Diethylenchus destructa*

Біозахисні препарати	Сільсько-господарські культури	Ступінь гомології (%) по гібридизації мРНК з гомологічними si/miРНК контрольних рослин (імп/хв/20 мкг мРНК)	Ступінь гомології (%) по гібридизації мРНК з контрольних рослин із si/miРНК рослин, оброблених препаратом та вирощених на інфекційному тлі (імп/хв/20 мкг мРНК), %
Дистильована вода (контроль)	Картопля	8456±218 (98±0,92%)*	---
	Огірки	8456±196 (98±0,83%)*	---
Аверком	Картопля	8456±218 (98±0,92%)*	7679±132 (89±1,7%)**
	Огірки	8456±196 (98±0,83%)*	7938±130 (92±1,5%)**
Аверком-нова 1	Картопля	8456±218 (98±0,92%)*	7852±164 (91±1,9%)**
	Огірки	8456±196 (98±0,83%)*	7162±104 (83±1,2%)**
Аверком-нова 2	Картопля	8456±218 (98±0,92%)*	6730±121 (78±1,4%)**
	Огірки	8456±196 (98±0,83%)*	7162±147 (83±1,7%)**

наявність достовірних відмінностей дослідних показників** відносно контролю*, $p < 0,05$, $n=3$

Порівняльний аналіз показника ступеню (%) гомології si/miРНК до мРНК між контрольними та дослідними рослинами (за різницями у відсотку гібридних молекул мРНК та si/miРНК, отриманому у дослідних рослин, порівняно з аналогічним показником у контрольних рослин), показав, що найбільша різниця у відсотку гомології щодо контрольних рослин спостерігалася у дослідних рослин, оброблених біозахисними препаратами: Аверкомом нова-2 (до 20% — картопля та до 15% — огірки) та Аверкомом нова-1 (до 15% — огірки та до 7% — картопля); меншу різницю за даним показником встановлено у дослідних рослин, оброблених препаратом Аверком (до 6% — огірки та 9% — картопля).

Проведене у безклітинних системах білкового синтезу з проростків пшениці тестування функціональної інгібуючої активності (антисенсової до мРНК інфікованих нематодами рослин) малих регуляторних si/miРНК, виділених з клітин контрольних та дослідних рослин, показало значне підвищення рівня (що наближався до рівня контрольних № 1 неінфікованих рослин) пригнічення біосинтезу поліпептидів у безклітинних системах протеїнового синтезу на матрицях мРНК з клітин рослин огірків, інфікованих гальною нематодою *M. incognita*, а також з клітин рослин картоплі, інфікованих стебловою нематодою картоплі *D. destructor* (табл. 5).

Таблиця 5

Рівень (%) сайленсингової активності si/miРНК, виділених із контрольних рослин (неінфікованих нематодами та необроблених препаратами) та з дослідних рослин картоплі та огірків (оброблених біозахисними препаратами та інфікованих паразитичною гальною нематодою *M. incognita* і стебловою нематодою картоплі *Diethylenchus destructor*)

Table 5

The level (%) of silencing activity of si/miRNA isolated from control plants (uninfected by nematodes and untreated by preparations) and experimental plants of potato and cucumber (treated with bioprotective preparations and infected by parasitic galling nematode *M. incognita* and stem nematode of potato *Diethylenchus destructor*)

Біозахисні препарати	Варіанти дослідів	Сільсько-господарські культури	Показник інгібування білкового синтезу у безклітинній системі з проростків пшениці (імп/хв/мг білку), %
1	2	3	4
Контроль 1 (дистильована вода)	мРНК + si/miРНК із контрольних неінфікованих рослин	Картопля	12562±215 (100±0,9%)*
		Огірки	8121±112 (100±0,7%)*
Контроль 2 (дистильована вода)	мРНК + si/miРНК із контрольних інфікованих рослин	Картопля	1884±310 (15±1,3%)**
		Огірки	1624±240 (20±1,5%)**



1	2	3	4
Аверком	мРНК + si/miРНК із дослідних інфікованих рослин	Картопля	4774±406 (38±1,7%)**
		Огірки	3410±192 (42±1,2%)**
Аверком-нова 1	мРНК + si/miРНК із дослідних інфікованих рослин	Картопля	4647±290 (37±1,5%)**
		Огірки	3654 ±272 (45±1,7%)**
Аверком-нова 2	мРНК + si/miРНК із дослідних інфікованих рослин	Картопля	6909±453 (55±1,9%)**
		Огірки	3816 ±176 (47±1,1%)**

наявність достовірних відмінностей дослідних показників** відносно контролю №1*,
p<0,05, n=3

Найвищу активність (порівняно з контролем № 1) виявляли si/miРНК, ізольовані з дослідних рослин, оброблених препаратами: Аверкомом нова-2 (до 55% інгібування — картопля та до 47% огірки) та Аверкомом нова-1 (до 45% — огірки та до 37% — картопля); меншу ефективність за даним показником виявляли si/miРНК, ізольовані з дослідних рослин, оброблених Аверкомом (до 42% інгібування — огірки та до 38% — картопля). Значно менший рівень сайленсингової активності si/miРНК (до 15% інгібування — картопля, до 20% — огірки), встановлено у виділених з інфікованих та необроблених препаратами рослин (контроль № 2).

Таким чином, у польових та тепличних умовах на культурах огірка сорту Гравіна та картоплі сорту Беллароза доведено високу біозахисну щодо нематод активність нових комплексних препаратів на основі авермектинів, які знижували ураження рослин паразитичними нематодами і підвищували урожайність: огірків і картоплі. Методом Дот-блот гібридизації мРНК із si/miРНК встановлено, що авермектинмісні препарати знижують відсоток гомології si/miРНК до мРНК у інфікованих рослинах відносно контрольних рослин в діапазоні від 6 до 23%. Отримані розбіжності в показниках відсотків гомології можуть бути наслідком активації препаратом у клітинах рослин синтезу малих регуляторних si/miРНК з антинематодними властивостями. На користь цього припущення свідчать також результати щодо підвищення мікробними препаратами в клітинах інфікованих рослин рівня сайленсингової активності si/miРНК (до 38–65% інгібування трансляції мРНК інфікованих рослин), унаслідок чого значно підвищується стійкість рослин до паразитичних нематод.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Иутинская Г.А., Титова Л.В., Белявская Л.А., Козырицкая В.Е.* Создание микробных препаратов с биозащитными и фитостимулирующими свойствами // Биологическая защита растений — основа стабилизации агроэкосистем // Современные мировые тенденции в производстве и применении биологических и экологических малоопасных средств защиты растений. Материалы международной научно-практической конференции (25–27 сентября 2012). Выпуск 7. — Краснодар. — 2012. — С. 181–184.
2. *Ильяшенко Д.А., Иванюк В.Г.* Особенности проявления дитиленхоза картофеля и некоторые меры борьбы с ними в условиях Беларуси // Землеробства і ахова раслін. — 2006. — № 3. — С. 38–41.
3. *Биорегуляция* микробно-растительных систем: Монография / Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андreyк Е.И. и др.; Под общей ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко. — К.: Ничлава, 2010. — 464 с.
4. *Белявская Л.А., Козырицкая В.Е., Валагурова Е.В., Иутинская Г.А.* Биологически активные вещества препарата аверком // Мікробіологічний журнал. — 2012. — 74, № 3. — С. 10–15.
5. *Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Білявська Л.О., Козирицька В.Є., Іутинська Г.О., Галкін А.П., Галаган Т.О., Болтовська О.В.* Рістстимулюючі, фунгіцидні і нематодцидні властивості нових субстанцій мікробного походження та їх вплив на синтез малих si/miРНК в клітинах рослин // Мікробіол. журн. — 2012. — Т. 74, № 6. — С. 3–12.
6. *Сигарева Д.Д.* Методические указания по выявлению и учету паразитических нематод полевых культур. — Киев: Урожай, 1986. — 41 с.
7. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований): 5-е изд. доп. и перераб. / Доспехов Б.А. — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
8. *Циганкова В.А., Андрусевич Я.В., Блюм Я.Б.* Виділення з клітин рослин малих регуляторних si/mi RNA з антинематодною активністю // Доп. НАН України. — 2011. — № 9. — С. 159–164.
9. *Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.* Molecular cloning: A laboratory manual. — New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982. — 480 p.
10. *Tsygankova V. A.* Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // Biotechnology. — 2010. — V. 3, № 4. — P. 86–95.
11. *Цыганкова В.А., Мусатенко Л.И., Пономаренко С.П., Галкина Л.А., Андрусевич Я.В., Галкин А.П.* Изменение популяций функционально активных цитоплазматических мРНК в клетках растений под влиянием регуляторов роста и биотехнологические перспективы бесклеточных систем белкового синтеза // Біотехнологія. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 19–32.

Стаття надійшла до редакції 14.03.2013 р.



Г.А. Иутинская¹, В.А. Цыганкова², Л.А. Белявская¹, В.Е. Козырицкая¹

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, Д03680, ДСП, Украина,
e-mail: galyna.iutynska@gmail.com

²Институт биорганической химии и нефтехимии НАН Украины,
ул. Мурманская, 1, Киев, 02660, Украина,
e-mail: vTsygankova@ukr.net

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ АВЕРКОМА НА РАЗВИТИЕ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ И НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ СИНТЕЗА si/miРНК

Реферат

Цель работы — усилить устойчивость растений огурцов и картофеля к нематодам с помощью новых эффективных микробных препаратов на основе авермектинов и определить молекулярно-генетические механизмы их защитного действия. Используются методы полевых и молекулярно-генетических исследований: выделение si/miРНК из клеток растений, Дот-блот гибридизация si/miРНК с популяциями цитоплазматических мРНК, исследование функциональной активности si/miРНК в бесклеточной системе белкового синтеза. В полевых и тепличных опытах у обработанных новыми микробными препаратами Аверком (продуцент штамм *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179) и его модификациями растений огурцов и картофеля установлены уменьшение поражения нематодами и увеличение урожайности культур. Методом Дот-блотинга установлена разница (6–23%) в степени гомологии si/miРНК и мРНК между опытными и контрольными растениями. В бесклеточной системе белкового синтеза из проростков пшеницы подтвержден высокий уровень (38–65%) антинематодной сайленсинговой активности малых регуляторных si/miРНК из клеток опытных растений. Повышение устойчивости к паразитическим нематодам инфицированных растений огурцов и картофеля при обработке препаратами на основе Аверкома и установленные различия в проценте гомологии между популяциями малых регуляторных si/miРНК, выделенных из этих растений, свидетельствуют, что иммуномодулирующее действие этих препаратов проявляется в направлении индукции в клетках растений синтеза антинематодных si/miРНК, вследствие чего снижается их поражение паразитическими нематодами и повышается урожайность.

Ключевые слова: авермектины, устойчивость растений к паразитическим нематодам, малые регуляторные si/miРНК, Дот-блот гибридизация.



H.O. Iutinska¹, V.A. Tsygankova², L.O. Beljavska¹, V.E. Kozyriska¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine,
e-mail: galyna.iutynska@gmail.com

²Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NASU,
1, Murmanska str., Kyiv, Ukraine, e-mail: vTsygankova@ukr.net

**INFLUENCE OF NEW BIOPREPARATIONS BASED ON
AVERKOM ON DEVELOPMENT AND PRODUCTIVITY OF
THE PLANTS AND ON EXPRESSION OF GENES
OF si/miRNA SYNTHESIS**

Summary

Aim. To strengthen the resistance of cucumbers and a potato plants to nematodes by means of new effective microbic preparations on the basis of avermectines and to determine the molecular-genetic mechanisms of their protective action. **Methods.** Methods of field and molecular-genetic experiments, such as: isolation of si/miRNA from plant cells, the Dot-blot hybridization si/miRNA with populations of cytoplasmic mRNA, investigation of functional activity si/miRNA in cell free system of protein synthesis. **Results.** In the field and greenhouse experiments at cucumbers and potato plants treated by new microbic preparations Averkom (producer strain *Streptomyces avermitilis* UKM Ac-2179) and its modifications the reduction of affection by parasitic nematodes and increase in productivity of cultures are determined. By Dot-blot method the difference (6–23%) is found in the degree of homology si/miRNA and mRNA between the experimental and control plants. In the cell free systems of protein synthesis from wheat sprouts the high level (38–65%) antinematode silencing activity of small regulatory si/miRNA from cells of experimental plants is confirmed. **Conclusions.** Increase of resistance to parasitic nematodes of the infected cucumbers and potato plants at the treatment by preparations on the basis of Averkom and the established differences in homology percent between populations of small regulatory si/miRNA, isolated from these plants, evidence that immunomodulating action of these preparations is occurred in the direction of induction in plant cells of antinematode si/miRNA synthesis, as a result their affection by parasitic nematodes decreases and productivity raises.

Key words: avermectines, plant resistance to parasitic nematodes, small regulatory si/miRNA, Dot-blot hybridization.



І.О. Скороход, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна,
тел.: +38(096) 297 81 10, e-mail: aphalina.85@mail.ru

ВПЛИВ НАНОЧАСТОЧОК ДІОКСИДУ КРЕМНІЮ ТА ВЕРМИКУЛІТУ НА АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7023

*Метою роботи було дослідження впливу наночастинок діоксиду кремнію та вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *Bacillus subtilis* IMB B-7023. Застосовуючи ряд мікробіологічних і біохімічних методів досліджень, встановлено, що культивування цих бактерій у середовищі, яке містило 0,05–0,5 г/л наночастинок SiO_2 чи 1,5–2,5 г/л вермикуліту, супроводжувалося підвищенням позаклітинної пероксидазної активності. Однак при подальшому збільшенні дози досліджуваних матеріалів цей показник знижувався. На позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність, а також на внутрішньоклітинну пероксидазну активність баціл наночастинок діоксиду кремнію та часточок вермикуліту помітного впливу не спричиняли. Таким чином встановлено, що низькі концентрації досліджених матеріалів викликають помірний прооксидантний ефект, який підвищує активність позаклітинних ферментів антиоксидантного захисту *B. subtilis* IMB B-7023, тоді як високі дози зумовлюють оксидативний стрес і пригнічують функціонування у мікроорганізмів їх протекторного комплексу.*

*Ключові слова: *Bacillus subtilis* IMB B-7023, каталазна активність, пероксидазна активність, діоксид кремнію, вермикуліт.*

Фосфатмобілізувальні бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7023 є компонентом комплексного бактеріального препарату, застосування якого в сільськогосподарському виробництві дозволяє суттєво покращити ріст і розвиток рослин та підвищити їх урожайність. При інтродукції цих мікроорганізмів у агроєкосистему на них будуть впливати різні її складові, зокрема наноматеріали ґрунту [7].

Наноматеріалами вважаються такі дисперсні часточки, розміри яких хоча б в одному геометричному вимірі є меншими за 100 нм [1]. В наностані більшість речовин набуває ряду нових властивостей, які суттєво відрізняються від вихідних у тих самих сполук мікронного чи більшого розміру. До комплексу фізико-хімічних характеристик наночастинок вхо-



дить збільшення розчинності, адсорбційної ємності, хімічної реакційної здатності та каталітичних властивостей. При взаємодії живих об'єктів з такими матеріалами це часто призводить до накопичення в клітинах активних форм кисню (АФК), які пошкоджують ліпіди, протеїни, нуклеїнові кислоти [5]. Вплив наноматеріалів на функціонування системи антиоксидантного захисту фосфатмобілізувальних бактерій не досліджено. Зважаючи на це, метою даної роботи є визначення дії наночасточок діоксиду кремнію та вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *B. subtilis* ІМВ В-7023.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *B. subtilis* ІМВ В-7023 [18]. Мікроорганізми вирощували в періодичних умовах протягом 22 год при 28 °С на качалці (260 об/хв.) в колбах Ерленмейєра, що містили 100 мл поживного середовища складу, (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — 14,0; KH_2PO_4 — 6,0; натрій лимоннокислий — 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2; глюкоза — 10,0. Вихідне рН 7,0 — 7,2 [16]. Початковий вміст життєздатних бактерій складав 10^6 кл/мл. Отриману суспензію *B. subtilis* ІМВ В-7023 вносили по 100 мл у колби зі стерильними наважками наноматеріалів: діоксиду кремнію (0,05—1 г/л) чи вермикуліту (1,5—5 г/л) та культивували протягом 2 год. Контрольним варіантом було поживне середовище з бактеріями без додавання діоксиду кремнію чи вермикуліту.

Діоксид кремнію наданий Інститутом хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. Розмір наночасточок SiO_2 становив 5—20 нм. Часточки вермикуліту отримували з його дисперсної форми, яку декілька разів промивали та висушували в сушильній шафі. Після просушки вермикуліт подрібнювали 2—3 рази у гомогенізаторі протягом 5 хв та просівали через сито з діаметром пор 0,1 мм.

Чисельність життєздатних клітин у суспензії визначали методом серійних розведень з подальшим висівом на поверхню агаризованого середовища (картопляний агар) в чашках Петрі та підрахунком на них вирощених колоній бактерій.

Для визначення позаклітинної каталазної та пероксидазної активностей, отриману культуральну рідину (КР) *B. subtilis* ІМВ В-7023 звільняли від клітин шляхом центрифугування на центрифугі ОПн-8 протягом 25 хв при 5000 g.

Для оцінки внутрішньоклітинної каталазної і пероксидазної активностей, осаджену біомасу двічі ресуспендували у 0,15 М фосфатному буфері (рН 7,0). Клітини руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі типу UD-20 automatic (робоча частота 22 кГц,) протягом 2 хв на льоду. Від залишків клітин звільнялися центрифугуванням отриманої суспензії на рефрижераторній центрифугі К26D протягом 30 хв при 5200 g (4 °С).



Каталазну активність визначали спектрофотометричним методом, принцип якого базується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс. Інтенсивність забарвлення вимірювали при довжині хвилі 410 нм. Каталазну активність виражали в мілімолях розкладеного H_2O_2 /хв на 1 мг білка [6, 12].

Пероксидазну активність визначали спектрофотометричним методом, який ґрунтується на зниженні концентрації індигокарміну, що окиснюється пероксидом водню в присутності пероксидази. Інтенсивність забарвлення вимірювали при довжині хвилі 610 нм [10]. Пероксидазну активність виражали в мікромолях/хв/1 мг білка.

Концентрацію білка у пробах визначали за його зв'язуванням із кумасі яскраво-синім [13], використовуючи як стандарт альбумін сироватки бика.

Всі експерименти виконувалися у трьох повтореннях. Статистичне опрацювання результатів здійснювали за використання критерію Стьюдента [8].

Результати та їх обговорення

Унікальність ряду властивостей нанорозмірного діоксиду кремнію зумовлена хімічною активністю його поверхні. Більшою мірою його біологічна дія носить мембранотропний характер [4]. При контакті такого наноматеріалу з клітинами, відбувається підвищення продукції АФК, які є чинниками перекисного окиснення біологічно активних молекул [15]. Активним інгібітором цього процесу є пероксидаза. Встановлено, що вплив наночасток діоксиду кремнію на пероксидазну активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 визначався його вмістом у середовищі. За внесення 0,05 г/л цього наноматеріалу позаклітинна пероксидазна активність бацил зростала на 43,8%, а внутрішньоклітинна — на 74,2%. При подальшому збільшенні дози діоксиду кремнію до 0,1 та 0,5 г/л, ці показники були ще вищими. Однак при додаванні в середовище 1 г/л цього матеріалу, позаклітинна та внутрішньоклітинна пероксидазна активність знижувалася (рис. 1), що може бути пов'язано, згідно літературних даних, з дозозалежним цитотоксичним ефектом наростання оксидативного стресу [5].

Бактерії *B. subtilis* характеризуються високим рівнем позаклітинної каталазної активності [14]. Встановлено, що при збільшенні вмісту наночасточок діоксиду кремнію позаклітинна каталазна активність *B. subtilis* ІМВ В-7023 мала тенденцію до зростання дуже повільно. Можливо, це зумовлено специфічністю даного ензиму антиоксидантного захисту до стрес-агентів. Пероксидаза першою реагує на пероксидацію ліпідів і інактивує значну кількість пероксидів (H_2O_2 , гідропероксиди, пероксинітрит), а каталаза детоксикує лише H_2O_2 , але розклад органічних пероксидів цей ензим не каталізує [9]. На внутрішньоклітинну каталазну активність наноматеріал впливу не спричиняв. Вона залишалася на рівні контролю, в який діоксид кремнію не вносили (табл. 1).

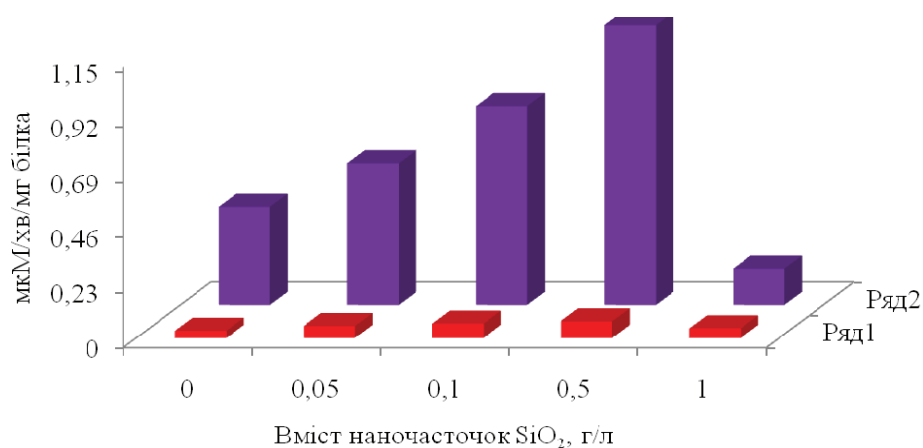


Рис.1. Вплив наночастинок діоксиду кремнію на позаклітинну та внутрішньоклітинну пероксидазну активність *B. subtilis* IMV V-7023
Ряд 1 – внутрішньоклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 6%); Ряд 2 – позаклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 3%).

Fig.1. Effect of nanoparticles of silica on extracellular and intracellular peroxidase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Row 1 – intracellular peroxidase activity (a relative error folder 6%);
Row 2 – extracellular peroxidase activity (a relative error folder 3%).

Наночастички SiO₂ не проявляють руйнівної дії на більшість полімерів, що є складовими цитоплазматичної мембрани бактерій і не спричиняють їх лізису. Існує припущення, що нанорозмірний SiO₂, концентруючись на поверхні мікробної клітини, викликає порушення її функцій, зокрема нейтралізує адгезивні властивості за рахунок денатурації мембранних білків і блокування факторів адгезії [3].

Таблиця 1

Вплив наночастинок діоксиду кремнію на позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність *B. subtilis* IMV V-7023

Table 1

Effect of nanoparticles of silica on extracellular and intracellular catalase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Вміст SiO ₂ , г/л	Каталазна активність, mM H ₂ O ₂ /хв×мг білка	
	в культуральному середовищі	в супернатанті
0	2,84 ± 0,11	0,68 ± 0,14
0,05	2,87 ± 0,13	0,69 ± 0,11
0,1	2,88 ± 0,10	0,69 ± 0,15
0,5	2,90 ± 0,09	0,69 ± 0,13
1,0	2,96 ± 0,13	0,70 ± 0,15



Оскільки вплив наночастинок діоксиду кремнію переважно мембранотропного характеру, можливо через це показники внутрішньоклітинної каталазної активності майже не змінювалися.

Відомо, що вермикуліт використовується як наповнювач при створенні бактеріальних препаратів [2]. Тому, представляло інтерес дослідити активність ензимів антиоксидантного захисту *B. subtilis* IMB B-7023 за присутності цього мінералу. Встановлено, що внесення часточок вермикуліту в суспензію *B. subtilis* IMB B-7023 спричиняє помітний вплив на активність позаклітинної пероксидази. За присутності в середовищі 1,5 та 2,5 г/л вермикуліту, цей показник зростає, порівняно з контрольним варіантом, на 163% і 186%, відповідно. При внесенні більш високих доз часточок мінералу (5 г/л) спостерігалось зниження позаклітинної пероксидазної активності. В той же час, внутрішньоклітинна пероксидазна активність практично не змінювалася (рис. 2).

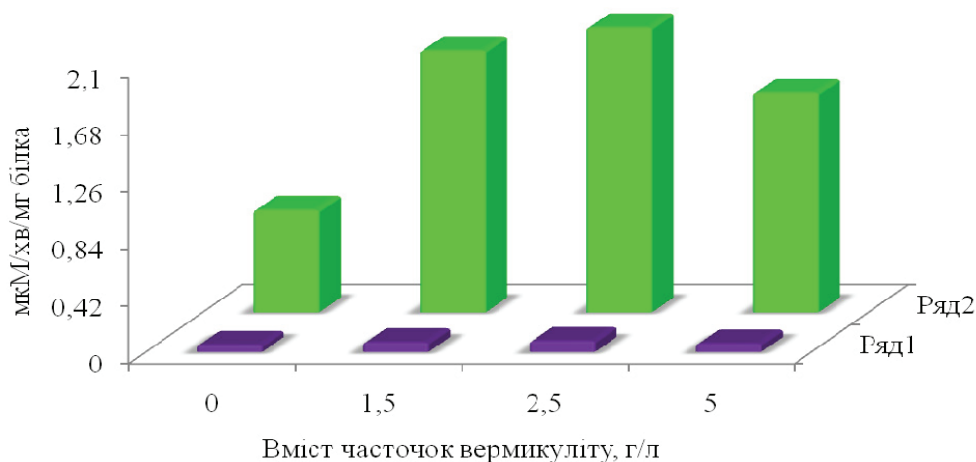


Рис. 2. Вплив наночастинок вермикуліту на позаклітинну та внутрішньоклітинну пероксидазну активність *B. subtilis* IMB B-7023

Ряд 1 — внутрішньоклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 6%); Ряд 2 — позаклітинна пероксидазна активність (відносна похибка складала 4%).

Fig. 2. Effect of nanoparticles of vermiculite on extracellular and intracellular peroxidase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Row 1 — intracellular peroxidase activity (a relative error folder 6%);
Row 2 — extracellular peroxidase activity (a relative error folder 4%).

За культивування *B. subtilis* IMB B-7023 в середовищі з різними дозами часточок вермикуліту спостерігалось достовірне ($p < 0,05$ в усіх випадках) до 109,0, 110,2, 111,6% підвищення позаклітинної каталазної активності бактерій при вмісті вермикуліту 1,5, 2,5, та 5,0 відповідно. Однак цей матеріал не спричиняв суттєвого впливу на внутрішньоклітинну каталазну активність. Вона залишалася на рівні контролю (табл. 2).

Вплив наночастинок вермикуліту на позаклітинну та внутрішньоклітинну каталазну активність *B. subtilis* IMB B-7023

Effect of nanoparticles of vermiculite on extracellular and intracellular catalase activity of *B. subtilis* IMV V-7023

Вміст вермикуліту, г/л	Каталазна активність, мМ Н ₂ О ₂ /хв×мг білка	
	в культуральному середовищі	в супернатанті
0	6,98 ± 0,12	0,53 ± 0,02
1,5	7,61 ± 0,17	0,54 ± 0,05
2,5	7,69 ± 0,17	0,54 ± 0,01
5,0	7,79 ± 0,18	0,55 ± 0,03

Отримані результати можна пояснити, виходячи з виразу «доза визначає механізм». При цьому токсичність з формуванням оксидативного стресу залежить не лише від вмісту досліджуваного матеріалу, а й від його поверхні та хімічного складу [17].

Приблизна формула вермикуліту (Mg⁺², Fe⁺², Fe⁺³)₃ [(AlSi)₄O₁₀](OH)₂×4H₂O. Його хімічний склад: (MgO) 14–23%, (FeO) 1–3%, (Fe₂O₃) 5–17%, (Al₂O₃) 10–13%, (SiO₂) 37–42%, (H₂O) 8–18% [2]. Слід припустити, що оскільки вміст SiO₂ є досить високим, він може ініціювати перекисне окиснення біомолекул [4], активуючи при цьому позаклітинну пероксидазну активність бацил за певної дози часточок вермикуліту в живильному середовищі. Однак із збільшенням вмісту досліджуваного матеріалу вплив SiO₂ зростає, пригнічуючи пероксидазну активність в культуральному середовищі. Такий ефект можна пояснити дозозалежним наростанням оксидативного стресу, який спричиняє зниження активності ензимів антиоксидантного захисту [5].

Оскільки каталаза активізує лише розклад Н₂О₂, але не впливає на інші пероксиди [9], можливо тому її активність зростає незначно. Слід припустити, що зниження позаклітинної каталазної активності не відбувалося завдяки високому її рівню у бацил в стаціонарній фазі росту, а також стійкості до великих концентрацій пероксиду водню [14].

Відомо, що каталаза та пероксидаза є металоензимами, до складу їх активних центрів входять йони заліза та мангану [11]. В складі вермикуліту присутні йони Fe⁺² та Fe⁺³, можливо саме вони зумовлюють зростання каталазної та пероксидазної активностей *B. subtilis* IMB B-7023, але до певного вмісту в живильному середовищі наноматеріалу.

Виходячи з отриманих результатів з оцінки впливу наночастинок діоксиду кремнію та часточок вермикуліту на активність ензимів антиоксидантного захисту *B. subtilis* IMB B-7023, а також літературних даних [15], можна зробити



висновок, що низькі концентрації різних матеріалів викликають помірний про-оксидантний ефект, який активізує компоненти антиоксидантної системи клітин бактерій, тоді як високі дози зумовлюють оксидативний стрес і пригнічують функціонування їх протекторного комплексу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Балабанов В. И. Нанотехнологии. Наука будущего. — М.: Эксмо, 2009. — 256 с.
2. Бегунова Т. Г., Дьяков А. Г., Усков М. Е., Гаврилюк Т. И. Приазовские месторождения вермикулита // Разведка и охрана. — 1970. — № 10. — 15 с.
3. Бондарчук О.И. Механизмы антисептического действия полисорба // Материалы. 2 Укр. научн. конф. с международ. участием «Актуальные проблемы клинической фармакологии». — Винница, 1998. — С. 228—229.
4. Геращенко И.И. Мембранотропные свойства наноразмерного кремнезема // Поверхность. — 2009. — Вып. 1 (16). — С. 288—306.
5. Гмошинский И.В., Смирнова В.В., Хотимченко С.А. Современное состояние проблемы оценки безопасности наноматериалов // Российские нанотехнологии. — 2010. — 5, № 9—10. — С. 6—10.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. — 1988. — № 1. — С. 16—19.
7. Курдиш І.К. Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми. — Київ: Наукова думка, 2010. — 253 с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. — Москва: Высш. шк., 1968. — 24 с.
9. Николлс П. Оксигеназно-пероксидазная теория Баха и Шода и её современные эквиваленты: изменения и постоянство в научном мышлении на примере нашего понимания роли воды, перекиси и кислорода в функционировании редокс-ферментов (обзор) // Биохимия. — 2007. — 72, вып. 10. — С. 1278—1288.
10. Попов Т., Нейковская Л. Метод определения пероксидазной активности крови // Гигиена и санитария. — 1971. — № 10. — С. 89—91.
11. Рич П.Р., Иваки М. Сравнение интермедиатов катализа активных центров цитохром с-оксидазы и пероксидаз // Биохимия. — 2007. — 72, вып. 10. — С. 1289—1299.
12. Хлебников В. В., Терехина Н. А., Соснин Д. Ю., Боровик Г. А. Активность ферментов крови и желчи у больных холелитиазом на фоне патологии печени // Материалы докладов научной конференции «Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической медицины». — Киров, 1995. — С. 120—121.

13. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — 72. — P. 248–254.
14. *Naclerio G., Baccigalupi L., Caruso C., Felice M.De., Ricca E.* *Bacillus subtilis* vegetative catalase is an extracellular enzyme // *Applied and environmental microbiology.* — 1995. — 61, № 12. — P. 4471–4473.
15. *Nel A., Xia T., Madler L.* Toxic potential of materials at the nano-level // *Science.* — 2006. — 311. — P. 622–626.
16. *Spizizen J.* Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1958. — 44. — P. 1072–1078.
17. *Zhu Lin, Chang Dong.* DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells // *Nano Lett.* — 2007. — 7. — № 12. — P. 3592–3597.
18. *Патент* України № 54923 А. Штам *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального препарату для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. / Опубл. 17.03 2003. Бюл. № 3.

Стаття надійшла до редакції 04.03.2013 р.

И.А. Скороход, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (096) 297 81 10, e-mail: aphalina.85@mail.ru

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ
И ВЕРМИКУЛИТА НА АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ *BACILLUS SUBTILIS*
ИМВ В-7023**

Реферат

Целью работы было исследование влияния наночастиц диоксида кремния и вермикулита на активность энзимов антиоксидантной защиты *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023. Используя ряд микробиологических и биохимических методов исследований, установлено, что культивирование этих бактерий в среде, которая содержала 0,05–0,5 г/л наночастиц SiO₂ и 1,5 или 2,5 г/л вермикулита, сопровождалось повышением внеклеточной пероксидазной активности. Однако при дальнейшем увеличении дозы исследуемых материалов этот показатель снижался. На внеклеточную и внутриклеточную каталазную активность, а также на внутриклеточную пероксидазную активность бацилл наночастицы диоксида кремния и частицы вермикулита существенного влияния не имели.



Таким образом, установлено, что низкие концентрации исследуемых материалов вызывают умеренный прооксидантный эффект, который повышает активность внеклеточных ферментов антиоксидантной защиты *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, тогда как высокие дозы обуславливают оксидативный стресс и угнетают функционирование у микроорганизмов их протекторного комплекса.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023, каталазная активность, пероксидазная активность, диоксид кремния, вермикулит.

I.O. Skorochoch, I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38(096) 297 81 10, e-mail: aphalina.85@mail.ru

INFLUENCE OF NANOPARTICLES OF SILICA AND VERMICULITE ON ACTIVITY OF ENZYMES OF ANTIOXIDANT DEFENCE

Summary

The aim of the work was to research the influence of nanoparticles of silica and vermiculite on activity of enzymes of antioxidant defence of *Bacillus subtilis* IMV V-7023. Using a number of microbiological and biochemical methods of researches, it is determined that cultivation of these bacteria in media that contained 0.05–0.5 g/l of nanoparticles of SiO₂ or 1.5–2.5 g/l of vermiculite was accompanied by increasing of extracellular peroxidase activity. However, at the further increase of dose of the investigated materials that index went down. On extracellular and intracellular catalase activity as well as on intracellular peroxidase bacilli activity both nanoparticles of silica and particles of vermiculite of substantial did not have any influence. Thus, it is ascertained that the subzero concentrations of the investigated materials cause a moderate prooxidant effect which promotes activity of extracellular enzymes of antioxidant defence of *Bacillus subtilis* IMV V-7023, while high doses stipulate oxidative stress and oppress functioning of microorganisms protector complex.

Key words: *Bacillus subtilis* IMV V-7023, catalase activity, peroxidase activity, silica, vermiculite.



УДК 582.28:577.158

Т.Є. Волошко, О.В. Федотов

Донецький національний університет,
вул. Університетська, 24, Донецьк, 83000, Україна,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

ВПЛИВ ДЕЯКИХ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

*Стаття присвячена вивченню впливу деяких мікроелементів на ріст та активність антиоксидантних оксидоредуктаз базидіальних грибів. Об'єктами дослідження були штами – активні продуценти оксидоредуктаз: *Agrocybe cylindracea* 167; *Pleurotus ostreatus* P-208 та *Fistulina hepatica* Fh-08. Для вивчення впливу мікроелементів на швидкість росту використовували ваговий метод визначення накопичення абсолютно сухої біомаси. Каталазну, пероксидазну та супероксиддисмутазну активності та вміст білку у міцелії і культуральному фільтраті визначали спектрофотометричними методами, на основі чого розраховували питому активність ферментів. Встановлено, що стимуляцію пероксидазної активності міцелію та культурального фільтрату штамів *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 спричиняє додавання Fe^{2+} у концентрації 8 та 1,6 мкмоль/л; а їх каталазної активності – Cu^{2+} та Mn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Підвищення у порівнянні з контролем каталазної активності штаму *A. cylindracea* 167 відбувається шляхом внесення до середовища Cu^{2+} та Zn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. При внесенні у живильне середовище сульфату Fe спостерігається незначна у порівнянні з контролем стимуляція супероксиддисмутазної активності штамів базидіоміцетів. Результати дослідження показали взаємозв'язок між складом живильних середовищ та структурою, функцією і локалізацією ферментів та їх взаємодію.*

Ключові слова: базидіоміцети, оксидоредуктази, регуляція активності, мікроелементи.

В останні десятиріччя спостерігається тенденція до пошуку шляхів використання базидіальних грибів як продуцентів біологічно активних речовин. Зокрема, як показала низка досліджень, базидіоміцети здатні до активного синтезу ферментів, у тому числі і редокс-ензимів [5, 16, 17]. До таких окисно-відновних ферментів належать пероксидази (КФ 1.11.1.7), каталаза (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) та ін. Вони знайшли широке використання у різних галузях промисловості, науці та медицині, що зумовило підвищення попиту на їх ферментні препарати [1, 9, 11]. У зв'язку з цим розробка способів регуляції активності

© Т.Є. Волошко, О.В. Федотов, 2013



редокс-ферментів організмів-продуцентів є актуальним завданням сучасної біотехнології.

Встановлено, що гриби мають здатність до підвищеної сорбції та акумуляції мінеральних елементів субстрату [4, 8]. Внаслідок цього відбуваються значні зміни в процесах метаболізму грибного організму, в тому числі і в синтезі та активності ферментів [13]. Особливий інтерес має використання тих чи інших мікроелементів як компонентів живильних середовищ для культивування штамів базидіоміцетів — продуцентів ферментів з метою регуляції їх метаболізму [4]. В цьому сенсі цікавим є залучення до середовищ Fe-, Cu-, Zn-, Mn-вмісних сполук, оскільки ці метали входять до активного центру ферментів: Fe або Mn — пероксидази, Fe — каталази, Cu, Zn або Mn — супероксиддисмутази [1, 9, 11].

Виходячи з вищезазначеного метою даної роботи було вивчення можливості регуляції активності оксидоредуктаз базидіоміцетів за допомогою деяких мікроелементів.

Матеріали і методи

Як об'єкти дослідження використовували відібрані в попередніх роботах штами базидіоміцетів — активні продуценти оксидоредуктаз [4]. Зокрема, як продуцент пероксидази обрано штам *Agrocybe cylindracea* 167; каталази — *Pleurotus ostreatus* P-208 та супероксиддисмутази — *Fistulina hepatica* Fh-08 [5]. Культури зберігаються у Колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин ДонНУ та депоновані у Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (ІБК) [12].

Штами культивували поверхнево в колбах Ерленмейера на двох модифікаціях глюкозо-пептонного середовища. Так, живильне середовище № 1 (ЖС₁) для культивування штамів *A. cylindracea* 167 і *F. hepatica* Fh-08 містило, г/л: глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,05; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; казеїн — 0,5 та дистильована вода; а живильне середовище № 2 (ЖС₂) — для *P. ostreatus* P-208, склад якого ідентичний ЖС₁, але містило замість казеїну валін — 0,3 г/л. Склад середовищ базується на попередніх дослідженнях з оптимізації живильних середовищ для цих штамів [6]. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів, що вирощувалися на сусло-агарі.

З метою вивчення шляхів регуляції активності оксидоредуктаз базидіоміцетів за допомогою деяких мікроелементів до живильних середовищ додатково вносили сульфати Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} у концентраціях: 0,01%, 0,05% та 0,1% у кінцевому об'ємі середовища. Це відповідає вмісту Fe і Mn 1,6; 8 і 16 мкмоль/л та Cu і Zn 1,7; 8 і 17 мкмоль/л. Контролем (К) слугували 12-денні культури на ЖС₁ штамів *A. cylindracea* 167 і *F. hepatica* Fh-08 та ЖС₂ — штаму *P. ostreatus* P-208 без додаткового

внесення сполук металів. Культивування штамів проводили при 27 ± 1 °С протягом 12 діб.

Матеріалами досліджень слугували міцелії та культуральний фільтрат (КФ), які отримували при 5 ± 1 °С шляхом фільтрування культуральної рідини обраних штамів. Міцелії при $1 \pm 0,5$ °С промивали дистильованою водою, підсушували на фільтрувальному папері та гомогенізували. Гомогенат розбавляли дистильованою водою у співвідношенні 1:10 та центрифугували протягом 10 хвилин при 2000 g.

Активність оксидоредуктаз визначали спектрофотометричними методами. Пероксидазну активність (POX activity) визначали за інтенсивністю забарвлення продукту окислення о-діанізидину пероксидом водню та виражали в ум. од. кількості ферменту, яка каталізує окислення 1 мкмоль о-діанізидину за 1 хвилину [5]. Каталазну активність (CAT activity) визначали за забарвленням продукту реакції пероксиду водню з молібдатом амонію та виражали у мкат, що відповідає кількості ферменту, яка бере участь у перетворенні 1 мМ перекису водню за 1 секунду у заданих умовах [5]. Рівень супероксиддисмутазної активності (SOD activity) оцінювали за здатністю цього ферменту інгібувати реакцію аутоокислення адреналіну в лужному середовищі, та виражали в ум. од., що відповідає 1% пригнічення швидкості аутоокиснення адреналіну під дією супероксиддисмутази (СОД) [5].

Абсолютно суху біомасу (АСБ) міцелію визначали ваговим методом [5]. Концентрацію білка в міцелії та культуральному фільтраті визначали за методом Лоурі-Фоліна [7].

На основі отриманих результатів розраховували питому пероксидазну, каталазну і супероксиддисмутазну активності за формулою:

$$A_{\text{пт}} = A / C_{\text{б}},$$

де: $A_{\text{пт}}$ — питома активність відповідного ферменту, A — активність відповідного ферменту, $C_{\text{б}}$ — концентрація білку.

Отримані експериментальні дані піддавали статистичній обробці з метою встановлення вірогідності впливу факторів згідно керівництву [10]. Результати представлені у вигляді середніх значень із зазначенням середньої квадратичної помилки ($M \pm m$). Для оцінки статистичної значущості відмінностей використовували рівень вірогідності $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Результати низки досліджень впливу мікроелементів при їх спільному і окремому додаванні в живильне середовище вказують на їх регулювальну функцію на ріст та утворення метаболітів при культивуванні штамів грибів на різних поживних середовищах [3, 13]. Отже, на першому етапі досліджень ми вивчали вплив сполук Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} на рівень накопичення АСБ досліджуваними штамми базидіоміцетів (табл. 1).



Таблиця 1

Вплив мікроелементів на накопичення абсолютно сухої біомаси штамів базидіомицетів

Table 1

Influence of microelements on absolutely dry biomass of strains basidiomycetes

Метал	Концентрація, мкмоль/л	АСБ					
		Вміст, г/л	К % **	Вміст, г/л	К % **	Вміст, г/л	К % **
		Штам <i>A. cylindracea</i> 167		Штам <i>F. hepatica</i> Fh-08		Штам <i>P. ostreatus</i> P-208	
Fe ²⁺	1,6	3,12±0,06	99	3,46±0,08	102	4,02±0,06*	87
	8	3,07±0,04	97	3,42±0,09	101	3,92±0,05*	85
	16	2,81±0,06*	89	3,21±0,07*	95	3,81±0,05*	82
Zn ²⁺	1,7	3,37±0,07*	107	3,10±0,06*	91	4,55±0,06	98
	8	3,29±0,05*	104	2,94±0,03*	87	4,58±0,06	99
	17	3,05±0,05	97	2,61±0,04*	77	4,24±0,05*	92
Cu ²⁺	1,7	2,54±0,04*	80	3,04±0,03*	90	4,37±0,05*	94
	8	2,07±0,04*	66	3,57±0,07*	105	4,13±0,05*	89
	17	1,91±0,03*	60	2,77±0,03*	82	4,02±0,06*	87
Mn ²⁺	1,6	2,83±0,04*	90	3,31±0,04	98	4,41±0,06*	95
	8	2,59±0,05*	82	3,14±0,05*	93	4,33±0,04*	94
	16	2,11±0,03*	67	2,02±0,02*	60	4,09±0,05*	88
Контроль (0)		3,16±0,06	0	3,39±0,09	0	4,63±0,06	0

Примітка: * — різниця достовірна порівняно з контролем

** — співвідношення дослідного АСБ до АСБ на контрольному живильному середовищі у відсотках.

Встановлено, що в більшості дослідів (91,7% від їх загальної кількості) сульфати металів викликають пригнічення ростових процесів, що найбільше виражено для штамів *A. cylindracea* 167 при концентраціях Cu^{2+} 17 і 8 та Mn^{2+} 16 мкмоль/л і для штаму *F. hepatica* Fh-08 при концентрації Mn^{2+} 16 мкмоль/л. Для трьох варіантів досліду зафіксована незначна стимуляція накопичення АСБ. Так, підвищення АСБ у 7% відмічено при культивуванні штаму *A. cylindracea* 167 на середовищі, що містило Zn^{2+} у концентрації 1,7 мкмоль/л та дещо меншу — у 4% при концентрації цього металу 8 мкмоль/л. Також відмічено незначне зростання накопичення біомаси при культивуванні штаму *F. hepatica* Fh-08 на середовищі, що містило Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Отже, застосовані сполуки металів у цих концентраціях в більшості випадків гальмують ріст міцелію досліджуваних штамів. Це збігається з низкою досліджень, результати яких показують, що ці метали можуть викликати або зниження, або прискорення росту та метаболічних процесів культур грибів [4, 14, 15].

Виходячи з того, що іони металів Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} наявні в активних центрах досліджуваних ферментів, наступним етапом вивчали вплив обраних речовин на активність оксидоредуктаз. Результати цих досліджень представлені у табл. 2–4.

Аналіз результатів цих досліджень показує відсутність закономірності щодо впливу металів на пероксидазну активність, яка залежить як від їх концентрації, так і від штаму гриба. Так, підвищення порівняно з контролем РОХ activity міцелію зафіксовано в 66,7%, а КФ — у 50% дослідів.

Найвищий рівень індукції у 4,6 разу спостерігали для штаму *P. ostreatus* P-208, який культивували на середовищі з Fe^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Далі за рівнем підвищення РОХ activity міцелію цього штаму йде Cu^{2+} у тій же концентрації та Fe^{2+} у концентрації 1,6 мкмоль/л, яка перевищує РОХ activity контролю у 4,0 та 3,5 рази відповідно. Така ж тенденція, з більш низькими значеннями стимуляції зареєстрована для КФ цього штаму, яка складала 2,3; 2,1 та 1,8 рази відповідним металам і їх концентраціям. Для штаму *A. cylindracea* 167 відмічено найвище значення стимуляції РОХ activity міцелію при його культивуванні на середовищі з Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л, яке у 3,7 разу перевищувало цей показник контролю. Дещо нижчі показники підвищення РОХ activity міцелію у 3,1 разу та КФ — у 1,5 рази зафіксовано при культивуванні цього штаму на середовищі з Zn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Штам *F. hepatica* Fh-08 має найвищий рівень стимуляції РОХ activity при його культивуванні на середовищі з Fe^{2+} у концентраціях 8 та 1,6 мкмоль/л, який у міцелії дорівнює 2-м, а у КФ — 3-м.

Максимальне пригнічення РОХ activity як в міцелії так і в КФ зафіксовано у всіх досліджених штамів, що росли на середовищах з Mn^{2+} у концентрації 16 мкмоль/л. Для штаму *P. ostreatus* P-208 таке зниження



Таблиця 2

Вплив мікроелементів на пероксидазну активність штамів базидіомицетів

Table 2

Influence of microelements on peroxidase activity of strains basidiomycetes

Метал	С, мкмоль/л	РОХ activity _{тр} , ум.од. / мг білку														
		Міцелій	Σ ** %	КФ	Σ ** %	Міцелій	% К **	КФ	% К **	Міцелій	% К **	КФ	Σ ** %			
		Штам <i>A. cylindracea</i> 167					Штам <i>F. hepatica</i> Fh-08					Штам <i>P. ostreatus</i> P-208				
	1,6	3,41±0,02*	113	10,96±0,05*	107	0,70±0,01*	194	3,70±0,03*	294	2,34±0,02*	349	0,68±0,01*	213			
Fe ²⁺	8	7,48±0,03*	248	9,04±0,04*	89	0,72±0,02*	200	3,78±0,02*	300	3,05±0,03*	455	0,74±0,01*	231			
	16	6,14±0,03*	203	8,53±0,04*	84	0,52±0,01*	144	1,11±0,01*	88	2,21±0,02*	330	0,56±0,01*	175			
	1,7	7,29±0,03*	241	10,34±0,03	101	0,54±0,02*	150	2,01±0,02*	160	0,67±0,01	100	0,43±0,01*	134			
Zn ²⁺	8	9,48±0,03*	314	15,36±0,06*	150	0,61±0,02*	169	2,18±0,02*	173	0,69±0,01	103	0,49±0,01*	153			
	17	1,94±0,02*	64	11,47±0,06*	112	0,49±0,01*	136	1,96±0,02*	156	0,65±0,01	97	0,31±0,01	97			
	1,7	7,34±0,06*	243	9,97±0,04*	98	0,36±0,01	100	1,14±0,02*	90	1,31±0,02*	196	0,49±0,02*	153			
Cu ²⁺	8	11,01±0,07*	365	9,63±0,03*	94	0,34±0,01*	94	1,26±0,01	100	2,68±0,02*	400	0,57±0,02*	178			
	17	2,87±0,02*	95	4,05±0,02*	40	0,21±0,02*	58	1,09±0,01*	87	1,27±0,01*	190	0,28±0,01*	88			
	1,6	6,21±0,04*	206	8,02±0,03*	79	0,46±0,02*	128	1,39±0,02*	110	0,50±0,02*	75	0,21±0,01*	66			
Mn ²⁺	8	6,96±0,05*	230	8,43±0,03*	83	0,41±0,01*	114	1,33±0,02*	106	0,44±0,01*	66	0,17±0,01*	53			
	16	2,27±0,02*	75	6,12±0,05*	60	0,24±0,01*	67	0,98±0,01*	78	0,32±0,01*	48	0,12±0,01*	38			
K (0)		3,02±0,04	0	10,21±0,04	0	0,36±0,01	0	1,26±0,02	0	0,67±0,01	0	0,32±0,01	0			

Примітка: * — різниця достовірна порівняно з контролем

** — співвідношення дослідного РОХ activity_{тр} до РОХ activity_{тр} на контрольному живильному середовищі у %.

характерне і при концентрації Mn^{2+} 8 мкмоль/л. При культивуванні на середовищах з Cu^{2+} у концентрації 17 мкмоль/л, встановлено два випадки суттєвого зниження POX activity: міцелію для штаму *A. cylindracea* 167 та КФ — штаму *F. hepatica* Fh-08. Щодо середовищ з Zn^{2+} , то максимальне зниження POX activity міцелію тут відмічене для штаму *A. cylindracea* 167 при концентрації у 17 мкмоль/л.

Отже, з метою стимуляції пероксидазної активності міцелію та КФ штамів *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 є доцільним використання Fe^{2+} у концентрації 8 та 1,6 мкмоль/л. Це пояснюється тим, що грибна лігнінпероксидаза містить в активному центрі іон Fe^{3+} [1].

Аналіз даних з впливу задіяних металів на каталазну активність штамів базидіоміцетів показав підвищення цього показника в міцелії у 63,9% та у КФ — у 55,6% дослідів.

Максимальна стимуляція SAT activity у 2,4 разу зафіксована для міцелію штаму *P. ostreatus* P-208, який культивували на середовищах з Mn^{2+} та Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л, а дещо нижча у 2,2 разу — з Mn^{2+} у 1,6 мкмоль/л. Та ж закономірність спостерігається для КФ цього штаму з індукцією у 1,2 та 1,1 разу відповідно. Для штаму *A. cylindracea* 167 характерна індукція SAT activity КФ в 1,8 разу на середовищах з Cu^{2+} у концентрації 8 і 17 мкмоль/л та міцелію — в 1,2 разу — з Zn^{2+} 8 та 17 мкмоль/л. Культура *F. hepatica* Fh-08 має найвищі значення SAT activity міцелію на середовищі з Cu^{2+} 8 та 17 мкмоль/л та Mn^{2+} 1,6 мкмоль/л, індукція тут складає 1,1. Щодо індукції SAT activity КФ штаму *F. hepatica* Fh-08, то найвищі значення у 1,3 разу вищі за контроль спостерігалися при культивуванні його на середовищах з Mn^{2+} та Cu^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л.

Зниження відносно контролю каталазної активності досліджуваних штамів спостерігали за різних концентрацій металів. Так, при культивуванні штаму *A. cylindracea* 167 на середовищі з Mn^{2+} 16 мкмоль/л зафіксована його найнижча SAT activity як в міцелії, так і в КФ. Штами *F. hepatica* Fh-08 (міцелій та КФ) і *P. ostreatus* P-208 (КФ) мали найнижчу SAT activity при культивуванні на живильному середовищі з Fe^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л.

Отже, з метою підвищення каталазної активності міцелію та КФ штамів *P. ostreatus* P-208 і *F. hepatica* Fh-08 виправдане внесення у живильне середовище Cu^{2+} та Mn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л; а штаму *A. cylindracea* 167 — Cu^{2+} (КФ) та Zn^{2+} (міцелій) у концентрації 8 мкмоль/л. Ці результати, можна пояснити взаємодією досліджуваних ферментів. Так, підвищення SAT activity є наслідком підвищення SOD activity, що зафіксовано в досліді (табл. 4).

Вивчення впливу обраних сульфатів металів на супероксиддисмутазну активність деяких штамів базидіоміцетів показало незначну стимуляцію цього показника в міцелії у 47,2% та у КФ — у 36,1% дослідів.



Вплив мікроелементів на каталазну активність штамів базидіомицетів

Table 3

Influence of microelements on catalase activity of strains basidiomycetes

Метал	С, мкмоль/л	САТ activity _{тр} , мкат / мг білку											
		Міцелій	** К %	КФ	** К %	Міцелій	** К %	КФ	** К %	Міцелій	** К %	КФ	** К %
Fe ²⁺	1,6	Штам <i>A. cylindracea</i> 167						Штам <i>P. ostreatus</i> P-208					
		49,61±0,08*	105	141,09±0,18*	106	94,88±0,09*	70	102,62±0,09*	74	51,08±0,07	103	953,33±1,01*	99
		52,63±0,08*	111	147,72±0,23*	111	92,31±0,08*	68	97,24±0,10*	70	54,19±0,07*	109	355,94±0,51*	37
Zn ²⁺	1,6	48,97±0,07*	103	143,87±0,20*	108	96,91±0,08*	71	108,12±0,10*	78	50,92±0,07	103	412,72±0,60*	43
		51,16±0,07*	108	144,92±0,16*	109	123,58±0,09*	91	144,36±0,10*	104	53,72±0,08*	108	829,39±0,84*	86
		58,21±0,08*	123	141,67±0,15*	107	127,80±0,10*	94	142,14±0,16	102	53,68±0,07*	108	741,87±0,53*	77
Cu ²⁺	1,7	56,35±0,08*	119	130,69±0,12	98	118,55±0,09*	87	139,11±0,15	100	50,31±0,07	101	529,48±0,47*	55
		47,24±0,07	100	212,06±0,16*	160	139,46±0,11	103	141,88±0,16	102	23,66±0,05*	48	966,32±0,97	100
		52,66±0,08*	111	241,72±0,16*	182	152,91±0,11*	113	173,78±0,15*	125	118,76±0,09*	239	1092,01±1,14*	113
Mn ²⁺	1,6	52,81±0,07*	111	239,88±0,18*	180	146,24±0,15*	108	148,11±0,15*	107	101,29±0,09*	204	1007,71±1,09*	104
		42,34±0,06*	89	113,32±0,12*	85	148,64±0,14*	109	150,10±0,17*	108	107,83±0,08*	217	1098,99±0,95*	114
		40,02±0,06*	84	88,63±0,10*	67	143,67±0,12*	106	173,78±0,16*	125	121,18±0,09*	244	1124,66±1,21*	117
К (0)	16	36,97±0,06*	78	46,21±0,09*	35	135,91±0,12	100	131,55±0,16*	95	96,47±0,07*	194	993,76±0,91*	103
		47,37±0,10	0	132,95±0,21	0	135,84±0,20	0	139,06±0,23	0	49,67±0,08	0	964,81±0,93	0

Примітка: * — різниця достовірна порівняно з контролем

** — співвідношення дослідного САТ activity_{тр} до САТ activity_{тр} на контрольному живильному середовищі у %.

Найвищу стимуляцію SOD activity дали середовища з Fe^{2+} : в концентрації 8 мкмоль/л в міцелії штамів *A. cylindracea* 167 і *P. ostreatus* P-208 — в 1,4 і 1,2 рази відповідно та в КФ *F. hepatica* Fh-08 — 1,1 разу, а також в концентрації 1,6 мкмоль/л в міцелії штаму *F. hepatica* Fh-08 — 1,3 разу і в КФ штаму *P. ostreatus* P-208 — в 1,2 разу. Слід відзначити, що для останнього штаму гливи звичайної таке ж підвищення SOD activity міцелію зафіксоване на середовищах з Zn^{2+} у всіх концентраціях.

Найнижчі значення SOD activity міцелію показали штами *P. ostreatus* P-208 і *A. cylindracea* 167 при культивуванні на середовищах з Mn^{2+} у концентраціях 8 і 16 мкмоль/л. На цих же середовищах також спостерігалася значна репресія SOD activity КФ штаму *P. ostreatus* P-208. Для штаму *F. hepatica* Fh-08 відмічені найнижчі значення цієї активності як в міцелії так і в КФ на середовищах з Cu^{2+} у концентрації 8 і 17 мкмоль/л.

Отже, сульфати Fe^{2+} та Zn^{2+} як компоненти живильного середовища викликають несуттєве підвищення SOD activity досліджуваних штамів базидіомицетів, що не перевищує 1,4 рази в порівнянні з контролем; а сполуки Cu^{2+} і Mn^{2+} спричиняють зниження цього показника в переважній більшості дослідів. Отримані результати можна пояснити таким чином: цинк входить до активного центру цитозольної СОД, а залізо міститься в СОД мітохондрій та пероксисом, а отже додаткове окреме внесення сульфату цих металів до живильного середовища викликає підвищення активності цього ензиму. Внесення до живильного середовища сульфатів міді чи марганцю веде до зниження SOD activity внаслідок токсичної дії застосованих концентрацій цих металів. Останнє припущення підтверджується зниженням накопичення біомаси досліджуваними штамми на цих варіантах живильних середовищ порівняно з контролем.

Таким чином, вивчена можливість регуляції росту і активності оксидоредуктаз деяких штамів базидіомицетів шляхом внесення до складу живильного середовища сульфатів Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} та Mn^{2+} в певних концентраціях. Зокрема, з метою стимуляції пероксидазної активності міцелію та КФ штамів *P. ostreatus* P-208 та *F. hepatica* Fh-08 є доцільним використання Fe^{2+} у концентрації 8 та 1,6 мкмоль/л; а їх каталазної активності — Cu^{2+} та Mn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. Для підвищення САТ activity штаму *A. cylindracea* 167 можна рекомендувати внесення до середовища Cu^{2+} та Zn^{2+} у концентрації 8 мкмоль/л. При внесенні у живильне середовище сульфатів Fe^{2+} та Zn^{2+} спостерігається незначна стимуляція SOD activity штамів базидіомицетів. Результати дослідження показали взаємозв'язок між складом живильних середовищ та структурою, функцією і локалізацією ферментів та їх взаємодію. Так, при підвищенні SOD activity у клітині накопичується перекис водню що викликає у відповідь підвищення САТ activity. Наприкінці процесу каталізу, при низьких концентраціях перекису водню каталаза внаслідок низької спорідненості до субстрату втрачає активність, а пероксидаза — навпаки зростає.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // Химия растительного сырья. — 2009. — № 2. — С. 5–18.
2. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 6. — С. 465–474.
3. Баринова К.В., Власов Д.Ю., Щипарев С.М. Влияние цинка и меди на рост и ацидофицирующую активность гриба *Penicillium citrinum* в условиях культуры // Микология и фитопатология. — 2012. — Т. 46, № 6. — С. 385–389.
4. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов / З.Э. Беккер. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. — 230 с.
5. Волошко Т.Є., Федотов О.В. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз // Мікробіологія і біотехнологія. — Одеса: ОНУ ім. І.І. Мечникова. — 2011. — №. 4(16). — С. 69–81.
6. Волошко Т.Є., Федотов О.В. Вплив джерел азотного живлення на активність оксидоредуктаз деяких штамів базидіоміцетів // Актуальні проблеми ботаніки та екології / Матер. міжнародної конф. молодих учених (Ужгород 19-23 вересня 2012) — Ужгород, 2012. — С. 197–198.
7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. Справочник биохимика — М.: Мир, 1991. — 544 с.
8. Иванов А.И., Костычев А.А., Скобанев А.В. Аккумуляция тяжелых металлов и мышьяка базидиомами макромицетов различных экологотрофических и таксономических групп // Поволжский экологический журнал. — 2008. — № 3. — С. 190–199.
9. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 3–25.
10. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
11. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. — СПб: ГИОРД, 2004. — 240 с.
12. Федотов О.В., Чайка О.В., Волошко Т.Є., Велигодська А.К. Колекція культур шапинкових грибів — основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів // Вісник Донецького національного університету. — 2012. — № 1. — С. 209–213.
13. Gbolagade J.S. The effect of different nutrient sources on biomass production of *Lepiota procera* in submerged liquid cultures // African Journal of Biotechnology. — 2006. — Vol. 5(12). — P. 1246–1249.
14. Hartikainen E.S., Lankinen P., Rajasarkka J. Impact of copper and zinc on the growth of saprotrophic fungi and the production of extracellular enzymes // Boreal environment research. — 2012. — № 17. — P. 210–218.



15. Stajic M., Vukojevic J., Duletic-Lausevic S. Influence of the cultivation conditions on ligninolytic enzyme production in *Pleurotus pulmonarius* // Zbornik Matice srpske za prirodne nauke. — 2007. — № 113. — P. 303–312.

16. Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — 89. — P. 1323–1332.

17. Wasser S.P., Sytnik K.M., Buchalo A.S., Solomko E.F. Medicinal mushrooms: Past, present and future // Ukrainian Botanical Journal. — 2002. — 59(5). — P. 499–524.

Стаття надійшла до редакції 06.02.2013 р.

Т.Е. Волошко, О.В. Федотов

Донецкий национальный университет,
ул. Университетская, 24, Донецк, 83000, Украина,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

Статья посвящена изучению влияния некоторых микроэлементов на рост и активность антиоксидантных оксидоредуктаз базидиальных грибов. Объектами исследования были штаммы — активные продуценты оксидоредуктаз: *Agrocybe cylindracea* 167; *Pleurotus ostreatus* P-208 и *Fistulina hepatica* Fh-08. Для изучения влияния микроэлементов на скорость роста использовали весовой метод определения накопления абсолютно сухой биомассы. Каталазную, пероксидазную и супероксиддисмутазную активности и содержание белка в мицелии и культуральном фильтрате определяли спектрофотометрическими методами, на основе чего рассчитывали удельную активность ферментов. Установлено, что стимуляцию пероксидазной активности мицелия и культурального фильтрата штаммов *P. ostreatus* P-208 и *F. hepatica* Fh-08 вызывает добавление Fe^{2+} в концентрации 8 и 1,6 мкмоль / л, а их каталазной активности — Cu^{2+} и Mn^{2+} в концентрации 8 мкмоль/л. Повышение по сравнению с контролем каталазной активности штамма *A. cylindracea* 167 происходит путем внесения в среду Cu^{2+} и Zn^{2+} в концентрации 8 мкмоль/ л. При внесении в питательную среду сульфата Fe наблюдается незначительная по сравнению с контролем стимуляция супероксиддисмутазной активности штаммов базидиомицетов. Результаты исследования



показали взаимосвязь между составом питательных сред и структурой, функцией, локализацией ферментов и их взаимодействие.

Ключевые слова: базидиомицеты, оксидоредуктазы, регуляция активности, микроэлементы.

T. Voloshko, O. Fedotov

Donetsk National University
24, University St., Donetsk 83000, Ukraine
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graff@yandex.ua

INFLUENCE OF SOME MICROELEMENTS ON BASIDIOMYCETES OXIDOREDUCTASES ACTIVITY

Summary

The article is devoted to the influence of some microelements on the growth and activity of antioxidant oxidoreductase of basidiomycetes. The objects of the study were strains — active producers of oxidoreductases: *Agrocybe cylindracea* 167; *Pleurotus ostreatus* P-208 and *Fistulina hepatica* Fh-08. The weighting method of determination of accumulation of absolutely dry biomass was used to study the influence of some microelements on the growth. Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activity and protein content of mycelium and culture filtrate was determined by spectrophotometric methods, and the specific activity of enzymes were calculated. A significant effect of Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Mn^{2+} on the level of accumulation of absolutely dry biomass, catalase, peroxidase and superoxide dismutase activity was estimated. It was found that the stimulation of peroxidase activity in mycelia and culture filtrate of the strains *P. ostreatus* P-208 and *F. hepatica* Fh-08 caused by the addition of Fe^{2+} in the concentration of 8 and 1.6 mmol / l, and the stimulation of their catalase activity caused by the addition of Cu^{2+} and Mn^{2+} in the concentration of 8 mmol / l. Increased catalase activity of strain *A. cylindracea* 167 caused by amending Cu^{2+} and Zn^{2+} in the concentration of 8 mmol / l in the medium. There was a slight stimulation of superoxide dismutase activity of the strains of basidiomycetes caused by addition of ferrous sulphate in the nutrient medium. The results of the study showed the relationship between the composition of culture media and the structure, function and localization of enzymes and their interaction

Key words: basidiomycetes, oxidoreductase, regulation of the activity, microelements.



С.О. Білоіваненко, А.Є. Бухтіяров

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

РЕЗИСТЕНТНІСТЬ *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ТА ЇХ АДСОРБЦІЯ

*Метою роботи було вивчення рівня стійкості штаму *Rhodotorula rubra* g2/1 до важких металів *Cu*, *Zn*, *Pb*, *Cd* та їх адсорбції клітинами цих дріжджів. Штам червоних дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1 був виділений з прибережних вод острова Зміїний. Оцінка впливу іонів досліджуваних токсичних металів на ріст дріжджів проведена на середовищі Рідер з додаванням різних концентрацій важких металів *Cu*, *Zn*, *Pb*, *Cd*. Вміст досліджених металів у зразках визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометру "Сатурн-2". Визначено мінімальні концентрації важких металів, що інгібують ріст дріжджів штаму *Rhodotorula rubra* g2/1. Для міді – 750 мг/л, цинку – 500 мг/л, свинцю – 120 мг/л, кадмію – 10 мг/л. Отже, досліджені дріжджі найрезистентніші до міді та найчутливіші до кадмію. За інкубації в розчинах, що містять важкі метали, дріжджі вилучають за 2 години 85,6% міді, 18,6% свинцю, 7,8% кадмію, 7,7% цинку. При цьому на один грам сухої біомаси дріжджі накопичують 90,0 мг міді, 38,9 мг кадмію, 12,9 мг цинку та 26,2 мг свинцю. Таким чином, проведені дослідження показали, що дріжджі штаму *Rhodotorula rubra* g2/1 одночасно мають високий рівень резистентності до міді та здатність до адсорбції цього металу.*

Ключові слова: дріжджі, важкі метали, резистентність, біосорбенти.

Дріжджі здатні активно накопичувати токсичні сполуки з навколишнього середовища, у тому числі важкі метали, та відзначаються високим кумулятивним ефектом у природі [1, 5, 9]. Вони адсорбують важкі метали із забруднених вод досить активно, іноді до повного вилучення. Набір металів, що накопичують дріжджі, надзвичайно широкий. Це дозволяє розглядати їх як потенційні, ефективні і дешеві сорбенти для очищення водного середовища від забруднень токсичними металами [1, 6, 10].

З іншого боку дріжджі виявляють значну резистентність до токсикантів. Відомо, що одними з найбільш стійких є червоні дріжджі завдяки активному синтезу пігментів, що виступають у ролі антиоксидантів та

дозволяють їм адаптуватися до екстремальних умов існування, у тому числі в середовищі з високими концентраціями токсичних металів [2].

Пошук високо резистентних штамів дріжджів здатних до накопичення важких металів має важливе значення для подальшого використання їх в екологічній біотехнології.

Метою роботи було вивчення рівня стійкості штаму *Rhodotorula rubra* g2/1 до Cu, Zn, Pb, Cd та їх адсорбції клітинами цих дріжджів.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам червоних дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1, виділений з поверхневого шару прибережних вод острова Зміїний [4].

Дріжджі вирощували на середовищі Рідер такого складу (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; K_2HPO_4 – 0,1; KH_2PO_4 – 1,0; MgSO_4 – 0,7; NaCl – 0,5; глюкоза – 1%, екстракт дріжджів – 0,1%; рН – 5,5.

Оцінку впливу досліджуваних важких металів на ріст дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1 здійснювали на середовищі Рідер з додаванням важких металів у різних концентраціях. Дріжджі культивували впродовж 72 год за 28 °С [3, 9, 10].

Для оцінки стійкості до важких металів досліджуваного штаму в середовище Рідер додавали розчин CuSO_4 , до кінцевої концентрації міді 50, 100, 150, 250, 500, 750 мг/л; $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ до кінцевої концентрації кадмію 5, 10, 20, 50 мг/л; ZnSO_4 до кінцевої концентрації цинку 20, 40, 100, 150, 200, 500 мг/л; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ до кінцевої концентрації свинцю 30, 60, 120, 250, 500 мг/л [3, 5, 9].

Середовище Рідер інокулювали двохдобовою культурою дріжджів *Rhodotorulla rubra* g2/1 в концентрації $1,5 \times 10^9$ КУО/мл. Ріст оцінювали після 4-х діб культивування за 28 °С за п'ятибальною шкалою.

Здатність мікроорганізмів до сорбції Cu, Cd, Zn і Pb визначали згідно з методикою [11]. Дріжджі культивували при 25 °С впродовж доби на середовищі Сабуро, змивали з живильного середовища і суспендували в 0,2 ммоль малеатному буфері (рН 6,8), доводячи їх до концентрації $1,5 \times 10^9$ КУО/мл. До суспензії дріжджів об'ємом 9,9 мл додавали 100 мкл розчину солей в розрахунку на метал: міді – в концентрації 3,1 мг/мл, кадмію – 4,0 мг/мл, цинку – 1,1 мг/мл, свинцю – 3,7 мг/мл. Таким чином, в 10 мл дослідних зразків містилося 310 мкг міді, 400 мкг кадмію, 110 мкг цинку, 370 мкг свинцю.

Як контрольні зразки використовували дріжджову суспензію, малеатний буфер або розчин солі відповідного металу. Інкубацію провадили на інкубаторі-шейкері Іппова 43R за 150 об/хв впродовж 2 год при температурі 25 °С. Клітини осаджували центрифугуванням при 8000 g впродовж 10 хв при температурі 4 °С. Після відбору надосадової рідини клітини мікроорганізмів двічі промивали малеатним буферним розчином з центрифугуванням при 8000 g впродовж 10 хв при температурі 4 °С.



У попередньо висушені при 110 °С впродовж 30 хв і зважені пеніцилінові флакони переносили ресуспендований у бідистильованій воді клітинний осад з центрифужних пробірок. Флакони повторно висушували при 110 °С впродовж 30 хв і зважували для визначення маси дріжджів. Для руйнування дріжджових клітин додавали 2,5 мл 70% азотної кислоти після чого витримували 30 хв при 180 °С. Після охолодження до кімнатної температури у флакони додавали по 4 мл бідистильованої води і закривали пластиковими корками. У всі варіанти дослідів вносили 70% азотної кислоти до отримання 20% розчину.

Вміст металів як у дослідних так і в контрольних зразках визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрофотометра “Сатурн-2” при довжині хвилі 324,7 нм для Cu, 228,8 нм для Cd, 213,9 нм для Zn і 283,3 нм для Pb. Кінцевий вміст важких металів у клітинах, надосадовій рідині і промивних водах дозволив розрахувати загальний вміст металів. Коливання від загального вмісту металу в кожному тесті становило до 5% від початкової концентрації токсикантів, доданих в суспензію клітин. Всі експерименти проводили у трьох повторях. Результати досліджень опрацьовували статистично [7].

Результати та їх обговорення

Характер впливу на мікроорганізми важких металів визначається їх концентрацією у середовищі, рівнем токсичності та біологічними властивостями клітин. В табл. 1 наведено дані залежності росту дріжджів від концентрацій міді, кадмію, цинку і свинцю в середовищі.

При вивченні стійкості до міді встановлено, що штам *R. rubra* g2/1 росте навіть за 500 мг/л. При цьому спостерігали зміну кольору біомаси *R. rubra* g2/1 на зелений при концентраціях міді 250 мг/л, що свідчить про перетворення та накопичення в біомасі іонів міді Cu. Пригнічення росту виявлено вже за концентрації 100 мг/л Cu, а за концентрації 750 мг/л дріжджі не росли. Втрата пігментації більшості дріжджів мала місце за концентрації 150 мг/л. Як відомо, основним механізмом токсичної дії міді є руйнування цілісності цитоплазматичної мембрани. Встановлено, що резистентність до іонів міді, обумовлена металотіонами, які зв'язують метал та перешкоджають його токсичній дії [3].

Кадмій виявився найтоксичнішим для *R. rubra* g2/1. Вже за концентрації Cd в середовищі 10 мг/л ріст дріжджів не спостерігали.

Затримку росту дріжджів не виявили навіть за концентрації 100 мг/л Zn. Вони не втрачали пігментацію до концентрації 150 мг/л Zn. При 100 мг/л колір колоній змінився на жовтий.

Встановлено, що штам *R. rubra* g2/1 при концентрації 250 мг/л Pb в середовищі і вище втрачає здатність до синтезу червоних пігментів та затримує ріст, починаючи з концентрації свинцю 60 мг/л Pb. За 120 мг/л свинцю в середовищі ріст дріжджів припиняється.

Вплив іонів Cu, Cd, Zn і Pb на ріст дріжджів штаму
Rhodotorula rubra g2/1Influence of different ions of Cu, Cd, Zn and Pb on the growth
of *Rhodotorula rubra* g2/1 strain

Метал	Концентрація металу, мг/л	Ріст
Мідь	50	+++
	100	+++
	150	+++
	250	++
	500	+
	750	—
Кадмій	5	++
	10	—
	20	—
	50	—
Цинк	20	+++
	40	+++
	100	+++
	150	++
	200	+
	500	—
Свинець	30	+++
	60	++
	120	—
	250	—
	500	—

Примітка: — відсутність росту; + — слабкий ріст; ++ — помірний ріст; +++ — інтенсивний ріст.

Для вивчення адсорбції важких металів дріжджі *R. rubra* g2/1 інкубували впродовж 2 год за 25 °С. З наведених в табл. 2 результатів можна зробити висновок, що клітини штаму *R. rubra* g2/1 найбільшою мірою здатні до адсорбції міді. Вони вилучають з розчину 85,6% внесеного металу.



Клітини *R. rubra* g2/1 вилучають із середовища 18,6% свинцю, 7,8% кадмію та 7,7% цинку. Проведені розрахунки показали, що дріжджі дослідженого штаму на один грам сухої біомаси накопичують $90,0 \pm 4,1$ мг міді, $38,9 \pm 2,1$ мг кадмію, $12,9 \pm 1,2$ мг цинку та $26,2 \pm 1,9$ мг свинцю.

Механізми адсорбції міді, та інших металів, дріжджами добре вивчені. Адсорбція металів на поверхні клітин, пов'язана з присутністю негативно заряджених груп аніонів: COO^- , HS^- , OH^- . Встановлено, що основними іонообмінними сайтами дріжджів є: ацетамідна група хітину, поліцукридні групи, аміногрупи і фосфатні групи нуклеїнових кислот, аміно- і амідогрупи, сульфгідрильні та карбоксильні групи білків.

Таблиця 2

Адсорбція важких металів червоними дріжджами *Rhodotorula rubra* g2/1

Table 2

Adsorption of heavy metals by red yeast *Rhodotorula rubra* g2/1

Метал	Внесено металу, мкг	Клітини, мкг		Надосадова рідина, мкг		Промивні води, мкг		Всього, мкг	
		$M \pm m$	%	$M \pm m$	%	$M \pm m$	%	$M \pm m$	%
Мідь	310	$257,0 \pm 13,2$	85,6	$42,0 \pm 2,4$	12,6	$9,3 \pm 0,3$	1,8	308,3	99,5
Кадмій	400	$31,0 \pm 2,3$	7,8	$358,0 \pm 18,8$	90,2	$7,9 \pm 0,4$	2,0	396,9	99,2
Цинк	110	$8,6 \pm 1,2$	7,7	$96,3 \pm 5,4$	88,5	$4,1 \pm 0,2$	3,8	109,0	99,1
Свинець	375	$70,0 \pm 3,3$	18,6	$285,5 \pm 13,2$	76,1	$19,0 \pm 0,9$	5,3	374,5	99,9

Відомо, що стійкість грибів, у тому числі і дріжджів, до токсичної дії важких металів, залежить як від морфологічних, так і від фізіологічних характеристик клітини. Адсорбція клітинними стінками і накопичення всередині клітин дозволяє видалити з розбавлених розчинів іноді до 100% металу [3, 5, 9].

З літературних джерел відомою, що різні штами *Rhodotorula mucilaginosa* (раніше відома як *Rhodotorula rubra*) здатні акумулювати від 8 до 579 мг на один грам сухої біомаси міді, та рости від 32 до 200 мг/л міді [8, 12].

Таким чином, ізолюваний з акваторії острова Зміїний штам дріжджів *Rhodotorula rubra* g2/1, характеризується одночасно як високим рівнем резистентності до міді так і здатністю до активної адсорбції цього металу з навколишнього середовища, тому є перспективним для застосування в екологічній біотехнології як біосорбент.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабьев К.Н., Щелоков С.А. Дрожжи. Биология. Пути развития. — М.: Мир, 1996. — 272 с.
2. Голубцев В.И. Идентификация дрожжевых грибов рода *Rhodotorula*. — М.: Мир, 1990. — 321 с.
3. Давидова Е.Г. О природе сорбции металлов клеточными стенками дрожжей // Микробиология. — 2002. — Т. 61, № 6. — С. 1018–1022.
4. Іваниця В.О., Білоіваненко С.О. Чисельність та таксономічний склад дріжджів прибережної акваторії острова Зміїний // Микробиологія і біотехнологія. — 2012. — № 3. — С. 74–81.
5. Іваниця В.А., Бухтіяров А.Є., Лисютин Г.В., Захарія А.Н., Гудзенко Т.В. Аккумуляція тяжелих металлов бактеріями рода *Pseudomonas* // Микробиологія і біотехнологія. — 2012. — № 4. — С. 76–83.
6. Квасников Л.Н. Дрожжи. — К.: Наук.думка, 1998. — 264 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
8. Мамеева О.Г., Касаткіна Т.П., Лаврінчук В.Я. Біосорбційна спроможність мутантів *Rhodotorula mucilaginosa* УКМ У-1776 // Микробиол. журнал — 2007. — Т. 69, № 2. — С. 29–35.
9. Подгорский В.С., Касаткіна Т.П., Лозова О.Г. Дрожжи — биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журнал — 2004. — Т. 66, № 1. — С. 91–101.
10. Fell J.W., van Uden N. Yeasts in marine environments. — Germany, 1963. — P. 329–335.
11. McEldowney S. Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass // Appl. and Environ. Microbiol. — 1994. — V. 60, № 8. — P. 2759–2765.
12. Villegas L.B., Amoroso M.J., de Figueroa L.I. Copper tolerant yeasts isolated from polluted area of Argentina // J. Basic Microbiol. — 2005. — V. 45(5). — P. 381–391.

Стаття надійшла до редакції 20.03.2013 р.



С.А. Белоиваненко, А.Е. Бухтияров

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

УСТОЙЧИВОСТЬ *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ И ИХ АДСОРБЦІЯ

Реферат

Целью работы было изучение уровня устойчивости штамма *Rhodotorula rubra* g2/1 к тяжелым металлам Cu, Zn, Pb, Cd и их адсорбции клетками этих дрожжей. Штамм красных дрожжей *Rhodotorulla rubra* g2/1 был выделен из прибрежных вод острова Змеиный. Оценка влияния ионов исследуемых тяжелых металлов на физиологию роста дрожжей проведена на среде Ридер с добавлением различных концентраций тяжелых металлов Cu, Zn, Pb, Cd. Содержание исследованных металлов в образцах определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Сатурн-2». Определены минимальные концентрации тяжелых металлов, ингибирующих рост дрожжей штамма *Rhodotorula rubra* g2/1. Для меди — 750 мг/л, цинка — 500 мг/л, свинца — 120 мг/л, кадмия — 10 мг/л. Таким образом, исследуемые дрожжи наиболее устойчивы к меди и наиболее чувствительны к кадмию. При инкубации дрожжей в растворах, содержащих тяжелые металлы, они извлекают за 2 часа 85,6% меди, 18,6% свинца, 7,8% кадмия, 7,7% цинка. При этом на один грамм сухой биомассы дрожжи накапливают 90,0 мг меди, 38,9 мг кадмия, 12,9 мг цинка и 26,2 мг свинца. Таким образом, проведенные исследования показали, что дрожжи штамма *Rhodotorula rubra* g2/1 одновременно обладают высоким уровнем устойчивости к меди и способностью к адсорбции этого металла.

Ключевые слова: дрожжи, тяжелые металлы, резистентность, биосорбенты.



S.O. Biloivanenko, A.Y. Bukhtiyarov

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

RESISTANCE OF *RHODOTORULA RUBRA* G2/1 TO HEAVY METALS AND THEIR ADSORPTION

Summary

The aim was to study the level of resistance of the strain *Rhodotorula rubra* g2/1 to the heavy metals Cu, Zn, Pb, Cd and adsorption of them by the yeast cells. Red yeast strain *Rhodotorula rubra* g2/1 was isolated by seeding on nutrient medium Saburo from the coastal waters of the Zmiinyi Island. The estimation of the influence of ions of heavy metals on physiology of yeast growth was conducted on Reader medium with addition of various concentrations of heavy metals Cu, Zn, Pb, Cd. The content of the metals in the investigated samples was determined with the atomic absorption spectrophotometer "Saturn-2". The minimal concentrations of heavy metals inhibited the growth of yeast strain *Rhodotorula rubra* g2/1 were determined. They are 750 mg/l for copper, 500 mg/l for zinc, 120 mg/l for lead, 10 mg/l for cadmium. Thus, the studied yeast strain is the most resistant to copper and the most sensitive to cadmium. During incubation of the yeast in solutions containing heavy metals for 2 hours they remove 85.6% of copper, 18.6% of lead, 7.8% of cadmium, 7.7% of zinc. One gram of dry yeast biomass accumulates 90.0 mg of copper, 38.9 mg of cadmium, 12.9 mg of zinc and 26.2 mg of lead. Thus, the conducted investigations have shown that the yeast strain *Rhodotorula rubra* g2/1 simultaneously possesses high levels of resistance to copper and the ability to absorb this metal.

Key words: yeast, heavy metals, resistance, biosorbents.



**N.V. Triapitsyna¹, K.M. Udovychenko¹, S.O. Vasyuta¹,
T.V. Medvedyeva¹, V.V. Yarushnikov², V.M. Udovychenko¹**

¹Institute of Horticulture, NAAS,

6, Sadova str., Novosilky, Kyiv, 03027, Ukraine

tel.: +38 (044) 526 65 97, e-mail: tryapic@ukr.net

²Artemivsk Experimental Nursery-garden Station of IH NAAS,

Yagidne, Artemivsk, Donetsk region, 84505, Ukraine,

tel.: +38 (0627) 44 83 99

DETECTION OF *PLUM POX VIRUS* ISOLATES IN THE ORCHARDS OF THE EASTERN STEPPE OF UKRAINE

Plum pox virus (PPV), the causal agent of Sharka disease, produces severe damage and significant economic losses to stone fruit production. The propagation and distribution of virus free materials into healthy growing areas is one of the main ways to reduce the spread of this virus. Given the aggressiveness of PPV, it is imperative that all infected by this virus plants must be excluded from planting materials. ELISA method now is one of the most popular and used techniques for PPV detection. Whereas the usage of polyclonal antibodies, which recognize multiple epitopes on any one antigen, is controversial due to problems with specificity and sensitivity because serum contains a mixture of antibodies of different affinity. To ensure the effectiveness of annual screening surveys of rootstocks and varieties nurseries to detect viral pathogens on guaranteeing healthy status of plant material, the minimalization of false-negative test results is important. The diagnostic characteristics of two commercially available serological diagnostic tests for the detection of Ukrainian isolates of plum pox virus in plant material of six stone fruit crops selected in the orchards of the Eastern Steppe were evaluated. The standardized methodology was used for the calculation of the parameters of the operational capacity of DAS-ELISA. The analyses of diagnostic data were performed with 2x2 contingency tables. For assessing the validity of two ELISA test systems for the detection of local PPV isolates, some diagnostic parameters were calculated: sensitivity and specificity, positive and negative predictive values, positive and negative likelihood ratios. It is shown that the Agdia test system is more specific and more reliably identifies the plant material PPV affected, allowing for a more comprehensive eradication of the virus-infected material. The Agdia test is therefore more useful for the screening of nursery orchards to guarantee the future propagation of PPV-free plant material. Incongruent diagnoses obtained by different diagnostic systems in all stone fruit plant material may evidence that PPV prevalence in the

local stone fruit crops orchards being significantly underestimated, may result in the unintended and harmful propagation of the disease.

Key words: likelihood ratio, Plum pox virus, polyclonal antibodies, PPV-strains, predictive value, specificity.

Plum pox virus (PPV), the agent responsible for Sharka disease, belongs to genus *Potyvirus*. The natural host range of this virus is restricted to *Prunus* spp. (stone fruits and ornamental trees). PPV is especially harmful for *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* та *P. salicina*. The disease significantly reduces the quality and quantity of fruits in plants of these species. This virus is highly polymorphous. To date, seven strains/groups of PPV have been identified due to biological, serological, and molecular properties: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinant) and T (Turkish) [4,14]. The comparison of complete genomic sequences revealed up to 27.7% of nucleotide divergence between representative isolates of seven strains of PPV. Most of the deposited virus isolates presented in the GenBank database of nucleotide sequences belongs to PPV D (Dideron) and PPV M (Marcus) [5].

Although many diagnostic tools are available for the sensitive and/or specific detection of PPV, its detection is significantly complicated by its uneven distribution in infected woody hosts, and its low titer outside of the active growth period. There are no effective control measures against plum pox virus. The use of certified planting material, the removal of wild hosts, and the control of aphid vectors will help to prevent outbreaks of the disease and reduce the risk of the disease spreading. Taking into consideration the aggressiveness of this virus, it is imperative that all PPV infected plants must be excluded from planting materials.

The annual screening surveys of rootstocks and varieties nurseries are conducted to detect viral pathogens, including the plum pox virus, using systematic sampling. To ensure the effectiveness of these screening surveys on guaranteeing healthy plant material, the minimalization of false-negative test results is important. The continued presence of affected plants can significantly reduce the effectiveness of the work and lead to unexpected losses in subsequent stages of virus-free planting material propagation. Consequently the objective of this study was to compare the accuracy of Loewe Phytodiagnostica (Germany) and AGDIA (USA) ELISA protocols in the detection of Ukrainian PPV isolates, with a particular emphasis on the false-negative indicators.

Materials and methods

Research was done in Virology, Plant health and Propagation of Fruit and Berry Cultures Department of the Institute of Horticulture NAAS Ukraine, during 2011–2012. The samples were selected at the beginning of June,



during the period of intensive growth in both collection and old fruiting orchards, in Artemivsk Experimental Nursery-garden Station of IH NAAS. The samples plants included myrobalan, plum, peach, apricot, and sweet and sour cherry. Each sample consisted of 5 branches or 10 full-grown leaves selected from different locations in the internal section of the tree. There were selected 130 samples from trees suspected to contain PPV presence and divided into two groups. The first group included the samples of plum, peach, myrobalan and apricot (total 96 samples), the second group was comprised of sour and sweet cherries (total 34 samples).

Plum pox virus was detected in two tests by DAS-ELISA (DAS-Double Antibody Sandwich) [6] in two repetition using specific polyclonal antibodies produced by Loewe Phytodiagnostica (Germany) and AGDIA (USA). Compliant with recommendations for PPV detection, a sample was considered to be positive when the rate of its absorbance value was more than two times greater than the negative control value [12].

Analyses of diagnostic data were performed with 2x2 contingency tables, enabling indicators of the operational capacity of each test system to be calculated. This method allows to make the probabilistic assessment of positive and negative test results. For assessing the validity of two ELISA test systems for the detection of local PPV isolates, some diagnostic parameters were calculated (formulas 1–6): sensitivity and specificity were calculated according to Altman and Bland [2], positive and negative predictive values were estimated according to Altman and Bland [3], positive and negative likelihood ratios were estimated according to Deeks and Altman [7]. The conventional data layout for the 2x2 contingency table used to calculate parameters of laboratory test capacity, along with relevant formulas, are shown in Table 1.

Table 1

Contingency table created by comparing the results of the diagnostic test and the reference test

		Reference test	
		Positive	Negative
Test Outcome	Test outcome Positive	a True positive (TP)	b False positive (FP)
	Test outcome Negative	c False negative (FN)	d True negative (TN)

$$\text{Sensitivity} = a/(a+c) = \text{true positives} / \text{disease+} \quad (1)$$

$$\text{Sensitivity} = d/(b+d) = \text{true negatives} / \text{disease-} \quad (2)$$

$$\text{Positive predictive value (PPV)} = a/(a+b) = \text{TruePositives}/\text{Test+} \quad (3)$$

$$\text{Negative predictive value} = d/(c+d) = \text{TrueNegatives}/\text{Test-} \quad (4)$$

$$\text{Likelihood ratio positive (LR+)} = \text{sensitivity} / (1 - \text{specificity}) \quad (5)$$

$$\text{Likelihood ratio negative (LR-)} = (1 - \text{sensitivity}) / \text{specificity} \quad (6)$$



Calculations were performed using the program JawaStat 2-way Contingency Table Analysis, in which confidence intervals (95%) for selected indicators were calculated on the basis of binomial distribution.

Results and discussion

Phytovirological monitoring of Plum pox virus in orchards belonging to the Institute of Horticulture have been conducted since 2004 by ELISA, using polyclonal commercial test systems produced by Loewe Phytodiagnostica in Germany, which are among the most common test systems used by in relevant European laboratories. Between 2004 and 2012, more than 3.500 trees from the plum group and approximately 1.200 trees from the cherry group were tested for PPV presence. This testing initiated the selection of virus-free clones of the rootstocks of prospective varieties and the creation of a virus-free clones base, and allowed for the control of PPV spread in different types of nurseries and orchards. The PPV prevalence rate was determined in the main collection orchards of stone fruit crops (plum, peach, plum, apricot, sweet and sour cherry) as well as in nurseries of vegetative rootstocks of the plum and cherry groups. It was found that in collection plantings of myrobalan, plum, peach, and apricot, the spread of PPV ranges from 3.8% to 19.2%, and in sweet and sour cherry plantings it varies between 6.7% and 9.1%.

Loewe Phytodiagnostica produced immunoglobulins were considered to be the «golden standard» for screening surveys of stone fruit crops plant material in the laboratory, and are comprised of an artificial mixture of antibodies which are effective against all the strains of PPV except PPV W. However, AGDIA produced polyclonal antibodies can detect all strains of PPV including the elusive PPV W. Detection of the virus in selected material using various test systems revealed some differences in the status of the tested materials (table 2).

The highest consistency in the testing results was observed for samples in the first group. The Pearson correlation between parameters of absorbance value (optical density) obtained using two diagnostic systems was significant ($cor = 0.856$ $p < 0.001$). The proportion of the samples with positive diagnosis was found by AGDIA and Loewe Phytodiagnostica test systems to be 0.478 and 0.270, respectively. All positive diagnoses obtained using Loewe Phytodiagnostica were validated by AGDIA. Mismatch of diagnosis was observed in 20.8% of samples which tested positive by AGDIA results only. The optical density of these samples was usually ranged from 2- to 3-fold value of the negative control. These findings indicate that the spread of PPV can be systemically underestimated using the test system of Loewe Phytodiagnostica in our regional screening surveys.



Table 2

ELISA results obtained with the AGDIA and Loewe Phytodiagnostica tests

Groups	Proportion of plants with test positive		Proportion of plants with inconsistent diagnosis
	Loewe Phytodiagnostica	AGDIA	
Group I (myrobalan, plum, peach, apricot)	0.270	0.479	0.208
group II (sour and sweet cherries)	0	0.375	0.375

There is much to be learned about PPV strains that circulate in the Ukrainian stone fruit orchards. In recent years there have been partial genome sequencing performed on select Ukrainian plum isolates which were identified as D-strains [1], including two isolates in our department (in preparation). Also known that the origin of the PPV W atypical isolates [8, 10] may be tied back to the region of the Eastern steppe of Ukraine. So it is within reason that in the Artemivsk district this strain could also be in circulation.

In sweet and sour cherry orchards samples were collected from the trees showing a decline of main shoots, expressed basal shoots, and reduction of leaf and fruit size. In only two cases clear mosaic symptoms on leaves (sweet cherry cultivars Krupnoplidna and Mahalebca) were observed. Analysis of this samples group using two testing systems showed 16.7% discrepancy in positive diagnosis. For one of the sweet cherry samples the optical density was equal to the optical density of the negative control obtained using the Loewe Phytodiagnostica testing system, and was equal to the positive control obtained using AGDIA one. There was no significant Pearson correlation between optical density rates in two different analyses (corr = -0.056, p=0.771). The results obtained using the two serological tests for cherry PPV detection were inconsistent with one another.

In reality, we face a mixture of virus isolates in our screening, as different PPV strains can be present not only in the same orchard but in the same plant as well [9]. The use of polyclonal antibodies which recognize multiple epitopes on the same antigen always raises the question of sensitivity and specificity, because the serum contains a mixture of antibodies of different affinities [13]. The screening test for PPV detection in nurseries may be evaluated using different indices. The more important among them are specificity, negative predictive value, and negative likelihood ratio, because these are indices which estimate the false-negative test results. Specificity in particular is defined as the probability of a negative test in plants free of the disease, while sensitivity is defined as the probability of a positive test in plants harboring the disease. The Loewe Phytodiagnostika antibodies were more specific for PPV detection in both groups of samples (table 3, 4).

Table 3

Discriminatory power of applying test systems for PPV detection in samples group I

Indicators	AGDIA		Loewe Phytodiagnostica	
	Parameters	95% confidence intervals	Parameters	95% confidence intervals
Sensitivity	1.000	0.859 ÷ 1.000	0.565	0.485 ÷ 0.565
Specificity	0.714	0.662 ÷ 0.714	1.000	0.926 ÷ 1.000
PPV	0.565	0.485 ÷ 0.565	1.000	0.859 ÷ 1.000
NPV	1.000	0.926 ÷ 1.000	0.714	0.662 ÷ 0.714
+LR	3.500	2.538 ÷ 3.500	inf	7.893 ÷ inf
-LR	0.000	0.000 ÷ 0.214	0.435	0.435 ÷ 0.556

Table 4

Discriminatory power of applying test systems for PPV detection in samples group II

Indicators	AGDIA		Loewe Phytodiagnostica	
	Parameters	95% confidence intervals	Parameters	95% confidence intervals
Sensitivity	0.333	0.063 ÷ 0.781	0.111	0.021 ÷ 0.260
Specificity	0.814	0.795 ÷ 0.845	0.946	0.924 ÷ 0.982
PPV	0.111	0.021 ÷ 0.026	0.333	0.063 ÷ 0.781
NPV	0.946	0.924 ÷ 0.982	0.814	0.795 ÷ 0.845
+LR	1.792	0.305 ÷ 5.047	2.056	0.275 ÷ 14.678
-LR	0.819	0.259 ÷ 1.179	0.940	0.753 ÷ 1.060

It is known that the laboratory test has a high capacity level if the sum of its sensitivity and specificity exceeds the value of 1.4. [15]. In our study, both test systems have sufficient capacity levels for PPV detection in plant material of the first group. The value of this sum is 1.714 for AGDIA test system and 1.565 for Loewe Phytodiagnostica. For the second group these values are much lower, resulting in 1.147 and 1.057 respectively. Low sensitivity of both diagnostic tests for the detection of local cherry PPV isolates should be noted. At the same time the level of its specificity to these virus strains is sufficient. Other authors also observed discordant results in determining PPV status in cherry plant material by ELISA [11].



But specificity and sensitivity serve only to provide a rough distribution of results into “positive” and “negative” categories, because these indices are significantly influenced by the prevalence of infected plants in the population investigated. Positive and negative predictive values are estimates of the probability that the infected plants have a defined diagnosis (posterior probability). Its value is less dependent on the disease prevalence in the population investigated. Positive predictive value is defined as the proportion of the plants showing positive results given by the method, which have been correctly diagnosed. Negative predictive value was the proportion of the plants showing negative results by the method, which were correctly diagnosed. The higher the NPV, the lower the rate of false-negative test results. For test results in both groups this indicator is higher for the Agdia test system. The NPV values indicate that a negative diagnosis in first group of samples was more reliable (NPV = 1.000) in comparison with the second one (NPV = 0.946).

Potential utility of the test can be objectively evaluated using the likelihood ratio (LR). This indicator offers important advantages over sensitivity and specificity in characterizing diagnostic tests, since it does not depend on the virus prevalence in the population. Likelihood ratio can be positive (+LR) or negative (-LR). LR+ is defined as the probability of a plant *with* disease having a positive test result, divided by the probability of a plant *without* disease having a positive test result. LR- is defined as the probability of a plant *with* disease having a negative test result, divided by the probability of a plant *without* disease having a negative test result. The positive likelihood ratio (LR+) must be greater than 1, and the negative likelihood ratio (LR-) – ranged from 0 to 1. The larger the value of LR+, the stronger the relationship between a positive result and the probability that the plants carry the disease. The smaller value of LR-, the stronger the relationship between a negative result and the probability that the plants are disease-free.

The antibodies provided by AGDIA is therefore more discriminative than the Loewe Phytodiagnostica test, as it demonstrated the lowest probability of false-negative diagnoses a wider range of PPV isolates in group I (LR = 0.000). In the plant material of the second group of the samples the lowest share of false-negative diagnoses were also obtained with the same test system.

Conclusion. The test system of AGDIA is more specific for the screening of nursery orchards of six stone fruit crops (plum, myrobalan, peach, apricot, sour and sweet cherry) for the presence of PPV. Incongruent diagnoses obtained by different diagnostic systems in all stone fruit plant material may evidence that PPV prevalence in the local stone fruit crops orchards has been significantly underestimated, resulting in the unintended and harmful propagation of the disease. Both test systems have low discriminatory abilities in the detection of local cherry PPV isolates. The local PPV strains require further study by more specific methods.

REFERENCES

1. Будзанівська І.Г. Філогенетичний аналіз та штамове різноманіття РНК-вмісних вірусів рослин в Україні: автореферат дис. ... д-ра біол. наук. К., 2012. — 44 с.
2. Altman D.G., Bland J.M. Diagnostic tests 1: Sensitivity and specificity // British Medical Journal. — 1994. — № 308. — P. 1552.
3. Altman D.G., Bland J.M. Diagnostic tests 2: Predictive values // British Medical Journal. — 1994. — № 309. — P. 102.
4. Candresse T., Cambra M. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2006. — № 36. — P. 239–246.
5. Capote N., Cambra M., Llacer G., Petter F., Platts L.G., Roy A.S. & Smith I.M. Current status of *Plum pox virus* and Sharka disease worldwide // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2006. — № 36. — P. 201–350.
6. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of the enzyme — linked immunosorbent assay for the detection of plant virus // J.Gen.Virol. — 1977. — 34, № 3. — P. 475–483.
7. Deeks J.J., Altman D.G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios // British Medical Journal. — 2004. — № 329. — P. 168–169.
8. James D., Varga A. Nucleotide sequence analysis of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain. Virus Reserach. — 2005. — № 110. — P. 143–150.
9. Kollerová E., Nováková S., Šubr Z., Glasa M. *Plum pox virus* mixed infection detected on apricot in Pakistan // Plant Disease. — 2006. — № 90. — P. 1108–1108.
10. Mavrodieva V., James D., Williams K., Negi S., Varga A., Levy L. Molecular analysis of a Plum pox virus W isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate // Plant diseases — 2013. — №97(1). — P. 44–52.
11. Navratil M., Šafařova D., Gadiou S., Franova J., Kučerova J., Talacko L. The partial molecular characterization of *Plum Pox Virus* infecting sweet cherry trees in the Czech Republic // Acta Horticulturae. — 2008. — № 781. — P. 203–208.
12. OEPP/EPPO Standards. Diagnostic protocols for regulated pests. *Plum pox potyvirus* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2004. — № 34. — P. 155–157.
13. Richter J., Proll E., Rabenstein F., Stanarius A. Serological detection of members of the potyviridae with polyclonal antisera.// J. Phytopathol. — 1994. — № 142. — P. 11–18.
14. Ulubaş Serze Ç., Candresse T., Svanella-Dumas L., Krizbai L., Gazel M. & Çağlayan K. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey // Virus Research. — 2009. — № 142. — P. 121–126.
15. Wians F.H. Clinical laboratory tests: which, why, and what do the results mean? / LabMedicin. — 2009. — № 40(2). — P. 105–113.

Стаття надійшла до редакції 27.02.2013 р.



**Н.В. Тряпичина¹, К.М. Удовиченко¹, С.О. Васюта¹, Т.В. Медведєва¹,
В.В. Ярушников², В.М. Удовиченко¹**

¹Інститут садівництва НААН, вул. Садова, 6, Новосілки, Київ, 03027, Україна,
тел.: +38 (044) 526 65 97, e-mail: tryapic@ukr.net

²Артемівська ДСР ІС НААН, Ягідне, Артемівськ, Донецька обл., 84505, Україна,
тел.: +38 (0627) 44 83 99

ВИЯВЛЕННЯ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ШАРКИ СЛИВИ В НАСАДЖЕННЯХ СХІДНОГО СТЕПУ УКРАЇНИ

Реферат

Метою роботи був порівняльний аналіз результатів дослідження маточників клональних підвоїв і маточно-черенкових насаджень на наявність вірусних патогенів та підтвердження безвірусного статусу рослинного матеріалу з використанням ІФА-діагностикумів. В роботі оцінено діагностичні характеристики двох комерційних тестових систем для виявлення українських ізолятів вірусу шарки сливи в рослинному матеріалі шести кісточкових культур, відібраному в насадженнях Східного Степу. Для розрахунку показників операційної потужності методу DAS-ELISA було використано стандартну методологію. Аналіз діагностичних даних було проведено з використанням 2x2 таблиці спряженості ознак. Для оцінки валідності двох тестових систем для ідентифікації локальних ізолятів вірусу шарки сливи було розраховано наступні діагностичні показники: чутливість, специфічність, негативне та позитивне предиктивні значення, негативне та позитивне відношення правдоподібності. Було показано, що тестова система виробництва AGDIA є більш специфічною та більш надійно визначає статус інфікованого вірусом шарки сливи рослинного матеріалу, що дозволяє більш ефективно його викоринювати. Ця тестова система є більш придатною для скринінгових обстежень в локальних маточних насадженнях і більш надійно забезпечує вирощування вільного від вірусу шарки сливи садивного матеріалу. Неузгодженість діагнозів, отриманих різними системами для всіх шести кісточкових культур свідчить про те, що поширення вірусу шарки сливи в локальних насадженнях може бути значно недооціненим, що сприяє небезпечному поширенню цього захворювання.

Ключові слова: відношення правдоподібності, вірус шарки сливи, поліклональні антитіла, предиктивне значення, специфічність, штами вірусу шарки сливи.



**Н.В. Тряпицына¹, К.Н. Удовиченко¹, С.А. Васюта¹, Т.В. Медведева¹,
В.В. Ярушников², В.М. Удовиченко¹**

¹Институт садоводства НААН, ул. Садовая, 6, Новоселки, Киев, 03027, Украина,
тел.: +38 (044) 526 65 97, e-mail: tryapic@ukr.net

²Артемовская ОСР ИС НААН, Ягодное, Артемовск, Донецкая обл., 84505, Украина,
тел.: +38 (0627) 44 83 99

ВЫЯВЛЕНИЕ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ В НАСАЖДЕНИЯХ ВОСТОЧНОЙ СТЕПИ УКРАИНЫ

Реферат

Целью данной работы явился сравнительный анализ результатов исследования маточников клоновых подвоев и маточно-черенковых насаждений на наличие вирусных патогенов и подтверждение безвирусного статуса растительного материала с использованием ИФА-диагностикумов. В статье оценены диагностические характеристики двух коммерческих тестовых систем для выявления украинских изолятов вируса шарки сливы в растительном материале шести косточковых культур, отобранном в насаждениях Восточной Степи. Для расчета показателей операционной мощности метода DAS-ELISA была использована стандартная методология. Анализ диагностических данных был проведен с использованием 2x2 таблицы сопряженности признаков. Для оценки валидности двух тестовых систем для идентификации локальных изолятов вируса шарки сливы были рассчитаны следующие диагностические показатели: чувствительность, специфичность, отрицательное и положительное предиктивные значения, отрицательное и положительное отношения правдоподобия. Было показано, что тестовая система производства AGDIA является более специфической и более надежно определяет статус инфицированного вирусом шарки сливы растительного материала, что позволяет более эффективно его искоренять. Эта тестовая система является более подходящей для скрининговых обследований в локальных маточных насаждениях и более надежно обеспечивает выращивание свободного от вируса шарки сливы посадочного материала. Несогласованность диагнозов, полученных разными системами для всех шести косточковых культур свидетельствует о том, что распространение вируса шарки сливы в локальных насаждениях может быть значительно недооцененным, что способствует опасному распространению этого заболевания.

К л ю ч е в ы е с л о в а : отношения правдоподобия, вирус шарки сливы, поликлональные антитела, предиктивные значения, специфичность, штаммы вируса шарки сливы.



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2012 РОЦІ

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Авдеева Л.В. див. Хархота М.А.</i>	2	60
<i>Алексеевко О.М., Жерносекова І.В., Вінніков А.І.</i> Вивчення дії культуральної рідини стрептоміцета на накопичення біомаси <i>Pleurotus ostreatus</i>	1	66
<i>Андріяш Г.С., Заболотна Г.М., Шульга С.М.</i> Регулювання та шляхи інтенсифікації біосинтезу лізину	4	6
<i>Артеменко А.Г. див. Декіна С.С.</i>	4	44
<i>Багаєва О.С. див. Ужєвська С.П.</i>	1	85
<i>Барштейн В.Ю. див. Круподьорова Т.А.</i>	1	47
<i>Беляєва Т.О. див. Гудзенко Т.В.</i>	4	36
<i>Бисов А.С. див. Руднева Т.О.</i>	4	29
<i>Білоіваненко С.О. див. Іваниця В.О.</i>	3	74
<i>Блайда І.А., Васильєва Т.В., Слюсаренко Л.І., Хитрич В.Ф., Іваниця В.О.</i> Вилучення рідкісних та кольорових металів угрупованнями мікроорганізмів золи від спалювання Павлоградського вугілля	3	91
<i>Бобрешова Н.С. див. Міресь С.Л.</i>	2	52
<i>Бойко М.І. див. Древаль К.Г.</i>	4	64
<i>Броварська О.С. див. Грицай Р.В.</i>	2	20
<i>Бухтіяров А.Є. див. Гудзенко Т.В.</i>	4	36
<i>Бухтіяров А.Є. див. Іваниця В.О.</i>	4	76
<i>Варбанець Л.Д. див. Грицай Р.В.</i>	2	20
<i>Варбанець Л.Д. див. Грицай Р.В.</i>	3	6
<i>Васильєва Н.Ю., Гудзенко Т.В., Панченко М.М., Іваниця В.О.</i> Оптимізація складу поживного середовища для ентомопатогенних бактерій штаму <i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 15	4	52
<i>Васильєва Т.В. див. Блайда І.А.</i>	3	91
<i>Васильєва Н.Ю. див. Сергєєва Ж.Ю.</i>	4	18



Автори	№ вип.	№ стор.
Велигодська А.К. див. Федотов О.В.	3	44
Велигодська А.К., Федотов О.В. Порівняльна характеристика загального вмісту каротиноїдів у деяких видів базидіальних грибів	4	84
Вінніков А.І. див. Алексеєнко О.М.	1	66
Волювач О.В. див. Гудзенко Т.В.	4	36
Галкін Б.М. див. Пахомова Є.Ю.	3	55
Галкін Б.М. див. Русакова М.Ю.	2	89
Галкін М.Б. див. Пахомова Є.Ю.	3	55
Галкін М.Б., Ліманська Н.В., Філіпова Т.О., Іваниця В.О. Формування біоплівки бактеріями <i>Lactobacillus plantarum</i> на коренях рослин <i>Lepidium sativum</i> L.	3	34
Галкін Б.М. див. Зінченко О.Ю.	2	69
Галушка А.А., Горішний М.Б., Кулачковський О.Р., Гудзь С.П. Вплив гідроген сульфідів на фотосинтезувальний апарат бактерій <i>Chlorobium limicola</i> IMB K-8	1	39
Гнатуш С.О. див. Горішний М.Б.	3	65
Голубець О.В. див. Грицай Р.В.	2	20
Горішний М.Б. див. Галушка А.А.	1	39
Горішний М.Б., Гудзь С.П. Особливості конструктивного анаболізму вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій <i>Chlorobium limicola</i> IMB K-8	2	79
Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Вплив мінерального та органічного живлення на кількісні зміни фотореакційних молекул у клітинах <i>Chlorobium limicola</i> IMB K-8	3	65
Горшкова О.Г. див. Гудзенко Т.В.	4	36
Грицай Р.В., Варбанець Л.Д. <i>Ralstonia solanacearum</i> : особливості біології і ідентифікації	3	6
Грицай Р.В., Голубець О.В., Броварська О.С., Варбанець Л.Д. Ліпополісахариди <i>Ralstonia solanacearum</i> : жирнокислотний склад і біологічна активність	2	20
Гриценко Н.А. див. Хом'як Д.І.	1	31
Гришко В.М., Коріновська О.М. Стійкість мікроміцетів до сумісної дії сполук важких металів	3	82
Гудзенко Т.В. див. Васильєва Н.Ю.	4	52



Автори	№ вип.	№ стор.
Гудзенко Т.В. див. Іваниця В.О.	4	76
Гудзенко Т.В. див. Міресь С.Л.	2	52
Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Конуп І.П., Бухтіяров А.Є., Захарія О.М., Лісютин Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Вилучення міді (II) та нікелю (II) із концентрованих водних розчинів глиною, хітозаном та іммобілізованими бактеріями	4	36
Гудзь С.П. див. Галушка А.А.	1	39
Гудзь С.П. див. Горішний М.Б.	2	79
Гудзь С.П. див. Горішний М.Б.	3	65
Декіна С.С., Овсепян А.М., Артеменко А.Г., Романовська І.І., Кузьмін В.Є. Дослідження впливу іонів металів на активність лізоциму методом QSAR аналізу	4	44
Древаль К.Г., Бойко М.І. Ферментативна активність препаратів екзоцелюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів	4	64
Дуденко Ю.Ю., Міресь С.Л., Іваниця В.О. Біологічно активні сполуки лікарського гриба <i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.:Fr) P. Karst	2	6
Дуденко Ю.Ю. див. Міресь С.Л.	2	52
Ертле Т. див. Ліманська Н.В.	2	30
Жерносекова І.В. див. Алексеєнко О.М.	1	66
Заболотна Г.М. див. Андріяш Г.С.	4	6
Заєць В.М., Кітам В.О., Руцак В.В., Максимчук О.В., Чащин М.О. Гетерологічна експресія рекомбінантного цитохрому P450 2E1 миші в <i>Escherichia coli</i>	2	41
Захарія О.М. див. Гудзенко Т.В.	4	36
Захарія О.М. див. Іваниця В.О.	4	76
Зінченко О.Ю., Шматкова Н.В., Сейфулліна І.І., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Антимікробна активність похідних ізонікотинової кислоти та комплексів стануму(IV) на їх основі	2	69
Іваниця В.О. див. Блайда І.А.	3	91
Іваниця В.О. див. Васильєва Н.Ю.	4	52

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Іваниця В.О. див. Галкін М.Б.</i>	3	34
<i>Іваниця В.О. див. Дуденко Ю.Ю.</i>	2	6
<i>Іваниця В.О., Білоіваненко С.О.</i> Чисельність та таксономічний склад дріжджів прибережної акваторії острова Зміїний	3	74
<i>Іваниця В.О. див. Гудзенко Т.В.</i>	4	36
<i>Іваниця В.О. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Іваниця В.О. див. Мірось С.Л.</i>	2	52
<i>Іваниця В.О. див. Сергєєва Ж.Ю.</i>	4	18
<i>Іваниця В.О. див. Ужєвська С.П.</i>	1	85
<i>Іваниця В.О., Бухтіяров А.Є., Лісютін Г.В., Захарія О.М., Гудзенко Т.В.</i> Акумуляція важких металів бактеріями роду <i>Pseudomonas</i>	4	76
<i>Іваниця Т.В. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Кітам В.О. див. Заєць В.М.</i>	2	41
<i>Конон А.Д. див. Хом'як Д.І.</i>	1	31
<i>Конуп І.П. див. Гудзенко Т.В.</i>	4	36
<i>Коріновська О.М. див. Гришко В.М.</i>	3	82
<i>Кортаєва Н.В. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Косюга А.А. див. Русакова М.Ю.</i>	2	89
<i>Крилова К.Д. див. Сергєєва Ж.Ю.</i>	4	18
<i>Круподьорова Т.А., Барштейн В.Ю.</i> Альтернативні субстрати для культивування лікарських та їстівних грибів	1	47
<i>Кузнецов В.О.</i> Наукова і педагогічна діяльність професора Юрія Васильовича Медведєва (05.09.1903 – 06.09.1969 рр.)	1	94
<i>Кузьмін В.Є. див. Декіна С.С.</i>	4	44
<i>Кулачковський О.Р. див. Галушка А.А.</i>	1	39
<i>Ліманська Н.В. див. Галкін М.Б.</i>	3	34
<i>Ліманська Н.В.</i> Захист винограду від бактеріального раку	1	6
<i>Ліманська Н.В. див. Сергєєва Ж.Ю.</i>	4	18



Автори	№ вип.	№ стор.
Ліманська Н.В., Іваниця Т.В., Шуазе І., Коротаєва Н.В., Сергєєва Ж.Ю., Шобер Ж.-М., Іваниця В.О., Ертле Т. Вплив бактеріоцину <i>Enterococcus durans</i> на збудника бактеріального вілту	2	30
Лісютин Г.В. див. Гудзенко Т.В.	4	36
Лісютін Г.В. див. Іваниця В.О.	4	76
Максимчук О.В. див. Заєць В.М.	2	41
Мірось С.Л. див. Дуденко Ю.Ю.	2	6
Мірось С.Л., Дуденко Ю.Ю., Бобрешова Н.С., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О. Електрофоретичні спектри карбоксилестераз <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis: Fr.) P. Karst залежно від умов екстрагування та субстрату для вирощування	2	52
Мороз О.М., Русин І.Б. Використання сполук нітрогену бактеріями циклу сульфуру озера Яворівське	2	96
Овсепян А.М. див. Декіна С.С.	4	44
Осадча А.І. див. Хархота М.А.	2	60
Панченко М.М. див. Васильєва Н.Ю.	4	52
Пахомова Є.Ю., Галкін М.Б., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Вплив вісмуткових комплексів порфіринів і бактеріофага на формування біоплівки та синтез піоціаніну <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	55
Пирог Т.П. див. Хом'як Д.І.	1	31
Пирог Т.П. див. Шулякова М.О.	1	57
Поліщук В.П. див. Руднева Т.О.	4	29
Романовська І.І. див. Декіна С.С.	4	44
Романовська І.І., Шестеренко Ю.А., Севаст'янов О.В. Видалення фенолу з морської води з використанням вільної і іммобілізованої тирозинази грибів <i>Agaricus bisporus</i>	1	23
Руднева Т.О., Шевченко Т.П., Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Бисов А.С., Поліщук В.П. Віруси перцю солодкого у агроценозах України та насінневому матеріалі	4	29
Русякова М.Ю., Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Косюга А.А. Антифузаріозна активність екзометаболітів деяких штамів роду <i>Pseudomonas</i>	2	89

Автори	№ вип.	№ стор.
Русин І.Б. див. Мороз О.М.	2	96
Руцак В.В. див. Заєць В.М.	2	41
Севастьянов О.В. див. Романовська І.І.	1	23
Сейфулліна І.І. див. Зінченко О.Ю.	2	69
Сергеева Ж.Ю. див. Ліманська Н.В.	2	30
Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильєва Н.Ю., Товкач Ф.І., Іваниця В.О. Вплив <i>Lactobacillus plantarum</i> ONU 87 та автолізу бактерій <i>Erwinia carotovora</i> ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі	4	18
Ситніков Д.М. Економічна доцільність застосування ризобіальних препаратів, модифікованих гомологічним лектином	1	75
Слюсаренко Л.І. див. Блайда І.А.	3	91
Тігунова О.О. див. Ткаченко А.Ф.	3	17
Ткаченко А.Ф., Тігунова О.О., Шульга С.М. Мікробні ліпіди — альтернативне джерело сировини для біопалива	3	17
Товкач Ф.І. див. Сергеева Ж.Ю.	4	18
Ужевська С.П., Багаєва О.С., Іваниця В.О. Мікроміцети як об'єкти живлення кліщів тарсонемід (<i>Tarsonemidae</i> , <i>Heterostigmata</i>)	1	85
Федотов О.В. див. Велигодська А.К.	4	84
Федотов О.В., Велигодська А.К. Загальний вміст поліфенольних речовин у деяких видів базидіоміцетів	3	44
Філіпова Т.О. див. Галкін М.Б.	3	34
Філіпова Т.О. див. Пахомова Є.Ю.	3	55
Філіпова Т.О. див. Русакова М.Ю.	2	89
Філіпова Т.О. див. Зінченко О.Ю.	2	69
Хархота М.А., Осадча А.І., Авдеева Л.В. Композиційні співвідношення пробіотичних штамів <i>B. subtilis</i> та пребіотиків для синбіотичного препарату	2	60
Хитрич В.Ф. див. Блайда І.А.	3	91
Хом'як Д.І., Гриценко Н.А., Конон А.Д., Пирог Т.П. Вплив органічних кислот на синтез поверхнево-активних речовин за умов росту <i>Nocardia vacillii</i> К-8 на гліцерині	1	31



Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Цвігун В.О. див. Руднева Т.О.</i>	4	29
<i>Чащин М.О. див. Заєць В.М.</i>	2	41
<i>Шамрайчук В.О. див. Руднева Т.О.</i>	4	29
<i>Шевченко Т.П. див. Руднева Т.О.</i>	4	29
<i>Шевчук Т.А. див. Шулякова М.О.</i>	1	57
<i>Шестеренко Ю.А. див. Романовська І.І.</i>	1	23
<i>Шматкова Н.В. див. Зінченко О.Ю.</i>	2	69
<i>Шобер Ж.-М. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Шуазе І. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Шулякова М.О., Пирог Т.П., Шевчук Т.А.</i> Деякі закономірності синтезу поверхнево-активних речовин за умов культивування <i>Rhodococcus erythropolis</i> ІМВ Ас-5017 на суміші ростових субстратів	1	57
<i>Шульга С.М. див. Андріяш Г.С.</i>	4	6
<i>Шульга С.М. див. Ткаченко А.Ф.</i>	3	17

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, діагностичуми, 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: «Оглядіві 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 10 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 мовою оригіналу та англійською мовою на дискеті (Word, шрифт Times New Roman,



кегель 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 результатів дослідження (до 200 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(ми).

Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, адреси, повну назву статті відповідною мовою. 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 TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті та дублюються окремим файлом на CD.

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

Розділ «Результати 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 наводять 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 phthalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. — 1982. — 132, № 2. — P. 185–188.

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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 або 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 для наукових досліджень тощо.



INFORMATION FOR THE AUTHORS

*Scientific journal «Microbiology and biotechnology»
invites you to spotlight*

Aims. Journal «Microbiology and biotechnology» publishes primary research papers on microbiology and biotechnology of prokaryotic (bacteria, archaea) and eucaryotic (fungi, microscopic algae, protozoa) microorganisms, viruses.

Topics: microbiology, virology, molecular biotechnology, development and selection of new microbial strains, microbial preparations, antimicrobial preparations, biosensors, diagnosticums, microbial technologies in agriculture, microbial technologies in food production, environment protection and enhancement, development of energy vectors and new raw materials, etc.

Languages: Ukrainian, Russian, English.

Types of publications: «Observation and theoretical articles», «Experimental works», «Reviews», «Original Research Papers», «Discussions», «Short communications», «Conferences, congresses, trend schools», «Scientific life chronicles», «Pages of History», «Anniversaries», «Book reviews», «Bookshelf».

The manuscript should be accompanied by a letter from an institution expert commission that should state that the paper is suitable for publication in MSM, and comprise a recommendation of the institution where the research was carried out, signed by the chief and a signed agreement of institution leader.

Article appearance:

The manuscript should satisfy journal topics and according to Resolution of Higher Attestation Commission of Ukraine (15.01.2003, № 7-05/1, p. 3) must contain the following elements: problem definition with the reference to main scientific and practical tasks; analysis of recent studies and publications that form a basis for problem decision; highlighting of main unsolved tasks; article task; narrative of main results with their full substantiation; conclusions and main challenges in given area of focus.

The following articles are accepted:

- original research papers — at most 10 pages (with pictures, tables, and captions, resume, bibliography)
- reviews — at most 15 pages
- book reviews — at most 3 pages
- short communications — at most 2 pages.



The manuscript should be given in 2 carbon copies with an electronic variant on CD (Word, font Times New Roman, 14, line spacing automatic, at most 30 lines per page, page margins – 2 cm on all sides).

Contents of manuscript

- UDC index on the first page top left;
- author(s) full name(s) in source language, name(s) of institution(s), institution postal address (in international format), contact phone number, e-mail address. Authors names and institutions they represent should be clearly stated by using superscript numbers;
- article title uppercase;
- article abstract (should not exceed 200 words);
- key words pertaining to the subject matter (5 maximum).

The manuscript should be divided into the following sections: introduction, materials and methods, results and discussion, concluding remarks, and references.

Abstracts in source language, Ukrainian/Russian (depending on article language) and English (each one on single page) should be attached to every copy of an article. **Author(s) name(s), institution(s) and article title** should be followed by word «Abstract», abstract itself and key words (new paragraph).

Next to article text contact details should be set: names of all the authors, institution names, postal address, phone/fax number, e-mail.

The manuscript should be signed by the author (all the authors) and dated on the last page.

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

Repeated word-combinations can be abbreviated. An abbreviation is set in brackets when first introduced, e. g. polimerase chain reaction (PCR).

Bibliography references should be numeral and are given in the text in square brackets according to their order in the bibliography list.

Tables should be compact, and numbered with Arabic numerals; all columns and rows should be arranged in logical and grafical order. All material presented in the tables (figures) should be clear and should not duplicate an article text. Results should be processed statistically.

All pictures should be presented in TIFF or JRG format, axes named. Figures should be placed in article body with electronic copies on CD in separate file.

Section «Results and Discussion» should clearly state revealed effects, cause-effect relations, compare obtained data with literature data and give the answers on questions specified in the introduction.

References should be numbered sequentially in alphabetical-chronological order (Cyrillic first, then Latin) at the end of the manuscript. If the first author in several references is the same, all these references are arranged in chronological order. Reference list should be numbered. The numbers should be set in square brackets in the text, *i. e.* [2, 15].



References should contain all the authors' names. Original research papers should contain at most 15 references. Patent documents should be mentioned at the end of the list.

Books

Bergeys 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.

Journals

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

The date of article acceptance is that one when the final variant comes to the publisher after a prepublication review.

After obtaining the proof sheet the author should correct mistakes (clearly cancel incorrect variant with blue or black ink and put the correct variant on border) and send the revised variant to the editor (by post, e-mail or phone).

In case of delays, editors keeping to the schedule have a right to publish the revised variant without author's proofreading.

Author's signature vouches that author grants a copyright to the publisher. Author vouches that the work has not been published elsewhere, either completely, or in part and has not been submitted to another journal.

Not accepted manuscripts will not be returned.

The publisher accepts paid-for advertisement on biotechnology, medicine, laboratory equipment, research diagnosticums, tests, reagents for publication on the cover or journal pages.



УВАГА!

У журналі «Мікробіологія і біотехнологія» № 2(18) 2012 у статті Ю.Ю. Дуденко, С.Л. Мірсь, В.О. Іваниця «БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА GANODERMA LUCIDUM (Curt .: Fr) P. Karst» на стор.15 у Списку використаної літератури під № 3 слід читати:

З. Іванова Т. С., Бісько Н. А., Барштейн В. Ю., Круподьорова Т. А. Біологічно-активні речовини грибів відділу Basidiomycota // Проблеми харчування. — 2010. — № 2. — С. 42–47.

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.

Зам. № 165. Тираж 100 прим.

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