

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал

Виходить 4 рази на рік

Засновано у липні 2006 року

№ 3(31)
2015

Одеса
ОНУ
2015

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

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

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

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

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.
Протокол № 6 від 23.06.2015 р.

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

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

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

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

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

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University.
Minutes No 6, 23.06.2015

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

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

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

© Odesa National Mechnykov
University, 2015

З М І С Т

О Г Л Я Д О В І П Р А Ц І

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| І.Д. Жунько, Н.В. Ліманська, Б.Н. Мілкус, В.О. Іваниця ВІРУСИ ТА ВІРУСНІ ХВОРОБИ ВИНОГРАДУ (<i>VITIS SP.</i>) | 6 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

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

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| А.І. Чуєнко МІКРОМІЦЕТИ – ПОТЕНЦІЙНІ БІОДЕСТРУКТОРИ ВІДХОДІВ ГУМОТЕХНІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ В УМОВАХ УКРАЇНИ | 21 |
| І.І. Романовська, А.П. Левицький, С.С. Декіна, А.М. Овсепян МУКОАДГЕЗИВНИЙ ГЕЛЬ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ЛІЗОЦИМОМ І КВЕРЦЕТИНОМ..... | 30 |
| О.О. Тігунова, С.М. Шульга ВИКОРИСТАННЯ МУТАНТНИМ ШТАМОМ <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ ЯК СУБСТРАТА | 41 |
| І.Б. Висотіна, О.С. Воронкова, А.І. Вінніков МОНІТОРИНГ ГРИБІВ – КОНТАМІНАНТІВ ХЛІБОВУЛОЧНИХ ВИРОБІВ..... | 50 |
| Т.В. Заговська, Н.В. Нестерова, Г.В. Баранова, С.Л. Рибалко, С.Д. Загородня ДЕТЕКЦІЯ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ ДО ВПГ-1 ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИЧНОГО БІОСЕНСОРА | 58 |
| А.С. Семенець, Н.Ю. Водзінська, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ <i>LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS 502</i> ЗА ПРИСУТНОСТІ ЕКЗОГЕННОГО НІЗИНА..... | 67 |
| Л.С. Дорош, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь ВПЛИВ НІТРАТУ НА СУЛЬФІДОГЕННУ АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ <i>DESULFOMICROBIUM SP. CRR3</i> | 76 |
| І.В. Пилипенко, Я.Б. Пауліна, Л.М. Пилипенко, Г.В. Ямборко СКЛАД МІКРОБНИХ КОНТАМІНАНТІВ ОВОЧЕВОЇ СИРОВИНИ | 83 |
| Х ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» | 95 |
| ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ | 97 |

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|
| I.D. Zhunko, N.V. Limanska, B.N. Milkus, V.O. Ivanytsia VIRUSES AND VIRAL DISEASES OF GRAPEVINE (<i>VITIS SP.</i>) | 6 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|

EXPERIMENTAL WORKS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A.I. Chuienko MICROMYCETES – POTENTIAL BIODESTRUCTORS OF RUBBER TECHNICAL MATERIALS WASTES IN THE CLIMATE OF UKRAINE | 21 |
| I.I. Romanovska, A.P. Levitsky, S.S. Dekina, A.M. Ovsepiyan MUCOADHESIVE GEL WITH IMMOBILIZED LYSOZYME AND QUERCETIN | 30 |
| O. Tigunova, S. Shulga USING BY MUTANT STRAINS <i>C. ACETOBUTYLICUM</i> LIGNO- CELLULOSIC MATERIAL AS A SUBSTRATE | 41 |
| I.B. Vysotina, O.S. Voronkova, A.I. Vinnikov MONITORING OF YEASTS CAUSED BAKERY PRODUCTS CONTAMINATION | 50 |
| T.V. Zatovska, N.V. Nesterova, G.V. Baranova, S.L. Rybalko, S.D. Zagorodnia DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO HSV-1 WITH THE OPTICAL BIOSENSOR..... | 58 |
| A.S. Semenets, N.S. Vodsinska, B.M. Galkin, T.O. Filipova BIOFILM FORMATION <i>LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS</i> 502 IN PRESENCE OF EXOGENOUS NISIN..... | 67 |
| L.S. Dorosh, T.B. Peretyatko, S.P. Gudz INFLUENCE OF NITRATE ON SULFIDOGENIC ACTIVITY OF BACTERIA <i>DESULFOMICROBIUM SP. CRR3</i> | 76 |
| I.V. Pylypenko, Y.B. Paulina, L.N. Pylypenko, G.V. Yamborko COMPOSITION OF MICROBAL CONTAMINANTS OF VEGETABLE RAW MATERIAL | 83 |
| X SUMMER SCHOOL “MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” | 95 |
| INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS | 97 |

УДК 578:632.3

І.Д. Жунько¹, Н.В. Ліманська¹, Б.Н. Мілкус², В.О. Іваниця¹

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: zynkin@te.net.ua

²Одеський державний аграрний університет,
вул. Пантелеймонівська, 13, Одеса, Україна

ВІРУСИ ТА ВІРУСНІ ХВОРОБИ ВІНОГРАДУ (*VITIS SP.*)

В огляді розглянуто літературні дані щодо шкочочинних вірусів – збудників захворювань винограду. Наведено таксономічне положення вірусів, їх морфологічні властивості, особливості геному та реплікації. Описано симптоми захворювань, які вони викликають. Розглянуто епідеміологічні питання, заходи боротьби та сучасні методи діагностики.

Ключові слова: вірус коротковузля винограду, вірус мармуровості винограду, вірус скручування листя винограду, комплекс борознистості деревини.

В різних кліматичних зонах, у багатьох країнах світу широко культивується виноград (*Vitis sp.*), але з причин вірусних захворювань щорічні втрати урожаю становлять не менше 10 % [8]. Вірусні захворювання можуть пригнічувати ріст коренів, пагонів, листя, ягід, перешкоджати запиленню, викликати пігментацію різних органів і порушувати різні аспекти метаболізму – дихання, фотосинтез, перенесення асимілятів [46]. Хворі кущі можуть загинути. Досить часто перебіг вірусних хвороб спостерігається у прихованій формі – без наявних симптомів захворювання [17, 26]. Найчастіше виявляються серед виноградних кущів рослини, уражені такими вірусами, як коротковузля (GFLV), скручування листя винограду 1–9 серотипів (GLRaV 1–9), мармуровості винограду (GFkV), вірусами А та В винограду (GVA, GVB), вірусами борознистості деревини Рупестріс (RSPaV) та ямкуватості деревини ЛН 33 [38, 44]. GVA і GVB пов'язані, відповідно, з такими захворюваннями, як ямкуватість деревини Кобера і опробковіння кори [6]. Віруси розповсюджуються з ураженим посадковим матеріалом та нематодами [3]. Зрідка вони переносяться під час цвітіння з пилком та насінням, а також механічним шляхом. Частіше віруси виявляються на щепленій культурі винограду порівняно з кореневласною. Тільки сертифікація посадкового матеріалу дає впевненість у тому, що рослини вільні від шкочочинних вірусних інфекцій [26, 38, 46].

© І.Д. Жунько, Н.В. Ліманська, Б.Н. Мілкус, В.О. Іваниця, 2015



Найбільш шкодочинними вірусними захворюваннями є коротковузля та скручування листя. Вони поширені в усіх виноградарських районах світу, призводять до значних втрат винограду і погіршують його якість [10, 31, 44].

Розглянемо детальніше вищезазначені віруси і захворювання, які вони спричиняють.

Вірус коротковузля винограду (Grapevine fanleaf virus – GFLV) згідно з 9-м повідомленням Міжнародного комітету з таксономії вірусів (Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV) належить до роду *Nepovirus* підродини *Comovirinae* родини *Secoviridae* порядку *Picornavirales* [10, 25]. GFLV представлений трьома групами штамів: коротковузля, жовтої мозаїки та облямування жилок [3].

Як і у всіх представників роду *Nepovirus*, капсид GFLV складається з одного білка з молекулярною масою (Mr) 55–60 кДа, що має гідрофобні властивості [40]. Кожна вірусна частинка містить 60 субодиниць даного білка. Вірус ізометричний без зовнішньої оболонки, з ікосаедричним типом симетрії (T=1), у діаметрі 28–30 нм, містить дві молекули лінійної одноланцюгової (+) РНК (о_л РНК), які несуть вірусний білок, ковалентно зв'язаний з геномом (viral genome-linked protein – VPg) на 5'-кінці [35, 40]. Очищені препарати віруса розділяються в градієнті щільності цукрози на три фракції: Т – top, що містить порожні частинки, М – middle, який містить покривний білок (CP) і РНК2 (70 % та 30 %, відповідно) і В – bottom, що містить CP і РНК1 (58 % та 42 %), котрий, у свою чергу, складається з двох компонентів [1, 10, 31]. РНК1 має довжину 7342 основи (о.), одну відкриту рамку зчитування (ВРЗ) розміром 6852 о., розташовану між 243 і 7101 нуклеотидами, котра кодує поліпротеїн Р1 з Mr 253 кДа, що складається з 2284 амінокислот, з якого протеолітичним розщепленням формується нуклеозидтрифосфат (НТФ)-зв'язувальний білок 1А, геліказа 1В, VPg 1С, протеїназа 1D і полімераза 1Е, які відповідають за реплікацію як РНК1, так і РНК 2 [10, 36, 40]. РНК2 має довжину 3900 о., одну ВРЗ розміром 3555 о. і кодує поліпротеїн Р2 з Mr 122 кДа, із котрого внаслідок протеолізу (протеїназа 1D) утворюються структурні і неструктурні білки: 2А білок, який відповідає за реплікацію РНК2, покривний 2С білок, зв'язаний з передачею віруса ґрунтовими нематодами, і транспортний 2В білок (MP), котрий акумулюється у великих концентраціях у цитозолі інфікованих клітин і зв'язується з клітинними стінками [10, 35, 36]. Іноді ідентифікується лінійна сателітна РНК3 (с_{ат} РНК) довжиною 1114 о. з одною ВРЗ розміром 341 о., яка кодує гідрофільний поліпептид з Mr 37 кДа. В геномних РНК та в с_{ат} РНК є полі(А) хвіст на 3'-кінці і VPg 4–6 кДа на 5'-кінці [15, 36, 40]. РНК3 потребує РНК1 і РНК2 для реплікації та інкапсації, її присутність впливає на прояв симптомів і зменшення продукування вірусу [15, 35, 40]. Наявність двох (+) о_л РНК є необхідною для системної інфекції, спільна геномна РНК є інфекційною, розділені РНК самостійно неінфекційні. Інфекційність асоціюється в основному з нижнім (В) компонентом.

Реплікація вірусу відбувається в цитоплазматичних включеннях, мембранні везикули котрих є місцем процесингу вірусних поліпротеїнів і реплікації РНК.



Так через 48 год після проникнення вірусної РНК в клітину агрегати вірусних компонентів, що кодується РНК1, акумулюються навколо ядра. Транспортний білок 2В (MP) з'єднується з плазмодесмами і формує тубули, через котрі вірусні частинки проникають до незаражених клітин, або вбудовуються у виступи клітинних стінок [1, 10, 35]. Віріони збираються і акумулюються в цитоплазмі клітин мезофіла, часто у вигляді кристалів. Виявляються також в тубулах, що проникають з клітини в клітину, і можуть бути місцем їх міжклітинного транспорту [7]. Агрегати вірусних часточок входять до складу великих везикулярно-вакуолярних включень, що складаються з рибосом, ендоплазматичного ретикулома та мембранних міхурців – везикул, які містять дрібні фібрили. Ряди порожніх часточок іноді зустрічаються в нуклеоплазмі [36].

Природні переносники вірусу – нематоди *Xiphinema index* [12] і *X. italiae* [10, 35]. Вірус також передається механічною інокуляцією трав'янистих тестрослин та з посадковим матеріалом [17]. Передача вірусу насінням винограду не встановлена, хоча вірус виявлений у оболонці ендосперму насіння і пилку [1]. Коротковузля завдає виноградарству великих економічних збитків, зниження урожайності в тяжких випадках досягає і перевищує 50 % і пов'язане з високою вірулентністю штамів вірусу. Уражений виноград вироджується [10, 30, 35]. Хвороба знижує укорінення чубуків і приживлення саджанців.

Симптоми захворювання дуже варіюють і залежать від сприйнятливості сорту та вірулентності патогена. На самому початку зараження на листях з'являються світло-зелені звивисті лінії, кільця і плями. Згодом хлоротичні листя починають всихати по краях, проявляються системні симптоми у вигляді асиметрії, редукції листя, аномального жилкування, широко відкритих черешкових виїмок, глибоких або відсутніх бокових вирізок, загострених і видовжених зубчиків (рис. 1) [8]. На пагонах спостерігаються подвійні вузли, короткі проміжки між ними, ненормальна галузистість, фасціація, зигзагоподібний ріст. Грона нечисленні, дрібні, спостерігається горошіння, а потім і осипання ягід. У хворих рослин корені менше розвинуті, ніж у здорових. Кущі поступово вироджуються і гинуть [1, 10, 31].

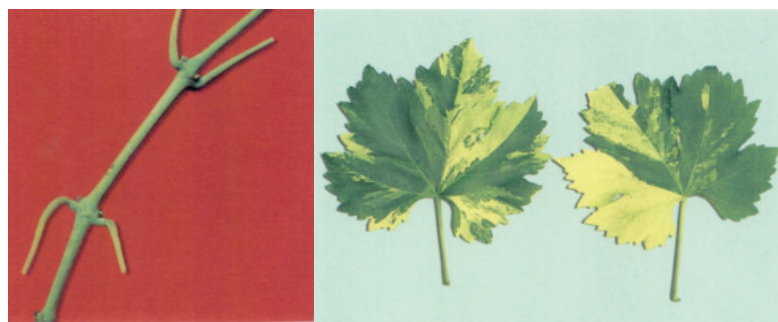


Рис. 1. Симптоми коротковузля винограду:
а – подвійні вузли, б – хлороз.

Fig. 1. Symptoms of the grapevine fanleaf disease:
a – double nodes, b – chlorosis.

Вірус мармуровості винограду (Grapevine fleck virus – GFkV). Генмна організація GFkV, біологія, епідеміологія, цитологія і молекулярні властивості свідчать про те, що він відноситься до роду *Maculavirus* родини *Tymoviridae* порядку *Tymovirales* [25, 32, 39].

GFkV – латентний флоемо-обмежений вірус, який не передається механічно, ізометричний, має розмір 28–30 нм [31, 39, 41]. Віріони округлої форми мають поверхневу структуру, що утворюється білком 28 кДа, згрупованим у пента- і гексамери. Генном вірусу являє собою (+) _{ОН} РНК, що має довжину, не враховуючи полі(А) хвіст з 3' кінця, 7564 о. з чотирма рамками зчитування, транскрипція котрих відбувається в 5' → 3' напрямі [32, 39]. Вірус седиментує двома компонентами: верхнім (Т – top), що містить порожні часточки і нижнім (В – bottom), що містить 35% РНК [32] з константами седиментації 52S і 120S [39]. VP31 (з 291 по 6140 о.) кодує поліпептид з Mr 215,4 кДа, який зв'язаний з реплікацією вірусної РНК і несе консервативні мотиви метилтрансферази, гелікази і РНК-залежної РНК-полімерази. VP32 (з 6366 по 7058 о.) кодує покривний білок з Mr 24,3 кДа, VP33 і VP34 розташовуються на 3'-кінці вірусної РНК і кодують пролінові білки з Mr 31,4 кДа та 15,9 кДа, відповідно, функція котрих поки що не з'ясована. Також у геномі вірусу є ділянки, які не транскрибуються, розміром 291 о. та 35 о. на 5' і 3' кінцях, відповідно. Характерною рисою РНК вірусу мармуровості винограду є високий вміст цитозину, близько 49,4% від загальної кількості основ, тоді як урацилу міститься 19,6%, гуаніну – 16,6%, аденіну – 14,4% [32, 39].

Інфіковані клітини винограду містять цитопатичні структури, які називають мультивезикулярними тільцями, що походять від мітохондрій у процесі периферійного утворення везикул. Можливо, що саме у них і відбувається реплікація вірусу [32, 39].

Це захворювання поширене в усіх виноградарських районах світу [39, 41]. Вірус розповсюджується з посадковим матеріалом винограду. Природний переносник мармуровості або відсутній, або не установлений. Збудник з насінням винограду не передається. На трав'янисті індикатори соком не переноситься [1, 31]. Вірус уражує європейські сорти, гібриди – прямі плідники і більшість підщепних сортів. Хвороба відома тільки на винограді, найчастіше протікає у латентній формі [5, 39].

Симптоми хвороби особливо чітко виявляються на підщепі Рупестріс дю Ло, яку використовують в усіх вірусологічних лабораторіях світу як індикатор мармуровості. Основною ознакою захворювання є просвітлення жилок третього порядку і прилеглих до них тканин. Залежно від вірулентності патогена кількість просвітлених жилок варіює [8]. Розвиток рослини-індикатора пригнічується у разі сильного розвитку симптомів. Ознаки хлорозу проявляються сильніше, листя стає дрібним, звивистим з піднятими догори краями. Спостерігається рясне утворення пасинків. Симптоми розвиваються в основному на листках верхнього яруса, на нижніх листках вони замасковані. Мозаїчність листя краще виявляти у прохолодну погоду, а з настанням постійно високої температури інтенсивність симптомів слабшає [1, 31].



На ультратонких зрізах тканин хворих рослин в клітинах-супутницях сито-подібних трубок виявлені сферичні частинки, які мають розмір близько 28 нм, упорядковано упаковані в агрегати, а також поодинокі розкидані в матриці клітини. Агрегати частинок оточені двошаровою оболонкою, вони можуть мати різний розмір і форму [1].

Вірус скручування листя винограду. Grapevine leafroll-associated virus (GLRaV). За останніми даними ICTV диференціюють дев'ять різних серотипів вірусу скручування листя винограду – GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7, GLRaV-8, GLRaV-9 [8, 25].

Їхня класифікація ґрунтується на відмінностях у розмірі вірусних часточок, молекулярної маси капсидного білка та епідеміології [13, 20]. Переважно усі види GLRaV, що переносяться псевдококцидами, були виокремлені у рід *Ampelovirus* [11, 20, 25, 33] інші відносяться до роду *Closterovirus* родини *Closteroviridae* [4]. Однак, останнім часом планують виділити до окремого запропонованого роду *Velarivirus* вірус GLRaV-7 [9, 24]. Також GLRaV-8 не може розглядатися як вид у родині *Closteroviridae*, що пов'язано з особливостями його генома [33].

Дуже гнучкі нитки вірусу довжиною 1200–2200 нм і діаметром 12 нм мають спіральну симетрію з кроком 3,4–3,8 нм [31]. На оберт спіралі припадає близько 10 білкових субодиниць [11]. Віріони містять одну молекулу геномної лінійної (+)_{out} РНК, котра складає 5–6% маси віріона. Геноми різних вірусів відрізняються за довжиною від 15000 о. до 19300 о. у представників роду *Closterovirus*, від 16900 о. до 19500 о. у представників роду *Ampelovirus* і 16496 о. у ізолятів представника роду *Velarivirus* [9, 24]. РНК має кеп на 5'-кінці, на 3'-кінці полі(А) відсутній [33]. Віріони седиментують однією або двома зонами в градієнтах щільності цукрози. Є один основний капсидний білок (СР) з молекулярною масою 23–28 кДа (решта серотипів вірусів, представників роду *Ampelovirus* мають капсидний білок – 35–43 кДа), а також мінорний дивергентний капсидний білок (СРd), цистрон котрого у кластеровірусів розміщується в геномі вище цистрона основного капсидного білка, тоді як у ампеловірусів – нижче [11, 13, 28, 33]. З генома транслюється також 8–10 неструктурних білків, з яких найбільший – 300–350 кДа містить послідовності цистинової протеази, метилтрансферази, аспартилової протеази і гелікази [28]. Інші білки, можливо, мають функції РНК-залежної РНК-полімерази та транспортну. Мінорний білок – дублікат білка оболонки, імовірно, не входить до структури віріона. Також є білки теплового шоку 70 та 90 [29].

Геном містить 8–13 ВРЗ, які частково перекриваються, вони експресуються у складному процесі протеолітичного процесингу, зсуву рамки зчитування та синтезу субгеномних матричних РНК (РНК_м) та кодуєть відповідну кількість функціональних білків. Так, у GLRaV-3 геном розміром 17919 о. має 13 відкритих рамок зчитування, транскрипція яких відбувається у 5' → 3' напрямі [11, 14, 28]. ВРЗ1а кодує поліпептид Мг 254 кДа, з котрого у процесі злиття з продуктом, який кодує ВРЗ1b, утворюється великий поліпептид з Мг 306 кДа. ВРЗ1а відповідає за утворення протеази, метилтрансферази та гелікази (77 кДа),



BP31b – РНК-залежної РНК-полімерази (61 кДа). BP32 кодує маленький гідрофобний білок з Мг 6 кДа, BP33 – маленький трансмембранний білок з Мг 6 кДа, BP34 – білок теплового шоку 70 (HSP70) з Мг 59 кДа, BP35 – білок з Мг 55 кДа, BP36 відповідає за синтез покривного білка (CP) з Мг 35 кДа [28], а BP37 – за синтез дивергентного покривного білка (CPd) з Мг 53 кДа. BP38 кодує білок з Мг 21 кДа, BP39 – білок з Мг 20 кДа, BP310 – білок з Мг 20 кДа, BP311 білок з Мг 4 кДа, BP312 – білок з Мг 7 кДа. Також в геномі GLRaV-3 є регіон, який не транслюється, розміром 277 о. Філогенетичний аналіз протеїназного, геліказного, РНК-залежного РНК-полімеразного, метилтрансферазного та інших доменів вказує на чітко виражені відмінності між кластеровірусами, які переносяться псевдококцидами, та іншими представниками родини *Closteroviridae*, що також свідчить про доцільність створення родів *Ampelovirus* та *Velarivirus* [9, 24, 28, 29]. На відміну від генома GLRaV-3, геном GLRaV-1 розміром 19500 о. містить 10 відкритих рамок зчитування, геном GLRaV-7 також містить 10 BP3. [9, 24, 25, 33]. BP33 кодує білок теплового шоку 70 (HSP70), BP34 – білок теплового шоку 90 (HSP90), BP35 відповідає за синтез покривного білка, BP36 та BP37 кодують дві дивергентні копії покривного білка CPd1 та CPd2 з Мг 56 та 50 кДа, відповідно, а BP38 та BP39 – два білка з Мг 22 та 24 кДа та невідомими функціями. Але, не зважаючи на невеликі відмінності в будові, GLRaV-3 та GLRaV-1 мають близьку філогенетичну спорідненість [14, 20, 29].

Реплікація вірусів відбувається в цитоплазмі і пов'язана з мембранними везикулами цитоплазми і мітохондрій. HSP70 і CPd локалізуються на периферії клітини і беруть участь у міжклітинному транспорті, маленький гідрофобний білок індукує утворення везикул ендоплазматичним ретикулюмом, котрі зв'язані з мультивезикулярними тільцями [28]. Білок, який кодується BP39, має здатність проникати до ядра, взаємодіяти з факторами клітини-хазяїна, що призводить до порушення регуляції клітинного циклу та механізмів захисту хазяїна. Інфіковані клітини винограду містять довгі, гнучкі нитки 12 нм в діаметрі та цитопатичні структури, похідні мітохондрій в процесі периферійного утворення везикул. У рослин, які інфіковані вірусом скручування листя винограду 1 серотипу, везикули розміром 50–100 нм розташовані між внутрішньою і зовнішньою мембраною мітохондрій і формують характерну “корону” навколо органели, що є диференціальною ознакою для даного серотипу віруса. Крісти також долучаються до процесу периферійного утворення везикул, тоді як строма мітохондрій деградує. Вірусні частинки збираються у пучки, котрі є в цитоплазмі клітин паренхіми флоєми [13, 20].

Захворювання поширене в усіх виноградарських країнах світу і вважається одним із найбільш шкодочинних вірусних захворювань винограду [30]. З відомих дев'яти серотипів віруса у світі дуже поширені 1 і 3 серотипи. Скручування листя передається щепленням і поширюється з посадковим матеріалом [4]. Переносниками GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-9 є борошністі червці, переважно псевдококциди – *Planococcus ficus*, *Pl. citri*, *Pseudococcus affinis*, *Ps. calceolariae*, *Ps. longispinus* [20, 25, 31, 43], *Helicococcus bohemicus* [87], *Phenacoccus aceris* [27, 29] та інші лускуваті комахи, такі як



кокциди *Parthenolecanium corni* [29], *Pulvinaria vitis* [43]. Природні переносники GLRaV-2, GLRaV-7, GLRaV-8 не встановлені [9, 25]. Вірус уражує європейські сорти винограду, підщепи і гібриди – прямі плідники [1, 31].

Симптоми хвороби варіюють залежно від сорту винограду, кліматичних умов, серотипів вірусу і, імовірно, вірулентності штамів збудника. Наприклад, симптоматика скручування на рослинах винограду, інфікованих вірусом GLRaV-3, більш виражена і тяжка, ніж у рослин, уражених GLRaV-4. А у кущів, інфікованих вірусом GLRaV-7, перебіг захворювання взагалі спостерігається у латентній формі [37]. Зазвичай, ознаки захворювання стають наявними в середині літа і підсилюються наприкінці вегетаційного періоду. Особливо яскраво симптоми проявляються на червоних сортах винограду, які реагують на інфекцію почервонінням листових пластинок і скручуванням їх країв до низу (рис. 2а) [37]. Почервоніння починається на листі біля основи пагонів і поступово охоплює нове листя у напрямі до верхівки. Спочатку між жилками третього порядку з'являються червонуваті розмиті плями, які постійно розростаються, охоплюючи весь листок, за виключенням вузьких смуг вздовж головних жилок, що зберігають зелене забарвлення [8]. Це відрізняє дану хворобу від інших типів почервоніння (нестача калію, асфіксія коренів, механічні пошкодження кущів, хвороби опробковіння кори, червонолистість тощо). Ягоди на час збору урожаю не набувають нормального забарвлення, вони кисліші і містять менше цукру, ніж здорові [1, 31, 37].



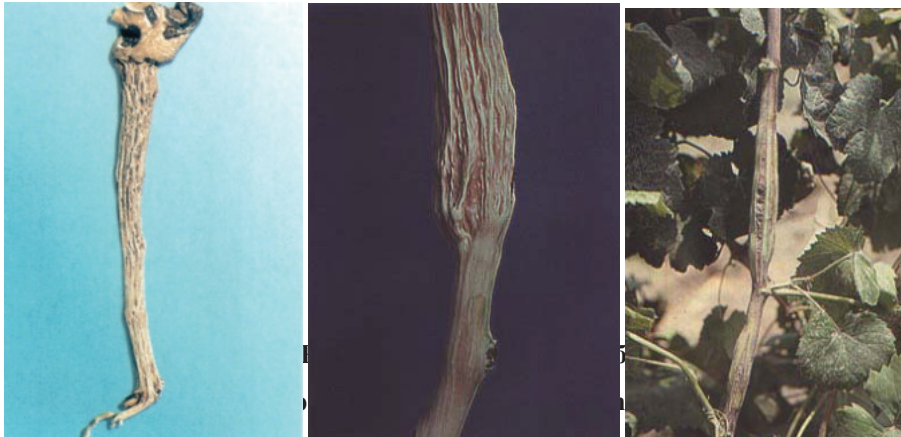
Рис. 2. Скручування листя винограду:
а – симптоми на червоному сорті, б – симптоми на білому сорті

Fig. 2. Grapevine leafroll disease:
a – symptoms in red-fruited cultivar, b – symptoms in white-fruited cultivar

На білих сортах листя жовтіє (рис. 2б). На заражених підщепках скручування листя не виявляє ніяких симптомів, і це сприяє поширенню інфекції. Хвороба послаблює силу росту кущів, погіршує утворення коренів і є одним із факторів порідшання виноградників. Є свідчення про зниження урожайності хворих кущів від 20 % до 50 % [1, 37] і більше, з одночасним зменшенням вмісту цукру та збільшенням кислотності у виноматеріалі, що пов'язано з порушенням фотосинтезу [10, 30]. Вино, виготовлене із ягід хворих кущів, містить менше

спирту, танінів та менше забарвлене, ніж із ягід здорових кущів, такі вина завжди отримують нижчі дегустаційні оцінки [1]

Комплекс борознистості деревини. Rugose wood complex (RWC) складається з чотирьох окремих захворювань, котрі дуже поширені у всьому світі, для них є характерним утворення ямок та борозен на здерев'янілому штабмі (рис. 3) [18, 34, 42].



До складу RWC входять представники двох самостійних родів *Foveavirus* (RSPaV) та *Vitivirus* (GVA, GVB) родини *Betaflexiviridae* порядку *Tymovirales* [25, 31, 34]: *Rupestris stem pitting associated virus* (RSPaV) – вірус борознистості деревини Рупестріс (індикатор *V. rupestris* дю Ло); *Grapevine virus B* (GVB) – *Corky bark* – вірус В винограду – опробковіння кори (індикатор LN 33) [19]; *Grapevine virus A* (GVA) – *Kober stem grooving* – вірус А винограду – наявність виямок у деревині Кобера (індикатор Кобер 5ББ). LN 33 stem grooving – наявність ямок у деревині ЛН (індикатор LN 33) [8].

Вірусні частинки GVA, GVB являють собою гнучкі нитки, які мають розмір 800 x 12 нм, зі спіральним розташуванням 10 субодиниць білка на оберт спіралі кроком 3,3 нм [19, 31, 33]. Ниткоподібні гнучкі часточки вірусу RSPaV із спіральною симетрією мають довжину 800 нм та 13 нм в діаметрі [33, 34]. Локалізуються в цитоплазмі. Вітівіруси мають одну молекулу лінійної (+) РНК довжиною – 7349 о. котра 3'-поліаденільована та має кеп на 5'-кінці [16, 33]. Вірусна РНК складає близько 5 % від усієї маси вірусної частинки. Одна молекула лінійної поліаденільованої (+) РНК RSPaV має довжину 8725 о. [34].

У вітівірусів є один структурний білок 22–26 кДа. Неструктурні білки являють собою довгий поліпептид 194–195 кДа з консервативними мотивами метилтрансферази, гелікази та РНК-залежної РНК-полімерази у послідовності від N- до С-кінця, білок 19–20 кДа та два білки – 11–13 кДа з нез'ясованими функціями [19, 33]. У вірусу борознистості деревини Рупестріс виявлено один структурний білок оболонки 28 кДа [5].

Геном вітівірусів включає п'ять ВРЗ, що перекриваються, з котрих ВРЗ1, розташована між 87 та 5210 нуклеотидами, кодує поліфункціональний білок

194–195 кДа з реплікативними властивостями, VP32 (з 5179 по 5712 о.) – білок 19–20 кДа з нез'ясованою функцією та VP33 (з 5654 по 6490 о.) – транспортний білок 31–36 кДа [22], VP34 (з 6414 по 7010 о.) – структурний білок 22–26 кДа та VP35 – білок (з 7015 по 7281 о.) 10 кДа, який, можливо, має вплив на безсимптомне протікання вірусної інфекції [19, 33]. Усі продукти VP32 – 5 транслюються за допомогою субгеномних мРНК. Реплікація віруса відбувається в цитоплазмі за участю продуктів VP31, транспортний білок накопичується в цитозолі та в клітинних стінках, які контактують з плазмодесмами, що призводить до передачі вірусних часточок в сусідні клітини [16, 22]. Будова клітин паренхіми при цьому зберігається, органели мають нормальний вигляд, а нечисленні вірусні часточки формують розрізнені агрегати невеликого розміру. Однак, клітини судинної тканини зазнають деструкції, клітинні стінки розтягуються, ендоплазматична мембрана активно проліферує, утворюючи везикулярні вирости тонопласта з фібрилярним матеріалом, і у формі пучків, завитків, скупчених шарів вірусні часточки випинаються у вакуолу або заповнюють усю порожнину клітини [1].

Геномна РНК віруса RSPaV має п'ять VP3, VP31 (з 61 по 6546 о.) кодує поліпептид 244 кДа з метилтрансферазним, протеїназним, геліказним та РНК-залежним РНК-полімеразним доменами (реплікативно активні білки), VP32 (з 6577 по 7242 о.), VP33 (з 7244 по 7597 о.) та VP34 (з 7518 по 7760 о.) кодують продукти трійчастого блоку генів, що беруть участь у русі віруса з клітини до клітини (24 кДа, 13 кДа, 8 кДа), та VP35 (з 7770 по 8549 о.) відповідає за синтез структурного (покривного) білка 28 кДа. VP31 траслюється безпосередньо з геномною РНК, решта VP3 – шляхом синтезу та наступної трансляції субгеномних мРНК [33, 34]. За даними деяких авторів у геномній РНК присутня також VP36 (з 8227 по 8586 о.). Вона локалізується біля 3'-кінця та можливо кодує поліпептид 14 кДа, функція котрого до нинішнього часу не відома [34].

Борознистість деревини Рупестріс є найпоширенішим у світі захворюванням серед захворювань комплексу RWC [34]. Захворювання можна чітко визначити на зараженому винограді, однак, часто його перебіг спостерігається у латентній формі, не викликає характерних симптомів і не впливає на ріст та урожайність кущів [18, 42]. На більшості європейських сортів хвороба не викликає ніяких симптомів, окрім пригнічення росту [1].

Вітівіруси передаються щепленням, посадковим матеріалом, борошнистими червцями: псевдококцидами *Pseudococcus affinis*, *Ps. longispinus*, *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Phenacoccus aceris* [27, 42], *Heliococcus bohemicus* [45], кокцидами *Neopulvinaria innumerabilis*, личинкою *Parthenolecanium corni* [23] і механічно. Насінням винограду хвороба не передається. Вірус борознистості деревини Рупестріс передається щепленням і посадковим матеріалом, переносники невідомі [42]. У природі інфікується тільки виноград, європейські сорти, підщепи, гібриди – прямі плідники.

Загальний стан уражених кущів залежить від ступеня розвитку хвороби. Слабко уражені кущі, без чітко виражених зовнішніх симптомів, порівняно добре розвинуті і плодоносять нормально. З розвитком хвороби відзначається



затримка росту кущів і слабкий хлороз листя, спостерігається підвищення кислотності, зменшення урожайності, нечисленні грона [18]. Дуже уражені кущі значно пригнічені, з витонченими, здебільшого безплідними пагонами і хлоротичним листям. Специфічним симптомом захворювання є утворення на штамбі, іноді рукавах і коренях ямок та видовжених борозен, що ідуть паралельно до їх вісі. Довжина борозен може досягати 50 мм, ширина має 1–4 мм і глибина 0,5–5 мм. При сильному розвитку хвороби декілька борозен можуть зливатися в одну, утворюючи довгі, широкі і глибокі канавки, котрі у більшості випадків сприяють розтріскуванню штамбу та рукавів. Часто на місці спайки щеплення прищепи утворює потовщення, а підщепи залишається набагато тоншою за прищепу. Кора під ділянками з симптомами борознистості потовщена, дірчаста (рис. 3). На кореневласних кущах розвиток симптомів починається від п'ятки і поширюється як догори по штамбу, так і донизу по коренях. Симптоми захворювання на прищеплених кущах починаються з місця з'єднання прищепи з підщепою, потім поширюються на компоненти щеплення і можуть охопити рукава і корені. У більшості випадків симптоми захворювання спостерігаються або на прищепі, або на підщепі, але в окремих випадках на обох одночасно [1, 42].

Гістологічними дослідженнями встановлено, що лінія камбію має хвилясті обриси, тому у циліндра зазубрений контур. На рівні борозен елементи твердого луба і судини деревини не формуються; у місцях пошкодження луб'яно-деревний камбій погано діє і утворює луб'яну або деревну паренхіму, майже без судин. У корі відбуваються гіпертрофія, порушення її нормальної структури і некроз флоєми. Борознистість деревини – хвороба вторинних тканин, з причини ненормального функціонування камбію спостерігається гіпертрофія, гіпер- і гіпоплазія та паренхіматози у вторинній ксилемі та флоємі [1].

У свою чергу, на тлі опробковіння кори у деяких сортів спостерігається затримка початку росту та загибель окремих пагонів. Деревина уражених пагонів м'яка і каучукоподібна, внаслідок чого пагони поникають. Кора біля основи лози часто розтріскується, пагони визрівають нерівномірно: зелені ділянки не здерев'янілих пагонів часто чергуються з нормально здерев'янілою тканиною (рис. 3). Листя на хворих кущах дрібне, бліде; пізніше у червоних сортів воно червоніє повністю, включаючи жилки, і скручується краями донизу. Восени таке листя опадає на три – чотири тижні пізніше, ніж звичайне. Часто у хворих кущів відзначають пригнічений ріст та зниження урожайності від 5 до 22 % [1, 6].

Заходи боротьби та профілактики вірусних захворювань винограду ґрунтуються на отриманні та розмноженні безвірусного посадкового матеріалу, який використовують для закладання нових насаджень [26, 38, 44]. Потрібно використовувати тільки здоровий посадковий матеріал та знищувати хворі рослини, вести боротьбу з нематодами-переносниками, можна застосовувати біостимулятори для підвищення імунітету рослин [4]. Також, сучасні дані свідчать про те, що можна використовувати хіміотерапевтичні методи позбавлення від вірусів [21].



Рання сучасна **діагностика вірусних захворювань** дозволяє швидко визначити якість посадкового матеріалу винограду [26, 44]. Одними із найнадійніших, найчутливіших і найспецифічніших методів діагностики є серологічні [20, 31, 44] і молекулярно-біологічні [2, 7, 17, 31]. Використання імуноферментного аналізу (ІФА) та полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) уможлиблює за короткий термін проведення скринінгу великої кількості зразків та вивчення поширення збудників вірусних захворювань на виноградниках [2, 20, 44]. Крім того, існують такі методи діагностики: візуальний, індексація щепленням на індикаторні сорти винограду (симптоми захворювання виявляються впродовж року щеплення, іноді на 2–3-й рік, залежно від виду вірусу), механічні перенесення на трав'янисті індикатори [17, 31, 35, 44]. Хоча, на жаль, вони і не завжди дають достовірні результати, згідно з міжнародними правилами при виробництві сертифікованого посадкового матеріалу винограду їх обов'язково використовують. Це пов'язано з тим, що на винограді можуть з'явитися нові невідомі віруси, які неможливо ідентифікувати за допомогою ІФА та ПЛР.

Таким чином, літературні дані свідчать про те, що питання вірусних захворювань винограду є досить актуальним і потребує подальшого вивчення. Не викликає сумнівів, що сучасні методи дослідження вірусних захворювань набувають ключового значення у діагностиці вищезазначених інфекцій.

І. Д. Жуцько¹, Н. В. Ліманская¹, Б. Н. Милкус², В. А. Іваниця¹

¹Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина
e-mail: zynkin@te.net.ua

²Одесский государственный аграрный университет,
ул. Пантелеймоновская, 13, Одесса, Украина

ВИРУСЫ И ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ ВИНОГРАДА (*VITIS SP.*)

Реферат

В обзоре рассмотрены литературные данные о вредоносных вирусах – возбудителях заболеваний винограда, приведены таксономическое положение вирусов, их морфологические свойства, особенности генома, репликации. Описана симптоматика заболеваний, которые они вызывают. Рассмотрены эпидемиологические вопросы, меры борьбы и современные методы диагностики.

Ключевые слова: вирус короткоузлия винограда, вирус мраморности винограда, вирус скручивания листьев винограда, комплекс бороздчатости древесины.



I. D. Zhunko¹, N. V. Limanska¹, B. N. Milkus², V. O. Ivanytsia¹

¹Odesa National I. I. Mechnykov University,

2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: zynkin@te.net.ua

²Odesa State Agrarian University, 13, Panteleimonivska st., Odesa, Ukraine

VIRUSES AND VIRAL DISEASES OF GRAPEVINE (*VITIS SP.*)

Summary

The literature data on devastating viruses – the causative agent of grapevine has been reviewed. The taxonomy of viruses, their morphological properties, features of the genome and replication were elucidated. The symptoms of the viral diseases were described. Epidemiological questions, methods of plant protection and modern diagnostic assays were reviewed.

Key words: grapevine fanleaf virus, grapevine fleck virus, grapevine leafroll associated virus, rugose wood complex.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинёв: Штиинца, 1985. – 312 с.
2. Жунько И. Д. Применение ИФА для выявления вирусов винограда // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ «Магарач». – Ялта: ИВиВ «Магарач», 2003. – С. 16–18.
3. Жунько И. Д. Виявлення вірусу коротковузля винограда за допомогою імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції // Вісник ОНУ. – 2004. – Т. 9, № 5. – С. 171–176.
4. Жунько И. Д. Виявлення вірусів скручування листя винограда // Вісник аграрної науки. – 2004. – № 12. – С. 75–76.
5. Жунько И. Д., Ліманська Н. В., Мілкус Б. Н., Конуп Л. О. Діагностика вірусу мармуровості винограда за допомогою полімеразної ланцюгової реакції // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. – 2005. – Т. 44. – С. 49–50.
6. Жунько И. Д., Ліманська Н. В., Мілкус Б. Н., Конуп Л. О. ЗТ-ПІР ідентифікація представників родів *Vitivirus* та *Foveavirus*, що паразитують на винограді // Вісник ОНУ. – 2005. – Т. 10, № 3. – С. 136–142.
7. Мілкус Б. Н., Конуп Л. О., Жунько И. Д., Ліманська Н. В. Тестування деяких сортів винограда на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя // Мікробіол. журн. – 2005. – Т. 67, № 1. – С. 41–48.
8. Мілкус Б. Н., Ліманська Н. В., Жунько И. Д., Конуп Л. А., Агеева О. В. Вірусні та бактеріальні хвороби винограда. – Одеса: Одеса, 2012. – 157 с.
9. Al Rwahnih. M., Dolja, V.V., Daubert S. Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae // Virus Research. – 2012. – V. 163. – P. 302–309.
10. Andret-Link P., Laporte C., Valat L. et al. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry // J. Plant Pathol. – 2004. – V. 86, № 3. – P. 183–195.



11. *Boulila M.* Selective pressure, putative recombination event and evolutionary relationships among members of the family Closteroviridae. A proposal for a new classification // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2010. – V. 38. – P. 1185–1192.
12. *Demangeat G., Komar V., Van-Ghelder C. et al.* Transmission competency of single-female *Xiphinema index* lines for Grapevine fanleaf virus // *Phytopathology*. – 2010. – V. 100. – P. 384–389.
13. *Faoro F., Tornaghi R., Gugerli P.* Cytopathology of grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1) // *Proc. XIth ICVG Meeting (Montreux, Switzerland, 6–9 September 1993)*. – Montreux, 1993. – P. 19–20.
14. *Fazeli C. F., Rezaian M. A.* Nucleotide sequence and organization of ten open reading frames in the genome of grapevine leafroll-associated virus 1 and identification of three subgenomic RNAs // *J. Gen. Virol.* – 2000. – V. 81. – P. 605–615.
15. *Fuchs M., Pinck M., Serghini M. A. et al.* The nucleotide sequence of satellite RNA in grapevine fanleaf virus, strain F13 // *J. Gen. Virol.* – 1989. – V. 70. – P. 955–962.
16. *Galiakparov N., Tanne E., Sela I., Gafny R.* Functional analysis of the grapevine virus A genome // *Virology*. – 2003. – V. 306, № 1. – P. 42–50.
17. *Gambino G., Angelini E., Gribaudo I.* Field assessment and diagnostic methods for detection of grapevine viruses // *Methodology and results in grapevine research*. – Vienna: Springer, 2011. – P. 211–228.
18. *Gambino G., Cuzzo D., Fasoli M. et al.* Effects of grapevine rupestris stem pitting-associated virus on *Vitis vinifera L.* // *Proc. 17th ICVG Congress (Davis, California, USA, 7-17th October 2012)*. – Davis, 2012. – P. 90–91.
19. *Goszczynski D. E.* Divergent molecular variants of grapevine virus B (GVB) from corky bark (CB)-affected and CB-negative LN33 hybrid grapevines // *Virus Genes*. – 2010. – V. 41. – P. 273–281.
20. *Gugerli P.* 25 years of serological identification of grapevine leafroll-associated viruses: antiserum and monoclonal antibodies to GLRaV-1 to GLRaV-9 // *Proc. 16th ICVG Meeting (Dijon, France, 31st August–4th September 2009)*. – Dijon 2009. – P. 24–28.
21. *Guta I. C., Buciumeanu F. C.* Grapevines chemotherapy for elimination of multiple virus infections // *Romanian Biotechnological Letters*. – 2011. – V. 16. – P. 6535–6539.
22. *Haviv S., Moskovitz Y., Mawassi M.* The OFR3-encoded proteins of vitiviruses GVA and GVB induce tubule-like and punctate structures during virus infection and localize to the plasmodesma // *Virus Research*. – 2012. – V. 163. – P. 291–301.
23. *Hommay G., Komar V., Lemaire O. et al.* Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni* // *Eur. J. Plant Pathol.* – 2008. – V. 121. – P. 185–188.
24. *Jelkmann W., Mikona C., Turturo C. et al.* Molecular characterization and taxonomy of grapevine leafroll-associated virus 7 // *Arch. Virol.* – 2012. – V. 157. – P. 359–362.



25. King A., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – London: Elsevier – Academic Press, 2011. – 1327 p.
26. Konup L., Limanskaja N., Zhunko I., Milkus B. The production of grapevine certified planting material in the Ukraine // Proc. 14th ICVG Meeting (Locorotondo, Italy, 12–17th September 2003). – Locorotondo, 2003. – P. 164.
27. Le Maguet J. L., Beuve M., Herrbach E. et al. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* // Phytopathology. – 2012. – V. 102. – P. 717–723.
28. Ling K. S., Zhu H. Y., Gonsalves D. Complete nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus *Ampelovirus* // J. Gen. Virol. – 2004. – V. 85. – P. 2099–2102.
29. Little A., Rezaian M. A. Gene function analysis and improved detection of Grapevine leafroll associated virus 1 // Proc. 14th ICVG Meeting (Locorotondo, Italy, 12–17th September 2003). – Locorotondo, 2003. – P. 35.
30. Mannini F. Virus elimination in grapevine and crop performance // Proc. 14th ICVG Meeting (Locorotondo, Italy, 12–17th September 2003). – Locorotondo, 2003. – P. 234–239.
31. Martelli G. P. (Ed.). Graft-transmissible diseases of grapevines: Handbook for detection and diagnosis. – Rome: FAO Publication Division, 1993. – 263 p.
32. Martelli G. P., Sabanadzovic S., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Saldarelli P. *Maculavirus*, a new genus of plant viruses // Arch. Virol. – 2002. – V. 147, № 9. – P. 1847–1853.
33. Martelli G. P. Grapevine virology highlights: 2010–2012 // Proc. 17th ICVG Congress (Davis, California, USA, 7-17th October 2012). – Davis, 2012. – P. 13–31.
34. Meng B., Li C., Wang W. et al. Complete genome sequences of two new variants of grapevine rupestris stem pitting-associated virus and comparative analyses // J. Gen. Virol. – 2005. – V. 86, № 5. – P. 1555–1560.
35. Pinck L. The grapevine fanleaf *Nepovirus* challenge: where do we stand? // Proc. XIIIth ICVG Meeting (Adelaide, Australia, 12–17 March 2000). – Adelaide, 2000. – P. 60–62.
36. Ritzenthaler C., Laporte C., Gaire F. et al. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes // J. Virol. – 2002. – V. 76, № 17 – P. 8808–8819.
37. Rowhani A., Golino D. A., Sim S. T. et al. Grapevine leafroll associated viruses effects on yield, vine performance and grape quality // Proc. 17th ICVG Congress (Davis, California, USA, 7-17th October 2012). – Davis, 2012. – P. 52–53.
38. Roy A. S. EPPPO certification scheme for grapevine // Proc. 14th ICVG Meeting (Locorotondo, Italy, 12–17th September 2003). – Locorotondo, 2003. – P. 149.
39. Sabanadzovic S., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Saldarelli P., Martelli G. P. Complete sequence and genome organization of grapevine fleck virus // J. Gen. Virol. – 2001. – № 82. – P. 2009–2015.



40. *Serghini M. A., Fuchs M., Pinck M. et al.* RNA 2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location // *J. Gen. Virol.* – 1990. – V. 71, № 7 – P. 1433–1441.
41. *Shi B. J., Habili N., Symons R. H.* Nucleotide sequence variation in a small region of the grapevine fleck virus replicase provides evidence for two sequence variants of the virus // *Annals of Applied Biol.* – 2003. – V. 142. – P. 349–355.
42. *Stewart S., Nassuth A.* RT-PCR based detection of Rupestris stem pitting associated virus within field grown grapevine throughout the year // *Plant Disease.* – 2001. – V. 85, № 6. – P. 617–620.
43. *Tsay C. W., Rowhani A., Golino D. A. et al.* Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: an analysis of virus-vector specificity // *Phytopathology.* – 2010. – V. 100. – P. 830–834.
44. *Walter B. (Ed.)*. Sanitary selection of the grapevine: Protocols for detection of viruses and virus-like diseases. – Paris: INRA Editions, 1997. – 225 p.
45. *Zorloni A., Prati S., Bianco P.A., Belli G.* Transmission of Grapevine virus A and Grapevine leafroll-associated virus 3 by *Heliococcus bohemicus* // *J. Plant Pathol.* – 2006. – V. 88, № 3. – P. 325–328.
46. *Zhun'ko I. D., Limanska N. V., Milkus B. N.* The spread of grapevine viruses on the South Ukraine // *Вісник КНУ імені Тараса Шевченка*. – 2008. – Т. 51. – С. 56–57.

Стаття надійшла до редакції 01.09.2015 р.



A.I. Chuienko

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine, tel. +38 (044) 526-11-89, e-mail: helmhammer@ukr.net

MICROMYCETES – POTENTIAL BIODESTRUCTORS OF RUBBER TECHNICAL MATERIALS WASTES IN THE CLIMATE OF UKRAINE

***Aim** of the presented paper was the preliminary screening of microscopic fungi promising for development of the biotechnology of destruction of the wastes of rubber technical materials (RTM). **Methods.** The cultures of micromycetes were isolated from RTM repositied on agarized mash (4.5° sensu Balling) on 4 °C. An ability of investigated micromycetes to grow on RTM was estimated on the model caoutchouc-based medium (CBM) imitated rubber substrate. The presence of carboxylesterase and oxidases was educed by the qualitative methods and the enzymatic index was calculated. The compatibility of the selected cultures of micromycetes has been estimated by the method of agarinic blocks. **Results.** It has been shown that 77 micromycetes from 85 studied strains were able to form clear colonies on CBM. Among them only five strains – *Aspergillus fumigatus* F-41484, *Mucor racemosus* F-41411, *M. racemosus* F-41412, *Rhizopus cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3 have high enzymatic indexes by the carboxylesterase activity and five strains – *Alternaria alternata* F-41431, *Aspergillus flavus* F-41432, *A. sydowii* F-41426, *A. ustus* F-41437 and *A. versicolor* F-41469 – have high enzymatic indexes by the oxidase activity. It has been ascertained an ability of using of the strains that have high enzymatic indexes in the eight mixed cultures. **Conclusion.** Ten fungal strains that have been characterized by high enzymatic indexes for carboxylesterase or complex of oxidative enzymes and were able to combined cultivation, were selected for development of technology of biodestruction of RTM wastes.*

Key words: rubber technical materials, micromycetes, biodestruction, enzymes, enzymatic index, mixed culture.

Until today the problem of concentration of RTM wastes is current not only for Ukraine but for the whole world. On an annual basis approximately 150 000 tons of rubber wastes get into a place on Ukrainian dumps, while in the world this number achieve 7–10 million tons [14].

Traditional technology of RTM utilization by the pyrolysis is dangerous for the environment due to its secondary products: oxides of carbon, sulfur, nitrogen, aromatic hydrocarbons etc [11]. The subsequent employment of RTM for producing of technical materials is not appropriate release of their utilization as well because manufactured goods have low funginertness [4].

Biodestruction is an alternative way of the conversion of the RTM wastes. The first step of the development of the technology of biodestruction is searching of the



strains of microorganisms able to degrade RTM. According to literature data and the results of our previous investigations it has been established that microscopic fungi are able to colonize the surface and inner layers of rubber substrates and destruct the main components of RTM – plasticizers and caoutchouc [1, 5, 13, 17]. We associated these processes with the action of enzymes of microscopic fungi, in particular – carboxylesterase that breaks up the ethereous group of plasticizers and complex of oxidative enzymes that are accountable for caoutchouc consuming. For this reason it is completely well to use microscopic fungi – the potential producers of above-mentioned enzymes as biodestructors of rubber wastes. The aim of present work is to detect microscopic fungi promising for developing of the biotechnology of destruction of the wastes of rubber technical materials (RTM).

Materials and methods

The objects of investigation were 80 strains t belonged to 31 species of 16 genera of micromycetes of phyla *Zygomycota* and *Ascomycota* that had been isolated earlier from biodeteriorated rubber technical materials (RTM) – fully-molded and pneumatic rubber tires and their main components (granulated rubber, rubber mix and plasticizers) [3]. As a control we have used five strains-producers of lipases and oxidative enzymes and destructors of different technical materials – *Penicillium sclerotiorum* J.F. H. Beyma F-1, *Rhizopus cohnii* Berl. & De Toni F-2, *R. microsporum* F-3, *P. chrysogenum* Thom F-16719 and *Trichoderma viride* Pers. F-16173. These cultures were gained from the collection of Department of Physiology and Taxonomy of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology of NASU.

Studied strains of microscopic fungi were stored on agarized mash (4.5° sensu Baling) on 4 °C. For the support of enzymatic activity all the cultures were subcultivated once per year on CBM media that was similar by its composition to Czapek-Doks media, but it contained natural caoutchouc in concentration 5 g/l as a source of carbon [15]. This media after our modifications was used on the first stadium of the screening for detection the ability of investigated micromycetes to grow on rubber substrates [6]. Microscopic fungi that formed distinct colonies on CBM in diameter at least 5 mm on the 14-th day of our experiment we considered capable to grow on RTM.

The presence of carboxylesterase and oxidase activities was educed by the qualitative methods on the third day of fungal growth on 29±2 °C [12]. Signification of carboxylesterase guided on agarized medium contained Tween-80 (ester of oleinic acid and sorbitol) as substrate and had forthcoming composition (g/l): Tween-80 – 10,0; peptone – 10,0; NaCl – 5,0; CaCl₂·H₂O – 0,1; agar – 20,0. Conclusion of carboxylesterase presence was given in case of appearance of zone of crystallinic precipitation of calcium oleate (halo) around fungal colonies. The ability to produce oxidases was estimated by the oxidase test. Fungal colonies on Czapek-Doks' medium were treated by 1 ml of 1 % fresh solution of tetramethyl-*p*-phenylendiamine that changed its colour from pink to dark-blue in case of presence of oxidative enzymes. Accounting of the results was carried out in 10 minutes after treatment of the colonies by tetramethyl-*p*-phenylendiamine.



Enzymatic index estimated as ratio of diameter of halo to diameter of fungal colony [8]:

$$EI = \frac{d_h}{d_x}, \text{ where:}$$

EI – enzymatic index; d_h – diameter of halo, mm; d_x – diameter of fungal colony, mm.

The strain that has EI over 1,5 is considered a potential producer of enzymes [7, 8]. The investigated strains were conventionally divided by the values of their enzymatic indexes into four groups: enzymatic index was absent (0), low (1.0–1.24), moderate (1.25–1.49) and high (1.5 and over).

The characterization of compatibility of the selected cultures was estimated by the method of agaric blocks [20]. As a criteria of compatibility we considered absence of suppression of one culture by another. Fungicidal and fungistatic cooperation, hyperparasitism (growth of mycelia of one culture on the surface of another) and contest for nutrient solution were considered as criteria of suppression. All the experiments were carried out in three-time replication. The statistical processing of gained results was carried out by computer program Microsoft Excel 2007.

The hazard of selected fungi for human health was evaluated by the data of literature [18, 19].

Results and their discussion

It has been shown that 77 strains from 85 (74 were distinguished from RTM and 3 control) formed on CBM clearly expressed colonies in diameter from 5 to 30 mm (Fig. 1), that testifies to their potential ability to colonize rubber substrates and cause their biodamage.

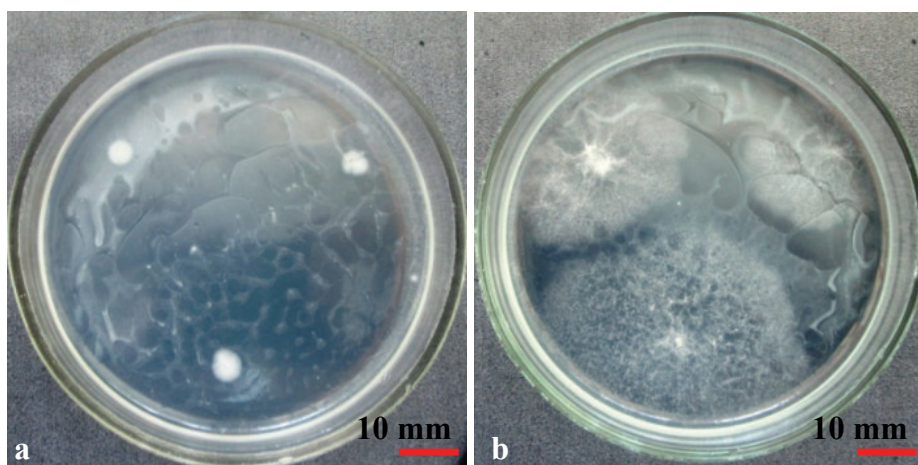


Fig. 1. Growth of microscopic fungi on the CBM (14-th day):
a) *Penicillium sclerotiorum* F-1; b) *Rhizopus cohnii* F-2

It has been established the ability to form extracellular carboxylesterases in 74 % of the investigated cultures and complex of oxidative enzymes – in 91 % of strains (Fig. 2).

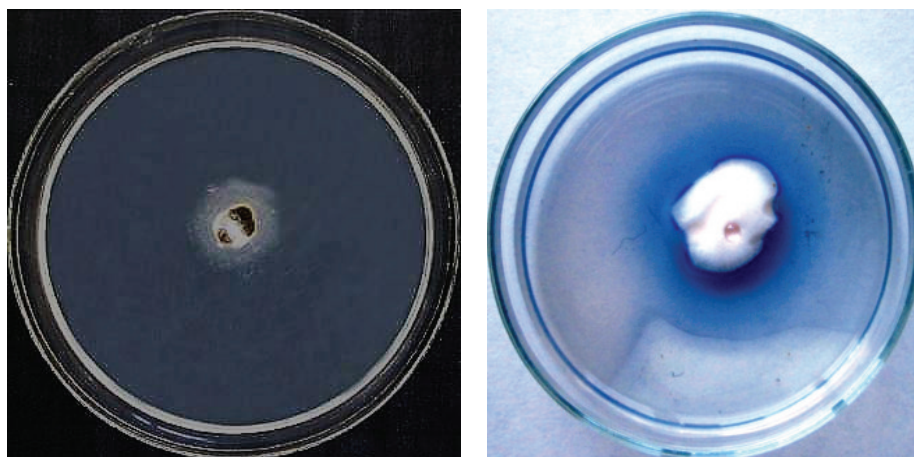


Fig. 2. Revelation of extracellular enzymes of the studied fungi (3-th day):
a) carboxylesterase; b) complex of oxidative enzymes

Studied micromycetes were divided into three groups:

- group 1 (EI $\geq 1,5$ by carboxylesterase);
- group 2 (EI $\geq 1,5$ by complex of oxidative enzymes);
- group 3 (EI $< 1,5$ by carboxylesterase and complex of oxidative enzymes).

Five strains – *Aspergillus fumigatus* Fresen. F-41484, *Mucor racemosus* Bull. F-41411, *M. racemosus* F-41412, *Rhizopus cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3 obtained the enzymatic indexes by carboxylesterase in limits 1.67 ± 0.1 – 2.42 ± 0.03 were belonged to the first group; five strains – *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. F-41431, *A. flavus* Link F-41432, *A. sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church F-41426, *A. ustus* F-41437 (Bainier) Thom & Church and *A. versicolor* (Vuill.) Tirab. F-41469 obtained the enzymatic indexes by complex of oxidative enzymes in limits 1.52 ± 0.07 – 2.7 ± 0.04 were belonged to the second group (Fig. 3). Other 75 investigated micromycetes were belonged to the third group.

It has been established that the strains which have high EI by carboxylesterase had low values of EI by complex of oxidative enzymes and vice versa. We suspect that it may be due to different functions of investigated micromycetes in consortium, which was formed during storage RTM *in vivo*.

We confirmed that the strains of the first group prioritily inhabited rubber substrate and caused destruction of its most affordable components – plasticizers, which decomposition products (organic acids and alcohols) could be a source of power for micromycetes of the second group, which in turn oxidized inaccessible component of RTM – caoutchouc to form oligoaldehydes and oligo ketones [2, 16, 17]. We assume that the formation of a number of low molecular weight, readily

available compounds on the surface of affected RTM during their destruction by micromycetes of the first and second groups promotes colonization of RTM by large third group of micromycetes, representatives of which are characterized by low values of EI by carboxylesterase and complex of oxidases activity and the lack of growth on the CBM.

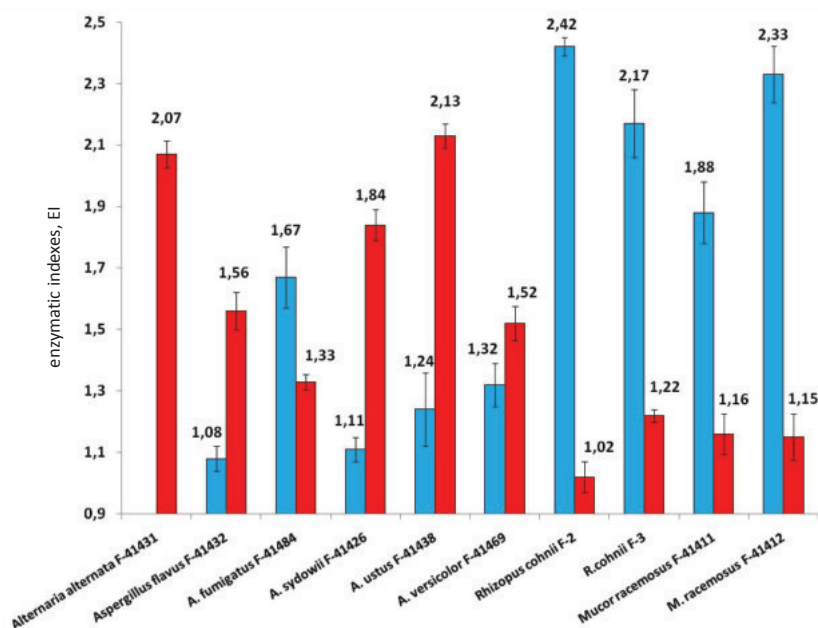


Fig. 3. Micromycetes that have enzymatic indexes over 1.5

In our opinion, for biodegradation technology of RTM it is optimal to use not only single cultures of micromycetes but their complexes. The cultures of microscopic fungi considered compatible in case of absence of signs of reciprocal inhibition (Fig. 4).

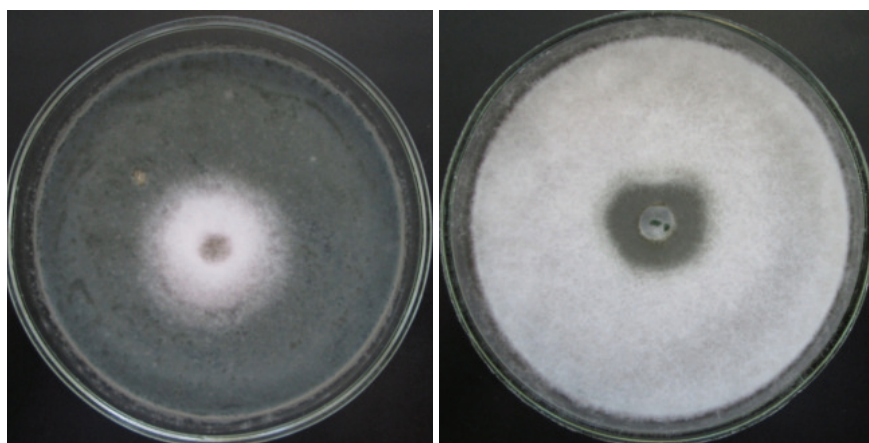


Fig. 4. Interaction of studied microscopic fungi:
a) Cultures are compatible; b) Cultures show reciprocal inhibition

We consider that this approach will not only ensure the simultaneous formation of both classes of enzymes, but also increase the level of their activity.

Micromycetes that were Compatible:

1). *A. alternata* F-41431, *A. sydowii* F-41426, *A. ustus* F-41437 and *A. versicolor* F-41469;

2). *M. racemosus* F-41411, *M. racemosus* F-41412, *R. cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3;

3). *A. alternata* F-41431, *R. cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3;

4). *A. alternata* F-41431, *A. flavus* F-41432;

5). *A. flavus* F-41432, *A. fumigatus* F-41484;

6). *A. flavus* F-41432, *Rhizopus cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3;

7). *A. fumigatus* F-41484, *A. ustus* F-41437;

8). *A. fumigatus* F-41484, *R. cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3;

The most selected strains, and particularly *A. flavus* F-41432 and *A. fumigatus* F-41484, are referred to opportunistic micromycetes because according to the literature, they can cause a variety of human diseases and produce mycotoxins (Table).

Table

**Characteristics of selected micromycetes
by negative impact on human health [18, 19]**

| № | Fungal specie | Group of patogenicity | Diseases | Mycotoxins |
|----|----------------------|-----------------------|------------------------------------------------|-------------------|
| 1. | <i>A. alternata</i> | IV | Sinusitis, keratomycosis, onychomycosis | Alternariols |
| 2. | <i>A. flavus</i> | III | Pulmonitis, infarcts and necrosis | Aflatoxins |
| 3. | <i>A. fumigatus</i> | III | Infections of viscera | |
| 4. | <i>A. sydowii</i> | IV | Keratomycosis, onychomycosis sinusitis, otitis | |
| 5. | <i>A. ustus</i> | IV | Middle otitis, infections at stings | Sterigmatocystine |
| 6. | <i>A. versicolor</i> | IV | Onychomycosis | |
| 7. | <i>M. racemosus</i> | IV | Zygomycosis | No data |
| 8. | <i>R. cohnii</i> | IV | | |

Thus, from the 85 investigated strains, 10 cultures that grew on CBM (*Alternaria alternata* F-41431, *Aspergillus flavus* F-41432, *A. fumigatus* F-41484, *A. sydowii* F-41426, *A. ustus* F-41437, *A. versicolor* F-41469, *Mucor racemosus* F-41411, *M. racemosus* F-41412, *Rhizopus cohnii* F-2 and *R. cohnii* F-3) were considered as the potential biodestructors of RTM. They are characterized by high enzymatic indexes by carboxylesterases and complex of oxidative enzymes and able to co-cultivation. The final conclusion on the suitability of use of the above-mentioned



strains for creation of biodegradation technology of RTM can be given only after the additory studies of their nonpathogenicity and nontoxicity.

Author express sincerely thanks to Nakonechna L.T., the senior engineer of Department of Physiology and Taxonomy of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology of NASU, for kindly given control strains of microscopic fungi.

А.І. Чуєнко

Інститут мікробіології і вірусології НАН України імені Д. К. Заболотного,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна, тел.: +38 (044) 526 11 89,
e-mail: helmhammer@ukr.net

МІКРОМІЦЕТИ – ПОТЕНЦІЙНІ БІОДЕСТРУКТОРИ ВІДХОДІВ ГУМОТЕХНІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ В УМОВАХ УКРАЇНИ

Реферат

Метою роботи був попередній скринінг мікроскопічних грибів, перспективних для створення біотехнології деструкції відходів гумотехнічних матеріалів (ГТМ).

***Методи.** Культури мікроміцетів, виділені з ГТМ, зберігали на агаризованому суслі (4,5° за Балінгом) при 4 °С. Здатність досліджених мікроміцетів до росту на ГТМ оцінювали на 14-у добу на модельному каучуквмісному середовищі (КВС), що імітувало гумовий субстрат. Наявність карбоксилестеразної та оксидазної активності виявляли якісними методами, розраховували ензиматичний індекс. Сумісність відібраних культур мікроміцетів оцінювали за методом агарових блоків. **Результати.** Показано, що з 85 досліджених штамів мікроскопічних грибів 77 здатні утворювати чітко виражені колонії на середовищі КВС діаметром від 5 до 30 мм. З них лише 5 штамів – *Aspergillus fumigatus* F-41484, *Mucor racemosus* F-41411, *M. racemosus* F-41412, *Rhizopus cohnii* F-2 та *R. cohnii* F-3 мали високі ензиматичні індекси за карбоксилестеразною активністю та 5 штамів – *Alternaria alternata* F-41431, *Aspergillus flavus* F-41432, *A. sydowii* F-41426, *A. ustus* F-41437 і *A. versicolor* F-41469 – за оксидазною. Встановлено можливість використання штамів з високими ензиматичними індексами у восьми змішаних культурах. **Висновок.** Для створення технології біодеструкції відходів ГТМ відібрано 10 штамів мікроміцетів, що характеризуються високими ензиматичними індексами за карбоксилестеразною або оксидазною активністю та здатні до сумісного культивування.*

Ключові слова: гумотехнічні матеріали, мікроміцети, біодеструкція, ферменти, ензиматичний індекс, змішана культура.



А.І. Чуенко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины имени Д. К. Заболотного,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина, тел.: +38 (044) 526 11 89,
e-mail: helmhammer@ukr.net

МИКРОМИЦЕТЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БИОДЕСТРУКТОРЫ ОТХОДОВ РЕЗИНОТЕХНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ УКРАИНЫ

Реферат

Целью работы был предварительный скрининг микроскопических грибов, перспективных для создания биотехнологии деструкции отходов резинотехнических материалов (РТМ). **Методы.** Культуры микромицетов, выделенные из РТМ, хранили на агаризованном сусле (4,5° по Баллингу) при 4 °С. Способность исследованных микромицетов расти на РТМ оценивали на 14-е сутки на модельной каучуксодержащей среде (КСС), имитирующей резиновый субстрат. Наличие карбоксилэстеразной и оксидазной активности выявляли качественными методами, рассчитывали энзиматический индекс. Совместимость отобранных культур микромицетов оценивали методом агаровых блоков. **Результаты.** Показано, что из 85 исследованных штаммов микроскопических грибов 77 способны образовывать четко выраженные колонии на среде КСС диаметром от 5 до 30 мм. Из них лишь 5 штаммов – *Aspergillus fumigatus* F-41484, *Mucor racemosus* F-41411, *M. racemosus* F-41412, *Rhizopus cohnii* F-2 та *R. cohnii* F-3 имели высокие энзиматические индексы по карбоксилэстеразной активности и 5 штаммов – *Alternaria alternata* F-41431, *Aspergillus flavus* F-41432, *A. sydowii* F-41426, *A. ustus* F-41437 і *A. versicolor* F-41469 – по оксидазной. Установлена возможность использования штаммов с высокими энзиматическими индексами в восьми смешанных культурах. **Вывод.** Для создания технологии биодеструкции отходов РТМ отобрано 10 штаммов микромицетов, характеризующихся высокими энзиматическими индексами по карбоксилэстеразной или оксидазной активности и способны к совместному культивированию.

Ключевые слова: резинотехнические материалы, микромицеты, биодеструкция, ферменты, энзиматический индекс, смешанная культура.

REFERENCES

1. Atagana H. I., Ejechi B. O., Ayilumo A. M. Fungi associated with degradation of wastes from rubber processing industry // Environmental Monitoring and Assessment. – 1999. – **55**. – P. 401–408.
2. Braaz R. Fischer P., Jendrosseck D. Novel Type of Heme-Dependent Oxygenase Catalyzes Oxidative Cleavage of Rubber (Poly-cis-1,4-Isoprene) // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – **70**, № 12. – P. 7388–7395.
3. Chuienko A.I., Nakonechna L. T., Zhdanova N. M. Special composition of fungi, isolated from damaged rubber tires and their components // Microb. journ. – 2010. – **72**, № 2. – P. 21–29. Paper published in Ukrainian.
4. Chuienko A.I., Subbota A. G., Olishevskaya S.V., Zaslavsky V.A., Zhdanova N. M. Deterioration of poured rubber tires by microscopic fungi // Microb. journ. – 2010. – **72**, № 3. – P. 36–42. Paper published in Ukrainian.
5. Chuienko A.I., Subbota A.G., Zhdanova N. M. Destruction of poured rubber tires by microscopic fungi // Microb. journ. – 2010. – **72**, № 5. – P. 32–41. Paper published in Ukrainian.



6. *Chuienko A.I.* Characteristics of the linear growth of micromycetes isolated from rubber materials // *Microb. Journ.* – 2011. – **73**, № 4. – P. 46–54. Paper published in Ukrainian.

7. *Colonia B. S.O., Chagas A. F. Jr.* Screening and detection of extracellular cellulases (endo- and exo-glucanases) secreted by filamentous fungi isolated from soils using rapid tests with chromogenic dyes // *African Journal of Biotechnology.* – 2014. – **13**, № 52. – P. 4694–4701.

8. *Florencio C., Couri S., Farinas C. S.* Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains // *Enzyme Research.* – 2012. – **2012**. – Article ID 793708. – 7 p.

9. *GOST 9.048–89.* Technical items. Methods of laboratory tests for mould resistance. Practise from 1989 – 26 – 06. M.: Publishing office of standards, 1989. – 22 p.

10. *Juma M., Koreňová Z., Markoš J., Annus J., Jelemensky L.* Pyrolysis and combustion of scrap tire // *Petroleum & Coal.* – 2006. – **46**, № 1. – P. 15–26.

11. *Moiseev R. E.* Relevance of substitution of traditional resources by converting waste products of industry // *Economics and management.* – 2010. – **66**, № 5. – P. 75–78. Paper published in Russian.

12. *Molitoris H. P., Schaumann K.* Physiology of marine fungi. A screening program for marine fungi // *The biology of marine fungi.* – Cambridge: Cambridge University Press, 1986. – P. 35–47.

13. *Nayanashree G., Thippeswamy B., Krishnappe M.* Natural rubber biodegradation by *Cladosporium fulvum* and enzymes responsible for biodegradation // *International journal of advanced research,* 2014. – **2**, № 2. – P. 1206–1212.

14. *Plyatsuk L. D., Gurets L. L., Budonyy O. P.* Utilization of rubber waste // *Bull. of M. Ostrogradsky KSPU.* – 2007. – **46**, № 5. – P. 152–154. Paper published in Ukrainian.

15. *Rook J. J.* Microbiological deterioration of vulcanized rubber // *Appl. Microbiol.* – 1955. – **3**, N 5. – P. 302–309.

16. *Rose K., Steinbuchel A.* Biodegradation of natural rubber and related compounds: Recent insights into a hardly understood catabolic capability of microorganisms // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2005. – **71**, № 6. – P. 2803–2812.

17. *Sato S., Honda Y., Kuwahara M., Kishimoto H., Vagi N., Muraoka K., Watanabe T.* Microbial scission of sulfide linkages in vulcanized natural rubber by a white rot basidiomycete, *Ceriporiopsis subvermispota* // *Biomacromol.* – 2004. – № 5. – P. 511–515.

18. *Sutton D. A., Fothergill A. W., Rinaldi M. G.* Guid to clinically significant fungi. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. – 460 p.

19. *Sergeev A. Yu. Sergeev Yu.V.* Fungal infections. – M.: Publishing office BYNOM, 2008. – 480 p. Book published in Russian.

20. *Turkova Z. A., Titkova O. A.* Relations between species of fungi, used to test technical products and their antibiotic properties // *Microorganisms and low plants – destructors of materials and articles.* – M.: Nauka, 1979. – P. 33–46. Paper published in Russian.

Стаття надійшла до редакції 10.07.2015 р.



УДК 577.15 (088.8)

І.І. Романовська¹, А.П. Левицький², С.С. Декіна¹, А.М. Овсепян¹

¹Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080,
тел.: +38(048)766 20 44, e-mail: romairina@gmail.com

²ДУ «Інститут стоматології НАМН України»,
вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026

МУКОАДГЕЗИВНИЙ ГЕЛЬ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ЛІЗОЦИМОМ І КВЕРЦЕТИНОМ

Мета. Розробити мукоадгезивний гель з сумісно іммобілізованими лізоцимом і кверцетином, дослідити біохімічні, фізико-хімічні і біологічні властивості комплексного препарату. **Методи.** Бактеріологічну активність лізоциму визначали турбідиметрично, використовуючи як субстрат *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698. Вміст білка визначали за Лоурі-Хартрі, кверцетину – із застосуванням хлориду цирконію (IV) спектрофотометрично. Іммобілізацію здійснювали методом включення в гель. Лікувально-профілактичну дію комплексного гелю досліджували на щурах, у яких відтворювали гінгівіт за допомогою індометацину. **Результати.** З використанням натрієвої солі карбоксиметилцелюлози як матриці здійснено сумісну іммобілізацію лізоциму і кверцетину. Показано, що за масових відношень лізоцим: кверцетин: матриця (1: 0,4: 6) спостерігається повне включення лізоциму, кверцетину і збереження бактеріологічної активності ферменту. Отриманий гель має високі мукоадгезивні властивості (сила адгезії 6000 Па), пролонговану дію: час повного виходу ензиму і кверцетину з гелю становили 180 і 75 хв, відповідно. Іммобілізований лізоцим активний в широкому діапазоні значень рН, стабільний в кислому середовищі і при зберіганні. Застосування орального гелю з лізоцимом і кверцетином приводить показники запалення до норми. **Висновки.** Сумісна іммобілізація лізоциму та кверцетину в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози не впливає на біохімічні властивості ферменту. Отриманий мукоадгезивний гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином є препаратом з комплексною біологічною активністю, і чинить антимікробну і протизапальну дії.

Ключові слова: лізоцим, кверцетин, сумісна іммобілізація, мукоадгезія, біохімічні і біологічні властивості.

Безсумнівною перевагою сучасних мукоадгезивних лікарських форм – гелів є їх здатність до збільшеного часу контакту зі слизовою оболонкою за рахунок мукоадгезивних полімерів у їх складі; такі лікарські форми (ЛФ) зручні для застосування в стоматології та офтальмології [1, 2]. В даний час, у зв'язку зі зростаючою резистентністю мікроорганізмів до антибіотиків та інших антибактеріальних засобів, увага дослідників приділяється використанню при створенні ЛФ «природних антибіотиків»; в т.ч. бактеріологічного ензиму лізоциму.

© І.І. Романовська, А.П. Левицький, С.С. Декіна, А.М. Овсепян, 2015



Лізоцим (КФ 3.2.1.17) – гідролітичний ензим, що каталізує гідроліз β -1,4-глікозидних зв'язків між залишками N-ацетил-D-глюкозаміну і N-ацетилмурамової кислоти пептидоглікану клітинної стінки бактерій, що призводить до втрати їх життєздатності. Ензим нетоксичний, має також проти-запальну, стимулювальну щодо тромбоцитопоезу дію, впливає на імунореактивність організму. Відомо, що недоліки функціонування біологічно-активних речовин (БАР), а також ензимів (відсутність стабільності, короткий термін зберігання та ін.) можуть бути усунені при їх іммобілізації з використанням різних матриць, у т.ч. мукоадгезивних полімерів, проте кількість досліджень в галузі створення мукоадгезивних форм лізоциму достатньо обмежена. Так, отримані іммобілізовані препарати лізоциму з застосуванням похідних целюлози [3]; хітозану [4], високомолекулярних полімерів, активованих силановими реагентами [5], поліаміду [6], желатинового гідрогелю [7], криогелю полівінілового спирту [8] та ін.

Проте мукоадгезивні і фізико-хімічні властивості іммобілізованих препаратів у даних дослідженнях детально не вивчені. Слід також відмітити можливість посилення позитивних лікувальних властивостей іммобілізованого лізоциму додаванням природнього поліфенолу – кверцетину, що має високу терапевтичну активність, унікальні протизапальну і ін. види активності (капіляропротекторна, протівірусна, антиоксидантна). У зв'язку з вищенаведеним, цілеспрямована розробка мукоадгезивних гелевих форм антибактеріальної і протизапальної дії з використанням природних БАР є актуальною задачею. Перспективними носіями для іммобілізації БАР є похідні карбоксиметилцелюлози, у тому числі її натрієва сіль (Na-КМЦ) внаслідок нетоксичності, добрих гелеутворювальних і мукоадгезивних властивостей, економічності, широкого медичного застосування.

Мета роботи – створення мукоадгезивного гелю з іммобілізованими на основі натрієвої солі карбоксиметилцелюлози лізоцимом і кверцетином, дослідження біохімічних, фізико-хімічних і біологічних властивостей препарату.

Матеріали і методи

У роботі використовували лізоцим, виділений з яєчного білка (КФ 3.2.1.17) (М.м. 14,4 кДа, 68000 од/мг, «Applichem», Бельгія), клітини *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 («Sigma-Aldrich», Німеччина), натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) (М.м. 125 кДа, FMC Biopolymer, Ірландія), кверцетин (Merck, Німеччина). Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом (субстрат – клітини *Micrococcus lysodeikticus* 2665) [9]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв. Вміст білка контролювали методом Лоурі-Хартрі [10], кверцетину – за допомогою хлориду цирконію [11].

Іммобілізацію лізоциму і кверцетину здійснювали згідно розробленої методики включення в гель Na-КМЦ. До складу гелю додавали спиртову настоянку м'яти перцевої для поліпшення органолептичних властивостей, гліцерин – для підвищення еластичності і полегшення розчинності БАР, хлоргексидину біглюконат, як консервант. Кінцева концентрація лізоциму в гелі становила



0,5 %, кверцетину – 0,2 %, Na-КМЦ – 3 %. Визначення і розрахунок адгезії отриманого гелю проводили згідно методу [12]. Як модель слизової оболонки використовували поверхню тонкого кишківника свині.

Перед експериментом тканину промивали фізіологічним розчином, висікали зразки слизової площею 5 см², однорідні за морфологією. В процесі експерименту слизову тканину додатково зволожували. Мукоадгезивний гель закріплювали на рухомому штоці з товщиною шару 0,3 мм, і з'єднували з слизовою. Фіксували навантаження на шток і час утримування (60 с). Далі під кутом 90 °С здійснювали відрив штоку з закріпленням на ньому гелем. Адгезію розраховували як силу відриву штоку з нанесеним гелем від слизової.

Для вивчення залежності бактеріолітичної активності лізоциму від рН рівні за активністю проби іммобілізованого і вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (рН 3,0–10,0), з наступним визначенням активності. Вплив температури на активність вільного і іммобілізованого ензиму вивчали в діапазоні 20–80 °С (0,1М Na-фосфатний буфер, рН 7,4). Для вивчення динаміки виходу лізоциму та кверцетину до 1 г іммобілізованого препарату додавали 5 см³ дистильованої води. Через рівні проміжки часу протягом 3 год відбирали по 0,1 см³ розчину і визначали бактеріолітичну активність лізоциму і кількість кверцетину. Отриманий гель зберігали при температурі +4 °С. Визначали збереження бактеріолітичної активності іммобілізованого лізоциму з інтервалом часу в один місяць протягом одного року.

Лікувально-профілактичну дію комплексного гелю досліджували на щурах, у яких відтворювали гінгівіт за допомогою індометацину [13]. Для цього білим щурам інтрагастрально вводили 10 мг/кг індометацину (виробництво АТ «Софарма», Болгарія). Через 24 години тварин піддавали евтаназії під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) шляхом тотальної кровотечі із серця. Усіх тварин було поділено на 5 груп по 7 голів у кожній: 1-а – контроль, 2–5 групи отримували індометацин, 3-я група за три доби до введення індометацину отримувала аплікації гелю з вмістом лізоциму 5 мг/мл, 4-а група – з вмістом кверцетину 2 мг/мл і 5-а – гель з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином (5 і 2 мг/мл, відповідно). Аплікації гелями робили щоденно за 30 хвилин до годівлі. В гомогенаті ясен визначали рівень біохімічних маркерів запалення [14]: вміст малонового діальдегіду і активність еластази, активність уреазі (біохімічний маркер мікробного обсіменіння) [15] і активність лізоциму (показник неспецифічного імунітету) [9], а також активність антиоксидантного фермента каталази [14]. За співвідношенням відносних активностей уреазі і лізоциму розраховували ступінь дисбіозу за Левицьким [16], а за співвідношенням активності каталази і вмісту МДА розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс АПІ [14].

Експериментальні дані опрацьовували статистично згідно [17].

Результати та їх обговорення

Результати досліджень масових відношень лізоцим : кверцетин : матриця (Na-КМЦ) показали, що при таких (1:0,4:6) відношеннях спостерігається повне включення білка лізоциму і збереження його бактеріолітичної активності,



кількісне – кверцетину з утворенням гелю, основні характеристики якого представлені в табл. 1.

Таблиця 1

**Характеристика мукоадгезивного гелю
з іммобілізованими лізоцимом и кверцетином**

Table 1

Characteristics of mucoadhesive gel with immobilized lysozyme and quercetin

| Показники | Результати визначення* |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Бактеріолітична активність | 60100±3000 од/г препарату |
| Вміст ферменту | 5±0,3 мг/г препарату |
| Вміст кверцетину | 2±0,1 мг/г препарату |
| Вміст води | 95±5,6 % |
| Органолептичні характеристики | однорідний гель жовто-зеленого кольору з м'ятним запахом |
| pH гелю | 6,5±0,3 |

Примітка: n* =5

Слід відмітити достатньо сильні мукоадгезивні властивості отриманого препарату, так, сила його адгезії до слизової оболонки дорівнює 6000 Па, тоді як у фармації використовують полімери з мукоадгезією до слизової у діапазоні 2000–9000 Па. Важливою властивістю мукоадгезивних гелів є тривалість дії, що сприяє ефективності їх застосування. Нами показаний пролонгований повний вихід ферменту з іммобілізованого препарату – одержаного гелю – (рис. 1) після 180 хв інкубації в умовах, наближених до фізіологічних (pH 6,2, t = 37 °C), який досягається, ймовірно, за рахунок нековалентних взаємодій ензиму з носієм.

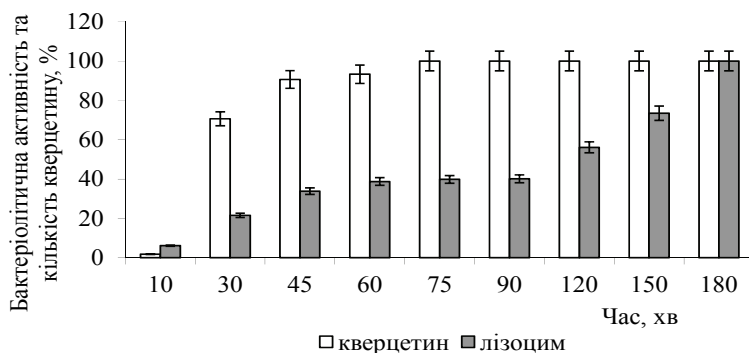


Рис. 1. Залежність вивільнення лізоциму і кверцетину з гелю від часу інкубації

Примітка: (pH 6,2; t=37 °C); n=5, P< 0,05–0,01

Fig. 1. Dependence of lysozyme and quercetin release from the gel on incubation time

Note: (pH 6,2; t=37 °C); n=5, P< 0,05–0,01



Однак кверцетин вивільняється за більш короткий час (75 хв), можливо за рахунок механічного включення у структуру гелю.

При дослідженні залежності бактеріолітичної активності лізоциму від рН інкубаційного середовища (рис. 2) відзначено розширення рН-профілю іммобілізованого ферменту у бік кислих значень, що пояснюється стабілізуючим впливом матриці – утворенням сприятливого мікрооточення ферменту.

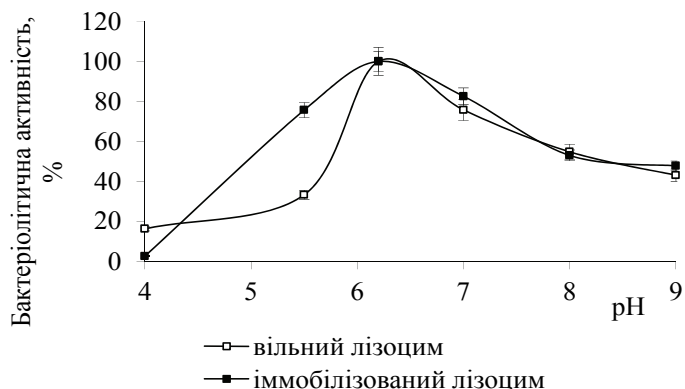


Рис. 2. Залежність бактеріолітичної активності вільного та іммобілізованого лізоциму від рН інкубаційного середовища

Fig. 2. Dependence of bacteriolitic activities of free and immobilized lysozyme on pH of the incubation medium

Вивчення впливу температури на активність іммобілізованого лізоциму (рис. 3) показало звуження термопрофілю активності ферменту в діапазоні 60–80 °С, що може бути пов'язано з конфігураційними змінами білкової молекули під впливом продуктів часткової термодеструкції носія.

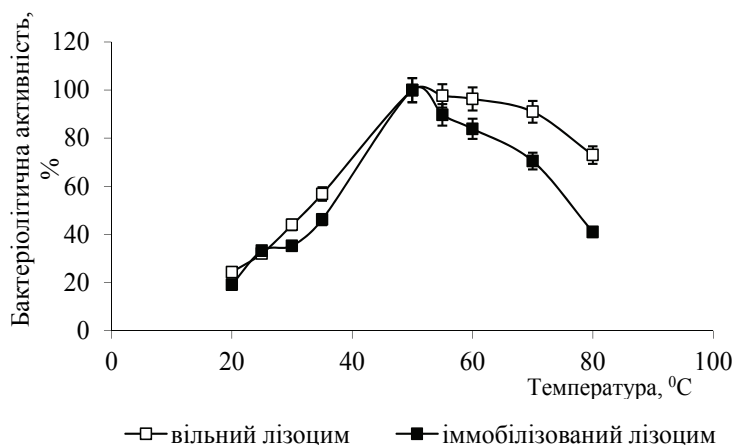


Рис. 3. Залежність бактеріолітичної активності вільного та іммобілізованого лізоциму від температури

Fig. 3. Dependence of bacteriolitic activities of free and immobilized lysozyme on the temperature



Показано, що іммобілізований лізоцим протягом 3 год в умовах слабко-кислого середовища (рН 5,5) практично повністю зберігає бактеріолітичну активність (при 25 °С і 37 °С) (рис. 4), тоді як вільний – лише 25–30 % (рис. 2), що свідчить про стабілізацію ензиму внаслідок іммобілізації.

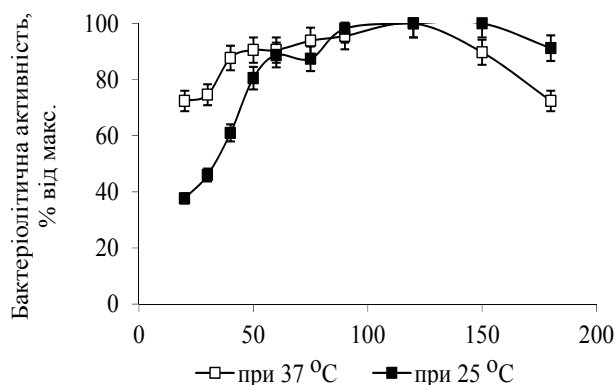


Рис. 4. Залежність гідролітичної активності іммобілізованого лізоциму від часу інкубації при рН 5,5 та температурі 25 °С і 37 °С

Fig. 4. Dependence of hydrolytic activity of the immobilized lysozyme on incubation time at pH 5.5 and the temperature of 25 °С and 37 °С

В розробленому гелі протягом року повністю зберігалась ферментативна активність лізоциму і вміст кверцетину (табл. 2).

Таблиця 2

Бактеріолітична активність лізоциму та кількість кверцетину в мукоадгезивному гелі протягом його зберігання

Table 2

Bacteriolytic lysozyme activity and the amount of quercetin in mucoadhesive gel during its storage

| Час зберігання | Активність лізоциму | | Вміст кверцетину | |
|---------------------|---------------------|-------|------------------|-------|
| | од/мг | % | мг/г | % |
| Після іммобілізації | 60010±3005 | 100,0 | 2,0±0,1 | 100,0 |
| 1 міс | 59800±2990 | 99,5 | 1,99±0,1 | 99,5 |
| 2 міс | 59680±2984 | 99,3 | 1,97±0,1 | 98,5 |
| 3 міс | 59680±2984 | 99,0 | 1,96±0,04 | 98,0 |
| 4 міс | 59680±2984 | 99,1 | 1,95±0,05 | 96,5 |
| 10 міс | 56855±2842 | 94,6 | 1,92±0,11 | 96,0 |
| 12 міс | 54871±2742 | 91,3 | 1,90±0,1 | 95,5 |

Примітка: n =5, P < 0,05



В таблиці 3 представлено результати визначення біохімічних маркерів в яснах щурів за умов експериментального гінгівіту та вплив іммобілізованого лізоциму і кверцетину на їх рівень. З цих даних видно, що у щурів з гінгівітом достовірно зростає рівень МДА, еластази і уреази, однак знижується рівень лізоциму і каталази. Застосування гелю *per os* з лізоцимом і кверцетином нормалізує вищезазначені показники.

Таблиця 3

Вплив аплікацій гелю з іммобілізованими лізоцимом і кверцетином на біохімічні показники ясен щурів з гінгівітом ($M \pm m$, в усіх групах $n=7$)

Table 3

Effect of gel application with immobilized lysozyme and quercetin on biochemical indices of rats' gums with gingivitis ($M \pm m$, in all groups $n=7$)

| № № пп | Групи | МДА, мкмоль/кг | Еластаза, мккат/кг | Уреаза, мккат/кг | Лізоцим, од/кг | Каталаза, мкат/кг |
|-----------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| 1 | Контроль | 10,8±0,3 | 40,0±2,0 | 2,03±0,31 | 364±67 | 5,75±0,28 |
| 2 | Гінгівіт | 15,5±0,8 $p < 0,01$ | 54,2±5,1 $p < 0,05$ | 3,83±0,25 $p < 0,01$ | 220±31 $p < 0,05$ | 4,87±0,19 $p < 0,01$ |
| 3 | Гінгівіт + лізоцим 5 мг/мл | 12,1±0,6 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$ | 41,0±4,0 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$ | 2,28±0,46 $p > 0,3$ $p_1 < 0,05$ | 312±52 $p > 0,3$ $p_1 > 0,05$ | 5,14±0,26 $p > 0,05$ $p_1 > 0,3$ |
| 4 | Гінгівіт + кверцетин 2 мг/мл | 11,5±0,6 $p > 0,1$ $p_1 < 0,01$ | 47,6±3,9 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$ | 2,91±0,30 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$ | 279±38 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$ | 5,49±0,27 $p > 0,3$ $p_1 > 0,05$ |
| 5 | Гінгівіт + лізоцим (5 мг/мл) + кверцетин (2 мг/мл) | 10,1±0,5 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$ | 40,8±4,0 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$ | 2,12±0,32 $p > 0,5$ $p_1 < 0,01$ | 356±52 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$ | 5,68±0,28 $p > 0,5$ $p_1 < 0,05$ |

Примітка: p – по відношенню до гр. 1; p_1 – по відношенню до гр. 2.

На рис. 5 показано дані про ступінь дисбіозу та індексу АПІ в яснах щурів з гінгівітом і дисбіозом. Видно, що при патології в яснах зростає в 2,8 рази ступінь дисбіозу і знижується в 1,7 разів індекс АПІ. Гель з лізоцимом і кверцетином нормалізує обидва показники.

Таким чином, в результаті нековалентної іммобілізації лізоциму і кверцетину в натрієву сіль карбоксиметилцелюлози отримано гель з високою адгезією до слизових оболонок, пролонгованої дії, стабільний при зберіганні і за умов кислого середовища, що має антимікробну і протизапальну дію і лікувально-профілактичні властивості.



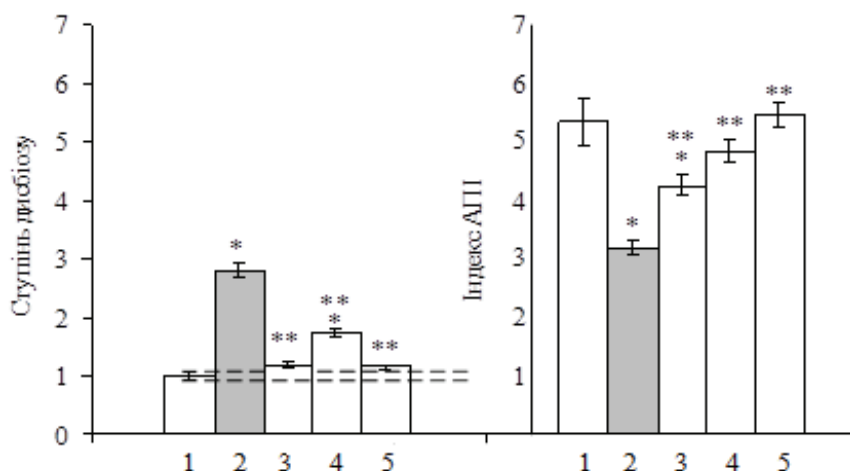


Рис. 5. Вплив іммобілізованих лізоциму і кверцетину на ступінь дисбіозу та індекс АПІ в яснах щурів, у яких відтворювали гінгівіт

(1 – контроль, 2 – гінгівіт, 3 – гінгівіт+лізоцим, 5 мг/мл, 4 – гінгівіт+кверцетин, 2 мг/мл, 5 – гінгівіт+лізоцим (5 мг/мл)+кверцетин (2 мг/мл)

* – $p < 0,05$ в порівнянні з групою 1; ** – $p < 0,05$ в порівнянні з групою 2

Fig. 5. Effect of immobilized lysozyme and quercetin on the degree of dysbiosis and API-index in gums of rats, which mimies gingivitis

(1 – control, 2 – gingivitis, 3 – gingivitis + lysozyme, 5mg / ml, 4 – gingivitis + quercetin, 2 mg / ml, 5 – gingivitis + lysozyme (5 mg / ml) + quercetin (2 mg / ml), * – $p < 0.05$ compared with group 1; ** – $p < 0.05$ compared with group 2

И.И. Романовская¹, А.П. Левицкий², С.С. Декина¹, А.М. Овсепян¹

¹Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины,
Лютдорфская дор., 86, Одесса, 65080, тел. +38(048)766 20 44,
e-mail: romairina@gmail.com

²ГУ «Институт стоматологии НАМН Украины»,
ул. Ришельевская, 11, Одесса, 65026

МУКОАДГЕЗИВНИЙ ГЕЛЬ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ЛІЗОЦИМОМ І КВЕРЦЕТИНОМ

Реферат

Цель. Разработать мукоадезивный гель с совместно иммобилизованными лизоцимом и кверцетином, исследовать биохимические, физико-химические и биологические свойства комплексного препарата. **Методы.** Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрически, используя в качестве субстрата *Micrococcus lysodeikticus* 2665. Содержание белка определяли по Лоури-Хартри, кверцетина с применением хлорида циркония (IV) спектрофотометрически. Иммобилизацию осуществляли методом включения в гель. Лечебно-профилактическое действие комплексного геля исследовали на крысах, у которых воспроизводили гингивит с помощью индометацина. **Результаты.** С использованием натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы в качестве матрицы осуществлена совместная иммобилизация лизоцима и кверцетина методом включения в гель. Показано, что при массовых отношениях лизоцим: кверцетин: матрица



(1:0,4:6) наблюдается полное включение лизоцима и кверцетина, сохранение бактериолитической активности фермента. Полученный гель обладает высокими мукоадгезивными свойствами (сила адгезии 6000 Па), пролонгированным действием: время полного выхода белка энзима и кверцетина из геля составили 180 и 75 мин, соответственно. Иммуобилизованный лизоцим активен в широком диапазоне значений рН, стабилен в кислой среде и при хранении. Применение орального геля с лизоцимом и кверцетином приводит показатели воспаления в норму. **Выводы.** Совместная иммуобилизация лизоцима и кверцетина в натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы не влияет на биохимические свойства фермента. Полученный мукоадгезивный гель с иммуобилизованными лизоцимом и кверцетином является препаратом с комплексной биологической активностью, и оказывает антимикробное и противовоспалительное действие.

Ключевые слова: лизоцим, кверцетин, совместная иммуобилизация, мукоадгезия, биохимические и биологические свойства.

I.I. Romanovska¹, A.P. Levitsky², S.S. Dekina¹, A.M. Ovsepiyan¹

¹A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine
86, Lustdorfska dor., Odesa, Ukraine, 65080, tel.:+38 (48) 765 94 31,
e-mail: romairina@gmail.com
²SI «Institute of stomatology NAMS of Ukraine», Odessa, Ukraine,
11, st. Rishelyevskaya, Odesa, 65026

MUCOADHESIVE GEL WITH IMMOBILIZED LYSOZYME AND QUERCETIN

Summary

Aim. To develop mucoadhesive gel with jointly immobilized lysozyme and quercetin and to investigate biochemical, physical, physico-chemical and biological properties of the complex preparation. **Methods.** The bacteriolytic activity of lysozyme was determined turbidimetrically, using *Micrococcus lysodeikticus* 2665 as substrate. Protein content was determined by Lowry-Hartree and that of quercetin – with usage of zirconium (IV) chloride, spectrophotometrically. Immobilization was conducted by gel entrapment method. Therapeutic and preventive action of complex gel was investigated on rats, with gingivitis, which was modelled using indomethacin. **Results.** Using the carboxymethyl cellulose sodium salt as support, the joint immobilization of lysozyme and quercetin was conducted by gel entrapment method. It was shown, that at mass ratio lysozyme: quercetin: matrix (1: 0.4: 6), the complete degree of lysozyme and quercetin inclusion is observed, with preservation of bacteriolytic enzyme activity. The obtained gel possesses high mucoadhesive properties (adhesive force equals 6000 Pa), prolonged action: the time of complete release of enzyme and quercetin was 180 and 75 min, respectively. The immobilized lysozyme is active in the wide range of pH-values, stable in acidic medium and during storage. The usage of oral gel with lysozyme and quercetin leads the indices of inflammation to the norm. **Conclusions.** The joint immobilization of lysozyme and quercetin in sodium carboxymethyl cellulose does not influence the biochemical properties of enzyme. The obtaining mucoadhesive gel with immobilized lysozyme and quercetin is the preparation with complex biological activity, antimicrobial and anti-inflammatory effect.

Key words: lysozyme, quercetin, joint immobilization, mucoadhesion, biochemical and biological properties.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Lee, J.W., Park Robinson, J. H. Bioadhesive-based dosage forms: the next generation // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2000, V. 89. – С. 850–866.
2. Харенко Е. А., Ларионова Н. И., Демина Н. Б. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор) // *Химико-фармацевтический журнал* – 2009. – Т. 43, № 7. – С. 17–24.
3. Lu Z., Zhang J., Ma Y. Biomimetic mineralization of calcium carbonate/carboxymethylcellulose microspheres for lysozyme immobilization // *Materials Science and Engineering*. – 2012. – V. 32, № 7. – P. 1982–1987.
4. Pirasa A. M., Maisetta G., Sandreschi S. Preparation, physical–chemical and biological characterization of chitosan nanoparticles loaded with lysozyme // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – V. 67. – P. 124–131.
5. Anirudhan T. S., Rauf T. A. Lysozyme immobilization via adsorption process using sulphonic acid functionalized silane grafted copolymer // *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – V. 107. – P. 1–10.
6. Takahashi D., Hamada T., Izumi T. Immobilization of lysozyme on poly (N-isopropyl acrylamide)/2-hydroxyethyl methacrylate copolymer core–shell gel beads // *Polymer Bulletin*. – 2012. – V. 68, № 6. – P. 1777–1788.
7. Kuijpers A. J., Wachemb P. B., Luyn M. J. In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves // *Journal of Controlled Release*. – 2000. – V. 67, № 1–2. – P. 323–336.
8. Декина С.С., Романовская И.И., Овсепян А.М., Молодая А.Л., Паукин И. И. Имобилизация лизоцима в криогель поливинилового спирта // *Biotechnologia Acta* – 2014. – V. 7, № 3. – P. 69–73.
9. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.
10. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Analytical Biochemistry*. – 1972. – V. 48, № 2. – P. 422–427.
11. Ogura H., Shikiba Y., Yamazaki Y. Quantitative analysis of flavonoids // *J. of Pharmaceutical Sciences* – 1968. – V. 57, № 4. – P. 705–706.
12. Kharenko E. A., Larionova N. I., Demina N. B. Mucoadhesive drug delivery systems: quantitative assessment of interaction between synthetic and natural polymer films and mucosa // *Pharmaceutical Chemistry Journal* – 2008. – V. 42, № 7. – P. 392–399.
13. Radi Z. A., Khan N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal tract // *Exper. Toxicol. Pathology*. – 2006. – V. 58, № 1. – P. 163–173.
14. Левицкий А. П., Деньга О. В., Макаренко О. А., Демьяненко С.А., Россаханова Л. Н., Кнава О. Э. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости (методические рекомендации). – Одесса: КП ОГТ, 2010. – 16 с.
15. Левицкий А. П., Макаренко О. А., Селиванская И.А., Россаханова Л.Н., Деньга О.В., Почтарь В.Н., Скидан К.В., Гончарук С. В. Ферментативный



метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков (методические рекомендации). – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 26 с.

16. *Патент* на корисну модель № 43140, Україна, МПК (2009) G01N 33/48 «Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин» / Левицький А. П., Деньга О. В., Селіванська І.О., Макаренко О.А., Дем'яненко С.О., Цісельський Ю. В. Заявка № U200815092 від 26.12.2008. Опубл. 10.08.2009. Бюл. № 15.

17. *Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морйон, 2000. – 320 с.

Стаття надійшла до редакції 26.05.15



О.О. Тігунова, С. М. Шульга

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

ВИКОРИСТАННЯ МУТАНТНИМ ШТАМОМ *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM* ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ ЯК СУБСТРАТА

Мета. Отримати мутантний штам з підвищеним накопиченням бутанола за допомогою хімічного мутагенезу (мутаген – *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідин) для культивування на заторі біомаси дроговидного проса. **Методи.** Для отримання мутантного штаму використовували метод індукованого мутагенезу. Для визначення продукції спиртів застосовували газову хроматографію. **Результати.** Оброблення культури *C. acetobutylicum* IMB В-7407 (IFBG С6Н) за допомогою мутагену *N*-метил-*N*-нітро-*N*-нітрозогуанідину привело до загибелі 99 % клітин. Було отримано стійкий мутантний штам *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М, який продукував на 45 % більше бутанола на лігноцелюлозній сировині (біомаса дроговидного проса *Panicum virgatum* L) в порівнянні з вихідним штамом. Показано, що штам не змінював властивості до підвищеного синтезу бутанола протягом 10 пересівів. Штам *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М мав аналогічну до вихідного штаму морфологію, але набув здатності до використання трегалози та аскуліну як субстрату. Знайдено оптимальні параметри попередньої обробки сировини (ступінь подрібнення, концентрація у ензиматичному середовищі, температура та час розварювання) для культивування мутантного штаму. Показано, що оптимальна концентрація біомаси дроговидного проса у ензиматичному середовищі склала 60 г/л. Встановлено, що найбільша концентрація бутанола (2,6 г/л для мутантного, та 1,8 для вихідного штаму) накопичувалася у культуральній рідині за умови використання попередньо обробленої сировини (знаходження під тиском 2 атм. протягом 2 годин). **Висновки.** Використовуючи методи індукованого мутагенезу отримано перспективний штам, який в сукупності з оптимізацією параметрів культивування має підвищений вихід цільового продукту в порівнянні з вихідним штамом.

Ключові слова: лігноцелюлоза, бутанол, *C. acetobutylicum*, біосинтез.

У зв'язку з зменшенням запасів викопних ресурсів, з постійним коливанням їх вартості, екологічними проблемами і жорсткими нормами законодавства у сфері доквілля до виробництва хімічних речовин і палива з відновлювальної сировини зростає інтерес. Одним з прикладів такого виробництва є виробництво бутанола в процесі ацетон-бутанол-етанол (АБЕ) ферментації. Виробництво бутанола складається з декількох етапів. У біомасу для АБЕ бродіння, що складається або з крохмалю, або цукрів чи лігноцелюлозної сировини попередньо оброблюють і використовують як субстрат. Способи попередньої



обробки відрізняються залежно від типу біомаси. Після ферментації кінцевий продукт екстрагують і очищують. Економіка біотехнології значною мірою залежить від вартості процесу бродіння і вартості субстрату. Для бутанола, як альтернативного виду палива, суттєве значення має сировина біомаси, яка має бути широко доступною і низьковартісною.

Промислове виробництво бутанола шляхом АБЕ ферментації на даний час не економічне через низьку продукцію бутанола, низьку швидкість ферментації, складне виділення продукту і проблеми з виродженням штамів у процесі виробництва і фаговими інфекціями.

При АБЕ ферментації бактерії *C. acetobutylicum* на першому етапі виробляють масляну, пропіонову, оцтову та молочну кислоти (стадія утворення кислот), потім рН знижується та починається стадія синтезу розчинників – бутанола, ацетона, етанолу та ізопропанолу [8]. Ця стадія пов'язана з підвищенням концентрації масляної кислоти та зниженням величини рН менше за п'ять. Виробництво бутанола лімітується (блокується ріст мікроорганізмів) за концентрації бутанола 1–2 % [9, 3, 5]. Для оптимізації процесу отримання метаболітів необхідно провести первинну селекцію штамів-продуцентів; змінити відповідним чином генетичні структури штаму-продуцента для збільшення накопичення бутанола і визначити оптимальні технологічні параметри (рН, температуру, потреби у поживних речовинах) та режими живлення і накопичення біомаси; вибрати спосіб іммобілізації клітин-продуцентів [2, 6, 7]. Одним із методів отримання високопродуктивних штамів є використання мутагенезу [3, 4, 14]. Мутагенез клостридій досліджувався в роботах [12, 14], де показано неефективність ультрафіолетового та радіаційного опромінення. Показано, що мутантні штами, які мали високу амолітичну активність та підвищену толерантність до бутанола мали високий вихід цільового продукту [10].

Таким чином, виходячи із необхідності вдосконалення біотехнологій, що існують, та розробки нових біотехнологій отримання біобутанола, поставлена мета отримати мутантний штам з підвищеним накопиченням бутанола за допомогою хімічного мутагенезу для культивування на заторі біомаси дроговидного проса.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були культура *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407 (ІФВГ СБН) з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інституту харчової біотехнології та геноміки» НАН України, яка була виділена з ґрунтів і мулів озер міста Києва, та її мутанти; біомаса дроговидного проса *Panicum virgatum L.*, отримана з Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка.

Для активації культур використовували середовище Виноградського та скибки картоплі натерті крейдою [6]. Як ензиматичне середовище використовували затор із дроговидного проса з різною концентрацією сухої рослинної біомаси (від 20 до 100 г/л). Для визначення чистоти культур використовували



модифіковане середовище Виноградського (ВМА) [7]. Для забарвлення живих препаратів використовували розчин Люголю, а для вітального – метиленового синього. Мікроскопіювання проводили за допомогою мікроскопу «Laboval» (Німеччина). Знімки робили за допомогою фотоапарату «Canon PowerShot A640» (Японія).

Для отримання мутантів методом хімічного мутагенезу добову культуру *C. acetobutylicum* IFBG С6Н на збагаченому м'ясо-пептонному бульйоні (ЗМПБ) було відцентрифуговано (7000 г) протягом 20 хв при 2 °С. Осаджені клітини промивали за допомогою пептонного буферу (ПБ) (0,1 г пептону, 8,5 г хлориду натрію на літр). При досягненні оптичної густини суспензії рівної 1 при 600 нм, клітини переносили на свіже ЗМПБ, яке містило 50 мкг N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин (НТГ). Після інкубації протягом 15 хв клітини відмивали за допомогою ПБ для видалення залишків НТГ. Отримані клони були перенесені на свіже ЗМПБ для культивування протягом 7 год. Після культивування культуру ще раз промивали за допомогою ПБ для видалення залишків глюкози. Отримані клони переносили на агаризовані затори із дратовидного проса (60 г/л біомаси дратовидного проса, 30 г/л агару). Через три доби колонії, навколо яких була найбільша зона просвітлення (культури з найбільшою амілолітичною активністю), було перенесено на затори із дратовидного проса для культивування. Для аналізу культуральної рідини використовували газову хроматографію (ГХ) [7].

Культивування мікроорганізмів на щільних середовищах проводили у анаеростаті «АЭ-01» (Росія) в атмосфері азоту. Анаеростат поміщали у термостат за температури 35 °С. Для забарвлення джгутиків використовували метод Лефлера з модифікацією наведеною в роботі [3]. Середовища Гіса з індикатором Андреде використовували для встановлення зброджування цукрів. Для ідентифікації місця положення спор у клітинах було застосовано метод забарвлення спор [3].

Суху біомасу (вологість 5–7 %) дратовидного проса подрібнювали за допомогою млина лабораторного «Циклон МШ 1» (Україна). Вологість визначали за допомогою аналізатора вологості RADWAG MA 50/C/1 (Польща).

Усі досліді проводили в 3-х повторях. Статистична обробка експериментальних даних була зроблена за допомогою програми Microsoft Excel. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Для отримання мутантного штаму з підвищеним синтезом бутанолу добову культуру *C. acetobutylicum* ІМВ В-7407 (IFBG С6Н) оброблювали мутагеном та висаджували на агаризоване середовище. Оброблення культури за допомогою НТГ спричинило загибель 99% клітин. Було відібрано вісім колоній з найбільшою зоною просвітлення та амілолітичною активністю. Накопичення бутанолу при культивуванні на лігноцелюлозній сировині було різним (рис. 1), деякі з штамів втратили властивість до утворення розчинників, у тому числі і бутанолу. Більшість штамів продукували бутанол у такій самій концентрації, що і вихідний штам і тільки один накопичував його у культуральній рідині на



45 % більше ніж вихідний штам. Цей штам було ідентифіковано як мутантний *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M за геном *bdh*. Отриманий штам не змінював властивості до підвищеного синтезу бутанолу протягом 10 пересівів. Штам *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M мав аналогічну до вихідного штаму морфологію та забарвлення за Грамом, але набув здатності до використання трегалози та аскуліну як субстрату.

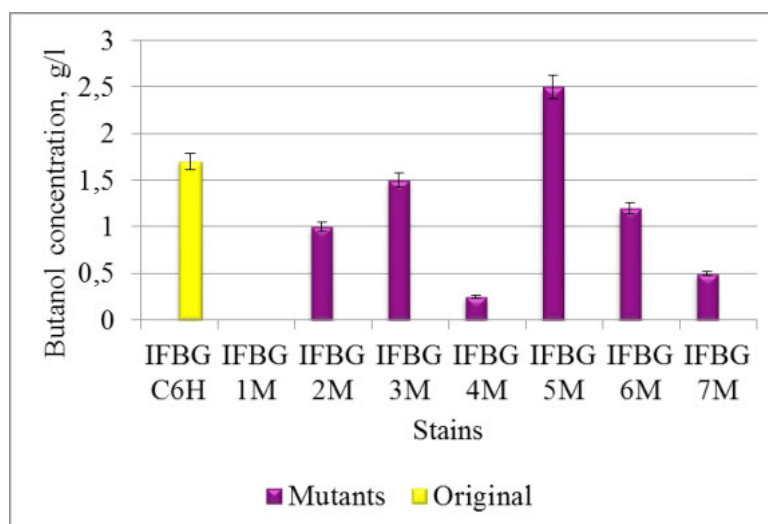


Рис. 1. Концентрація бутанолу вихідного та мутантних штамів при культивуванні на заторі із дроговидного проса

Fig. 1. Butanol concentration of original and mutant strains cultured on swithgrass

Одним із факторів, що ускладнюють виробництво бутанолу з лігноцелюлозної сировини є молекули целюлози та геміцелюлози, пронизані лігніновою оболонкою з великою кількістю перехресних зв'язків, мало доступних як для мікроорганізмів так і ферментів. У зв'язку з цим для *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M було проведено дослідження впливу концентрації біомаси дроговидного проса (субстрату) на накопичення бутанолу (рис. 2).

Показано, що оптимальна концентрація біомаси дроговидного проса у середовищі для ферментації склала 60 г/л. При збільшенні концентрації біомаси дроговидного проса концентрація бутанолу зменшувалася, а накопичення біомаси продовжувалося. Подальші дослідження проводили з використанням для ферментації концентрації 60 г/л дроговидного проса.

Важливим фактором, який впливає на процес культивування є попередня підготовка лігноцелюлозного субстрату і особливо ступінь його подрібнення. Клітинну структуру біомаси руйнують для розірвання зв'язків целюлози та геміцелюлози з лігніном. Було проведено дослідження впливу ступеня подрібнення сухої біомаси дроговидного проса на концентрацію бутанолу (рис. 3).

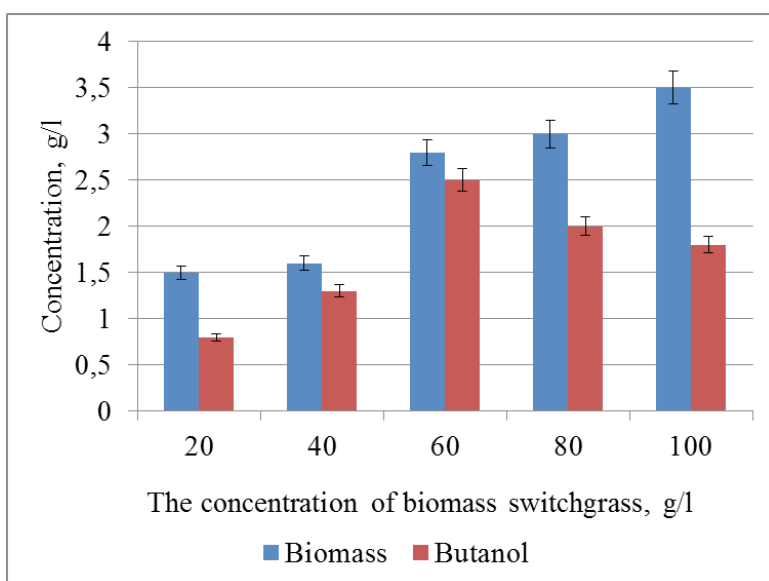


Рис. 2. Вплив концентрації дроговидного проса на накопичення біомаси і бутанолу мутантним штамом

Fig. 2. Effect of biomass concentration of switchgrass on biomass and butanol concentration of mutant strain

Показано, що із збільшенням ступеня подрібнення дроговидного проса до 200 меш. концентрація бутанолу у культуральній рідині зростала як для мутантного, так і для вихідного штамів – 2,5 г/л та 1,2 г/л, відповідно.

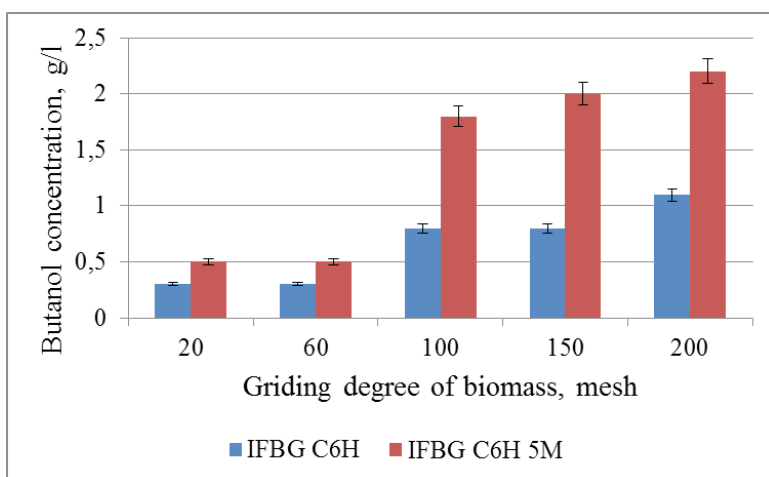


Рис. 3. Залежність концентрації бутанолу від ступеня подрібненості субстрату

Fig. 3. Dependence of butanol concentration on gridding degree of biomass

Ще одним етапом попередньої підготовки субстрату для збільшення кількості вільних моно- та поліцукрів є термічна обробка. Було досліджено вплив режимів попередньої термічної обробки дротовидного проса на концентрацію бутанола у культуральній рідині (рис. 4).

Показано, що найбільша концентрація бутанола (2,6 г/л для мутантного і 1,8 г/л для вихідного штамів) накопичувалася у культуральній рідині за використання попередньо обробленої сировини (за температури 133 °С, тиску 2 атм., протягом 2 годин). Подальше збільшення часу обробки або тиску суттєво не впливало на накопичення бутанола як мутантним, так і вихідним штамми.

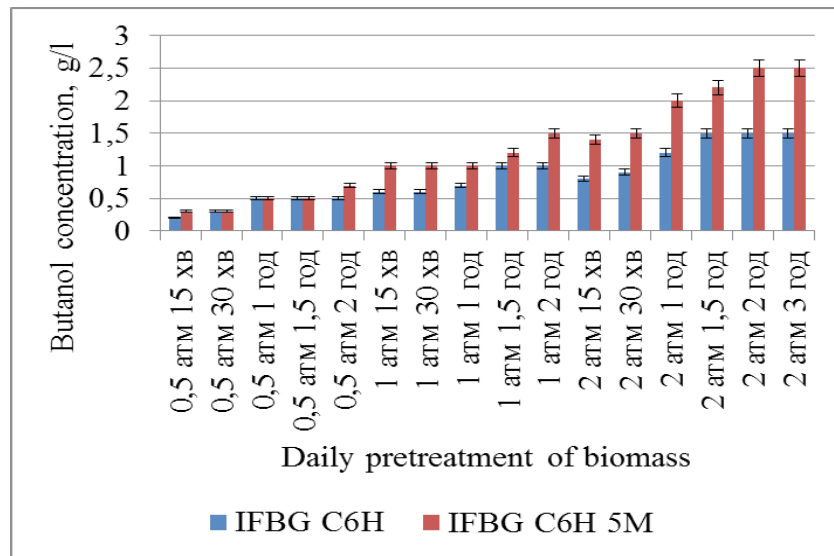


Рис. 4. Залежність концентрації бутанола від попередньої обробки сировини

Fig. 4. Dependence of butanol concentration on daily biomass pretreatment

Таким чином, за результатами досліджень отримано мутантний штам *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M, який продукував на 45% більше бутанолу на лігноцелюлозній сировині (біомаса дротовидного проса *Panicum virgatum* L) порівняно з вихідним штамом. Знайдено оптимальні параметри попередньої обробки сировини (ступінь подрібнення 200 меш., концентрація дротовидного проса у ензиматичному середовищі 60 г/л, тиск 2 атм. та час розварювання протягом 2 год.) для культивування мутантного штаму.

Е.А. Тигунова, С.М. Шульга

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

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МУТАНТНЫМ ШТАМОМ *C. ACETOBUTYLICUM* ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ КАК СУБСТРАТА

Реферат

Цель. Создать мутантный штамм с повышенным накоплением бутанола с помощью химического мутагенеза (мутаген *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидин) при культивировании на заторе из биомассы стеблевидного проса. **Методы.** Для получения мутантного штамма использовали метод индуцированного мутагенеза. Для определения продукции спиртов использовали газовую хроматографию. **Результаты.** Обработка культуры *C. acetobutylicum* IMB В-7407 (IFBG С6Н) с помощью мутагена *N*-метил-*N*-нитро-*N*-нитрозогуанидина привела к гибели 99% клеток. Был получен стойкий мутантный штамм *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М, который продуцировал на 45% больше бутанола на лигноцеллюлозном сырье (биомассе стеблевидного проса *Rapiscum virgatum* L) по сравнению с исходным штаммом. Было показано, что штамм не изменял свою особенность к повышенному синтезу бутанола на протяжении 10 пассажей. Штамм *C. acetobutylicum* IFBG С6Н 5М имел аналогичную с исходным штаммом морфологию, но приобрёл способность к использованию трегалозы и аскулина, как субстрата. Найдены оптимальные параметры предварительной обработки сырья (степень измельчения, концентрация в ферментационной среде, температура и время разваривания) для культивирования мутантного штамма. Показано, что оптимальная концентрация биомассы стеблевидного проса в ферментационной среде составила 60 г/л. Установлено, что наибольшая концентрация бутанола (2,6 г/л для мутантного и 1,8 для исходного) накапливалась в культуральной жидкости с использованием сырья, предварительного обработанного при 2 атм. на протяжении 2 часов. **Выводы.** Используя методы индуцированного мутагенеза получены перспективные штаммы, которые в совокупности с оптимизацией параметров культивирования имеют повышенный выход целевого продукта по сравнению с исходным штаммом.

Ключевые слова: лигноцеллюлоза, бутанол, *C. acetobutylicum*, биосинтез.

О. Tigunova, S. Shulga

SI «Institute of Food Biotechnology and Genomics», NAS of Ukraine,
2a, st. Osipovskii, Kyiv-123, 04123, Ukraine, tel.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

USING BY MUTANT STRAINS *C. ACETOBUTYLICUM* LIGNO-CELLULOSIC MATERIAL AS A SUBSTRATE

Summary

Aim. To create a mutant strain with increased accumulation of butanol by chemical mutagenesis (mutating agent *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine) cultured on



switchgrass biomass mash. **Methods.** To obtain the mutant strain there were used the method of induced mutagenesis. To determine the production of alcohols there were used gas chromatography. **Results.** Processing *C. acetobutylicum* IMB culture B-7407 (IFBG C6H) via the mutagen *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine, led to 99% cell death. There were obtained a mutant resistant strain *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M which produced 45% more butanol on lignocellulosic materials (switchgrass biomass *Panicum virgatum* L) compared with the parent strain. It has been shown that the strain does not change its feature to increased synthesis of butanol over 10 passages. The strain of *C. acetobutylicum* IFBG C6H 5M had a similar morphology to the original strain, but gained the ability to use askulin and trehalose as a substrate. The optimal parameters of the pretreatment of raw materials (crushing ratio, the concentration in the fermentation medium, the temperature and time of cooking) for the cultivation of a mutant strain have been found. It is shown that the optimal concentration of switchgrass biomass in fermentation medium was 60 g/l. It has been shown that the highest concentration of butanol (2.6 g/l and 1.8 g/l to mutant and original strain) accumulated in the culture liquid using raw material pretreated at 2 atm. for 2 hours. **Conclusions.** Using the methods of induced mutagenesis promising strains can be obtained, which together with optimizations cultivation parameters have an increased yield of the desired product as compared to the parent strain.

Key words: lignocellulose, butanol, *C. acetobutylicum*, biosynthesis.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пирог Т.П. Біологічні основи мікробіологічного синтезу. – В кн.: Основи біотехнології. – К.:2010. –127 с.
2. Слюсаренко П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. Издательство третье переработанное и дополненное. – М. «Легкая и пищевая промышленность» – 1984. – 208 с.
3. Тігунова Е.А., Шульга С.М. Синтез бутанола штамом *C. acetobutylicum* на альтернативних субстратах // Матеріали 7-го Міжнародного конгреса «Біотехнологія: состояние и перспективы развития», Москва, 19–22 марта 2013. – С. 272.
4. Федоренко В.О., Остап Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів. – Львів, 2007. – С. 279.
5. Шульга С.М., Тігунова О.О, Блюм Я.Б. Лігноцелюлоза як альтернативна сировина для одержання біобутанола // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V. 6, N 2. – С. 9–21.
6. Шульга С.М., Тігунова О.О. Нові штами-продуценти біобутанола. I. Виділення та ідентифікація // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – V. 6, N 1. – С. 97–104.
7. Шульга С.М., Тігунова О.О. Нові штами-продуценти біобутанола. II. Ферментація лігноцелюлозної сировини // *Biotechnologia Acta*. – 2014. – V. 7, N 4. – С. 54–60.



8. *Tigunova O., Shulga S., and Blume Y.* Biobutanol as an Alternative Type of Fuel // *Cytology and Genetics*. – 2013. – V. 47, N 6. – P. 51–71.

9. *Tigunova O., Shulga S.* Obtaining of new butanol producers // *Abst. 15th Eur. Congr. Biotechnol., Istanbul, Turkey, 23-29 September 2012*. – V. 29, Issue S. – P. S 43.

10. *Annous B.A., Blaschek H.P.* Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity // *Appl. and Env. Microb.* – 1991. – V. 57, N 9. – P. 2544–2548

11. *Blaschek H., Annous B., Formanek J., Chen C. K.* Method of producing butanol using a mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101. – 2002. – US patent 6,358,717.

12. *Liu X.B., Gu Q.Y., Yu X.B., Luo W.* Enhancement of butanol tolerance and butanol yield in *Clostridium acetobutylicum* mutant NT642 obtained by nitrogen ion beam implantation. // *J. Microbiol.* – 2013, V. 50, I 6. – P. 1024–1028

13. *Syed Q.-ul-A., Nadeem M., Nelofer R.* Enhanced Butanol Production by Mutant Strains of *Clostridium acetobutylicum* in Molasses Medium // *Turk J. Biochem.* – 2008. – 33(1). – P. 25–30.

14. *Yu X.B., Hu W. J., Wang Q., Gu Q. Y., Luo W., Li H. G.* Acetone, butanol, and ethanol production from cane molasses using *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by combined low-energy ion beam implantation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine induction // *Bioresource Technol.* – 2013. – 137. – P. 254–260.

Стаття надійшла до редакції 12.05.2015 р.



И.Б. Высотина, О.С. Воронкова, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
e-mail: irafarma@mail.ru

МОНИТОРИНГ ГРИБОВ – КОНТАМИНАНТОВ ХЛЕБОБУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Цель. Определить возбудителей меловой болезни хлеба. **Методы.** Микробиологические – для определения грибной контаминации хлебобулочных изделий с признаками поражения хлеба путем описания морфологических признаков болезни, изучения микроскопической картины и проведения культуральных исследований. **Результаты.** Установлено, что наиболее часто контаминация хлеба была вызвана представителями рода *Saccharomycopsis* (57,1 % случаев), также выявляли виды родов *Sporobolomyces* (25,0 %) и *Hyphopichia* (17,9 %). Экспериментальная контаминация выделенными штаммами показала, что только в 17,9 % случаев зона роста гриба составляла более 1 см в диаметре, а в 53,5 % – она была меньше 5 мм. Для 57,1 % штаммов *Sporobolomyces* при экспериментальной контаминации хлебобулочных изделий образование зоны роста превышало 1 см. Нанесение суспензий клеток культур других выделенных контаминантов также приводило к проявлению признаков меловой болезни, но зона роста не превышала 5 мм. **Выводы.** При отборе материала для исследований установлено, что грибной контаминации в большинстве случаев подвержены изделия из ржаной муки (71,4 %). Преимущественными контаминантами были виды рода *Saccharomycopsis* (57,1 % случаев). Зона роста гриба более 1 см в диаметре при экспериментальном заражении обнаружена только в 17,9 % случаев, что потенциально указывает на сложность эффективного распознавания контаминированной продукции в производственных условиях и требует разработки мер по предупреждению распространения возбудителей болезней хлеба.

Ключевые слова: меловая болезнь, хлеб, контаминация, дрожжевые грибы.

Порча хлебобулочных изделий при развитии на них ряда дрожжеподобных грибов называется меловой болезнью хлеба. Вызывают такие поражения преимущественно дрожжи видов *Saccharomycopsis fibuligera*, *Hyphopichia burtonii*, *C. parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Sporobolomyces gracilis* и другие, в том числе и пекарские дрожжи [5].

Чаще всего признаки заболевания обнаруживаются на поверхности мякиша ржано-пшеничного хлеба, подвергнутого нарезке и хранящегося в упаковке из полимерных материалов. Реже меловая болезнь проявляется на корке изделий. Поражения характеризуются образованием на поверхности корки и в мякише хлеба белых, сухих, порошкообразных налетов или отдельных пятен.



Споры возбудителей меловой болезни устойчивы к высоким температурам и не погибают во время выпечки. Их прорастание занимает некоторое время, что усложняет выявление меловой болезни хлеба на производстве. Обычно ее проявления выявляются уже при поступлении хлебобулочных изделий в торговую сеть [2, 6].

Употребление в пищу пораженного меловой болезнью хлеба не считается опасным для человека, поскольку токсичных веществ эти грибы не продуцируют [5]. Однако изделия теряют свою товарную ценность, что наносит существенный урон производителю [2, 4, 6], поэтому определение возбудителей меловой болезни хлеба является важной задачей микробиологического контроля производства хлебобулочных изделий, что позволяет избежать распространения болезни и массовой порчи продукции.

Целью исследования было определить возбудителей меловой болезни хлеба.

Задачи исследования:

- выделить и идентифицировать грибы, контаминировавшие хлеб;
- определить частоту встречаемости грибов-контаминантов на разных сортах хлеба.

Материалы и методы

Для идентификации видов дрожжей – возбудителей меловой болезни хлеба – изучены 28 образцов хлебобулочных изделий с признаками проявления меловой болезни. Из них 20 образцов составляли хлебобулочные изделия из ржаной муки, а 8 – из пшеничной. Все обследованные изделия были упакованы в полимерные материалы. На поверхности корки или срезов (при исследовании образцов нарезанного хлеба) наблюдали образования в виде белых, реже бежевых сухих пятен плотной консистенции и/или такого же цвета порошкообразного либо крошковатого налета, напоминающего мел.

Для проведения идентификации изучали морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенных чистых культур [8]. Для выделения чистых культур использовали прямой метод, который основан на снятии дрожжевых клеток с исследуемой поверхности с использованием прозрачного адгезивного материала. Липкой лентой снимали предварительно нанесенную на поверхность объекта тонкую агаровую пленку. Одну полоску ленты с агаром и прикрепившимися к нему дрожжевыми клетками изучали под микроскопом (Биолам-70P-1, ×600) без проращивания, опуская пленки в капли воды на предметном стекле (для улучшения визуализации воду подкрашивали метиленовым синим). Вторую полоску переносили на поверхность питательной среды (сусло-агар со стрептомицином: неохмеленное пивное сусло (8 град. по Баллингу) – 250 мл, агар-агар – 20 г, вода – до 1 л; после стерилизации вносили стрептомицин – 100 ЕД/мл среды) и делали отпечаток, прижимая к поверхности. Чашки с отпечатками инкубировали 5–7 суток при температуре 28 °С. Метод отпечатка позволяет определить плотность грибной контаминации поверхности хлеба и характер распределения дрожжей на поверхности [3].



Для получения чистых культур выделенных штаммов материал с отпечатка пересевали на сусло-агар со стрептомицином, а свойства чистых культур изучали при выращивании в разбавленном солодовом сусле (3 град. по Баллингу) и на сусло-агаре, приготовленном по стандартным прописям [1, 7]. Инкубацию проводили на протяжении 15 суток [3]. Для идентификации всех выделенных штаммов использовали тесты на способность сбрасывать углеводы (глюкоза, рамноза, целобиоза, галактоза, сахароза, мальтоза, лактоза, трегалоза, мелибиоза, инулин) и расти в присутствии этанола [3, 8].

Для подтверждения роли в развитии меловой болезни, выделенные штаммы тестировали путем нанесения суспензии (1×10^9 КОЕ/мл) на поверхность хлебного мякиша изделия из ржаной муки: 1 мл суспензии дрожжевых клеток наносили на хлеб возле корки, давая свободно растечься и впитаться. Инкубировали при температуре 28 °С 5 дней в полиэтиленовых пакетах [5], с третьего дня осуществляя ежедневный контроль роста. Появление крошковатого мелового роста считали подтверждением роли выделенного штамма в развитии меловой болезни хлеба. Исследования проводили в четырехкратной повторности. Визуальное наблюдение за проявлением повреждений на поверхности хлеба позволило условно разделить повреждения в результате контаминации на сильные и слабые. Под слабыми повреждениями имели в виду появление крошковатого налета по размеру примерно соответствующему зоне растекания нанесенной суспензии, а сильными считали проявления с выходом роста гриба за пределы зоны растекания.

Результаты исследований

Всего из обследованных образцов хлеба было выделено 28 штаммов микроорганизмов, среди которых было определено 4 типа отличающихся по своим морфологическим признакам.

При микроскопии материала снятого на пластинку агара во всех случаях отмечено присутствие тесно прилегающих друг к другу клеток во всем поле зрения. При рассмотрении пророщенного отпечатка пораженного мякиша на сусло-агаре со стрептомицином было выявлено 4 различных морфотипа роста (табл. 1).

Для морфотипа 1 при росте на сусло-агаре было характерно образование серо-белых матовых колоний диаметром до 4–5 мм, округлой формы с ровным краем, выпуклых. Рост на жидкой среде имел характер легкого помутнения с образованием небольшого осадка. Установлена способность расти в жидкой среде с глюкозой, целобиозой, сахарозой и мальтозой и в присутствии этанола. Рост в жидкой среде с рамнозой, галактозой, лактозой, мелибиозой и инулином не отмечали, что характерно для представителей рода *Saccharomycopsis* [5, 6, 8].

Культуры, отнесенные к морфотипу 2, на сусло-агаре образовывали блестящие розовато-серые колонии диаметром до 6 мм. Форма колоний округлая, край – волнистый; профиль – плоский. При росте в жидком солодовом сусле отмечали его легкое помутнение и образование крупного серо-коричневого осадка. Отмечали рост культур в жидкой среде с целобиозой и трегалозой.



Роста не было в жидкой среде с лактозой, галактозой, сахарозой, мальтозой, мелибиозой и инулином. В присутствии этанола роста также не было. Подобные признаки характерны для представителей рода *Sporobolomyces* [5, 6, 8].

Таблица 1

Морфологические признаки выделенных возбудителей меловой болезни

Table 1

Morphological characteristics of isolated lime disease pathogens

| Тип | Форма и расположение клеток |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 (n=16) | Овальные, продолговатые клетки. Материнские и дочерние клетки образуют цепочки |
| 2 (n=7) | Крупные клетки округлой или овальной формы, располагаются поодиночке или попарно, образуют хаотичные скопления |
| 3 (n=4) | Округлые, расположенные поодиночке клетки |
| 4 (n=1) | Клетки овальной формы, образующие ветвящиеся цепочки, почкующиеся на концах |

При посеве на твердую питательную среду культур, отнесенных к морфотипу 3, отмечали образование грязно-белых матовых колоний диаметром до 5 мм. Колонии бугристые, округлой формы с волнистым краем. При засеве в жидкое солодовое сусло отмечали значительное помутнение, а на поверхности образовалась тонкая грязно-белая пленка, на дне пробирки обнаруживался небольшой осадок. Выявляли рост на жидкой среде с глюкозой, сахарозой, целобиозой, галактозой, мальтозой и трегалозой. Роста не было на жидкой среде с рамнозой, лактозой, мелибиозой и инулином. Единственная культура, отнесенная к морфотипу 4, на сусло-агаре образовывала блестящие бежевые с желтизной колонии диаметром до 3 мм. Форма колоний круглая, край ровный, колонии выпуклые. При росте на жидком солодовом сусле отмечали значительное помутнение с формированием осадка и небольшим пристеночным ростом у поверхности. Выявляли рост на жидких средах с глюкозой, целобиозой, сахарозой, галактозой, мальтозой, трегалозой и в присутствии этанола. Рост не выявляли на жидкой среде с рамнозой, мелибиозой и инулином. Культуры морфотипов 3 и 4 отнесены к роду *Huiphopichia*.

Таким образом, проведенная идентификация показала наличие 3 возбудителей меловой болезни на хлебобулочных изделиях, изготовленных из муки разных видов (табл. 2).

Анализ частоты встречаемости контаминации указанными грибами различных видов продукции показал, что представители всех трех родов микроорганизмов вызывали меловую болезнь хлеба из обоих типов муки. Больше количество случаев выявления контаминации имело место на хлебе из ржаной

муки (общая доля образцов хлеба из которой составляла 71,4 %), что косвенно может свидетельствовать о большей подверженности к контаминации хлеба из ржаных сортов муки. Рост 4 морфотипа был выявлен в единственном случае на образце хлеба, содержащем фрукты (черный хлеб с курагой и изюмом), что позволяет предположить контаминацию хлебного изделия через сухофрукты.

Таблица 2

**Частота встречаемости грибов-контаминантов
в зависимости от типа муки**

Table 2

Occurrence frequency of yeasts-contaminants depending on the type of flour

| Тип муки | Микроорганизм | | |
|----------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|
| | <i>Saccharomycopsis</i> | <i>Sporobolomyces</i> | <i>Hyphopichia</i> |
| Пшеничная, n=8 | 2 | 2 | 4 |
| Ржаная, n=20 | 14 | 5 | 1 |

Для всех выделенных штаммов были проведены исследования для подтверждения их роли как контаминантов хлебобулочных изделий (табл. 3).

Таблица 3

Характеристика проявлений признаков меловой болезни хлеба из ржаной муки

Table 3

Characteristic of lime disease symptoms of bread made of rye flour

| Признаки болезни | Микроорганизм | | |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|
| | <i>Saccharomycopsis</i> | <i>Sporobolomyces</i> | <i>Hyphopichia</i> |
| Крупные очаги на мякише (зона роста более 1 см), налет на корке | 1 | 4 | - |
| Очаги только на мякише | 2 | 1 | - |
| Очаги только на корке | 4 | - | 1 |
| Слабое проявление признаков (зона роста менее 5 мм) | 9 | 2 | 4 |

Установлено, что все выделенные штаммы вызывали появление признаков меловой болезни хлеба, что подтверждает их роль как контаминантов. Выявлено, что только 5 из 28 штаммов (17,9 %) вызывали сильное проявление



признаков болезни хлеба. Большинство штаммов (15/ 53,5 %) вызывали слабые проявления признаков. Для остальных штаммов выявлены одиночные признаки только на мякише (10,7 %) или только на корке (17,9 %).

Анализ данных характера поражения, приведенный в табл. 3, показал, что из исследуемых штаммов наиболее сильные признаки меловой болезни хлеба вызвали культуры представителей рода *Sporobolomyces*, 57,1 % штаммов которого провоцировали появление крупных очагов поражения. Для культур представителей родов *Saccharomycopsis* и *Huiphovichia* выявлены преимущественно слабые проявления признаков болезни, что указывает на сложности в выявлении поражения хлеба этими возбудителями в производственных условиях и своевременное снятие товара с реализации.

Таким образом, исследованиями установлено, что из 28 образцов хлебо-булочной продукции с признаками меловой болезни 57,1 % было контаминировано представителями рода *Saccharomycopsis*, 25,0 % – *Sporobolomyces*, 17,9 % – *Huiphovichia*; частота контаминации хлебобулочных изделий выше среди изделий из ржаной муки – 71,4 % образцов; экспериментальное контаминирование выделенными штаммами хлеба из ржаной муки позволило установить, что зона роста при внесении суспензии клеток для 17,9 % штаммов составила более 1 см в диаметре, а для 53,5 % штаммов зона роста не превышала 5 мм в диаметре; определено, что 57,1 % штаммов *Sporobolomyces* провоцировали появление очагов поражения хлеба с диаметром более 1 см, что указывает на наибольшую значимость этого микроорганизма в порче хлебной продукции.

УДК 579.674: 664.66.019

І.Б. Висотіна, О.С. Воронкова, А.І. Вінніков

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

МОНІТОРИНГ ГРИБІВ – КОНТАМІНАНТІВ ХЛІБОБУЛОЧНИХ ВИРОБІВ

Реферат

Мета. Визначити збудників крейдяної хвороби хліба. **Методи.** Мікробіологічні – для визначення грибної контамінації хлібобулочних виробів з ознаками ураження хліба шляхом опису морфологічних ознак хвороби, вивчення мікроскопічної картини і проведення культуральних досліджень. **Результати.** Встановлено, що найчастіше контамінація хліба була викликана представниками роду *Saccharomycopsis* (57,1 % випадків), також виявляли види родів *Sporobolomyces* (25,0 %) і *Huiphovichia* (17,9 %). Експериментальна контамінація виділеними штамами показала, що тільки у 17,9 % випадків зона росту гриба перевищувала 1 см у діаметрі, а в 53,5 % – вона була менше за 5 мм. Для 57,1 % штампів *Sporobolomyces* при експериментальній контамінації хлібобулочних виробів зона росту перевищувала 1 см. Нанесення суспензій клітин культур інших виділених контамінантів також призводило до появи ознак крейдяної хвороби, але зона росту не перевищувала 5 мм. **Висновки.** При відборі матеріалу для досліджень



було встановлено, що грибна контамінація в більшості випадків спостерігається серед виробів з житнього борошна (71,4%). Переважними контамінантами були види роду *Saccharomycopsis* (57,1% випадків). Зона росту гриба більше 1 см в діаметрі при експериментальному зараженні виявлена тільки у 17,9% випадків, що потенційно вказує на складність ефективного розпізнавання контамінованої продукції у виробничих умовах і вимагає розробки заходів щодо попередження поширення збудників хвороб хліба.

Ключові слова: крейджана хвороба, хліб, контамінація, дріжджові гриби.

УДК 579.674: 664.66.019

I.B. Vysotina, O.S. Voronkova, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarin avenue, Dnepropetrovsk, 49050, Ukraine, e-mail: irafarma@mail.ru

MONITORING OF YEASTS CAUSED BAKERY PRODUCTS CONTAMINATION

Summary

Aim. The aim of the research was to determine the contaminants of bread, caused lime disease. **Methods.** Microbiological methods were used to determine the yeast contamination of bakery products with signs of bread's disease by describing the morphological signs of the contamination, there were also used the microscopy and cultural study. **The results.** It was found, that in the most cases the contamination was caused by the species of genus *Saccharomycopsis* (57.1% of cases), the species of genera *Sporobolomyces* (25.0%) and *Hyphopichia* (17.9%) were isolated as well. The experimental contamination with the isolated strains showed that only in 17.9% of cases zone of fungal growth was more than 1 cm in diameter, and in 53.5% of cases it was less than 5 mm. 57.1% of *Sporobolomyces* strains in experimental contamination of bakery products caused the formation of the growth zone with more than 1 cm in diameter. Application of cell suspension of other isolated contaminants cultures also led to the manifestation of the lime disease signs, but the growth zone did not exceed 5 mm. **Conclusions.** During the selection of material for the research, it was found that in most cases the fungal contamination took place among the products of rye flour (71.4%). The preferred contaminants were species of genus *Saccharomycopsis* (57.1% cases). In the experimental infection the fungal growth zone of more than 1 cm in diameter was found only in 17.9% of cases. That potentially indicates the complexity of the effective recognition of contaminated products in production environment and demands the development of measures to prevent the spread of pathogens of bread diseases.

Keywords: lime disease, bread, contamination, yeasts.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ауэрман Л. Я. Технология хлебопекарного производства. – СПб.: Профессия, 2009. – 416 с.
2. Афанасьева О. В. Микробиология хлебопекарного производства. – СПб.: Береста, 2003. – 220 с.
3. Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 120 с.
4. Блекберн К. де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов / К. де В. Блекберн (ред.). Пер с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
5. Красникова Л. В., Савкина О. А., Машкин Д. В. Возбудители меловой болезни хлебобулочных изделий // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия Процессы и аппараты пищевых производств. – 2011. – № 2 (12). – С. 123–130.
6. Красникова Л. В., Кострова И. Е., Машкин Д. В. Микробиологические процессы при производстве хлеба, кондитерских и макаронных изделий. – СПб.: СПбГУНиПТ, 2007. – 132 с.
7. Матвеева И. В., Белявская И. Г. Биотехнологические основы приготовления хлеба. – М: Делипринт, 2001. – 150 с.
8. *The Yeasts: A taxonomic study* (5th ed.) / ed. C. P. Kurtzman, J. W. Fell, T. Boekhout. – San Diego: Elsevier, 2011. – 2384 p. Режим доступа: [<https://books.google.ca/books>].

Стаття надійшла до редакції 11.06.2015 р.



УДК 578.001.53

**Т.В. Затовська¹, Н.В. Нестерова¹, Г.В. Баранова¹,
С.Л. Рибалко², С.Д. Загородня¹**

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел. +38 (044) 526 61 68, e-mail: svetazagorodnya@ukr.net

²Інститут епідеміології та інфекційних захворювань імені Л.В. Громашевського АМН України,
вул. М. Амосова, 5, Київ 03680, Україна,
тел. +38(044) 275 83 00, e-mail: y_Dasha@ukr.net

ДЕТЕКЦІЯ СПЕЦИФІЧНИХ АНТИТІЛ ДО ВПГ-1 ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИЧНОГО БІОСЕНСОРА

Мета. Дослідити можливість використання оптоелектронного біосенсора «Плазмон-6» на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для детекції специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу (ВПГ-1). **Методи.** ВПГ-1 накопичували в культурі епітеліальних клітин нирки теляти MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) та очищали шляхом диференційного центрифугування в градієнті щільності хлористого цезію. Наявність вірусних білків перевіряли методом електрофорезу в поліакриламідному гелі. Вірусні білки наносили на поверхню біочипу, попередньо модифіковану декстраном. Відбір сироваток крові людей здійснювали методом ІФА з використанням тест-систем «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, США) «HSV-1 IgG ELISA» (Вектор-Бест, Росія). Біосенсорний аналіз проводили на оптоелектронному спектрометрі «Плазмон-6». **Результати.** Одержано концентрований препарат білків ВПГ-1 і показано, що нанесення білків у кількості 8×10^{-5} мг/мм² було оптимальним для виявлення антитіл до ВПГ-1. На біочипах було протестовано 10 негативних до ВПГ-1 сироваток крові донорів для визначення меж позитивного і негативного відгуку. Проведено порівняльний аналіз 25 сироваток крові хворих на наявність антитіл до ВПГ-1 методами ІФА і ППР. Збіг за обома методами був у 24 з 25 випадків. **Висновки.** В результаті проведених досліджень показано, що імуносенсорний аналіз з використанням приладу «Плазмон-6» дозволяє виявляти специфічні антитіла до ВПГ-1 в сироватках крові хворих на рівні з традиційними підходами.

Ключові слова: ППР-аналіз, біочип, антитіла до ВПГ-1.

Представники родини *Herpesviridae*, котрим притаманна як гостра, так і персистуюча форма розвитку інфекції, є одними з найпоширеніших серед патогенних для людини вірусів, зокрема, вірус простого герпесу 1-го типу (ВПГ-1). Інфікування людини цим вірусом проявляється у вигляді пухирців навколо губ або носа. ВПГ-1 має тропізм до нервової тканини і може викликати як гострі, так і хронічні захворювання центральної та периферійної нервової системи і бути причиною таких захворювань як енцефаломієліти, арахно-енцефаліти, полінейропатії та ін. [3, 5]. За даними ВООЗ захворювання, що

© Т.В. Затовська, Н.В. Нестерова, Г.В. Баранова, С.Л. Рибалко, С.Д. Загородня, 2015



спричинюються вірусами простого герпесу, посідають друге місце (15,8 %) після грипу як причина смерті від вірусних інфекцій. Сучасні методи діагностики даного захворювання базуються на імунохімічних методах (ІФА, МФА) та молекулярно-біологічних (ПЛР). Останнім часом все більшого значення для діагностики захворювань, спричинених вірусами та бактеріями, набуває застосування оптичних біосенсорів [1, 13].

Після того, як наприкінці минулого сторіччя на світовому ринку з'явився перший серійний оптичний біосенсор, який дозволив з високою точністю реєструвати в реальному часі взаємодію макромолекул, багато дослідників стали використовувати його у біохімічних, фармакологічних і медичних цілях. В Україні в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАНУ створені оптоелектронні спектрометри на основі явища ППР серії «Плазмон», які успішно використовуються українськими дослідниками у галузі біології та медицини, а саме, для дослідження білок-білкових взаємодій в системі гемостазу крові людини і для розробки експрес-методу ранньої діагностики загрози тромбоутворення при захворюваннях серцево-судинної системи [8], для ранньої діагностики розвитку пухлин [9], виявлення антитіл проти вірусу лейкозу в сироватках молока великої рогатої худоби [7]. Суттєвими перевагами біосенсорного аналізу є те, що він не потребує будь-якої мітки, виконується за короткий проміжок часу, характеризується високою чутливістю [12]. У зв'язку з цим дослідження, направлені на використання методу ППР для розробки діагностикуму, який дозволить виявляти інфекцію, спричинену ВПГ-1, є досить актуальними. Метою даної роботи було дослідження можливості використання оптоелектронного біосенсора «Плазмон-6» на основі ППР для детекції специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу в сироватках крові людей.

Матеріали і методи

Вірус простого герпесу 1 типу (штам УС) був отриманий з Інституту антивірусної хіміотерапії Центру клінічної та теоретичної медицини (Німеччина). Для очистки вірусу використовували надосадову рідину з культури епітеліальних клітин MDBK, наданої Інститутом органічної хімії з центром фітохімії Болгарської академії наук. ВПГ-1 очищували за стандартною методикою в градієнті щільності CsCl з наступною дезінтеграцією вірусу для вивільнення капсидних білків [2]. Наявність вірусних білків в очищеному препараті визначали методом електрофорезу у 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію (ДСН) за стандартною методикою Laemmli [10]. Молекулярні маси білків виходили за допомогою програми Total Lab (версія 2.1). Концентрацію білка у вірусному препараті визначали за допомогою спектрофотометра «DeNovix DS-11» (Німеччина). Специфічну активність антигену виявляли непрямим твердофазним імуноферментним аналізом [4] із застосуванням комерційної сироватки до ВПГ-1 («Дакко», Данія).

В роботі були використані 25 сироваток крові хворих, отриманих з клінічної лікарні м. Києва, і 10 сироваток крові донорів.



Імуноферментний аналіз сироваток крові з використанням комерційних тест-системи «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, США) і «HSV-1 IgG ELISA» (Вектор-Бест, Росія) проводили за інструкцією виробника. Його результати слугували контролем достовірності результатів, отриманих за допомогою оптичного біосенсора. Підготовку біочипів і біосенсорний аналіз проводили як описано нами раніше [6]. Дослідження виконували на двоканальному оптоелектронному ППР-спектрометрі «Плазмон-6». Статистичну обробку виконували за стандартною методикою, використовуючи програму Origin 7.0.

Результати та обговорення

Для виявлення антитіл до ВПГ-1 у сироватках крові людей як антиген використовували вірусні білки, очищені з накопиченого в культурі клітин вірусу. Наявність вірусних білків і чистоту отриманого препарату характеризували за допомогою електрофорезу в ПААГ з ДСН (рис. 1). На електрофореграмі було виявлено білкові смуги, які за розрахованими молекулярними масами відповідали білкам ВПГ-1 з молекулярними масами: 175 кДа, 155 кДа, 132 кДа, 126 кДа, 112–118 кДа, 88 кДа, 80 кДа, 74 кДа, 59 кДа, 48 кДа, 44 кДа, 33 і 30 кДа, описаними в літературі [11]. Концентрація білка в одержаному препараті становила 8 мг/мл. Для підтвердження специфічної активності очищених вірусних білків проводили непрямий твердофазний імуноферментний аналіз з комерційною сироваткою до ВПГ-1. Позитивний результат спостерігався навіть при розведенні препарату 1:12000, що свідчить про високий вміст білків вірусу та їх відповідність ВПГ-1.

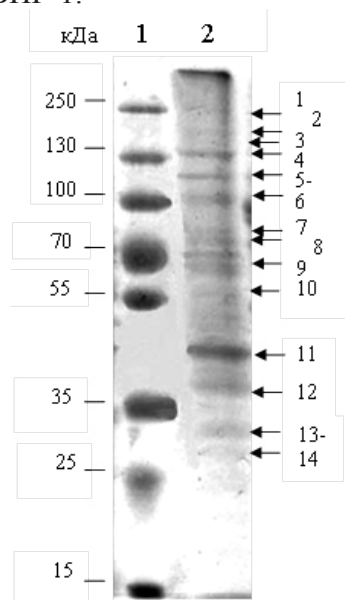


Рис. 1. Електрофореграма білків очищеного препарату ВПГ-1
(1 – маркери молекулярної маси ; 2 – препарат ВПГ-1)

Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified preparation of HSV-1
(1 – MW markers, 2 – purified preparation of HSV-1)

Таким чином, було отримано та охарактеризовано концентрований препарат білків ВПГ-1, який використовували як антиген для виявлення в сироватках крові специфічних антитіл до даного вірусу методом ППР.

При розробці імуносенсорного біочипа проводили іммобілізацію вірусних білків на його поверхні з попереднім нанесенням 0,2 % розчину декстрана 17 000 (Sigma) як полімерної основи. Спостерігали зростання резонансного відгуку на позитивну в імуноферментному аналізі сироватку та відсутність реакції з негативною сироваткою. Типова сенсограма біосенсорного аналізу представлена на рис. 2.

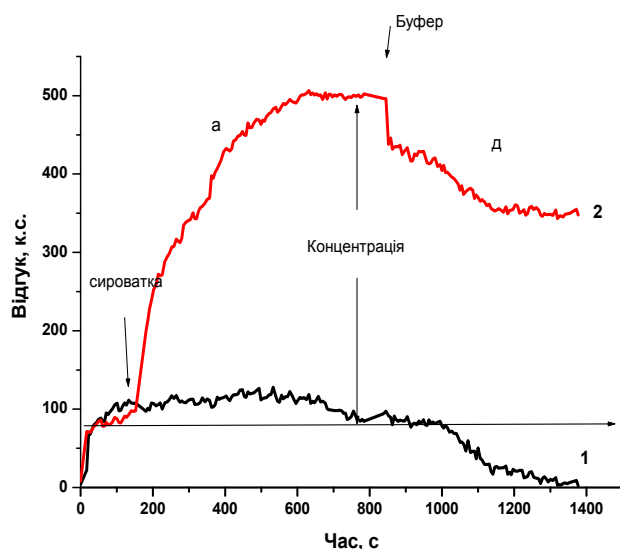


Рис. 2. Типова сенсограма, яка відображує кінетику міжмолекулярного зв'язку іммобілізованих вірусних білків (антигену) з антитілами позитивної (1) і негативної (2) сироваток.

Фаза (а) відповідає процесу асоціації при контакті антитіл сироватки з іммобілізованим антигеном, фаза (д) відповідає процесу дисоціації, після заміни сироваток у протоці на цитратний буфер. К. с. – кутові секунди.

Fig. 2. Typical sensogram is showing the kinetics of intermolecular bonds of immobilized viral proteins with antibodies of positive (1) and negative (2) sera.

Phase (a) corresponds to the association process during contact of serum antibodies with immobilized antigen, phase (d) corresponds to the dissociation process after replacement of serum in the cell by citrate buffer. A. s. – angle seconds.

Отримані таким чином біочипи використовували в контрольних експериментах по виявленню специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу в сироватках крові людей.

Щоб підібрати оптимальну концентрацію антигену для аналізу сироваток, вірусний препарат наносили на біочипи у декількох розведеннях в інтервалі 1:4000–1:500. Було виявлено прямий зв'язок між концентрацією вірусного матеріалу і отриманим відгуком на позитивну в імуноферментному аналізі сироватку (Рис. 3).

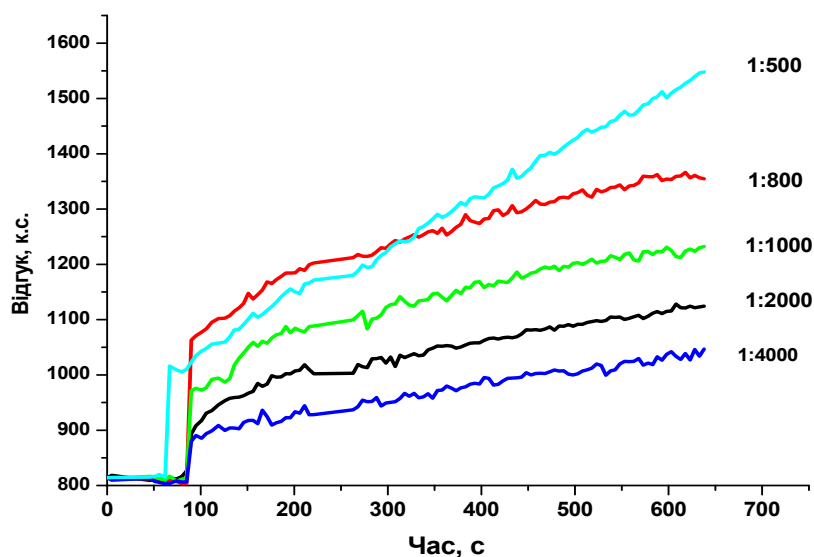


Рис. 3. Криві залежності відгуку на позитивну сироватку від концентрації іммобілізованого антигена

Fig. 3. Dependence of response on positive serum from concentration of immobilized antigen

Максимальний відгук на позитивну сироватку спостерігався при розведенні 1:500, що відповідає концентрації 8×10^{-5} мг/мм² вірусних білків на поверхні біочипа. Використання розчину антигену у вищій концентрації не призвело до значного підвищення відгуку на позитивну сироватку. При додаванні негативної сироватки не спостерігалось залежності відгуку від концентрації антигену. Ці результати свідчать про специфічність зв'язку іммобілізованих на біочипі білків ВПГ-1 з антитілами сироватки крові.

Для дослідження можливості застосування створених біочипів для виявлення антитіл до ВПГ-1 у сироватках крові хворих, проводили порівняльний аналіз сироваток методами ППР та імуоферментного аналізу.

З метою визначення меж позитивного і негативного відгуку в біосенсорному аналізі було протестовано 10 сироваток крові донорів, які за результатами ІФА були негативними до ВПГ-1. За отриманими результатами вираховували середнє значення і стандартне відхилення. З цих значень було вираховано граничне значення для даної серії біочипів, яке становило $185 \text{ к.с.} \pm 65 \text{ к.с.}$ (середнє значення плюс два стандартних відхилення). Відповідно, сироватки, які при ППР-аналізі мали значення відгуку більше ніж 250 к.с., вважалися позитивними, а сироватки, що давали відгук менше 250 к.с., – негативними. Результати аналізу 25 сироваток крові хворих, які за даними імуоферментного аналізу мали високий титр антитіл до ВПГ-1 наведені в таблиці 1 (для кожної сироватки проводили 4-кратне вимірювання).

Дослідження сироваток крові людей на вміст антитіл до ВПГ-1 імунохімічним та імуносенсорним методами

Table 1

Investigation of human blood sera on the content of antibodies to HSV-1 by the immunochemical and immunosensor methods

| № | Результат ППР (к.с. – кутові секунди) | Результат ІФА (ОО – оптичні одиниці) |
|----|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 367 к.с. | 0,569 |
| 2 | 312 к.с. | 0,588 |
| 3 | 339 к.с. | 0,587 |
| 4 | 518 к.с. | 0,667 |
| 5 | 549 к.с. | 0,711 |
| 6 | 427 к.с. | 0,640 |
| 7 | 547 к.с. | 0,806 |
| 8 | 476 к.с. | 0,808 |
| 9 | 460 к.с. | 0,723 |
| 10 | 863 к.с. | 1,050 |
| 11 | 564 к.с. | 0,823 |
| 12 | 839 к.с. | 0,95 |
| 13 | 598 к.с. | 0,652 |
| 14 | 371 к.с. | 0,542 |
| 15 | 383 к.с. | 0,514 |
| 16 | 447 к.с. | 0,587 |
| 17 | 589 к.с. | 0,705 |
| 18 | 721 к.с. | 0,910 |
| 19 | 837 к.с. | 1,286 |
| 20 | 696 к.с. | 0,819 |
| 21 | 1264 к.с. | 1,414 |
| 22 | 452 к.с. | 0,669 |
| 23 | 225 к.с. | 0,417 |
| 24 | 718 к.с. | 0,842 |
| 25 | 348 к.с. | 0,497 |



Встановлено, що 24 з 25 сироваток хворих, позитивних за результатами імуноферментного аналізу, були позитивними і при тестуванні методом ППР. Одна сироватка (№ 23) була негативною за результатами аналізу ППР, але позитивною за даними ІФА. Одержані дані свідчать про великий відсоток співпадання результатів (96 %) аналізу методами ІФА та ППР, що підтверджує можливість використання оптоелектронного пристрою «Плазмон-б» для виявлення специфічних антитіл до вірусу простого герпесу 1 типу.

Таким чином, в результаті проведених досліджень одержані біочипи з сорбованими на декстрановій основі сумарними білками вірусу простого герпесу 1-го типу та встановлено їх оптимальну концентрацію для детекції антитіл. Проведений аналіз клінічних зразків (25 сироваток крові хворих) за допомогою оптоелектронного ППР-спектрометра «Плазмон-б» дозволяє стверджувати про здатність одержаного імуносенсорного чипа виявляти специфічні антитіла до ВПГ-1 в сироватках крові людей, оскільки співвідношення результатів класичного методу ІФА та ППР аналізу становить 96 %. У попередні роки нами були проведені дослідження, які довели можливість застосування ППР-спектрометра «Плазмон-б» в медицині для діагностики аденовірусної і ВЕБ-інфекцій [6]. Даними дослідженнями ми розширюємо спектр використання цього приладу для детекції вірусних патогенів, шкідливих для здоров'я людини.

Т.В. Заговская¹, Н.В. Нестерова¹, Г.В. Баранова¹,
С.Л. Рыбалко², С.Д. Загородня¹

¹Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, ул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,

тел.: +38 (044) 526 61 38, e-mail: svetazagorodnya@ukr.net

²Інститут епідеміології та інфекційних захворювань

імені Л. В. Громашевського АМН України, ул. Амосова, 5, Київ, 03680, Україна, тел.: +38(044) 275 83 00, e-mail: y_Dasha@ukr.net

ДЕТЕКЦИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ВПГ-1 С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА

Реферат

Цель. Исследовать возможность использования оптоэлектронного биосенсора «Плазмон-б» на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) для детекции специфических антител к вирусу простого герпеса 1 типа (ВПГ-1).

Методы. ВПГ-1 накапливали в культуре эпителиальных клеток почки теленка MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) и очищали путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности CsCl. Наличие вирусных белков проверяли методом электрофореза в полиакриламидном геле. Вирусные белки наносили на поверхность биочипа, предварительно модифицированную декстраном. Отбор сывороток крови людей осуществляли методом ИФА с использованием тест-систем «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, США) и «HSV-1 IgG ELISA» (Вектор-Бест, Россия). Биосенсорный анализ выполняли на оптоэлектронном спектрометре «Плазмон-б». **Результаты.** Получен концентрированный препарат белков ВПГ-1 и показано, что нанесение на чип белков в количестве 8×10^{-5} мг/мм² было оптимальным для детекции антител к ВПГ-1. На биочип-



пах было протестировано 10 отрицательных к ВПГ-1 сывороток крови для определения границ положительного и отрицательного отклика. Проведен сравнительный анализ методами ИФА и ППР 25 сывороток крови больных на присутствие антител к ВПГ-1. Совпадение по результатам ППР-анализа и ИФА было в 24 из 25 случаев. **Выводы.** В результате проведенных исследований показано, что иммуносенсорный анализ с использованием прибора «Плазмон-6» позволяет выявлять специфические антитела к ВПГ-1 в сыворотках крови больных на уровне с традиционными подходами.

Ключевые слова: ППР-анализ, биочип, антитела к ВПГ-1.

**T.V. Zatovska¹, N.V. Nesterova¹, G.V. Baranova¹,
S.L. Rybalko², S.D. Zagorodnia¹**

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, 154, Zabolotny str., 03143, Kyiv, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 61 38, e-mail: svetazagorodnya@ukr.net

²Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of the Academy of Medical Sciences of Ukraine, 5, Amosova Str., 03038, Kyiv, Ukraine, tel.: +38(044) 275 83 00, e-mail: y_Dasha@ukr.net

DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES TO HSV-1 WITH THE OPTICAL BIOSENSOR

Summary

Aim. To investigate the possibility of using the optoelectronic biosensor «Plasmon-6» based on surface plasmon resonance (SPR) for detection of specific antibodies to herpes simplex virus type 1 (HSV-1). **Methods.** HSV-1 was propagated in MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) cell culture and was purified by differential centrifugation in cesium chloride density gradient. The presence of viral proteins was tested by polyacrylamide gel electrophoresis. Viral proteins were applied on the biochip surface pre-modified by dextran. Selection of human blood sera was performed by ELISA using the test systems «HSV-1 IgG ELISA» (GenWay, USA) and «HSV-1 IgG ELISA» (Vector-Best, Russia). Biosensor analysis was carried out on the optoelectronic spectrometer «Plasmon-6». **Results.** Concentrated preparation of HSV-1 proteins was obtained. It was shown that application of viral proteins at 8×10^{-5} mg / mm² was optimal for detection of antibodies against HSV-1. 10 negative to HSV-1 blood sera of donors have been tested on biochips to determine the limits of positive and negative response. The comparative analysis of 25 blood sera of the patients for detection the antibodies to HSV-1 was carried out by ELISA and SPR methods. The coincidence of the results of SPR-analysis and ELISA was in 24 of 25 cases. **Conclusion.** As a result of carried out investigations there were shown that immunosensor analysis using the device «Plasmon-6» as well as traditional approaches allowed to detect specific antibodies to HSV-1 in blood sera.

Key words: SPR analysis, biochip, antibodies to HSV-1.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Болтовец П. М., Нестерова Н. В. Застосування методу поверхневого плазмонного резонансу у вірусологічних дослідженнях // Мікробіол. журн. – 2006. – 68, № 3. – С. 86–98.
2. Вирусология. Методы / Под ред. Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – 344 с.
3. Гервазиева В.Б., Самойликов П. В. Взаимодействие вирусов семейства *Herpesviridae* с иммунной системой человека // Аллергология и иммунология. – 2010. – 11, № 1. – С. 31–41.
4. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: – Высшая Школа, 1991. – 288 с.
5. Исаков В. А., Борисова В. В., Исаков Д. В. Герпес. Патогенез и лабораторная диагностика. – СПб.: – издательство «Лань», 1999. – 192 с.
6. Нестерова Н. В., Рыбалко С. Л., Загородня С. Д., Баранова Г.В., Головань А. В. Иммуносенсорная тест-система для выявления антител к вирусу Эпштейна-Барр // Биотехнология. – 2012. – 5, № 1. – С. 100–105.
7. Пирогова Л. В., Стародуб М. Ф., Нагаева Л.И. Визначення рівня антитіл проти вірусу лейкозу в сироватці молока великої рогатої худоби за допомогою імунного сенсора // Укр. Біохім. журн. – 2005. – 77, № 2. – С. 166–168.
8. Урвант Л. П., Макогоненко Є.М., Березницький Г.К., Луговська Н.Е., Луговської Е.В., Пидюра М.О., Позняк Т.А., Сторожилова Н.С., Комісаренко С.В. Відщеплення фібринопептиду А викликає структурні перебудови в 118-134 ділянці В β -ланцюга молекули фібрин (оген) у // Доп. Нац. Акад. Наук України. – 2012. – № 7. – С. 170–175.
9. Gridina N., Dorozinsky G., Khristosenko R., Maslov V., Samoylov A., Ushenin Yu., Shirshov Yu. Surface plasmon resonance biosensor // Sensors & Transducers. – 2013. – 149, № 2. – P. 60–68.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.
11. Loret S., Guay G., Lippé R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions // J. Virol. – 2008. – 82, № 17. – P. 8605–8618.
12. Piliarik M., Vaisocherova H., Homola J. Surface plasmon resonance biosensing // Meth. Mol. Biol. – 2009. – 503. – P. 65–68.
13. Rebecca L. Caygill, Blair G.E., Millner P.A. A review on viral biosensors to detect human pathogens // Anal. Chim. Acta. – 2010. – 681, № 1–2. – P. 8–15.

Стаття надійшла до редакції 23.06.2015 р.



А.С. Семенець, Н.Ю. Водзінська, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

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

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS 502 ЗА ПРИСУТНОСТІ ЕКЗОГЕННОГО НІЗИНА

Мета роботи: встановити вплив екзогенного нізина на формування біоплівки *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502 та вміст полісахаридів в її матриксі.

Матеріали та методи. як тест-мікроорганізм використовували штамп бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502, що був отриманий з колекції мікроорганізмів Білоруського державного технологічного університету. Як джерело нізина використовували комерційний препарат Nisaplin® (Sigma-Aldrich Co.), що містив 2,5 % чистого нізина. Кінцеві концентрації нізина, що вивчались у даній роботі, становили 0,025–250 нг/мл. Культивування проводили при 30 °C впродовж 48 годин у середовищі ТДЕС в 48-лункових плоскодонних пласкетках Nuclon. Кількість планктонних клітин оцінювали спектрофотометрично, масу біоплівки – за методом забарвлення кристалічним фіолетовим, вміст полісахаридів у матриксі – за методом забарвлення конго червоним. **Результати.** В системі планктон–біоплівка нізин у концентраціях вищих за 62,5 нг/мл чинить виражену інгібувальну дію на утворення біоплівки та вміст полісахаридів в матриксі. За концентрацій аутоіндуктора 125 і 250 нг/мл маса біоплівки становила лише 11 % та 7 % від контролю, а рівень полісахаридів в матриксі знижувався у 3,6 та 8,3 рази, відповідно. Планктонні клітини виявилися менш чутливими до дії нізина: за двох найбільших з досліджених концентрацій їх вміст складав 60 % від контролю. Стимулюючий ефект аутоіндуктора спостерігався в узькому діапазоні концентрацій. Маса біоплівки зростала в 1,6 рази за присутності нізина в концентрації 2,5 нг/мл. Вміст полісахаридів у матриксі збільшувався на 20–24 % за концентрацій аутоіндуктора 2,5–12,5 нг/мл. **Висновки.** Отримані результати дозволяють припустити, що високі концентрації нізина інгібують сенсорну киназу NisK, що, у свою чергу, перешкоджає активації генів системи кворуму *L. lactis*.

Ключові слова: *Lactococcus lactis*, нізин, біоплівка, екзополісахариди

Нізин є поліциклічним антибактеріальним пептидом, який синтезується численними штамми бактерії *Lactococcus lactis* і широко застосовується як харчовий консервант [10, 14]. На відміну від інших бактеріоцинів, що виявляють антимікробну дію тільки щодо близькоспоріднених видів, цей лантибіотик ефективний проти багатьох грампозитивних бактерій: лістерій, стафілоко-



ков, бацил, клостридій [7–9]. Біоінженерні аналоги нізина пригнічують ріст грамнегативних мікроорганізмів. Крім того, нізин є аутоіндуктором системи quorum sensing у *L. lactis* [2, 11, 12]. Позаклітинний пептид зв'язується з сенсорною кіназою NisK, внаслідок чого вона активується і фосфорилує білок-регулятор. Активований білок-регулятор набуває полімеразної активності та викликає експресію генів системи кворуму [7, 12]. Під контролем системи quorum sensing знаходиться біосинтез власних сигнальних молекул, численних факторів патогенності та низки вторинних метаболітів бактерій [1, 12, 13]. Важливим наслідком активації системи кворуму є утворення біоплівки, у складі яких мікроорганізми придбають важливі для виживання якості: стійкість до несприятливих факторів довкілля та антимікробних препаратів. З практичної точки зору розробка підходів до контролю (як негативного так і позитивного) формування біоплівки є актуальним завданням. Так у біотехнології використання процесу формування біоплівки дозволяє значно підвищити вихід корисних продуктів мікробного синтезу [1, 14, 15], зокрема, розробляються біоплівкові реактори для отримання нізина. У той же час, у медичній практиці утворення біоплівки умовно-патогенними мікроорганізмами призводить до значного ускладнення терапії інфекційних захворювань. У ряді робіт була продемонстрована здатність нізина сповільнювати, або пригнічувати утворення біоплівки деякими грампозитивними бактеріями [6,9,13]. Однак відомостей щодо його впливу на цей процес у *L. lactis* немає. Тому метою роботи було встановлення впливу екзогенного нізина на формування біоплівки *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502 та вміст полісахаридів в її матриці.

Матеріали та методи

У роботі як тест-мікроорганізм використовували штам бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502, що був отриманий з колекції мікроорганізмів Білоруського державного технологічного університету.

Як джерело нізина використовували комерційний препарат Nisaplin® (Sigma-Aldrich Co.), що містив 2,5 % чистого нізина. Стокові розчини препарату готували на основі стерильного розчину 0,02 N HCl, які зберігали при температурі 4 °C. Кінцеві концентрації нізина, що вивчались у даній роботі, становили 0,025–250 нг/мл.

Культивування штаму проводили на середовищі ТДЕС, яке містило у 1 л: глюкозу – 10 г; триптон – 15 г; дріжджовий екстракт – 5 г; KH_2PO_4 – 2 г; $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,035 г.

Добову культуру *L. lactis*, вирощену на скошеному щільному середовищі ТДЕС в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином і визначали вміст клітин спектрофотометрично. Отриману суспензію розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації 2×10^4 кл/мл. В стерильні 48-лункові плоскодонні планшети Nuclon вносили по 1 мл середовища ТДЕС у кожну лунку. Після цього у лунки додавали по 50 мкл суспензії мікроорганізму. Таким чином, кінцева концентрація клітин дорівнювала 1×10^3 кл/мл. Далі до усіх до-



слідних лунок додавали по 20 мкл відповідного стокового розчину нізіна, а у контрольні лунки – по 20 мкл стерильного розчину 0,02 N HCl [11]. Інкубацію проводили при температурі 30 °C впродовж 48 годин. По закінченні терміну інкубації з кожної лунки ретельно відбирали планктонну культуру і переносили в інший планшет та вимірювали її оптичну густину на спектрофотометрі «μQuant» BioTek (Угорщина) при довжині хвилі 540 нм.

Біоплівку у планшетах тричі відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96 % етанолом впродовж 10 хв. Після фіксації зразки висушували та забарвлювали 1% водним розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Біоплівку у планшетах після 24-годинного висушування при кімнатній температурі розчиняли у 0,1 M NaOH, що містив 1% додецилсульфату натрію. Облік результатів здійснювали на спектрофотометрі «μQuant» BioTek при довжині хвилі 592 нм, що відповідає максимуму поглинання використаного барвника: [13].

Метод визначення вмісту полісахаридів базується на здатності барвника конго червоного зв'язуватися з полісахаридами матриксу біоплівки. Біоплівку *L. lactis* відмивали та фіксували, як описано у попередній методиці. Після фіксації зразки висушували та забарвлювали 1% водним розчином конго червоного впродовж 5 хв. Після висушування у лунки додавали лізуючий розчин та залишали на 1,5 годин. Облік результатів проводили на спектрофотометрі «μQuant» BioTek при довжині хвилі 490 нм [29].

Всі експерименти проводили у 3 незалежних дослідах з 6 повторами у кожному.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S_{\bar{x}}$). Вірогідність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

Дослідження властивостей штаму *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 502 показало, що він є продуцентом нізіна. Дводобова культуральна рідина після видалення клітин лактококу та доведення рН до 6,5 виявляла антимікробну дію у відношенні *Micrococcus luteus*. Діаметр зони затримки росту становив $23,4 \pm 1,8$ мм (неопубліковані власні результати). Штам виявився здатним формувати біоплівку на поверхні лунок плоскодонних планшетів. На рис. 1 наведені фотографії біоплівки *L. lactis*, забарвленої кристалічним фіолетовим (а), який зв'язується як з клітинами, так і з матриксом біоплівки, а також конго червоним (б), який виявляє полісахариди матриксу.

Як свідчать фотографії, досліджуваний штам *L. lactis* утворює міцну біоплівку, яка, як і полісахариди матриксу, рівномірно покриває поверхню лунок. На рис. 1а видно мікроколонії, занурені у матрикс.



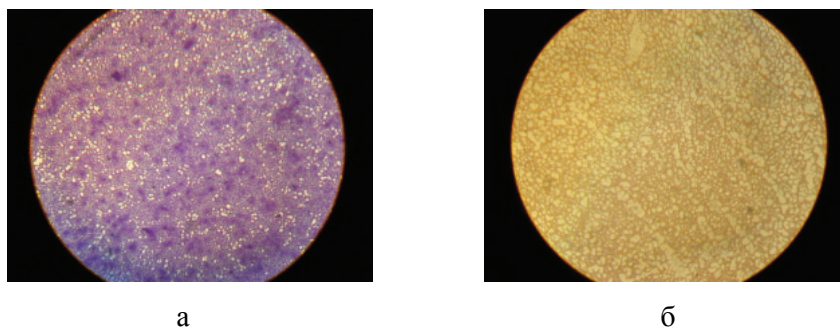


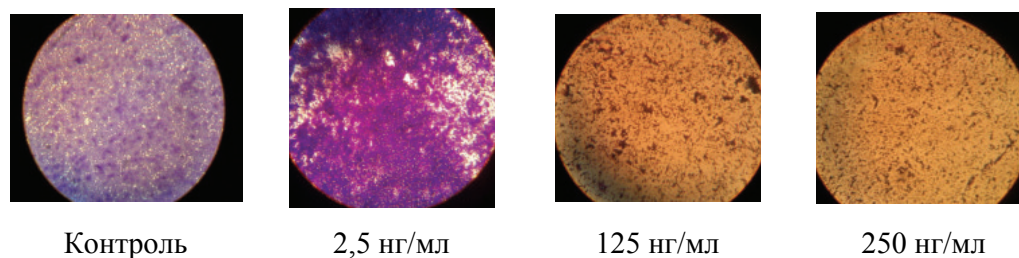
Рис. 1. Загальний вигляд біоплівки *L. lactis* під мікроскопом ($\times 400$)

а – забарвлення кристалічним фіолетовим; б – забарвлення конго червоним

Fig. 1. General view of *L. lactis* biofilms under the microscope ($\times 400$)

a – crystal violet staining; b – congo red staining

Культивування *L. lactis subsp. lactis* 502 у присутності різних концентрацій екзогенного нізіна виявило різноспрямовану дію лантибіотику на формування біоплівки (рис. 2).



Контроль 2,5 нг/мл 125 нг/мл 250 нг/мл

Рис. 2. Загальний вигляд біоплівки *L. lactis*, сформованої за різних концентрацій нізіна ($\times 400$, забарвлення кристалічним фіолетовим)

Fig. 2. General view of *L. lactis* biofilms, formed by different concentrations of nisin ($\times 400$; crystal violet staining)

Так, за впливу 2,5 нг/мл нізіна формується більш міцна у порівнянні з контролем біоплівка, в якій спостерігається злиття окремих мікроколоній. У той же час, на два порядки вищі концентрації нізіна суттєво пригнічують утворення біоплівки. За вмісту у середовищі 125 нг/мл лантибіотику у складі біоплівки присутні лише окремі мікроколонії і майже не видно матриксу. Найвища з досліджених концентрацій (250 нг/мл) повністю запобігає формуванню мікроколоній і біоплівка представлена окремими адгезованими до поверхні клітинами та дуже тонким шаром матриксу.

Кількісна оцінка маси біоплівок, що утворювалися *L. lactis* за впливу різних концентрацій нізіна, наведена на рис. 3. Отримані результати виявили, що у присутності 2,5 нг/мл маса біоплівки в 1,6 рази перевищує контрольне значення. Починаючи з концентрації 62,5 нг/мл відбувається пропорційне вмісту нізіна зменшення маси біоплівки. За 125 та 250 мг/мл вона складає лише 11 % та 7 % від контрольного рівня.



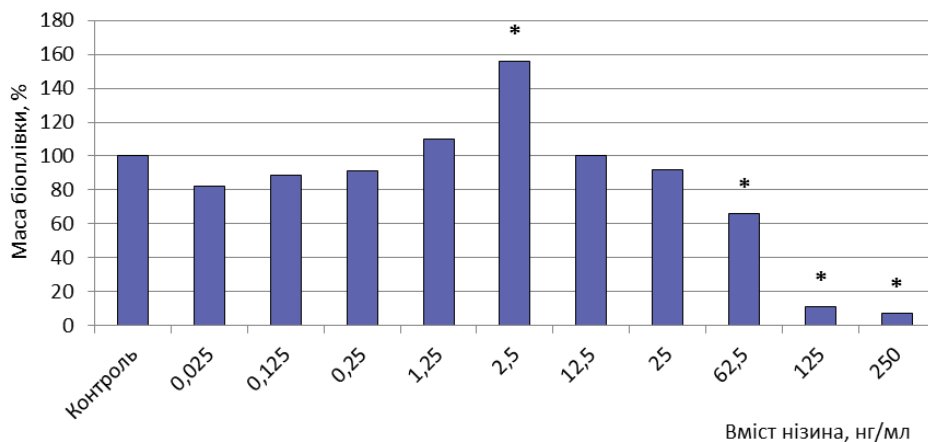


Рис. 3. Вплив різних концентрацій нізина на масу біоплівки *L. lactis*,

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 3. The effect of different concentrations of nisin on *L. lactis* biofilms weight

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

Такі ж самі закономірності виявлені при дослідженні вмісту полісахаридів у матриці біоплівок (рис. 4). Він збільшувався на 20–24 % за концентрацій аутоіндуктора 2,5–12,5 нг/мл, але різко знижувався (у 3,6 та 8,3 рази) за концентрацій нізину 125 і 250 нг/мл, відповідно.

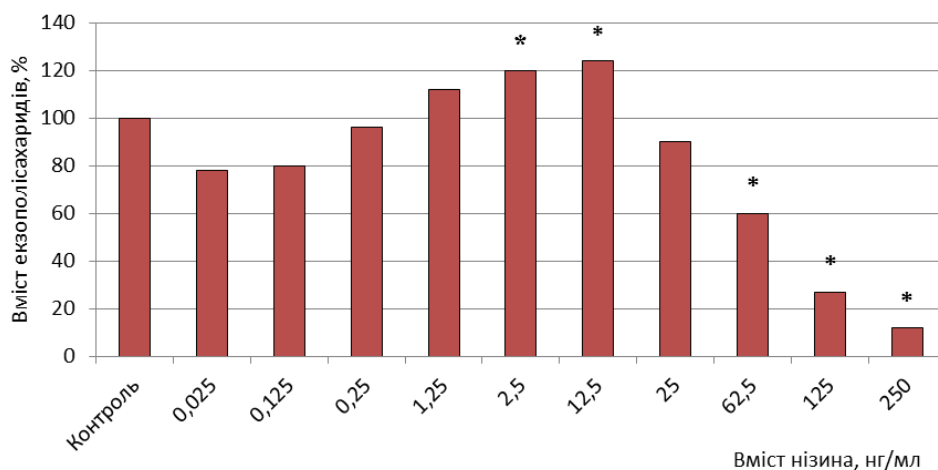


Рис. 4. Вплив різних концентрацій нізина на вміст полісахаридів в матриці біоплівки *L. lactis*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 4. The effect of different concentrations of nisin on polysaccharides content in *L. lactis* biofilms matrix

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

Планктонні клітини виявилися менш чутливими до дії нізіна: за двох найбільших з досліджених концентрацій їх вміст складав 60 % від контролю. Інші концентрації аутоіндуктора значних змін не викликали (рис. 5).

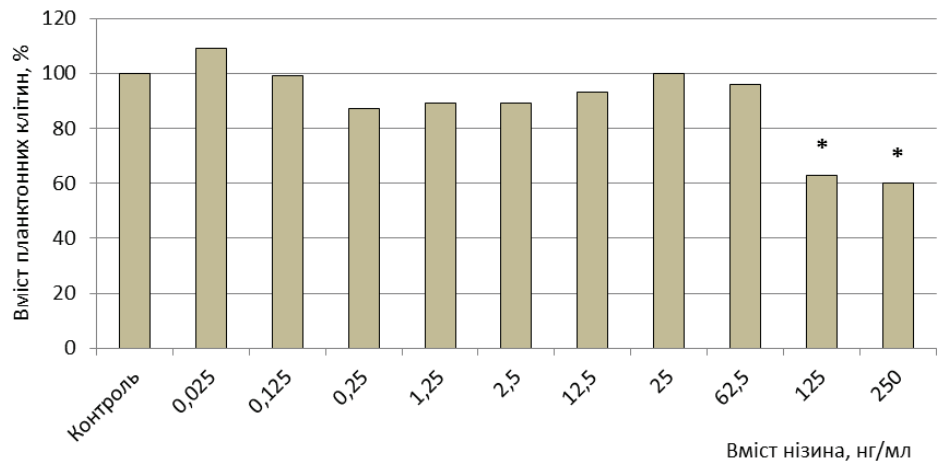


Рис. 5. Вплив різних концентрацій нізіна на вміст планктонних клітин *L. lactis*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 5. The effect of different concentrations of nisin on the content of *L. lactis* planktonic cells

Note: * – distinctions are reliable as compared to control

Таким чином, проведене дослідження показало, що нізін може здійснювати різноспрямований вплив на *L. lactis*, який є продуцентом цього лантибіотику. Стимулюючий ефект на утворення біоплівки та синтез екзополісахаридів спостерігається у вузькому діапазоні концентрацій нізіна в середовищі – 2,5–12,5 нг/мл. Разом з тим, вперше встановлено, що нізін здатний пригнічувати утворення біоплівки не тільки умовно-патогенними бактеріями [7–9], але і власним продуцентом. У діапазоні концентрацій 62,5–250 нг/мл аутоіндуктор суттєво знижує масу біоплівки і вміст екзополісахаридів. Незначний вплив нізину на вміст планктонних клітин дає можливість припустити його переважну дію на систему кворуму, яка відповідає, зокрема, за формування біоплівки. Можна припустити, що за найбільших з використаних концентрацій нізіна відбувається інгібування сенсорної кінази NisK, що, в свою чергу, блокує активацію генів системи кворуму [11, 12]. Слід також зазначити, що для визначення механізмів виявленого характеру дії нізіна необхідним є проведення подальших досліджень, які дозволять розробити науково обґрунтовані підходи до його використання у біотехнології, харчової промисловості, медицині та ветеринарії.

А. С. Семенец, Н. Ю. Водзинська, Б. Н. Галкин, Т. О. Филиппова

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

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ *LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS 502* В ПРИСУТСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО НИЗИНА

Реферат

Цель работы: установить влияние экзогенного низина на формирование биопленки *Lactococcus lactis subsp. lactis 502* и содержание полисахаридов в ее матриксе. **Материалы и методы.** В качестве тест-микроорганизма использовали штамм бактерии *Lactococcus lactis subsp. lactis 502*, который был получен из коллекции микроорганизмов Белорусского государственного технологического университета. Источником низина служил коммерческий препарат Nisaplin® (Sigma-Aldrich Co.), содержащий 2,5 % чистого низина. Конечные концентрации низина, изучавшиеся в данной работе, составляли 0,025–250 нг/мл. Культивирование проводили при 30 °С в течение 48 часов в среде ТДЕС в 48-луночных плоскодонных планшетах Nislon. Количество планктонных клеток оценивали спектрофотометрически, массу биопленки – по методу окраски кристаллическим фиолетовым, содержание полисахаридов в матриксе – по методу окраски конго красным. **Результаты.** В системе планктон-биопленка низин в концентрациях, превышающих 62,5 нг/мл, оказывает выраженное ингибирующее действие на образование биопленки и содержание полисахаридов в матриксе. При концентрации аутоиндуктора 125 и 250 нг/мл масса биопленки составляла лишь 11 % и 7 % от контроля, а уровень полисахаридов в матриксе снижался в 3,6 и 8,3 раза, соответственно. Планктонные клетки оказались менее чувствительными к действию низина при двух наибольших из исследованных концентраций их содержание составляло 60 % от контроля. Стимулирующий эффект аутоиндуктора наблюдался в узком диапазоне концентраций. Масса биопленки возрастала в 1,6 раза в присутствии низина в концентрации 2,5 нг/мл. Содержание полисахаридов в матриксе увеличивалось на 20–24 % при концентрации аутоиндуктора 2,5–12,5 нг/мл. **Выводы.** Полученные результаты позволяют предположить, что высокие концентрации низина ингибируют сенсорную киназу NisK, что, в свою очередь, препятствует активации генов системы кворума *L. lactis*.

Ключевые слова: *Lactococcus lactis*, низин, биопленка, экзополисахариды.

A. S. Semenets, N. S. Vodsinska, B. M. Galkin, T. O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

BIOFILM FORMATION *LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS 502* IN PRESENCE OF EXOGENOUS NISIN

Summary

Aim: Discovery of the exogenous nisin action on biofilm formation and matrix polysaccharides content in *Lactococcus lactis subsp. lactis 502*. **Materials and**



methods. As test there were organism used bacteria of strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 502 received from the collection of microorganisms of Belarussian State Technological University. Commercial preparation Nisaplin (Sigma-Aldrich Co.), containing 2.5 % of pure nisin was used as a source of nisin. The final concentration of nisin was 0.025–250 ng/ml. The cultivation was carried 48 hours at 30 °C in TDES medium in 48-well flat-bottomed plates Nuclon. The number of the planktonic cells was assessed spectrophotometrically. The biofilms were stained with crystal violet. The matrix polysaccharides were stained with congo red. **Results.** Nisin in concentrations exceeding 62.5 ng/ml has a pronounced inhibitory effect on biofilm formation and polysaccharide content in the matrix. When autoinducer concentrations were 125 and 250 ng/ml biofilm mass were only 11 % and 7 % compared to control and the level of polysaccharide in the matrix decreased by 3.6 and 8.3 times, respectively, in the presence of 125 and 250 ng/ml of nisin. Planktonic cells were less sensitive to the action of nisin. In the presence of two highest concentrations of the autoinducers their content was 60 % from control. The stimulatory effect of nisin was observed over a narrow range of concentrations. Biofilm weight increased 1.6-fold in the presence of nisin at the concentration of 2.5 ng/ml. The content of polysaccharides in the matrix increased by 20–24 % at the concentration of autoinducer 2.5–12.5 ng/ml. **Conclusion.** The obtained results suggest that high concentrations of nisin inhibit sensory kinase NisK, that, in turn, prevents gene activation of genes of quorum system *L. lactis*.

Key words: *Lactococcus lactis*, nisin, biofilm exopolysaccharides.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Образование биопленок – пример «социального» поведения бактерий / Романова Ю. М., Смирнова Т. А., Андреев А. Л. и др. // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 556–561.
2. Шнаков А. О. Пептидные аутоиндукторы бактерий // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 3. – С. 291–303.
3. Brown S., Johnstone R. Cooperation in the dark: signalling and collective action in quorum-sensing bacteria // Proc. R. Soc. Lond. B. – 2001. – Vol. 268. – P. 961–965.
4. Caplice E., Fitzgerald G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation // Int. J. Food Microbiol. – 1999. – Vol. 50. – P. 131–149.
5. Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. – 1999. – V. 284. – P. 1318–1322.
6. Klaenhammer T., Altermann E., Arigoni F. et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics // Antonie Leeuwenhoek. – 2002. – Vol. 82. – P. 29–58.
7. Guder A., Wiedemann I., Sahl H. Posttranslationally modified bacteriocins – the lantibiotics // Biopolymers. – 2000. – Vol. 55. – P. 62–73.
8. Bryan E. M., Bae T., Kleerebezem M. et al. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria // Plasmid. – 2000. – Vol. 44. – P. 183–190.



9. Kim W. S., Hall R. J., Dunn N. W. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1998. – Vol. 50, 4. – P. 429–433
10. Mozzi F., Raya R. R., Vignolo G. M. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. – John Wiley and Sons, 2010. – 393 p.
11. Parsek M., Greenberg E. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms // Trends Microbiol. – 2005. – Vol. 13. – P. 27–33.
12. Quadri L. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria // Antonie van Leeuwenhoek – 2002. Vol. 82. – P. 133–145.
13. Swift S., Vaughan E., de Vos W. M. Quorum sensing within the gut ecosystem // Microbial Ecol. Health Dis. – 2000. – Vol. 12. – P. 81–92.
14. Mahdavi M., Jalali M., Kermanshahi R. et al. The effect of nisin on biofilm forming foodborne bacteria using microtiter plate method // Research in Pharmaceutical Sciences. – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 113–118.
15. Welman A. D., Maddox I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges // Trends in Biotechnology – 2003. – V. 21. – P. 269–274.

Стаття надійшла 08.08.2015 р.



УДК 631.461.7+579.695

Л.С. Дорош, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: +38(097) 990 07 98,
e-mail: Dorosh_lilya@ukr.net

ВПЛИВ НІТРАТУ НА СУЛЬФІДОГЕННУ АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ *DESULFOMICROBIUM SP. CRR3*

*Метою цієї роботи було дослідити вплив нітрату на ефективність відновлення сульфату і нагромадження гідроген сульфіду бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Методи. Об'єктом дослідження були хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Вплив нітрату на сульфідогенну активність бактерій визначали за зміною біомаси та концентрації сульфату, нітрату, нітриту, амонію та гідроген сульфіду в культуральному середовищі. Результати. За внесення у середовище 5 мМ нітрату спостерігали пригнічення сульфатредукції на 40 % у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Із збільшенням концентрації нітрату до 10 мМ відбувається повне пригнічення сульфатредукції. Висновки. Одержані результати свідчать про те, що нітрат у високих концентраціях пригнічує сульфатредукцію у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3*.*

Ключові слова: нітрат, сульфідогенна активність, сульфатвідновлювальні бактерії.

Окиснення органічних речовин та відновлення сульфату мікроорганізмами в процесах анаеробного дихання відіграє важливу роль у мінералізації цих сполук в природі. Однак, при цьому утворюється гідроген сульфід, що має неприємний запах та виявляє токсичну, мутагенну та канцерогенну дії. Він також знижує вміст оксигеновмісних сполук у водоймах [4]. При нафтовидобуванні в результаті взаємодії гідроген сульфіду з йонами важких металів утворюються сульфіди – нерозчинні сполуки, які знижують нафтовіддачу пластів [9]. Пригнічення сульфідогенної активності сульфатвідновлювальних бактерій може бути одним із способів зниження рівня гідроген сульфіду у навколишньому середовищі.

Для пригнічення сульфідогенної активності найчастіше застосовують інгібітори сульфатредукції та біомодифікатори [6].

Інгібітори сульфатредукції специфічно конкурують з йонами сульфату за активний центр АТФ-сульфурилази, в результаті чого утворюється нестабільний комплекс АМФ-сульфат, що швидко гідролізується до АМФ та сульфату. Повторні реакції з інгібітором приводять до виснаження запасу АТФ для активації сульфатів, що в кінцевому результаті призводить до пригнічення росту сульфатвідновлювальних бактерій. Крім того, інгібітори сульфатредукції пригнічують

© Л.С. Дорош, Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь, 2015



транспорт сульфату в клітини бактерій. До інгібіторів належать антрахінони, хромати, селенати, молібдат [6] та інші. Відомо, що останній спричиняє дисбаланс запасів АТФ у клітині *Desulfovibrio sp.* [10].

До біомодифікаторів належать нітрат [6] та нітрит [15], які можуть використовуватися деякими бактеріями як альтернативні акцептори електронів [14]. Дія нітрату та нітриту синергічна [6, 15]. За високої концентрації нітрату сульфатвідновлювальні бактерії можуть використовувати їх як акцептори електронів [2]. Концентрація біомодифікаторів для пригнічення утворення гідроген сульфідів залежить від вмісту джерела карбону в середовищі та інших чинників [6, 15].

Метою цієї роботи було дослідити вплив нітрату на ефективність відновлення сульфату і нагромадження гідроген сульфідів бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

Матеріали та методи

У роботі використовували хромрезистентні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* [3].

Бактерії культивували у середовищі Постгейта С за температури 30 °С у пробірках об'ємом 25 мл за анаеробних умов. Анаеробні умови забезпечували кип'ятінням та швидким охолодженням середовища культивування, що призводить до зменшення в ньому розчинного кисню, а також додаванням аскорбінової кислоти чи Na_2S . Пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками [13].

Біомасу визначали фотометрично на фотоелектроколориметрі КФК-3 за мутністю клітинної суспензії.

Вміст сульфату визначали турбідиметрично після його осадження барій хлоридом з утворенням барій сульфату. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [14].

Кількість гідроген сульфідів у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням з *n*-амінодиметиланіліндигідрохлориду. У результаті взаємодії гідроген сульфідів з *n*-амінодиметиланілін-дигідрохлоридом утворюється комплексна сполука синього кольору [16].

Вміст нітриту визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм з використанням *n*-нафтилетилендіаміндихлориду. Метод ґрунтується на діазотуванні сульфанілової кислоти нітритами і взаємодії утвореної солі з *n*-нафтилетилендіаміндихлоридом. Нітрат визначали після визначення концентрації нітриту методом діазотування. Як відновник використовували цинковий порошок [7].

Концентрацію амонію визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 640 нм. Метод ґрунтується на утворенні індофенолу голубого кольору в результаті взаємодії амонію, фенолу та гіпохлориту за високого значення рН [8].

Вплив нітрату на сульфідогенну активність бактерій визначали за зміною біомаси та концентрації сульфатів, нітрату і нітриту у культуральному середовищі, а також за зміною кількості гідроген сульфідів.



Результати наводили як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми «Origin 6.1».

Результати і обговорення

Сульфатвідновлювальні бактерії можуть використовувати різні оксоаніони як акцептори електронів за анаеробного окиснення органічних сполук [2]. Виходячи з цього спочатку дослідили використання нітрату як єдиного акцептора електронів при окисненні лактату (рис. 1, Б), контролем при цьому було середовище, у якому акцептором електронів був сульфат (рис. 1, А).

Дані рис. 1 показують, що ріст і використання сульфату та нітрату бактеріями *Desulfomicrobium* sp. CrR3 відрізнялися незначно. Біомаса бактерій, вирощених у середовищі з сульфатом, становила 2,4 г/л, тоді як з нітратом – 3 г/л. У середовищі з сульфатами нагромаджується гідроген сульфід у концентрації 4 мМ, а нітратами – амоній (6 мМ). У процесі нітратредукції утворюється нітрит у концентрації 2 мМ, який практично повністю вичерпується після 4 діб культивування.

Результати досліджень свідчать про здатність бактерій *Desulfomicrobium* sp. CrR3 використовувати нітрат і сульфат як акцептори електронів.

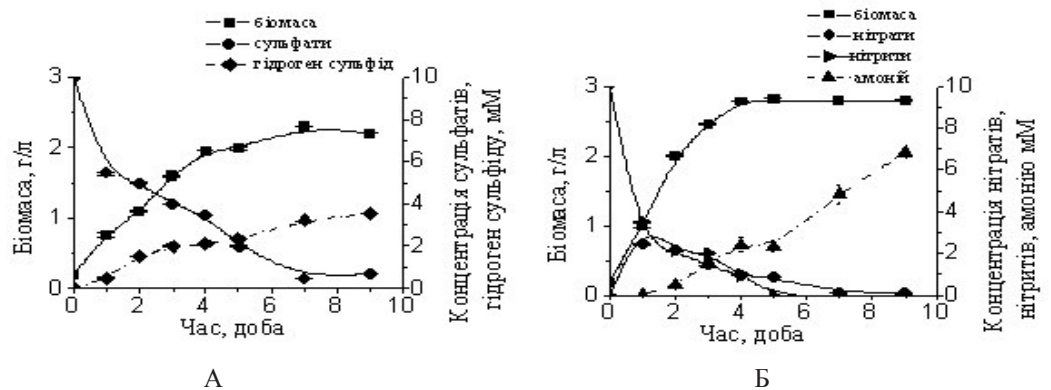


Рис. 1. Ріст *Desulfomicrobium* sp. CrR3 у середовищі з лактатом (як донором електронів) за внесення сульфату (А) та нітрату (Б) як кінцевих акцепторів електронів

Fig. 1. The growth of *Desulfomicrobium* sp. CrR3 in the medium with lactate (as electron donors), with the addition sulfate (A) and nitrate (B) as terminal electron acceptors

У природних умовах забруднення середовища відбувається, як правило, багатьма токсичними сполуками одночасно, забруднювачами найчастіше бувають нітрат, нітрит, хромати, молібдати, солі важких металів тощо. Цікаво було дослідити як відбувається використання різних можливих акцепторів електронів за їхньої одночасної присутності в середовищі. Результати досліджень, представлені у табл. 1, свідчать про те, що за одночасної наявності у



середовищі сульфату і нітрату інтенсивніше використовується нітрат (100 % використання нітрату на 8 добу культивування). За наявності у середовищі 10 мМ нітрату та сульфату одночасно ефективність використання сульфату бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* знижується на 50 %. За цих умов у середовищі нагромаджується близько 2 мМ гідроген сульфід, що удвічі менш порівняно з контрольними показниками (рис. 1, А, табл. 1).

Таблиця 1

Ріст та використання сульфату і нітрату бактеріями
Desulfomicrobium sp. CrR3 за їхньої одночасної наявності у середовищі

Table 1

The growth and utilization of sulfate and nitrate by bacteria
Desulfomicrobium sp. CrR3 at their simultaneous presence in the medium

| Час, доба | Біомаса, г/л | Сульфат, мМ | Гідроген сульфід, мМ | ЕВ* SO ₄ ²⁻ , % | Нітрат, мМ | Нітрит, мМ | Амоній, мМ | ЕВ NO ₃ ⁻ , % |
|-----------|--------------|-------------|----------------------|---------------------------------------|------------|------------|------------|-------------------------------------|
| 0 | 0,2 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 0,69±0,08 | 8,44±0,35 | 0 | 15,6 | 5,36±0,25 | 0 | 0,80±0,14 | 46,4 |
| 2 | 1,05±0,07 | 8,31±0,42 | 0,97±0,04 | 16,3 | 4,81±0,31 | 2,51±0,22 | 1,54±0,12 | 51,9 |
| 3 | 1,95±0,12 | 7,35±0,43 | 1,32±0,08 | 16,9 | 3,84±0,22 | 1,96±0,14 | 2,35±0,18 | 61,6 |
| 4 | 2,12±0,10 | 6,04±0,27 | 1,42±0,12 | 39,6 | 2,58±0,18 | 1,31±0,15 | 3,25±0,25 | 74,2 |
| 5 | 2,17±0,13 | 5,32±0,43 | 1,45±0,14 | 46,8 | 2,36±0,25 | 0,32±0,12 | 4,48±0,35 | 76,4 |
| 7 | 2,25±0,02 | 5,21±0,34 | 1,51±0,18 | 47,9 | 0,17±0,05 | 0 | 5,84±0,25 | 98,3 |
| 8 | 2,41±0,12 | 5,45±0,25 | 1,82±0,10 | 45,5 | 0 | 0 | 6,01±0,33 | 100 |
| 9 | 2,12±0,14 | 4,84±0,31 | 1,92±0,14 | 51,6 | 0 | 0 | 0 | 100 |

Примітка: ЕВ* – ефективність використання.

Одержані результати свідчать, про те, що бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* здатні використовувати сульфат- та нітрат одночасно, як бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* DT101 [2], на відміну від бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* CS4, у яких спостерігали повне інгібування нітратредукції за наявності гідроген сульфід, як кінцевого продукту дисиміляційної сульфатредукції [10].

За високих концентрацій нітрату бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* протягом 9 діб культивування не використовували сульфат як акцептор електронів. Про це свідчить характер кривої росту бактерій і вміст сульфату в середовищі. Навіть при вичерпуванні нітрату біомаса бактерій не зростає, не дивлячись на високий вміст сульфату (рис. 2).



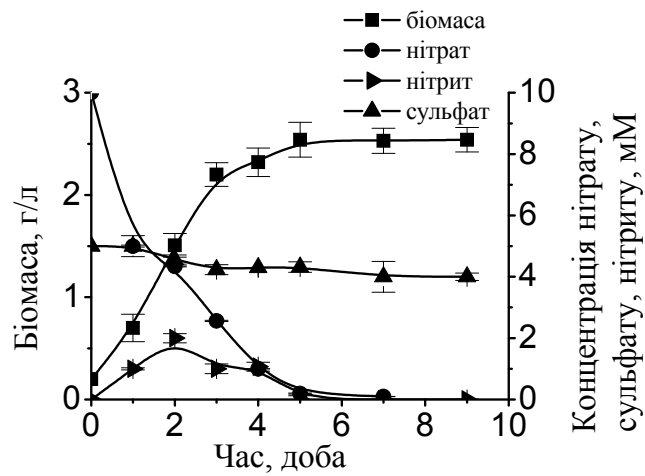


Рис. 2. Ріст та використання сульфату бактеріями *Desulfomicrobium sp. CrR3* за наявності нітрату у середовищі

Fig. 2. The growth and utilization of sulfate by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3* at the presence of nitrate in the medium

Анаеробні сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* здатні використовувати нітрат як акцептори електронів в процесі безкисневого окиснення органічних сполук, що, очевидно, може знайти практичне застосування цих бактерій при очистці середовища від нітрату. Важливим фактором при цьому слід враховувати співвідношення компонентів середовища і в першу чергу акцепторів електронів.

Бактерії *Desulfomicrobium sp. CrR3* здатні до дисиміляційної сульфат-та нітратредукції. Оскільки за культивування їх з сульфатом та нітратом як єдиними акцепторами електронів у середовищі спостерігали нагромадження гідроген сульфід (4 мМ) та амонію (6 мМ), відповідно. При цьому біомаса бактерій зростала до 3 г/л.

За одночасного внесення у середовище 5 мМ нітрату та 10 мМ сульфату спостерігали пригнічення сульфатредукції на 40%. Із збільшенням концентрації нітрату до 10 мМ відбувається повне пригнічення сульфатредукції у бактерій *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

УДК 631.461.7+579.695

Л. С. Дорош, Т. Б. Перетятко, С. П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: +38(097)990 07 98,
e-mail: Dorosh_lilya@ukr.net

ВЛИЯНИЕ НИТРАТА НА СУЛЬФИДОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ *DESULFOMICROBIUM SP. CRR3*

Реферат

Целью этой работы было исследовать влияние нитрата на эффективность восстановления сульфата и накопление сульфида бактериями *Desulfomicrobium sp. CrR3*. **Методы.** Объектом исследования были хромрезистентные сульфатредуцирующие бактерии *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Влияние нитрата на сульфидогенную активность бактерий определяли по изменению биомассы и концентрации сульфата, нитрата, нитрита, аммония и сероводорода в культуральной среде. **Результаты.** При внесении в культуральную среду 5 мМ нитратов наблюдали ингибирование сульфатредукции на 40 %. С увеличением концентрации нитратов до 10 мМ происходит полное подавление сульфатредукции бактериями *Desulfomicrobium sp. CrR3* и роста примерно на 50 % и полное подавление образования сероводорода. **Выводы.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что внесение нитрата подавляет процесс сульфатредукции у бактерий *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

Ключевые слова: нитрат, сульфидогенная активность, сульфатредуцирующие бактерии.

UDC 631.461.7+579.695

L. S. Dorosh, T. B. Peretyatko, S. P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, Lviv, Ukraine
4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +38(097)990 07 98,
e-mail: Dorosh_lilya@ukr.net

INFLUENCE OF NITRATE ON SULFIDOGENIC ACTIVITY OF BACTERIA *DESULFOMICROBIUM SP. CRR3*

Summary

The aim of this work was to study influence of nitrate on the effectivity of sulphate reduction and accumulation of hydrogen sulfide by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*. **Methods.** The object of the study was chromiumresistant sulphate-reducing bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*. Effect of nitrate on sulfidogenic activity of bacteria was determined by the change of biomass and concentration of sulfates, nitrate and hydrogen sulfide in culture medium. **Results.** It was established the influence of nitrate ions on sulfidogenic activity of bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*. 5 mM nitrate in adding culture medium caused the inhibition of sulphate reduction by 40 %. With the increase of nitrate concentrations up to 10 mM the inhibition of sulfate reduction was completely. **Conclusions.** The results indicate that the addition of nitrate caused the inhibition of the dissimilatory sulfate reduction by bacteria *Desulfomicrobium sp. CrR3*.

Key words: nitrate, sulfidogenic activity, sulphate-reducing bacteria.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. *Тарасова Н. Б., Горшков О. В., Петрова О. Е.* Нитратредуктазная активность *Desulfovibrio desulfuricans* ВКМ 1388 // Микробиология. – 2009. – 78, № 2. – С. 192–196.
3. *Шоляк К.В., Перетятко Т.Б., Гудзь С. П.* Хромрезистентні сульфат-відновлювальні бактерії, виділенні із стічних вод промислових підприємств // Микробиологія і біотехнологія. – 2013. – № 2. – С. 66–76.
4. *Bordado J. C.M., Gomes J.F. P.* Emission and odour control in Kraft pulp mills // J. Cleaner Production. – 2003. – № 11. – P. 797–801.
5. *Birkeland N. K.* Sulfate-reducing bacteria and Archaea // **Petroleum microbiology**. ASM Press, Washington. – 2005. – P. 35–54.
6. *Bratcova S., Groudev S., Georgiev P.* The effect of some essential environmental factors on the microbial dissimilatory sulphate reduction // Mining Miner Process. – 2002. – 44, № 2. – P. 123–127.
7. *Granger D. L., Taintor R. R., Boockvar K. S.* Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction // Methods in Enzymology. – 1996. – № 268. – P. 142–151.
8. *Ivančić I., Degobbis D.* An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by the indophenol blue method // Wat. Res. – 1984. – № 18. – P. 1143–1147.
9. *Magot M., Ollivier B., Patel B.* Microbiology of petroleum reservoirs // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2000. – № 77. – P. 103–116.
10. *Marietou A., Griffiths L.* Preferential reduction of the thermodynamically less favorable electron acceptor, sulfate, by nitrate-reducing strain of the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans* 27774 // J. Biol. – 2008. – 191, № 3. – P. 882–889.
11. *Okabe S., Ito T., Satoh H.* Sulphate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – 63. – P. 322–334.
12. *Polanco F.F., Polanco M. F., Uruena M. A., Garcia P.A., Villaverde S.* Combining the biological nitrogen and sulphur cycles in anerobic conditions // Wat. Sci. Tech. – 2001. – 44, № 8. – P. 77–84.
13. *Postgate J. R.* *The sulphate reducing bacteria*. –2nd Edition. Cambridge University Press. Cambridge, 1984. – 1–123 p.
14. *ГОСТ 26426-85.* Почвы. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. – М.:Изд-во стандартов, 1985.
15. *United States Patent № 6309597.* Method for reducing hydrogen sulphide level in water containing sulphate reducing bacteria and hydrogen sulphide metabolizing bacteria / *Ballinger, K.E., Burger, E.D., Knauer, R.F.*, 2001.
16. *United States Patent № 6.340.596.* Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Sugiyama M., 2002.

Стаття надійшла до редакції 21.05.2015 р.



И.В. Пилипенко¹, Я.Б. Паулина¹, Л.Н. Пилипенко¹, А.В. Ямборко²

¹Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина, e-mail: i.pylypenko@mail.ru

²Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

СОСТАВ МИКРОБНЫХ КОНТАМИНАНТОВ ОВОЩНОГО СЫРЬЯ

***Цель.** Выявить и охарактеризовать потенциальных возбудителей пищевых заболеваний, порчи и остаточной микробиоты продуктов промышленной переработки овощного сырья южных областей Украины. **Методы.** Микробиологические – для определения групп микробных контаминантов овощного сырья и идентификации бацилл путем выделения чистых культур и изучения их морфологических, культуральных, биохимических свойств. **Результаты.** По материалам исследования группового состава микробных контаминантов наиболее распространенных видов овощей число мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (МАФАНМ) составляет от $4,6 \times 10^4$ на томатах до $8,4 \times 10^6$ на моркови КОЕ/г, тогда как плесневых грибов насчитывалось от $2,7 \times 10^2$ на перце до $5,2 \times 10^4$ на моркови, дрожжей – от $0,9 \times 10^2$ на кабачках до $1,7 \times 10^5$ КОЕ/г на моркови. Показано, что биоразнообразие микробиоты, вегетирующей на исследованных овощах, составляют преимущественно бактерии с доминированием спорообразующих видов, которые являются потенциальными возбудителями порчи пищевых продуктов. Среди выявленных МАФАНМ бациллы составили от 36 % на перце сорта Виктория до 59 % – на моркови сорта Витаминная 6. Выделено 42 чистые культуры термоустойчивых палочковидных микроорганизмов девяти морфотипов, которые идентифицированы по комплексу морфологических, физиологических, культуральных и биохимических свойств. **Выводы.** Впервые изучен групповой состав эпифитных микроорганизмов различных видов и сортов овощного сырья по количеству МАФАНМ, плесневых грибов, дрожжей. Установлено доминирование на 2–3 порядка МАФАНМ среди исследованных групп микроорганизмов. Для 42 чистых культур выделенных термоустойчивых видов мезофильных бацилл, представленных девятью морфотипами, изучен комплекс биологических свойств, а также приведена количественная характеристика каждого морфотипа, что необходимо для прогнозирования и обеспечения безопасности продукции.*

Ключевые слова: овощное сырье, мезофильные бациллы, микробные контаминанты, видовая идентификация.

При переработке растительного сырья, в частности, при производстве консервов, доброкачественность и безопасность готового продукта зависит от качества перерабатываемого сырья и определяется отсутствием в нем микроорганизмов и их токсинов, опасных для здоровья человека либо изменяющих



его пищевую ценность [1, 2]. В документах Кодекса Алиментариус и ряде директивных – САС/GL 21, докладе Комиссии ЕС, руководстве ЕС 2073/2005, документах Федерального Агентства по пищевым продуктам и лекарственным средствам (США) приведены общие сведения относительно принципов разработки и применения микробиологических критериев для разных видов пищевых продуктов [3–5].

Основным источником микробиологической контаминации большинства овощей является почва, содержащая представителей практически всех известных групп микроорганизмов и включающая по разным сведениям от 10^7 до 10^9 бактериальных клеток в 1 г, среди которых до 60 % приходится на спорообразующие бактерии, а также плесневые грибы разных видов и дрожжи [6].

Поверхностная микробиота овощного сырья характеризуется большим разнообразием и может содержать как сапрофитные, так и патогенные для людей и фитопатогенные микроорганизмы [4, 7]. Разрабатывать режимы технологической переработки, устранять причины, вызывающие микробиологическую недоброкачественность овощной продукции, возможно лишь на основании данных о численности, видовом составе и свойствах микробиоты исходного овощного сырья. Вместе с тем сведения об особенностях состава микробных контаминантов овощей и, в частности, их термоустойчивых видов, для юга Украины отсутствуют.

Цель работы: выявить и охарактеризовать потенциальных возбудителей пищевых заболеваний, порчи и остаточной микробиоты продуктов промышленной переработки овощного сырья южных областей Украины.

Задачи исследования: изучить состав микробных контаминантов отдельных видов и сортов промышленно перерабатываемого овощного сырья; выявить и идентифицировать термоустойчивые виды мезофильных бацилл – потенциальных компонентов остаточной микробиоты термообработанных пищевых продуктов.

Материалы и методы исследования. Исследованию подвергали районированные в Украине и выращенные в Одесской области следующие овощные культуры: морковь (сортов Нантская харьковская, Витаминная 6, Шантенэ сквирская), перец болгарский (сортов Подарок Молдовы, Лумина, Виктория), баклажаны (сортов Смуглянка и Алмаз), томаты (сортов Серпневый, Шедевр), кабачки сорта Одесский 52. Образцы овощей отбирали на сырьевой площадке по стандартизованным правилам отбора средней пробы [8] непосредственно после доставки на переработку, их число указано в табл. 1. Исследование каждого образца проводили в трех повторностях. Для анализа использовали смывы со средней пробы сырья, которые прогревали в течение 20 мин при температуре $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$ для выделения термостойких спорообразующих бактерий. Для учета общего количества бактерий, плесневых грибов и дрожжей смывы не прогревали. Состав микробиоты сырья изучали стандартизованными методами: мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы (МАФАНМ) и грибы учитывали высевом под мясопептонный агар (МПА) и агаризованное сусло (СА) соответственно [2, 8]. Морфологические, тинкто-



риальные, культуральные и биохимические свойства выделенных культур изучали общепринятыми методами по признакам: форма клетки, отношение к окрашиванию по Граму, подвижность, тип дыхания, характер роста на плотных и жидких питательных средах (МПБ, МПА, СА, МПА с добавлением крахмала, нитратов и т. п.); сахаролитические свойства изучали засевом в полужидкие среды Гисса, протеолитические – посевом в молоко, а также под мясоептонный желатин (МПЖ) и уколом в столбик; определение индола – реакцией со щавелевой кислотой, каталазы – реакцией с пероксидом водорода, продукцию ацетона – реакцией с яичным желтком, жировые включения – окрашиванием суданом III, **гранулезу – окрашиванием раствором иода. По комплексу изученных признаков определяли видовую принадлежность выделенных культур [2, 4, 8, 9]. Количественную характеристику устанавливали как долю (%) каждого определенного вида бацилл от их общего числа.**

Результаты и обсуждение

Изучение группового состава контаминантов овощного сырья было ограничено учетом мезофильных бактерий, мицелиальных и немиецелиальных грибов (табл. 1).

Анализ материалов табл. 1 показывает, что среди мезофильных микроорганизмов на изученных видах овощного сырья – моркови, перце, томатах, кабачках и баклажанах, – **преобладают бактерии, что соответствует литературным сведениям [8, 10]. Среди них порчу пищевых продуктов вызывают, как правило, термостойкие бациллы и клостридии, споры которых могут сохраняться после термической обработки. В данной работе внимание было уделено преимущественно группе аэробных бацилл.**

Сопоставление численности бактерий в смывах до и после прогрева показало, что в состоянии спор на исследованном сырье находилась значительная часть мезофильных бактерий – от 36 % на перце сорта Виктория до 59 % на моркови сорта Витаминная 6. Однако, численность спорообразующих бактерий на сырье может превышать полученные значения, т. к. в момент анализа эти же бациллы могли быть и в вегетативном состоянии.

При изучении микробиоты прогретых смывов среди наиболее часто встречающихся на МПА колоний было отобрано 42 культуры, составивших 9 морфотипов или морфогрупп. Описание выделенных бацилл приведено в таблицах 2 и 4.

Таблица 2 представляет описание морфофизиологических и биохимических свойств бацилл, наличие споры в которых не видоизменяет вегетативную клетку, и утилизирующих арабинозу, маннит и ксилозу с кислотообразованием без газа (6 морфотипов). Эти культуры имели следующие общие свойства: палочки среднего размера (0,6–0,8) x (1,5–3,0) – (1,0–1,2) x (3,5–5,0) мкм с эллиптическими спорами, расположенными центрально и не превышающими размера клеток. Все грамположительны. Восемь изолятов обладали выраженной подвижностью в суточной культуре.



Таблица 1

Численность доминирующих групп мезофильной микробиоты сырь

Table 1

Quantity of dominant groups of the raw material mesophilic microbiota

| Вид сырь | n* | Микроорганизмы | | | |
|-------------------------------------|----|-------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------|
| | | МАФАНМ | | Плесневые грибы, КОЕ/г | Дрожжи, КОЕ/г |
| | | Общее количество, КОЕ/г | Бациллы, % от общего числа бактерий | | |
| Морковь, сорт: Нантская харьковская | 8 | $(8,0-8,4) \cdot 10^6$ | 48-56 | $(5,0-5,2) 10^4$ | $(4,2-4,4) 10^4$ |
| Витаминная 6 | 6 | $(7,6-7,9) \cdot 10^5$ | 47-59 | $(4,4-4,6) 10^4$ | $(3,1-3,4) 10^4$ |
| Шантенэ сквирская | 3 | $(2,0-3,0) 10^6$ | 39-49 | $(3,1-3,4) 10^4$ | $(1,7-1,2) 10^5$ |
| Перец, сорт: Подарок Молдовы | 4 | $(6,3-6,4) 10^4$ | 43-48 | $(2,7-2,9) 10^2$ | $(8,9-9,3) 10^2$ |
| Лумина | 2 | $(7,3-7,5) 10^4$ | 39-47 | $(8,9-9,2) 10^2$ | $(9,1-9,3) 10^2$ |
| Виктория | 3 | $(6,1-6,3) 10^4$ | 36-39 | $(4,0-4,3) 10^2$ | $(3,6-3,9) 10^2$ |
| Баклажаны, сорт: Смуглянка | 5 | $(4,0-4,2) 10^5$ | 44-48 | $(9,0-9,3) 10^2$ | $(1,2-1,4) 10^2$ |
| Алмаз | 4 | $(2,8-3,1) 10^5$ | 37-48 | $(1,0-1,2) 10^3$ | $(1,8-2,2) 10^2$ |
| Кабачки, сорт Одесский 52 | 3 | $(0,2-1,0) 10^5$ | 47-52 | $(2,2-2,5) 10^3$ | $(0,9-1,2) 10^2$ |
| Томаты, сорт: Серпневый | 6 | $(2,2-3,4) 10^5$ | 41-48 | $(2,8-3,2) 10^3$ | $(2,3-2,5) 10^2$ |
| Шедевр | 2 | $(4,6-5,0) 10^4$ | 42-49 | $(2,3-3,0) 10^3$ | $(1,8-2,0) 10^2$ |

Примечание: n* – число образцов

Note: n* – number of samples



Всем культурам присущ аэробный тип дыхания, но 14 из них проявляли также способность к росту на МПА в анаэробных условиях. Из других общих свойств все изолированные культуры с разной степенью интенсивности проявляли способность к разжижению желатина, гидролизу казеина, ассимиляции глюкозы, лактозы, сахарозы с образованием кислоты без выделения газа, но только 18 из них развивались на средах с маннитом, ксилозой или арабинозой. Они же не образовывали ацетоина (отрицательная реакция Фогеса-Проскауэра) и индола. К расщеплению тирозина способность выявлена у 10 выделенных культур, для одной она не была установлена достоверно. За исключением двух изолятов все восстанавливали нитраты до нитритов. Четыре культуры проявляли лецитиназную активность.

Таблица 2

Характеристика кислотообразующих бацилл овощного сыра

Table 2

Description of the acid-forming bacilli of vegetable raw material

| Показатели | Свойства бацилл по морфотипам | | | | | |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| | I | II | III | IV | V | VI |
| Число изолятов, взятых для идентификации | 8 | 6 | 2 | 4 | 4 | 2 |
| Размеры клеток, мкм | (0,7-0,8) x (2,0-3,0) | (0,6-0,8) x (1,5-2,0) | (0,6-0,7) x (2,0-2,5) | (1,0-1,2) x (3,0-4,0) | (1,0-1,2) x (3,0-4,0) | (1,2-1,5) x (2,5-3,0) |
| Рост на МПА в анаэробных условиях | - | + | - | + | + | - |
| Гидролиз крахмала | + | + | - | + | + | + |
| Редукция нитратов | + | + | - | + | + | + |
| Образование ацетоина | + | + | + | + | + | - |
| Декарбоксилирование тирозина | - | - | - | + | + 3 культуры ± 1 культура | + |
| Образование кислоты из арабинозы, ксилозы, маннита | + | K+ Г± | + | - | - | +1 культура -1 культура |
| Предполагаемый вид | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Bacillus pumilis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus megaterium</i> |

После установления видовой принадлежности по совокупности культуральных, биохимических, тинкториальных характеристик исследованных бацилл была определена доля каждой из них в общем числе выделенных (табл. 3).



Таблица 3

Численность выделенных кислотообразующих бацилл
(доля от идентифицированных, %)

Table 3

Quantitative indices of the isolated acid-forming bacilli
(a percentage of the identified, %)

| Вид сырья | <i>Bacillus subtilis</i> - <i>Bacillus licheniformis</i> | <i>Bacillus pumilis</i> | <i>Bacillus cereus</i> | <i>Bacillus thuringiensis</i> | <i>Bacillus megaterium</i> |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Морковь, сорт: Нантская харьков- ская | 24-26 | 6-10 | 19-21 | 5-9 | 9-11 |
| Витаминная 6 | 30-33 | 6-9 | 14-19 | 4-9 | 5-8 |
| Шантенэ сквирская | 24-32 | 7-11 | 22-31 | 7-10 | 17-21 |
| Перец, сорт: Подарок Молдовы | 30-31 | 4-7 | 18-24 | 8-10 | 4-6 |
| Лумина | 20-26 | 9-13 | 12-18 | 10-13 | 9-12 |
| Виктория | 32-35 | 7-11 | 10-14 | 8-12 | 11-14 |
| Баклажаны, сорт Смуглянка | 20-25 | 9-10 | 17-19 | 8-13 | 9-12 |
| Кабачки, сорт Одесский 52 | 28-37 | 6-7 | 18-22 | 6-10 | 11-14 |
| Томаты, сорт: Серпневый | 32-37 | 4-8 | 18-23 | 3-6 | 12-13 |
| Шедевр | 24-33 | 6-11 | 12-16 | 8-11 | 9-11 |

Примечание: число исследованных образцов указано в табл. 1.

Note: number of the investigated samples are given in table 1.

По комплексу изученных морфологических и культуральных признаков изолированных культур первого и второго морфотипов можно заключить, что при общем совпадении большинства отдельных показателей они различаются между собой немногими (рельеф колоний – представители I морфотипа на МПА образовывали мелкие сероватые блестящие колонии, а II морфотипа – расплывающиеся; представители I морфотипа при посеве уколом давали кратеровидное разжижение желатина, представители II морфотипа – мешковидное; на МПБ представители I и II морфотипов создавали помутнение и нежную пленку, но во втором случае впоследствии происходило просветление бульона; представители I морфотипа подщелачивали молоко в процессе пептонизации) и могут быть



об'єднені в групу *subtilis-licheniformis*. Эти культуры составили наиболее многочисленную группу среди бацилл, обнаруженных на сырье, что отражено в таблице 3. Именно эти микроорганизмы чаще всего составляют допустимую аэробную микробиоту подвергнутых термообработке доброкачественных продуктов, предназначенных для длительного хранения [8].

От описанных в таблице 2 бацилл группы *subtilis-licheniformis* две культуры из третьей морфогруппы отличались более гладкими беловатыми блестящими колониями на МПА, растущими в субстрат, образованием на МПБ тонкой пленки и помутнением, пептонизацией молока без свертывания; кратерообразным разжижением желатина при посеве уколом в столбик, отсутствием амилазной и тирозиназной активностей и способности к редукции нитратов. Предположительно, эти культуры отнесены к виду *Bacillus pumilis*, численность которой была незначительной и составляла не более 13 % от общего числа бацилл, контаминировавших исследованное сырье (табл. 3).

В четвертой группе культуры на МПА образовывали гладкие серовато-белые колонии, вызывали помутнение МПБ и образование осадка, не изменяли вида молока, не разжижали желатина при посеве уколом, образуя на поверхности блестящий налет. Они расщепляли мальтозу, не расщепляли маннит. На ранних стадиях роста на глюкозном агаре клетки содержали жировые шарики. Споры образовывались менее, чем за 16–18 часов. Все культуры проявляли лецитиназную активность на желточном агаре, образовывали ацетоин и характерные рубиновые колонии на солевом агаре с 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом, а также индол, что подтвердило их отличие от *B. pumilis* и микроорганизмов группы *subtilis-licheniformis*. Это позволило определить их как *B. cereus*. На исследованных овощах разновидности *B. cereus* составляли от 10 до 31 % от общего числа бацилл (табл. 3).

Колонии бацилл V группы округлые, серовато-белые, с пастообразной консистенцией, матовой поверхностью, как и *B. cereus*, со слабоволнистым краем. По совокупности полученных характеристик эта группа может быть образована штаммами *B. thuringiensis*. На исследованных овощах представители *B. thuringiensis* оказались малочисленными, но преобладали на баклажанах и перце.

Существенным ориентиром при идентификации бацилл группы VI служили размеры, структура клетки, складчатый макрорельеф колонии, дифференцирующие их от описанных выше видов. Колонии на МПА круглые, толстые, выпуклые, цельные, блестящие, слизистые. С возрастом культуры субстрат окрашивается в коричневый цвет. На МПБ рост скудный в виде помутнения, на желатиновых средах образует сероватый поверхностный налет, при посеве уколом в столбик – разжижение в виде кратера. Молоко не сворачивает, пептонизирует. В старых культурах при росте на МПА выявлен жир. Представители шестой группы были идентифицированы как *B. megaterium* также предположительно, т. к. реакции расщепления тирозина и редукции нитратов варьировали в зависимости от возраста культуры. Термостойкие штаммы этих бацилл на исследованных овощах также были немногочисленны: 4–14 % (табл. 3).



Бациллы, описанные в табл. 4, представляют собой грамположительные подвижные палочки, споры которых по диаметру превосходят толщину клеток и располагаются субтерминально или терминально. Они образуют каталазу, но способны расти на МПА в анаэробных условиях, а также гидролизуют крахмал, казеин, восстанавливают нитраты в нитриты, не образуют индола, лецитиназы и тирозиназы. В отличие от бацилл, описанных в табл. 2, при культивировании на средах с арабинозой, ксилозой и маннитом образуют газ наряду с кислотой.

Таблица 4

Характеристика кислото- и газообразующих бацилл овощного сырья

Table 4

Description of the acid- and gas-forming bacilli of vegetable raw material

| Показатели | Свойства бацилл по морфотипам | | |
|----------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | VII | VIII | IX |
| Число изолятов, отобранных для идентификации | 6 | 6 | 6 |
| Размеры клеток, мкм | (0,5-0,6) x (3,0-4,0) | (0,6-0,7) x (2,0-3,5) | (0,7-1,0) x (2,0-3,0) |
| Гидролиз казеина | – | + | + |
| Разжижение желатина | + | ± (слабая реакция) | ± |
| Образование ацетоина | – | + | – |
| Декарбоксилирование тирозина | – | – | – |
| Предполагаемый вид | <i>Bacillus macerans</i> | <i>Bacillus polymyxa</i> | <i>Bacillus circulans</i> |

Группа бацилл VII составлена из микроорганизмов, слабо растущих на МПА с образованием тонких круглых бежевых распространенных колоний. Они вызывают помутнение МПБ и образуют слизистый осадок. Окрашиваемость клеток по Граму при культивировании на разных средах проявляла вариабельность. Эти бациллы не декарбоксилируют тирозин и не образуют ацетилметилкарбинол, разжижают желатин. На желатиновой среде образуют слабый поверхностный налет, при посеве уколом разжижения не вызывают. Крахмал гидролизуют до моно- и дисахаридов. Молоко сворачивают с образованием газа, утилизируют глюкозу, лактозу, мальтозу с образованием кислоты. Комплекс выявленных свойств данной группы в основном совпадает с описанием бацилл вида *B. macerans* [9].

Отличительной чертой бацилл VIII группы является образование слизи на плотных и жидких субстратах и медленное разжижение желатина. На МПА образуют сероватые блестящие крупные колонии, на МПБ – помутнение, осадок, поверхностную пленку сероватого цвета. Молоко не сворачивают.



Крахмал гідролізують з утворенням гранулеми; желатин розжижають слабо (мешковидне розжиження). Ці бактерії можна передположително отнести к разновидностям *B. polymyxa*.

Групу IX склали бактерії, утворюючі на МПА тонкі розпространяючіся по поверхні колонії. Вызывают слабое помутнение МПБ и слабое кислотообразование в молоке (медленное сворачивание). На желатиновых средах растут в виде незначительного поверхностного налета, при посеве уколом рост отсутствовал. Глюкозу, лактозу, сахарозу усваивают с образованием кислоты. Два изолята в этой группе после выращивания на разных субстратах окрашивались по Граму вариабельно, остальные – положительно. По типу дыхания они относятся к факультативно-анаэробным микроорганизмам. Они не образуют ацетин, медленно разжижают желатин, гидролизуют казеин. По большинству признаков описание соответствует *B. circulans*. Этот вид считается мезофильным, однако в литературе отмечается наличие термофильных вариантов [10].

Обнаружение бактерий VII–IX морфотипов в сырье обращает внимание на необходимость их контроля в продуктах после термической обработки (в частности, пресервов, консервов) как потенциальных возбудителей бомбажной порчи.

Кислото- и газообразующие бактерии на изученном сырье представлены относительно небольшим количеством (табл. 5) – от 2–3 % на помидорах до 9–14 % на моркови от общего числа выделенных бактерий.

Таблица 5

**Численность кислото- и газообразующих бактерий
(доля от идентифицированных, %)**

Table 5

**Quantitative indices of the acid- and gas-forming bacilli
(percentage of the identified, %)**

| Вид сырь | <i>B. macerans</i> | <i>B. polymyxa</i> | <i>B. circulans</i> |
|----------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| Морковь, сорт: Нантская харьковская | 6-8 | 6-11 | 4-7 |
| Витаминная 6 | 5-9 | 9-14 | 3-6 |
| Перец, сорт Подарок Молдовы | 5-9 | 7-9 | 2-6 |
| Баклажаны, сорт Алмаз | 4-5 | 5-7 | 3-5 |
| Кабачки, сорт Одесский 52 | 3-4 | 3-4 | 2-4 |
| Помидоры, сорт Серпневый | 2-6 | 3-7 | 2-3 |

Примечание: число исследованных образцов указано в табл. 1.

Note: number of the investigated samples are given in table 1.



Следует отметить, что морфологические, культуральные и биохимические свойства изученных культур не всегда проявлялись убедительно. На разных средах некоторые колонии R-формы переходили в колонии S-формы, что затрудняло первичную идентификацию по культуральным признакам. Это не позволило ввести характеристики некоторых культур в таблицы и четко определить долю изученных изолятов в общем числе бацилл, обнаруженных на исследованном сырье.

Полученные результаты показывают, что на изученных видах овощей наряду с микромицетами и дрожжами вегетируют наиболее распространенные и выявляемые мезофильные бациллы, в частности, на консервируемом овощном сырье бациллы чаще бывают представлены описанными выше видами: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. macerans*, *B. polymyxa* и *B. circulans*. Эти материалы позволяют оценить существенную составляющую эпифитной микробиоты овощного сырья, которая формирует так называемую остаточную микробиоту продуктов его переработки. На определении наличия и численности этих микроорганизмов основывается контроль полуфабрикатов и готовой продукции. Своевременное выделение и идентификация их позволят оперативно внести коррективы в технологический процесс и обеспечить соответствие продуктов питания требованиям Hazard Analysis and Critical Control Points [5].

Микробиота овощного сырья разнообразна, однако мицелиальные и немиелиальные грибы в термически обработанных продуктах представляют меньшую опасность для потребителя, чем спорообразующие бактерии. Превалирующая численность бацилл – потенциальных возбудителей порчи пищевых продуктов, среди которых возможно присутствие патогенных видов (например, *B. cereus*), актуализирует поиск ускоренных и экспрессных методов их диагностики. В литературных источниках мы не обнаружили систематизированных сведений о микробиоте овощей, районированных в Украине, поэтому приведенные результаты являются новыми и необходимыми с позиций их практического использования.

I.V. Pylypenko¹, Y.B. Paulina¹, L.N. Pylypenko¹, G.V. Yamborko²

¹Odesa National Academy of Food Technologies, 112, Kanatnaya st., Odesa, 65039, Ukraine, e-mail: l.pylypenko@mail.ru

²Odesa National I. I. Mechnykov University, 2, Dvoryanskaya st., Odesa, 65082, Ukraine

COMPOSITION OF MICROBIAL CONTAMINANTS OF VEGETABLE RAW MATERIAL

Summary

Aim. To identify and characterize the potential agents caused alimentary diseases, contamination and residual microbiota of the products of the vegetable raw material industrial processing in the South of Ukraine. **Methods.** The determination of the groups of vegetable raw material microbial contaminants and bacilli identification with



studying of their morphophysiological, cultural, biochemical properties were carried out using microbiological methods. **Results.** The research of the group composition of microbial contaminants of the most widespread vegetables species shows that the quantity of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms (MAFAnM) varies from $4,6 \times 10^4$ CFU/g on tomatoes surface to $8,4 \times 10^6$ on carrots' surface, while the quantity of mold fungi varies from $2,7 \times 10^2$ CFU/g on pepper to $5,2 \times 10^4$ on carrots, the quantity of yeasts – from $0,9 \times 10^2$ on vegetable marrows to $1,7 \times 10^5$ CFU/g with carrots. The biodiversity of microbiota vegetating on tested vegetables was mainly formed by the sporeforming bacteria species that are the potential agents contaminating of the foodstuff. Among the identified MAFAnM the quantity of bacilli has varied from 36 % on the peppers surface to 59 % on the carrots surface. 42 pure cultures of thermoresistant rod-like bacteria of nine morphotypes were isolated and identified according to their morphological, physiological, cultural and biochemical properties. **Conclusions.** For the first time the group composition of epiphytic microorganisms of different vegetable raw material species was investigated according to the MAFAnM, mold fungi and yeasts quantity. The dominance of MAFAnM by 2–3 orders among the groups of microorganisms was established. 42 pure cultures of the identified thermoresistant types of mesophilic bacilli were represented by nine morphotypes. The complex of biological properties of isolated cultures was studied and the quantitative description for every morphotype necessary for prediction and products safety was given as well.

Key words: vegetable raw material, mesophilic bacilli, microbial contaminants, specific authentication.

І.В. Пилипенко¹, Я.Б. Пауліна¹, Л.М. Пилипенко¹, Г.В. Ямборко²

¹Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна,
e-mail: i.pylypenko@mail.ru

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082,
Україна

СКЛАД МІКРОБНИХ КОНТАМІНАНТІВ ОВОЧЕВОЇ СИРОВИНИ

Мета. Виявити і охарактеризувати потенційних збудників харчових захворювань, псування і залишкової мікробіоти продуктів промислової переробки овочевої сировини південних областей України. **Методи.** Мікробіологічні – для визначення груп мікробних контамінантів овочевої сировини та ідентифікації бацил шляхом виділення чистих культур і вивчення їх морфологічних, культуральних, біохімічних властивостей. **Результати.** За матеріалами дослідження групового складу мікробних контамінантів найбільш поширених видів овочів кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів (МАФAnM) становить від $4,6 \times 10^4$ на томатах до $8,4 \times 10^6$ на моркві КУО/г, тоді як плісневих грибів налічувалося від $2,7 \times 10^2$ на перці до $5,2 \times 10^4$ на моркві, дріжджів – від $0,9 \times 10^2$ на кабачках до $1,7 \times 10^5$ КУО/г на моркві. Показано, що біорізноманіття мікробіоти, вегетуючої на досліджених овочах, складають переважно бактерії з домінуванням спороутворюючих видів, які є потенційними збудниками псування харчових продуктів. Серед виявлених МАФAnM бацили склали від 36 % на перці сорту Вікторія до 59 % – на моркві сорту Вітамінна 6. Виділено 42 чисті культури термостійких паличковидних мікроорганізмів дев'яти морфотипів, які ідентифіковано за комплексом морфологічних,



фізіологічних, культуральних і біохімічних властивостей. **Висновки.** Вперше вивчено груповий склад епіфітних мікроорганізмів різних видів і сортів овочевої сировини за кількістю МАФАНМ, плісневих грибів, дріжджів. Встановлено домінування на 2–3 порядки МАФАНМ серед досліджених груп мікроорганізмів. Для 42 чистих культур виділених термостійких видів мезофільних бацил, представлених дев'ятьма морфотипами, вивчено комплекс біологічних властивостей, а також наведено кількісну характеристику кожного морфотипа, що необхідно для прогнозування і забезпечення безпеки продукції.

Ключові слова: овочева сировина, мезофільні бацили, мікробні контамінанти, видова ідентифікація.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Craig, G. de Burca. EU Law: Text, Cases, and Materials. – 5th ed. – Cambridge: Cambridge University Press, 2011. – 1304 p.
2. Пилипенко Ю. Д., Мазуренко І.К., Пилипенко І.В., Пилипенко Л. М. Державні нормативні документи на сировину, напівфабрикати, матеріали та консервовану продукцію. Показники безпечності та якості (Методичні вказівки. Видання офіційне). – К.: Мінагрополітики, 2009. – 114 с.
3. SANCO/4198/2001. Draft commission regulation of on microbiological criteria for foodstuffs. – Rev. 21 (final). – Commission of the European Communities. – Brussels, 2005. – 34 p.
4. Melngailė A. Microbiological risk analysis in catering establishments // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. – 2013. – V. 67, № 4/5 (685/686). – P. 340–349.
5. Mortimore S. E., Wallace C. O. HACCP: A Practical Approach. – 3^d ed. – UK: Springer Science & Business Media, 2013. – 475 p.
6. Ильяшенко Н. Г., Бетева Е. А., Пичугина Т.В., Ильяшенко А. В. Микробиология пищевых производств. – М.: Колос, 2008. – 412 с.
7. Пилипенко Л. Н., Верхивкер Я. Г., Пилипенко И. В. Консервирование пищевых продуктов. Микробиология, энергетика, контроль. – Одесса: «ВМВ», 2015. – 232 с.
8. Персианова И. П., Герасименко Л. Н., Стоянова Л. А. Микробиология консервирования и микробиологический контроль консервного производства – Одесса: Изд. «Внешрекламсервис», 2010. – 310 с.
9. Bergey's Manual of systematic bacteriology. The proteobacteric. Part A. // Bergey's Manual Trust Department of Microbiology and Molecular Genetics Michigan State University. – 2005. – 2nd ed., V. 2. – P. 317–321.
10. Клив де В. Блэкберн. Микробиологическая порча пищевых продуктов / Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.

Стаття надійшла до редакції 21.07.2015 р.



Х МІЖНАРОДНА ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

З 4 по 20 червня 2015 року на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова спільно з Інститутом мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, за підтримки Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського та Спільки біологів і біотехнологів Одеси проведена ювілейна Х Міжнародна Літня школа «Молекулярна мікробіологія і біотехнологія».

Серед слухачів Літньої школи були молоді вчені та аспіранти з університетів та наукових закладів України з Києва, Одеси, Дніпропетровська, Чернігова.

Лекційний курс Х Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології висвітлював питання досягнень вітчизняної мікробіології, бактеріальної геноміки, геноміки профагів і островів патогенности, геноміки плазмід, сучасного погляду на еволюцію мікроорганізмів, методів секвенування наступного покоління, метагеноміки та біоінформатики, антифунгальних властивостей лактобактерій, унікального механізму переносу генетичної інформації *Agrobacterium tumefaciens*, структури та функцій біоплівки, кластерного аналізу і нумеричної таксономії. Лекції читали: директор ІМВ НАНУ д.б.н. професор, академік НАН України Підгорський В. С., заступник директора ІМВ НАНУ, завідувач відділом молекулярної генетики бактеріофагів, член-кор. НАН України, д.б.н. Товкач Ф.І., проректор, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова д.б.н. професор Іваниця В. О., завідувач відділом Національного інституту агрономічних досліджень Франції (INRA, France) професор Томас Ертле, наукові співробітники Грецького центру морських досліджень Інституту Морської біології, біотехнології та аквакультури (Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research, Heraklion, Greece) к.н. Йон Христоферсен, к.н. Анастасис Оулас, науковий співробітник лабораторії індикації особливо небезпечних біологічних патогенних агентів Державної установи Українського науково-дослідного протичумного інституту к.б.н. Юрченко О. О., с.н.с. Біотехнологічного ННЦ ОНУ імені І.І. Мечникова, к.б.н. Васильєва Н. Ю., доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова к.б.н. Ліманська Н. В., н.с. Біотехнологічного ННЦ ОНУ імені І.І. Мечникова к.б.н. Галкін М. Б..

Впродовж двох тижнів на практичних заняттях учасники Х Літньої школи опанували метод полімеразної ланцюгової реакції, методи титрування та препаративного отримання бактеріофагів, виділення бактеріальної, плазмідної та фагової ДНК та білків, рестрикційний аналіз, електрофорез в агарозному та поліакриламідному гелях, сучасні методи рідинної хроматографії, здійснювали трансформацію бактерій плазмідною ДНК, ознайомилися з основними методами біоінформатики та ідентифікації мікроорганізмів з використанням газової



хроматографії. Практичні заняття на Літній школі вели наукові співробітники кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології і Біотехнологічного ННЦ Одеського національного університету імені І.І. Мечникова – с.н.с., к.б.н. Сергєєва Ж. Ю., с.н.с., к.б.н. Крилова К. Д., с.н.с., к.б.н. Іваниця Т. В., н.с., к.б.н. Жумінська Г.І., доц., к.б.н. Ліманська Н. В., с.н.с., к.б.н. Васильєва Н. Ю., асп. Боброва О.Є., Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ – завідувач лабораторії, к.б.н. Остапчук А. М., асп. Голубенко О..

У рамках школи проведено семінари з програм мобільності для молодих вчених і демонстрації віртуальних лабораторій у біологічних дослідженнях (співробітники Одеського національного університету імені І.І. Мечникова с.н.с., к.б.н. Степанова Т. Ю. та завідувач лабораторії ІТ і ТЗН Афонін С. А.).

На урочистому закритті учасники Х Міжнародної Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології отримали сертифікати.

Організатори Міжнародної Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології запрошують аспірантів та молодих учених взяти участь у ХІ Літній школі, яка відбудеться у травні – червні 2016 року!

Телефон: (0482) 68-79-64

Електронна адреса: sergeeva.zh@onu.edu.ua.

Відповідальний секретар
Міжнародної Літньої школи
к.б.н. Сергєєва Жанна Юріївна



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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



При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

Текст статті має включати такі складові:

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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



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

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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

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



На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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

Верстка В.Г. Вітвицька

Підписано до друку 28.09.2015 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. ____ Тираж 100 пр.
Зам. № 1336.

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