

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

№ 4(32)
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.

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.

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

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Н.В. Воробйова, О.І. Корнелюк ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА АІМР1/Р43 – КОМПОНЕНТА МУЛЬТИСИНТЕТАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ЛЮДИНИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ШТАМУ <i>ESCHERICHIA</i> <i>COLI</i> BL21(DE3)RIL.....	6
В.Л. Пономарьова, І.П. Висеканцев, О.С. Онасенко, П.М. Зубов ВИВЧЕННЯ КРІОУШКОДЖЕНЬ ВІЛЬНИХ ТА ІММОБІЛІЗОВАНИХ В ГЕЛІ АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ <i>SACCHAROMYCES</i> <i>CEREVISIAE</i>	15
В.О. Іваниця, О.Г. Горшкова, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач, Т.В. Гудзенко, А.М. Остапчук СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ ШТАМУ <i>BACILLUS</i> SP. O3-5, ВИДІЛЕНОГО ІЗ ЗАБРУДНЕНОГО НАФТОЮ ҐРУНТУ О. ЗМІЇНИЙ.....	28
І.С. Бровко, Л.В. Титова, Г.О. Іутинська ВПЛИВ ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ СОЇ НА ФОРМУВАННЯ СОЄВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ І РИЗОСФЕРНЕ МІКРОБНЕ УГРУПОВАННЯ.....	36
С.С. Декіна, І.І. Романовська, О.П. Сотнікова ЛІЗОЦИМВМІСНИЙ ПРЕПАРАТ «ШТУЧНА СЛЪОЗА»: ОТРИМАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ.....	46
Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.С. Бондар, О.П. Третяк ВПЛИВ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АМОЇЇУ НА РІСТ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ	53
С.С. Муродова, К.Д. Давранов АНАЛІЗ ПЛАЗМІДНОГО СКЛАДУ ДНК СОЛЕСТИЙКИХ ШТАМІВ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ	61
Г.К. Палій, О.А. Назарчук, В.В. Бобир, О.О. Гончар, Т.Л. Гридїна, Д.В. Палій, І.В. Коваленко, В.М. Буркот ОЦІНКА АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ТА ПРОТИГРИБКОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СУЧАСНИХ АНТИСЕПТИКІВ	67
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	75

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

N.V. Vorobyova, O.I. Kornelyuk BACTERIAL EXPRESSION OPTIMIZATION OF HUMAN AIMP1/ P43 RECOMBINANT PROTEIN – A COMPONENT OF HUMAN MULTISYNTHETASE COMPLEX IN STRAIN OF <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21(DE3)RIL	6
V.L. Ponomareva, I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenko, P.M. Zubov STUDY OF CRYOINJURIES OF FREE AND IMMOBILIZED IN SODIUM ALGINATE GEL <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> YEAST CELLS	15
V.O. Ivanytsia, O.G. Gorshkova, N.V. Korotaeva, O.V. Voliuvach, T.V. Gudzenko, A.M. Ostapchuk FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF STRAIN <i>BACILLUS</i> SP. O3-5 ISOLATED FROM OIL-CONTAMINATED SOIL OF THE ZMIINY ISLAND ..	28
I.S. Brovko, L.V. Tytova, G.O. Iutynska INFLUENCE OF ENDOPHYTIC SOYBEAN BACTERIA ON THE RHIZOBIUM-SOYBEAN SYMBIOSIS AND RHIZOSPHERE MICROBIAL COMMUNITY	36
S.S. Dekina, I.I. Romanovska, E.P. Sotnikova LYSOZYME-CONTAINING PREPARATION “ARTIFICIAL TEARS”: OBTAINING, PROPERTIES	46
N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, O.S. Bondar, O.P. Tretyak INFLUENCE OF QUATERNARY SALTS OF AMMONYUM ON GROWTH OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA	53
S.S. Murodova, K.D. Davranov ANALYSIS OF DNA PLASMID COMPOSITION OF SALT TOLERANT STRAINS OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS	61
G.K. Paliy, O.A. Nazarchuk, V.V. Bobyr, O.O. Gonchar, T.L. Grydina, D.V. Paliy, I.V. Kovalenko, V.M. Burcot THE ESTIMATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL QUALITIES OF MODERN ANTISEPTICS	67
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	75

УДК 579.222:577.217

Н.В. Воробйова^{1,2}, О.І. Корнелюк^{1,2}

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01033;

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03143,
тел.: +38 (044) 526 55 89, +38 (044) 526 07 56
e-mail: vorobyova_natali_0307@ukr.net

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ РЕКОМБІНАНТНОГО БІЛКА АІМР1/Р43 – КОМПОНЕНТА МУЛЬТИСИНТЕТАЗНОГО КОМПЛЕКСУ ЛЮДИНИ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ШТАМУ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)RIL

Мета. Оптимізація умов бактеріальної експресії рекомбінантного білка АІМР1/р43 людини для підвищення виходу і концентрації стабільного нативного білка у розчині. **Методи.** Культивування в бактеріальній системі експресії; метал-хелатувальна афінна хроматографія, гель-електрофорез. **Результати.** Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу цільового білка ізопропіл-β-тіогалактопіранозид (ІПТГ) на кінцевий вихід білка та визначено оптимальні температура і час культивування бактерій після додавання індуктора. Запропоновано оптимальну схему культивування штаму *Escherichia coli* BL21(DE3) RIL для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного білка у розчинній формі. **Висновки.** За отриманими результатами встановлено, що кількість рекомбінантного білка АІМР1/р43 у розчинній формі суттєво підвищується при зменшенні концентрації ІПТГ до 0,5 мМ, зниженні температури культивування культури до 25 °С та збільшення часу культивування до 8 годин. Це відкриває перспективу отримання цього білка у препаративних кількостях для подальших структурних досліджень та впровадження як нового продукту молекулярної біотехнології.

Ключові слова: білок АІМР1/р43, бактеріальна система експресії, оптимізація експресії.

Сучасна молекулярна біотехнологія орієнтована на створення нових біомедичних препаратів на основі рекомбінантних білків [1]. Рекомбінантна експресія білків в *E. coli* є простим, швидким, недорогим і надійним методом, який дозволяє отримати цільові білки з високим виходом, що є необхідною умовою для впровадження даного метода у біотехнологічне виробництво. Однак для ефективної продукції рекомбінантних білків в бактеріальних системах необ-



хідно проведення оптимізації умов експресії для досягнення максимального виходу білка у розчинному стані [2].

Білок АІМР1/р43 людини (ргоЕМАР-II) є обов'язковим компонентом мультиаміноацил-тРНКсинтетазного комплексу вищих еукаріотів [3], поліпептидний склад якого консервативний для організмів різного рівня організації від комах до ссавців. Враховуючи, що білок АІМР1/р43 містить послідовність цитокіна ЕМАР-II і ряд не досліджених до кінця властивостей, зокрема локалізацію білка АІМР1/р43 в клітинному ядрі [4, 5] та наявність у нього цитокінової активності [6, 7], можна віднести даний білок до молекулярних об'єктів, які становлять інтерес як перспективного продукту молекулярної біотехнології.

До цього часу просторова структура повнорозмірного білка АІМР1/р43 не встановлена: кристалографічну структуру визначено тільки для його С-кінцевого модуля – цитокіна ЕМАР-II [8, 9]. Для проведення структурних досліджень білка р43 методами рентгеноструктурної кристалографії і мультимірної ЯМР-спектроскопії необхідні препаративні кількості білка. Отже, для забезпечення структурних досліджень білка АІМР1/р43 необхідним є використання вискоелективних оптимізованих систем експресії рекомбінантних білків. З цією метою в даній роботі здійснено підбір оптимальних умов культивування бактеріальної культури та експресії цільового білка АІМР1/р43 людини в препаративних кількостях для подальших структурних досліджень.

Матеріали і методи

В роботі використано штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21 *CodonPlus*(DE3)-RIL (Stratagene, США). Штам трансформований за загально прийнятою методикою відповідною конструкцією, що була створена на базі вектору рЕТ-30а(+) *E. coli* ("Novagen", США, 5422 п.н.) і містила ген, що кодує синтез цільового білка АІМР1/р43 під контролем промотора фага Т7. Селективним маркером плазмиди рЕТ30а(+) є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину.

Клонування отриманої з сумарної кДНК тканин людини вставки довжиною 1066 п.н. проводили з використанням олігонуклеотидних праймерів Direct (р43f), 35 нт, з сайтом *NdeI*, *catatg*: 5'-CAGTCATG*catatg*GCAA-ATAATGATGCTGTTCTG-3' та Reverse (р43r), 55 нт з сайтом *NcoI*, *ccatgg*, що містив кодони для 6хHis-Tag в С-кінцевій частині білка: 5'-ATCATGCC ATGGTCAATGATGATGATGGTGTTTGATTCCACTGTTGC-TCATG-3'. Для клонування було використано сайти рестрикції *NdeI* та *NcoI*, що входили до складу праймерів. Отримана конструкція позначена як рЕТ-30а-р43С2 (6488 п. н.).

Фізико-хімічні властивості білка АІМР1/р43 проаналізовані за допомогою сервера ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>): молекулярна вага 35175.5 Да; ізоелектрична точка pI = 8.62; коефіцієнт екстинції АІМР1/р43 при довжині хвилі 280 нм складає 9970 М⁻¹ см⁻¹ (0,29 мл/мг).

Штам-продуцент вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB) з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Культуру



інкубували при температурі 37 °С та інтенсивному струшуванні при 250 об/хв до досягнення нею оптичної густини 0,5–0,7 о.о. Оптичну густину ($ОГ_{600}$) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр *BioMate-5*, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка до культурального середовища додавали індуктор ППТГ – ізопропіл- β -тіоґалактопіранозид (*Sigma*, США) до кінцевих концентрацій 0,1; 0,25; 0,5 і 1,0 мМ. Визначали оптимальний час (2, 4, 8, 12 і 16 годин) та температуру (15, 20, 25, 30 і 37 °С) культивування бактерій після індукції експресії.

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин *E. coli* методом метал-хелатувальної хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою (*Qiagen*, Germany). Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах у 12% розділювальному гелі [7], використовуючи суміш маркерних білків виробництва *Thermo Scientific* (Литва). Гелі забарвлювали Coomassie blue R-250.

Відносні кількості розчинної і функціонально-активної форми білка в супернатантах та загальні кількості білка після експресії оцінювали скануванням акриламідних гелів, подальші обчислення проводили за допомогою програмного пакету *TotalLab*. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програмного пакету «Excel 2007», наведені результати представлені у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.

Концентрацію очищеного рекомбінантного білка АІМР1/р43 визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнти екстинкції $9970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (0,29 мл/мг) при довжині хвилі 280 нм.

Результати та їх обговорення

Однією з проблем при експресії АІМР1/р43 за стандартних умов ($T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, концентрація ППТГ – 1 мМ та $t = 4$ год) є його агрегація і утворення тілець включення, що може свідчити про неправильну укладку поліпептидного ланцюга за рахунок високого рівня експресії. Отже, необхідно здійснити підбір умов бактеріальної експресії, за яких максимальним буде вихід розчинної функціонально-активної форми АІМР1/р43 по відношенню до загального рівня експресії.

При проведенні оптимізації умов культивування штаму-продуцента рекомбінантного білка АІМР1/р43 враховувалися такі фактори, як концентрація індуктора експресії ППТГ, час та температура культивування штаму-продуцента після додавання індуктора.

При підвищенні концентрації індуктора до 1 мМ спостерігається зростання рівня експресії білка (рис. 1а). Однак встановлено, що кількість білка у розчинному стані є максимальною при концентрації ППТГ 0,5 мМ (рис. 1б).

При дослідженні рівня експресії білка залежно від часу культивування культури після індукції показано найбільший приріст експресії цільового білка при культивуванні культури протягом 12 годин (рис. 2а).



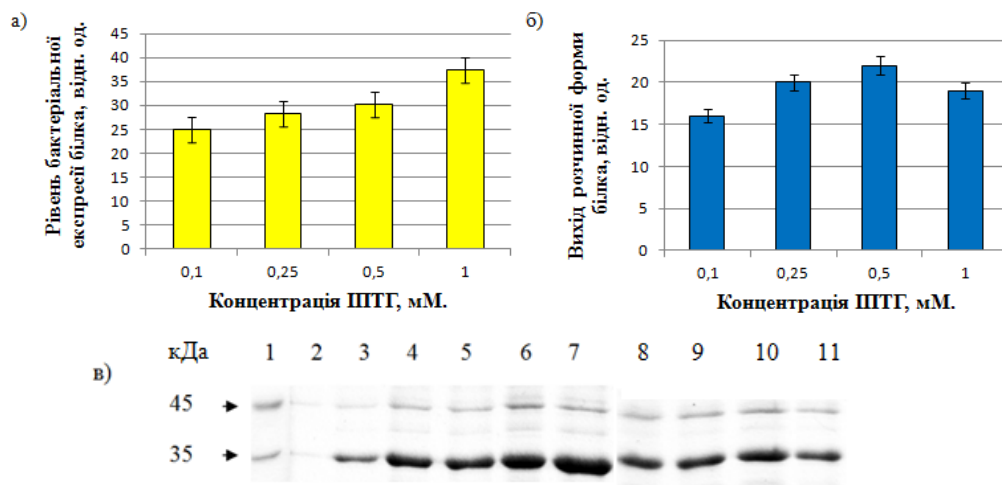


Рис. 1. Залежності рівня експресії білка АІМР1/р43 (а) і виходу його розчинної функціонально-активної форми (б) від концентрації ІПТГ; електрофореграма загального вмісту білка в клітинах (4–7) та вмісту його розчинної форми (8–11) при різних концентраціях ІПТГ (в)

1 – білкові маркери молекулярної маси (*ThermoScientific*, Литва); 2 – лізат до індукції; 3 – лізат після індукції, 4–7 – лізати і 8–11 – супернатанти після індукції при 0,1, 0,25, 0,5 і 1,0 мМ ІПТГ, відповідно.

Fig. 1. Dependence of the expression level of AIMP1/p43 protein (a) and the yield of its soluble, functionally active form (b) on the concentration of IPTG in solution; electrophoretograms of total cell protein (4–7) and its soluble fraction (8–11) at different IPTG concentrations (c)

1 – protein molecular weight markers (*Thermo Scientific*, Lithuania), 2 – without IPTG inducer; 4–7 – lysates and 8–11 – supernatants, induced with 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM IPTG, respectively.

Кількість розчинної форми білка є максимальною при культивуванні культури протягом 8 годин, при подальшому культивуванні спостерігається різке зниження кількості білка у розчинній формі (рис. 2б).

Важливим параметром, який впливає на бактеріальну експресію після її індукції є температура. Встановлено, що рівень бактеріальної експресії з підвищенням температури поступово збільшується і досягає максимуму при 25 °С, проте при подальшому підвищенні температури спостерігається зниження рівня експресії (рис. 3а). Кількість рекомбінантного білка АІМР1/р43 у розчинному стані є максимальною при культивуванні культури за температури 25 °С (рис. 3б).

Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка ЕМАР II металхелатувальною хроматографією на Ni-NTA агарозі. В результаті очистки білка АІМР1/р43 на Ni-NTA агарозі отримано препарат високого ступеня чистоти (близько 95%) (рис. 4).

Білок АІМР1/р43 людини, попередник цитокіна ЕМАР II, є компонентом мультиаміноацил-тРНК синтетазного комплексу вищих еукаріотів і в ізолю-

ваному стані теж виявляє цитокинові активності. Проте, на відміну від ЕМАР II цей поліпептид є досить нестабільним, оскільки належить до природно неструктурованих білків [11,12]. Нами показано, що центральний фрагмент АІМР1/p43 Thr84-Asp146 є неструктурованим згідно даних біоінформатичного аналізу амінокислотної послідовності білка. Закономірно, що наявність неструктурованого фрагмента в АІМР1/p43 приводить до його значної агрегації при бактеріальній експресії та входження у тільця включення.

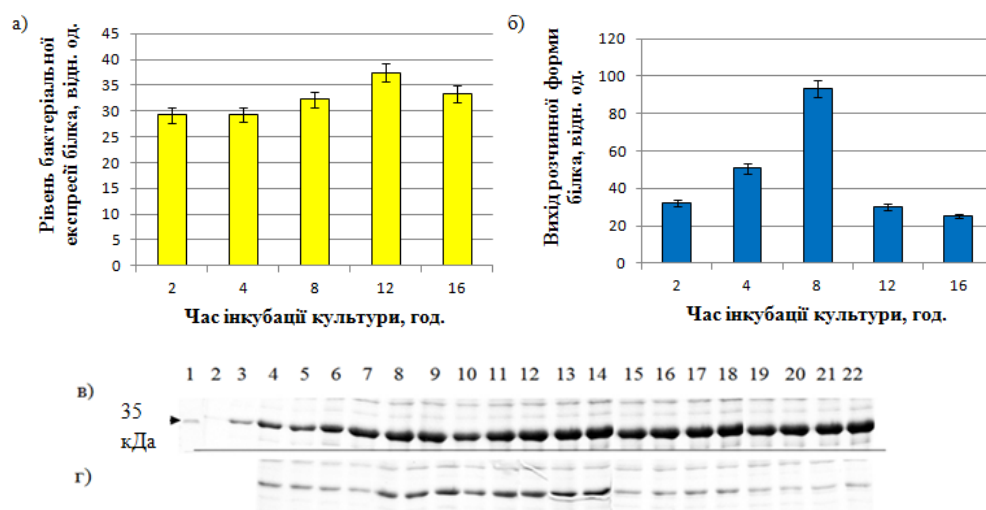


Рис. 2. Залежність рівня бактеріальної експресії білка АІМР1/p43 (а) і виходу його розчинної функціонально-активної форми (б) від часу культивування бактерій; електрофореграми загального вмісту білка в клітинах (в) та вмісту його розчинної форми (г) за різного часу культивування

1 – білкові маркери молекулярної маси; 2 – лізат до індукції; 3–6; 7–10; 11–14; 15–18 і 19–22 (г) – лізати після індукції протягом 2, 4, 8, 12, 16 годин при 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 мМ ПТТГ відповідно; 3–6; 7–10; 11–14; 15–18 і 19–22 – супернатанти після індукції протягом 2, 4, 8, 12, 16 годин при 0,1, 0,25, 0,5 і 1,0 мМ ПТТГ, відповідно.

Fig. 2. Dependence of the expression level of AIMP1/p43 protein (a) and the yield of its soluble, functionally active form (b) on the cultivation time; electrophoretograms of total cell protein (c) and its soluble fraction (d), obtained at different time of cultivation

1 – protein molecular weight markers; 2 – without IPTG inducer; 3–6, 7–10, 11–14, 15–18 and 19–22 (c) – lysates after induction at 2, 4, 8, 12, 16 hours, respectively (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM IPTG); 3–6, 7–10, 11–14, 15–18 and 19–22 – supernatants after induction with 2, 4, 8, 12, 16 hours, respectively (0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mM IPTG).

З метою отримання максимального виходу білка АІМР1/p43 у розчинно-му стані нами проведена оптимізація його бактеріальної експресії у клітинах *E. coli* BL21(DE3)RIL. Встановлено, що оптимальна кількість індуктора ПТТГ для експресії АІМР1/p43 становить 0,5 мМ, оптимальні час і температура після індукції синтезу цільового білка становлять 8 годин і 25 °С, відповідно. Ви-



хід цільового білка АІМР1/р43 людини при бактеріальній експресії у культурі клітин *E. coli* BL21(DE3)RIL складає близько 5 мг з 1 л бактеріальної культури, що відповідає приблизно 8% сумарних бактеріальних білків. Отриманий вихід білка є достатнім для проведення подальших структурних досліджень методами оптичної та ЯМР-спектроскопії. Слід зазначити, що оптимальні умови бактеріальної експресії АІМР1/р43 суттєво відрізняються від визначених нами раніше оптимальних умов для експресії цитокіна ЕМАР II [13], який є С-кінцевим доменом АІМР1/р43.

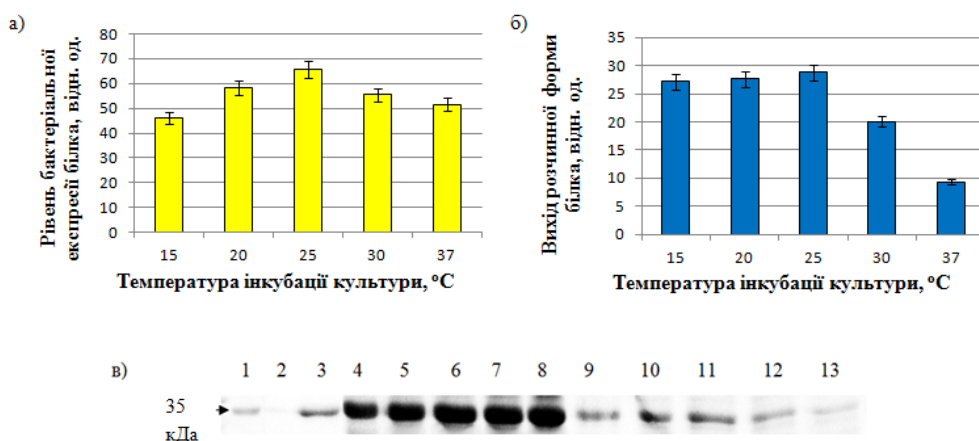


Рис. 3. Залежності рівня бактеріальної експресії білка АІМР1/р43 (а) та виходу його розчинної функціонально-активної форми (б) від температури культивування; електрофореграма загального вмісту білка в клітинах (4–8) та вмісту його розчинної форми (9–13) за різної температури культивування (в)

1 – білкові маркери молекулярної маси; 2 – лізат до індукції; 3 – лізат після індукції; 4–8 – лізати і 9–13 – супернатанти після індукції при 15, 20, 25, 30 і 37 °С відповідно

Fig. 3. Dependence of the expression level of AIMP1/p43 protein (a) and the yield of its soluble, functionally active form (b) on the cultivation temperature; electrophoretograms of total cell protein (4–8) and its soluble fraction (9–13), obtained at different cultivation temperatures (d)

1 – protein molecular weight markers; 2 – without inducer; 3 – lysates and 8–12 – supernatants after induction at 15, 20, 25, 30 and 37 °C, respectively

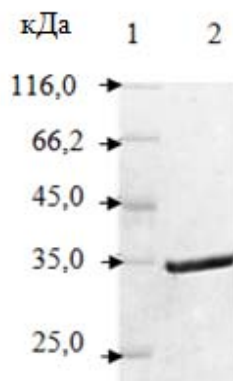


Рис. 4. Електрофоретичний контроль чистоти отриманого препарату АІМР1/р43

1 – білкові маркери молекулярної маси; 2 – препарат АІМР1/р43 після очистки.

Fig. 4. Electrophoretic analysis of AIMP1/p43 protein purity

1 – protein molecular weight markers; 2 – protein AIMP1/p43 after purification.

Отже, в результаті проведення даної роботи створено продуцент мультифункціонального білка АІМР1/р43 в бактеріальній системі експресії.

Білок АІМР1/р43 є перспективним препаратом для його подальшого впровадження як нового продукту сучасних генно-інженерних біотехнологій.

Біотехнологічне виробництво цього цитокіну є необхідним для проведення експериментальних досліджень впливу АІМР1/р43 на клітинні процеси (індукція апоптозу, вплив на ангиогенез), а в перспективі як нового лікарського препарату для інгібування пухлинного росту.

N.V. Vorobyova^{1,2}, O.I. Kornelyuk^{1,2}

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64, Volodymyrska Str., Kyiv, Ukraine, 01033;

²Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine,
150, Academ. Zabolotny Str., Kyiv, Ukraine, 03680,
tel.: +38 (044) 526 55 89, +38 (044) 526 07 56
e-mail: vorobyova_natali_0307@ukr.net

BACTERIAL EXPRESSION OPTIMIZATION OF HUMAN AIMP1/P43 RECOMBINANT PROTEIN – A COMPONENT OF HUMAN MULTISYNTHETASE COMPLEX IN STRAIN OF ESCHERICHIA COLI BL21(DE3)RIL

Summary

Aim. The optimization of conditions for bacterial expression of recombinant protein AIMP1/p43 has been carried out in order to increase the yield of stable protein in solution. **Methods.** Protein expression in bacterial expression system, metal-chelating affinity chromatography, gel-electrophoresis. **Results.** The influence of expression inductor IPTG concentration on final yield of target protein has been studied. The optimal time and temperature of cultivation of bacterial culture with inductor has been investigated. Optimal culturing conditions for Escherichia coli BL21(DE3)RIL cultivation have been proposed to achieve a high expression level of soluble recombinant protein. **Conclusions.** It has been established that the yield of soluble recombinant AIMP1/p43 protein increased significantly with the decrease of IPTG concentration to 0,5 mM, decrease of temperature to 25°C and increase of cultivation time to 8 h. This gives one the possibility of preparing the protein AIMP1/p43 in enough amount for its further structural studies and use as a new molecular biotechnological product.

Key words: protein AIMP1/p43, bacterial expression system, optimization of expression.



Н.В. Воробьева^{1,2}, А.И. Корнелюк^{1,2}

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, Украина, 01033;

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03143,
тел.: +38 (044) 526 55 89, +38 (044) 526 07 56
e-mail: vorobyova_natali_0307@ukr.net

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА АІМР1/Р43 – КОМПОНЕНТА МУЛЬТИСИНТЕТАЗНОГО КОМПЛЕКСА ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)RIL

Реферат

Цель. Оптимизация условий бактериальной экспрессии рекомбинантного белка АІМР1/р43 для повышения выхода и концентрации стабильного нативного белка в растворе. **Методы.** Культивирование в бактериальной системе экспрессии; металл-хелатирующая аффинная хроматография, гель-электрофорез. **Результаты.** Исследовано влияние концентрации индуктора синтеза целевого белка на его конечный выход и установлены оптимальные время и температура культивирования бактериальной культуры после добавления индуктора. Предложена оптимальная схема культивирования штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)RIL для достижения высокого уровня выхода рекомбинантного белка в растворимой форме. **Выводы.** По полученным результатам было установлено, что растворимость рекомбинантного АІМР1/р43 существенно повышается при уменьшении концентрации ИПТГ до 0,5 мМ, понижении температуры до 25 °С и увеличении времени культивирования до 8 ч. Это открывает перспективу получения белка АІМР1/р43 в препаративных количествах для дальнейших структурных исследований и внедрения как нового продукта молекулярной биотехнологии.

Ключевые слова: белок АІМР1/р43, бактериальная система экспрессии, оптимизация экспрессии.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М. Мир. – 2002. – 589 с.
2. Francis D.M., Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. Curr Protoc Protein Sci. – 2010. – Aug;Chapter 5:Unit 5.24.1–29.
3. Wolfe C.L., Warrington J.A., Davis S., Green S., Norcum M.T. Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII // Protein Sci. – 2003.–12, № 10. – P. 2282–2290.
4. IvanovaIu.L., Cherni N.E., Popenko V.I., Filonenko V.V., Vartanian O.G. Comparative study of localization of tryptophanyl-tRNA-synthetase and components



of high molecular weight aminoacyl-tRNA-synthetase complex in animal cells // Mol. Biol. (Mosk).—1993. — 27, № 3. — P. 666–684.

5. Popenko V.I., Ivanova J.L., Cherny N.E., Filonenko V.V., Beresten S.F., Wolfson A.D., Kisselev L.L. Compartmentalization of certain components of the protein synthesis apparatus in mammalian cells // Eur. J. Cell. Biol. — 1994. — 65, № 1.—P. 60–69.

6. Quevillon S., Agou F., Robinson J-C., Mirande M. The p43 component of the mammalian multi-synthetase complex is likely to be the precursor of the endothelial monocyte-activating polypeptide II cytokine// J. Biol. Chem. — 1997. — 272, № 51. — P. 32573–32579.

7. Ivakhno S.S., Kornelyuk A.I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis// Exp. Oncol. — 2004. — 26, № 4. — P. 250–255.

8. Lozhko D., Stanek J., Kazimierczuk K., Zawadzka-Kazimierczuk A., Kozminski W., Zhukov I., Kornelyuk A.¹H, ¹³C, and ¹⁵N chemical shifts assignments for human endothelial monocyte-activating polypeptide EMAP II// Biomol. NMR Assign. — 2013. — 7, № 1. — P. 25–29.

9. Renault L., Kerjan P., Pasqualato S., Menetrey J., Robinson J.C., Kawaguchi S., Vassylyev D.G., Yokoyama S., Mirande M., Cherfils J. Structure of the EMAPII domain of human aminoacyl-tRNA synthetase complex reveals evolutionary dimer mimicry // EMBO J. — 2001. — 20, № 3.—P. 570–578.10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — 227, № 5259. — P. 680–685.

11. Wright P.E., Dyson H.J. Intrinsically unstructured proteins: Reassessing the protein structure-function paradigm // J. Mol. Biol. — 1999. — 293, N 2. — P. 321–331.

12. Dyson H.J., Wright P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol.—2005.—6, N 3.—P. 197–208.

13. Бабенко Л.А., Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І. Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE, Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 3, С. 21–31.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2015 р.



ИЗУЧЕНИЕ КРИОПОВРЕЖДЕНИЙ СВОБОДНЫХ И ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ГЕЛЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Целью данного исследования было выявление особенностей повреждений клеток *Saccharomyces cerevisiae*, свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия, в результате их криоконсервирования. *Методы.* Объектом исследования были клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. С помощью флуоресцентных красителей *AnnexinV* и *7AAD* методом проточной цитометрии проведена оценка повреждений деконсервированных клеток *S. cerevisiae*. *Результаты.* Характерными признаками негативного воздействия низких температур было нарушение целостности и липидной асимметрии цитоплазматических мембран (ЦПМ), фрагментация ДНК. Проведенный анализ асимметричного распределения фосфолипидов в мембране клеток дрожжей *S. cerevisiae* показал, что перестройки в липидной организации мембраны в процессе криоконсервирования могут происходить не только под воздействием физико-химических факторов, но и под влиянием криопротекторов. Выход фосфатидилсерина в наружный монослой ЦПМ наблюдали у 2,5% иммобилизованных клеток (2 группа). Количество *AnnexinV* – меченых клеток в группе 4 было в 2 раза больше относительно количества сохранных клеток после замораживания. Подобная динамика наблюдалась и в отношении такого рода повреждений в образцах свободных клеток. Однако, следует отметить, что количество *AnnexinV* – меченых клеток в группе 1 было значительно меньше и сопоставимо с контрольными образцами. Мы полагаем, что снижение клеток с нарушением асимметричного распределения фосфолипидов в этой группе происходило за счет увеличения количества полностью разрушенных (не подвергшихся анализу) клеток в этих образцах. Установлено, что во всех исследуемых образцах, включая контрольные, присутствуют клетки, находящиеся на различных стадиях апоптоза. Разница в образцах заключается в значении процента клеток элиминированных из процесса анализа проточной цитометрии. Количество полностью разрушенных клеток в иммобилизованных образцах было значимо меньше, чем в группах свободных в суспензии клеток. *Выводы.* Установлено, что под влиянием повреждающих факторов процесса криоконсервирования в части свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия клеток *Saccharomyces cerevisiae* развиваются нарушения целостности и липидной асимметрии цитоплазматических мембран, фрагментация ДНК. Показано, что наличие криопротектора ДМСО в консервирующей среде приводит к увеличению числа криоконсервированных клеток с асимметричным распределением фосфолипидов в клеточных мембранах. Количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза после замораживания под защитой ДМСО, в 2–2,5 раза превышало количество аналогичных клеток, замороженных без криопротектора. Криоконсервирование дрожжей в полисахаридном геле



альгината натрия может являться альтернативным способом консервации биообъектов под защитой традиционных криозащитных средств, позволяющим достичь высокой степени жизнеспособности и сохранности клеток без использования криопротекторов.

Ключевые слова: дрожжи, криоповреждения, иммобилизация, проточная цитофлуориметрия.

Перевод биологических объектов в состояние глубокого холодового анабиоза с целью их долгосрочного хранения является многоэтапным процессом, на всех этапах которого биологические объекты попадают в экстремальные условия. Снижение температуры окружающей среды ниже физиологических значений, образование кристаллов льда с последующим концентрированием солей в клетках и в окружающей среде, изменение рН среды являются повреждающими факторами, оказывающими отрицательное воздействие на биологические объекты. В ответ на действие указанных повреждающих факторов клетки реагируют изменением ряда физико-химических свойств, обеспечивающих их адаптацию к замораживанию и максимальное сохранение функциональной активности. В случае превышения адаптационных возможностей клеток в них возникают повреждения, в том числе и необратимые, степень выраженности которых может зависеть от исходных генетически детерминированных морфофункциональных свойств клеток.

В современных биотехнологических производствах большое внимание уделяют иммобилизации микробных клеток в различных гелевых носителях. На разных этапах биотехнологического производства возникает необходимость хранения их при низких температурах. Учитывая то, что иммобилизованные в гелевых матрицах микробные клетки используют в качестве продуцентов в биореакторах, в виде медицинских и ветеринарных препаратов перспективным следует считать исследования по возможности консервации их без применения криопротекторов [1]. Работы в этом направлении только начинаются. Более того особое внимание исследователей привлекает возможность криоконсервирования иммобилизованных клеток микроорганизмов для создания коллекций с целью долгосрочного хранения

[2–5]. Ведущей тенденцией криобиологии является отказ от эмпирических принципов исследований, а глубокое изучение механизмов криоповреждений и криозащиты, разработка на этой основе необходимых и достаточных условий эффективного низкотемпературного консервирования биологических объектов [6]. Эти разработки открывают новые перспективы консервации биоматериалов, как для научных исследований, так и для практического использования без утраты ими важнейших генетических признаков. Влияние условий криоконсервирования на иммобилизованные в гелевых носителях клетки микроорганизмов изучено недостаточно. Существующие в настоящее время исследования в этом направлении единичны и фрагментарны.



Целью данного исследования было выявление особенностей повреждений клеток *Saccharomyces cerevisiae*, свободных и иммобилизованных в геле альгината натрия, в результате их криоконсервирования.

Материалы и методы

Объектом исследования были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*, раса ЛЮ-2 (раса получена из РНИИ хлебопекарной промышленности, г. Санкт-Петербург, Россия). Дрожжи культивировали по стандартной методике в неохмеленном пивном сусле (8°Б) при 30 °С с аэрацией до начала стационарной фазы роста [7]. В качестве криопротектора использовали диметилсульфоксид (ДМСО) [8]. Конечная концентрация ДМСО составляла 5%. Все опытные образцы были разделены на 4 группы: 1 группа – суспензия клеток в дистиллированной воде; 2 группа – суспензия клеток в дистиллированной воде с последующей иммобилизацией; 3 группа – суспензия клеток в 5% водном растворе криопротектора ДМСО; 4 группа – суспензия клеток в 5% водном растворе ДМСО с последующей иммобилизацией. Исходная концентрация клеток во всех образцах составляла 25×10^7 кл/мл. Клетки опытных образцов были заморожены со скоростью охлаждения 1 °/мин до –40 °С с последующим погружением в жидкий азот (ранее установленный нами оптимальный режим охлаждения). Размораживали образцы на водяной бане, при температуре 37 °С [9]. Контролем служили образцы с нативными клетками (без замораживания). Для иммобилизации клеток в геле альгината натрия к суспензии клеток добавляли в соотношении 1:1 2% раствор альгината натрия (FarmaSino, Китай). После тщательного перемешивания суспензию клеток с альгинатом натрия набирали в шприц объемом 2 мл с выходным отверстием иглы диаметром 0,3 мм. Затем суспензию вносили по каплям с высоты 5–10 см в 0,1 М водный раствор CaCl_2 , где происходила сшивка альгината катионами кальция в результате реакции полимеризации. Образующиеся гранулы выдерживали в течение 15–20 мин в этом растворе для упрочнения геля. Затем промывали стерильной дистиллированной водой [1]. Деполимеризацию гранул проводили в 4% водном растворе этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Концентрация ЭДТА определена экспериментальным путем с учетом скорости растворения гранул и сохранности жизнеспособности клеток *S. cerevisiae*. Жизнеспособность дрожжей *S. cerevisiae* оценивали по способности образовывать макроколонии на поверхности агаризованных сред («чашечный» метод Коха). Сохранность клеток дрожжей определяли методом исключения мертвых клеток после инкубации с 0,4% раствором трипанового синего. Общее количество клеток, сохранивших морфологическую целостность, подсчитывали в камере Горяева по стандартной методике. Оценку повреждений деконсервированных клеток дрожжей проводили методом проточной цитометрии на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD, USA) с помощью флуоресцентных красителей AnnexinV и 7AAD [10–13]. Результаты измерения оценивали с помощью программного обеспечения фирмы BD – CELLQuestPro. Статистическую обработку данных проводили



по методу Стьюдента – Фишера с использованием программного обеспечения «Excel». Количество проб в каждой составляющей эксперимента $n=6$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования для оценки эффективности различных условий криоконсервирования определили жизнеспособность и сохранность клеток дрожжей *S. cerevisiae* после использования разных скоростей охлаждения, криозащитных сред и иммобилизации. В ходе исследования был установлен оптимальный режим охлаждения со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ для всех экспериментальных групп. Наиболее высокие показатели жизнеспособности и сохранности при данном режиме охлаждения были в группах иммобилизованных клеток, соответственно $96,6\pm 0,4$ и $98\pm 1,3\%$ – во второй, $90,3\pm 2,3$ и $94,8\pm 4,6\%$ – в четвертой экспериментальной группе. Анализируя полученные в данном исследовании результаты, мы пришли к заключению о том, что иммобилизация и экспериментально подобранный оптимальный режим охлаждения это те условия, которые позволяют сохранить жизнеспособность дрожжевых клеток почти на исходном уровне [9, 14, 15]. Этот показатель был в 2–3 раза ниже в образцах свободных клеток в суспензии (рис. 1).

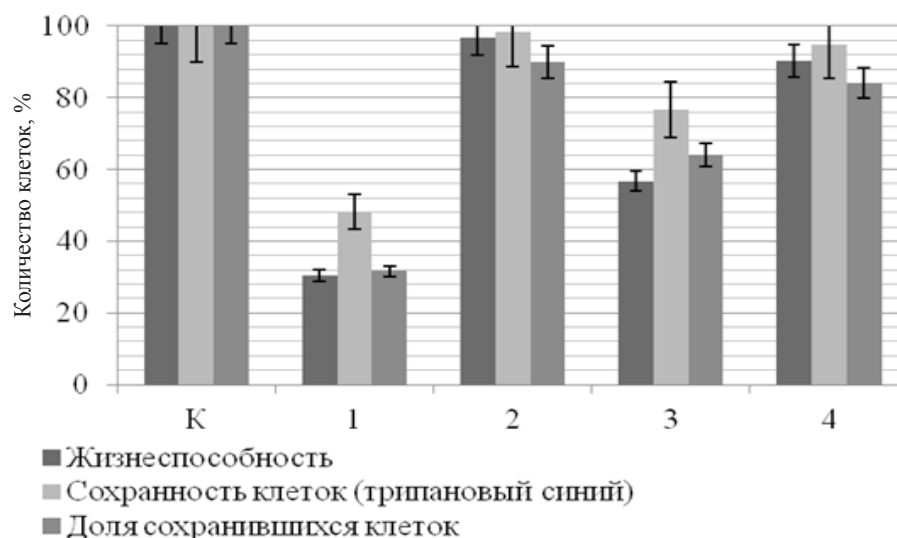


Рис. 1. Влияние различных условий криоконсервирования на культуру клеток *S. cerevisiae*.

Примечание: ■ – жизнеспособность; ■ – сохранность (трипановый синий); ■ – доля клеток, сохранивших морфологическую целостность; цифрами обозначены опытные группы

Fig. 1. Effect of different cryopreservation conditions on *S. cerevisiae* cell culture.

Notes: ■ – viability; ■ – integrity (trypan blue); ■ – a part of cells, kept their morphological integrity; experimental groups are numerated.



Использование медленного замораживания при криоконсервировании дрожжей *S. cerevisiae* под защитой 5% ДМСО также позволяет в значительной степени сохранить жизнеспособность клеток ($56,8 \pm 2,0\%$). Однако, использование его нецелесообразно по двум причинам: во-первых, этот показатель достоверно ниже, чем в группах иммобилизованных клеток, во-вторых, присутствие классических криопротекторов нежелательно при использовании микроорганизмов в пищевой, фармацевтической и биотехнологической промышленности.

Следующим этапом исследования было выявление особенностей повреждений свободных и иммобилизованных клеток *S. cerevisiae* в результате их криоконсервирования. Предварительно, с помощью камеры Горяева было подсчитано общее количество клеток, сохранивших морфологическую целостность после процесса криоконсервирования. Исходная концентрация клеток во всех образцах была равна $(25 \pm 1,3) \times 10^7$ кл/мл. После замораживания в первой группе происходило снижение этого показателя до $(7,9 \pm 0,84) \times 10^7$ кл/мл, что составляло 31,6% от исходной концентрации клеток в образцах (рис. 2). Данные второй и четвертой групп были сопоставимы с контрольными образцами и составляли соответственно $(22,5 \pm 1,48) \times 10^7$ и $(21 \pm 1,74) \times 10^7$ кл/мл. В третьей группе количество клеток, сохранивших морфологическую целостность, уменьшилось почти в 1,5 раза.

Анализ с использованием флуоресцентных красителей показал, что под влиянием повреждающих факторов процесса криоконсервирования в клетках дрожжей *S. cerevisiae* развиваются нарушения фосфолипидной асимметрии (AnnexinV) и целостности цитоплазматической мембраны, фрагментация ДНК в ядре клеток (7AAD). На диаграмме, представленной на рис. 2, показано процентное соотношение 7AAD- и AnnexinV-меченых клеток в анализируемых пробах. Подвергшиеся охлаждению клетки испытывали огромный комплекс воздействий, в результате которых происходили, прежде всего, специфические нарушения в состоянии цитоплазматических мембран.

Одним из них было нарушение липидной асимметрии, являющейся основой для нормального функционирования мембраны и клетки в целом. Особенное внимание при оценке степени нарушения асимметрии мембран мы уделяли анионному фосфолипиду фосфатидилсерину (ФС). ФС, локализующийся на внутренней поверхности ЦПМ, при инициации апоптоза утрачивал асимметричность распределения в липидном бислое и перемещался на внешнюю сторону мембраны. Экспонированный на поверхности ЦПМ он легко обнаруживался с помощью флуоресцентно-меченного AnnexinV на поверхности клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза.

Сравнительный анализ асимметричного распределения фосфолипидов в мембране клеток дрожжей *S. cerevisiae* показал высокую вероятность того, что перестройки в липидной организации мембраны, происходящие под влиянием криопротекторов, могут приводить к нарушению асимметричного распределения фосфолипидов в мембране [16, 17]. Результаты, полученные в данном исследовании в пересчете в абсолютные значения (с учетом клеток, сохранивших морфологическую целостность), приведены на рис. 3. Количество



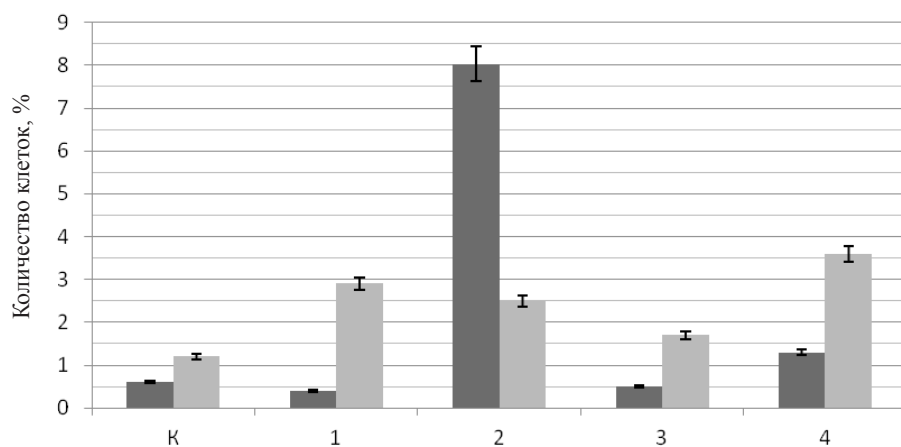


Рис. 2. Соотношение 7AAD- и AnnexinV-меченых клеток *S. cerevisiae* в контроле и опытных образцах после криоконсервирования.

Примечание: ■ – AnnexinV-меченые клетки; ■ – 7AAD-меченые клетки; цифрами обозначены опытные группы.

Fig. 2. Percentage of 7AAD- and AnnexinV-labelled *S. cerevisiae* cells in the control and experimental samples after cryopreservation.

Notes: ■ – AnnexinV-labelled cells; ■ – 7AAD-labelled ones; experimental groups are numerated.

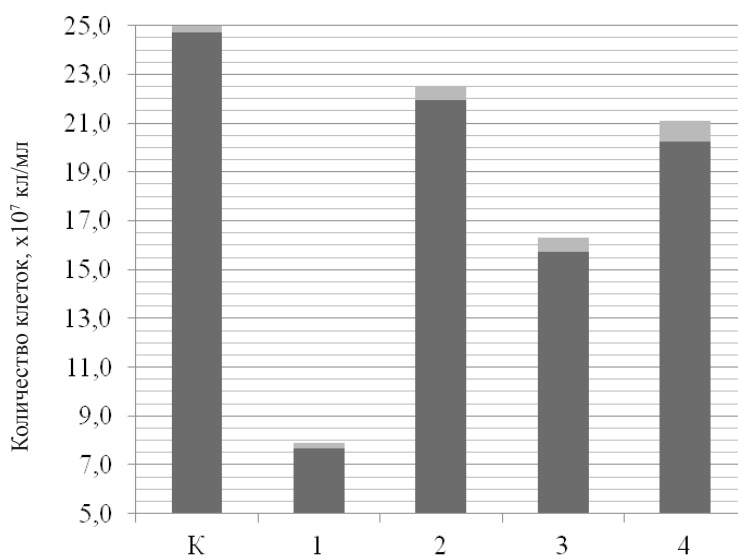


Рис. 3. Количество AnnexinV-меченых клеток *S. cerevisiae* после криоконсервирования.

Примечание: ■ – живые неповрежденные клетки; ■ – AnnexinV-меченые клетки; цифрами обозначены опытные группы.

Fig. 3. Number of AnnexinV-labelled *S. cerevisiae* cells after cryopreservation.

Notes: ■ – living undamaged cells; ■ – AnnexinV-labelled cells; experimental groups are numerated.



Annexin V-меченых клеток в группе 4 было почти в 2 раза больше относительно количества сохранных клеток после замораживания. Подобная динамика наблюдалась и в отношении такого рода повреждений в образцах свободных клеток. Количество клеток, находящихся на ранней стадии апоптоза, в группе свободных клеток, консервированных под защитой ДМСО, было в 2–2,5 раза больше, чем в группе 1. Однако следует отметить, что количество Annexin V-меченых клеток в 1 группе было значительно меньше и сопоставимо с контрольными образцами. Мы полагаем, что снижение числа клеток с нарушением асимметричного распределения фосфолипидов в группе 1 происходило за счет большего количества полностью разрушенных клеток в этих образцах.

Сохранность, являющаяся одним из важнейших показателей состояния клетки, не может на 100% говорить о ее жизнеспособности, поскольку при сохранении структуры клетка может быть нежизнеспособной [18]. Поэтому на следующем этапе исследования с помощью ДНК-тропного красителя 7-AAD, не проникающего в живые, но свободно проникающего в клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной нами были определены клетки, находящиеся на поздней стадии апоптоза и мертвые клетки. На рис. 4 приведены результаты в пересчете в абсолютные значения.

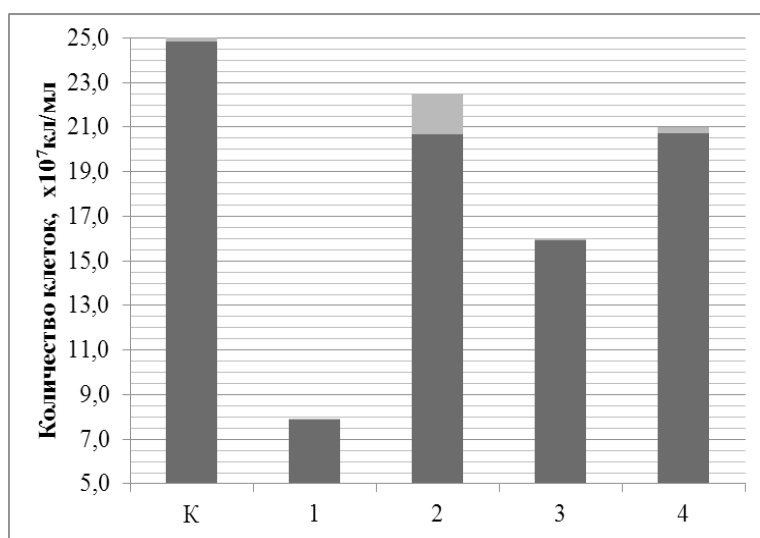


Рис. 4. Количество 7AAD-меченых клеток *S. cerevisiae* после криоконсервирования.

Примечание: ■ – живые неповрежденные клетки; ■ – 7AAD-меченые клетки; цифрами обозначены опытные группы.

Fig. 4. Number of 7AAD-labeled *S. cerevisiae* cells after cryopreservation.

Notes: ■ – living undamaged cells; ■ – 7AAD-labelled cells; experimental groups are numerated.

7AAD-меченых клеток в образцах 2 группы (иммобилизованные клетки) было в 4 раза больше, чем в группе 4 (иммобилизованные клетки + ДМСО). Однако количество 7AAD – немеченых (живых неповрежденных) клеток в этих

группах значимо не отличалось. Это свидетельствует о том, что иммобилизация клеток в альгинатном геле и оптимальные режимы охлаждения позволяют сохранить высокую степень неповрежденных живых клеток без использования традиционных криозащитных средств.

Для оценки количественного соотношения клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза мы использовали двухпараметровый анализ с окрашиванием AnnexinV FITC и 7AAD. Данная комбинация флуоресцентных красителей позволяет отследить «цикл смерти»: на ранних стадиях апоптотические клетки окрашиваются только AnnexinV, после повреждения ЦПМ начинают пропускать 7-AAD, который подавляет флуоресценцию AnnexinV. Живые клетки не окрашиваются ни AnnexinV, ни 7AAD. Используемый нами способ оценки позволяет получить реальную картину влияния условий консервирования (режимы охлаждения, состав криозащитной среды, иммобилизация) на состояние клеток. В таблице приведены результаты, полученные в данном исследовании. Показатели иммобилизованных клеток (группы 2 и 4) и группы 3 (наличие ДМСО в криозащитной среде) по многим значениям не отличались от показателей контроля. Сохранность в образцах свободных клеток (группа 1) снижалась более чем на 50% без достоверного увеличения количества 7AAD-меченых клеток за счет разрушения данных клеток и элиминации их из процесса анализа проточной цитометрии. Несмотря на то, что в образцах второй группы наблюдали значительное увеличение популяции позднеапоптотических и мертвых клеток, общее количество живых неповрежденных клеток в этой группе было сопоставимо с показателями 3 и 4 группы.

Таблица

Соотношение неповрежденных клеток и клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза после консервирования в разных условиях

Table

Percentage of undamaged cells and those being at different apoptotic stages after cryopreservation under different conditions

Клетки	Содержание, %				
	Контроль	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа
AnnexinV ⁻ / 7AAD ⁻ (живые клетки)	99,42±0,05	98,78±0,16	92,47±0,21	99,26±0,07*	97,63±0,17
AnnexinV ⁺ / 7AAD ⁻ (ранний апоптоз)	0,23±0,01	0,16±0,01	0,71±0,03*	0,25±0,01*#	1,77±0,01 *#
AnnexinV ⁺ / 7AAD ⁺ (позд- ний апоптоз)	0,22±0,07	0,56±0,01*	3,81±0,04*	0,17±0,08 #	0,34±0,01*
AnnexinV ⁻ / 7AAD ⁺ (мерт- вые клетки)	0,14±0,09	0,5±0,03*	3,01±0,01 *	0,33±0,01*#	0,26±0,01*#

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем; # – p<0,05 по сравнению с группой 2.
Notes: * – p<0.05 if compared with the control, # – p<0.05 if compared with the group 2.



Аналізуючи якісну картину розподілу кліток *S. cerevisiae* між групами, кожна з яких визначає ступінь пошкодження кліток, встановлено, що всі зразки, включаючи контрольну групу, характеризуються певною кількістю кліток, що знаходяться на різних стадіях апоптозу. В процесі низькотемпературної консервації в клітках виникають пошкодження в результаті безпосереднього і опосередкованого впливу фізико-хімічних факторів, реалізуємих на етапах криоконсервації. Вплив на клітки цих факторів в процесі криоконсервування не привело до суттєвого перерозподілу між досліджуємих групами, що підтверджується показателями, представленими в табл. Різниця між групами заключається в кількості елімінованих кліток з процесу аналізу проточної цитометрії. Значення повністю знищених кліток в зразках 2 і 4 групи (імобілізовані клітки) було значно менше, ніж в 1 і 3 групах (вільні клітки). Це ще раз підтверджує захисний ефект імобілізації в гелевому носії в процесі наступного криоконсервування кліток мікроорганізмів.

На основі проведених досліджень можна зробити висновок про те, що експериментально підібрані режими охолодження, склад криозащитних серед, імобілізація в гелевому носії дозволяють досягти високої ступеня збереженості дрожжевих кліток, звести до мінімуму кількість пошкоджених і повністю знищених кліток. Ми припускаємо, що інтенсивність негативного впливу фізико-хімічних факторів на імобілізовані клітки в процесі заморожування зменшується за рахунок зміни в потрібному напрямку швидкості утворення кристалів льоду і характеру кристалізації. Отримані результати обумовлюють доцільність подальших досліджень в цьому напрямку і дають можливість для уточнення зроблених нами висновків.

Таким чином, можна зробити висновок, що під впливом пошкоджуючих факторів процесу криоконсервування в частині вільних і імобілізованих в гелі альгінату натрію кліток *Saccharomyces cerevisiae* відбуваються порушення цілості і ліпідної асиметрії цитоплазматических мембран, фрагментація ДНК. Наявність криопротектора ДМСО в консервуючій середі призводить до збільшення числа криоконсервованих кліток з асиметричним розподілом фосфоліпідів в клітинних мембранах. Кількість кліток, що знаходяться на ранній стадії апоптозу після заморожування під захистом ДМСО, в 2–2,5 рази перевищувало кількість аналогічних кліток, заморожених без криопротектора. Криоконсервування дрожжей в полісахаридному гелі альгінату натрію може бути альтернативним способом консервації біооб'єктів під захистом традиційних криозащитних засобів, що дозволяють досягти високої ступеня життєспроможності і збереженості кліток без використання криопротекторів.



В.Л. Пономарьова, І.П. Висеканцев, О.С. Онасенко, П.М. Зубов

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна, тел.:+38 (057) 373 30 39, e-mail: viktoriiia-may@mail.ru

ВИВЧЕННЯ КРІОУШКОДЖЕНЬ ВІЛЬНИХ ТА ІММОБІЛІЗОВАНИХ В ГЕЛІ АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Реферат

Метою цього дослідження було виявлення особливостей ушкоджень клітин *Saccharomyces cerevisiae*, вільних та іммобілізованих в гелі альгінату натрію, в наслідок їх кріоконсервування. **Методи.** Об'єктом дослідження були клітини дріжджів *S. cerevisiae*. За допомогою флуоресцентних барвників AppexinV і 7AAD методом поточної цитометрії проведено оцінку ушкоджень деконсервованих клітин *S. cerevisiae*. **Результати.** Притаманними ознаками негативного впливу низьких температур було порушення цілісності та ліпідної асиметрії цитоплазматичних мембран, фрагментація ДНК. Проведеним аналізом асиметричного розподілу фосфоліпідів у мембрані клітин дріжджів *S. cerevisiae* було показано, що перебудови у ліпідній організації мембрани можуть відбуватися не тільки під впливом фізико-хімічних факторів, але й під впливом кріопротекторів. Вихід фосфатиділсерину в зовнішній моношар ЦПМ спостерігали у 2,5% іммобілізованих клітин (2 група). Кількість AppexinV-мічених клітин у групі 4 була в 2 рази більшою відносно кількості збережених клітин після заморозування. Подібну динаміку спостерігали і щодо такого роду ушкоджень у зразках вільних клітин. Проте, слід зазначити, що кількість AppexinV-мічених клітин у групі 1 була значно меншою і відповідала рівню в контрольних зразках. Ми вважаємо, що зниження клітин з порушенням асиметричного розподілу фосфоліпідів у цій групі відбувалося за рахунок збільшення кількості повністю зруйнованих (що не зазнали аналізу) клітин у цих зразках. Встановлено, що в усіх досліджуваних зразках, включаючи контрольні, присутні клітини, які знаходяться на різних стадіях апоптозу. Різниця у зразках полягає в значенні відсотка клітин елімінованих з процесу аналізу поточної цитометрії. Кількість повністю зруйнованих клітин в іммобілізованих зразках була значимо меншою, ніж у групах вільних у суспензії клітин. **Висновки.** Встановлено, що під впливом ушкоджувальних чинників процесу кріоконсервування у частини вільних та іммобілізованих в гелі альгінату натрію клітин *Saccharomyces cerevisiae* розвиваються порушення цілісності й ліпідної асиметрії цитоплазматичних мембран, фрагментація ДНК. Показано, що наявність кріопротектора ДМСО в консервувальному середовищі призводить до збільшення числа кріоконсервованих клітин з асиметричним розподілом фосфоліпідів у клітинних мембранах. Кількість клітин, що знаходяться на ранній стадії апоптозу після заморозування під захистом ДМСО, в 2–2,5 рази перевищувала кількість подібних клітин, заморожених без кріопротектора. Кріоконсервування дріжджів у поліукридному гелі альгінату натрію може бути альтернативним способом консервації біоб'єктів під захистом традиційних кріозахисних засобів, що дозволяє досягти високого ступеня життєздатності й збереженості клітин без використання кріопротекторів

Ключові слова: дріжджи, кріоушкодження, іммобілізація, проточна цитофлуориметрія.



V.L. Ponomareva, I.P. Vysekantsev, E.S. Onasenko, P.M. Zubov

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya str., Kharkov, 61015, Ukraine, tel.: +38 (057) 373 30 39, e-mail: viktoriiia-may@mail.ru

STUDY OF CRYOINJURIES OF FREE AND IMMOBILIZED IN SODIUM ALGINATE GEL *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST CELLS

Summary

The aim of this study was the revealing of the peculiarities of cryoinjuries of free and immobilized in sodium alginate gel *Saccharomyces cerevisiae* cells after cryopreservation. **Methods.** The research object was the *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. By means of fluorescent dyes Annexin V and 7AAD with flow cytometry the injuries of frozen-thawed *Saccharomyces cerevisiae* cells were assessed. **Results.** The characteristic features of negative effect of low temperatures were impairments in the integrity and lipid asymmetry of cytoplasm membranes (CPM), DNA fragmentation. The performed analysis of asymmetric distribution of phospholipids in membrane of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells has shown that the rearrangements in lipid membrane structure during cryopreservation may occur not only under the effect of physical and chemical factors but also due to cryoprotectants. The yield of phosphatidylserine in an outer monolayer layer of CPM was observed in 2.5% of immobilized cells (group 2). The number of Annexin V–labeled cells in group 4 was twice higher relative to the amount of intact cells after freezing. A similar tendency was observed with regard to this kind of damage in the samples of free cells. However, it should be noted that the number of Annexin V–labeled cells in group 1 was significantly lower and it is comparable with the controls. We believe that the reduction in the number of cells with disordered asymmetric distribution of phospholipids in group 1 was due to increase in the number of completely destroyed (not subjected to analysis) cells in these samples. It has been found that all the tested samples, including controls, there were the cells being at different stages of apoptosis/necrosis. The difference in the samples consists in the value of the percentage of cells eliminated from the analysis of flow cytometry. The number of completely destroyed cells in immobilized samples was significantly lower than in the group of free cells in a suspension. It has been established that there are the cells being at different stages of apoptosis, in all the studied samples including the control ones. The difference in the samples consists in the value of the percentage of the cells eliminated from the process of flow cytometry analysis. The number of completely destroyed cells in immobilized samples was statistically and significantly lower than in the groups of free in suspension cells. **Conclusions.** It has been established that under the influence of cryopreservation damaging factors in a part of free and immobilized in alginate gel *S. cerevisiae* cells there were developed the disorders in an integrity and lipid asymmetry of the cytoplasmic membranes, DNA fragmentation. The presence of DMSO as a cryoprotectant in preserving medium has been shown to lead to an increase in the number of cryopreserved cells with an asymmetric distribution of phospholipids in cell membranes. The number of cells in early apoptosis after freezing with DMSO as a cryoprotectant in 2–2.5 times exceeded the number of similar cells frozen without cryoprotectant. Cryopreservation of yeasts in polysaccharide gel of sodium alginate may be an alternative way to preservation of biological objects under the protection with traditional cryoprotective agents, allowing a high degree of viability and preservation of cells with no cryoprotectants.

Key words: yeast, cryoinjury, immobilization, flow cytometry.



СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Синицын А.П., Райнина Е.И., Лозинский В.И. Иммуобилизованные клетки микроорганизмов. – М.: МГУ, 1994. – 288 с.
2. Mahler S., Desille M., Fremond B. Hypothermic storage and cryopreservation of hepatocytes: the protective effect of alginate gel against cell damages // Cell Transplant. – 2003. – Vol. 12, № 6. – P. 579–592.
3. Siti-Ismail N., Bishop AE., Polak JM., Mantalaris A. The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29. – P. 3946–3952.
4. Dang S.M., Gerecht-Nir S., Chen J., Itskovitz-Eldor J., Zandstra P.W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture // Stem Cells. – 2004. – Vol. 22. – P. 275–282.
5. Li Z., Leung M., Hopper R., Ellenbogen R., Zhang M. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – P. 404–412.
6. Грищенко В.И. Достижения и развитие криобиологии в Украине // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 3. – С. 232–233.
7. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: МГУ, 1976. – 307 с.
8. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – К.: Наукова думка, 1978. – 204 с.
9. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С. Изучение влияния режимов охлаждения и защитных сред, содержащих альгинат натрия, на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Вісник проблем біології і медицини. – 2011. – Вип. 3, Т. 1 (87). – С. 35–37.
10. Скибо Ю.В., Абрамова З.И. Методы исследования программируемой клеточной гибели. Учебно-методическое пособие по курсу «Теория апоптоза». – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. – 61 с.
11. Engeland M. Van, Nieland L.J., Ramaekers F.C. Annexin-V-affinity assay: a review based on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure // J. Cytometry. – 1998. – Vol. 31. – P. 1–9.
12. Willingham Mark C. Cytochemical methods for the detection of apoptosis // J. of Histochemistry and Cytochemistry. – 1999. – Vol. 47, № 9. – P. 1101–1109.
13. Гланц С. Медико-биологическая статистика / Под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 460 с.
14. Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V // J. Immunol. Meth. – 1995. – Vol. 184. – P. 39–51.
15. Пономарева В.Л., Высеканцев И.П., Гурина Т.М., Онасенко Е.С., Пишкото О.М. Изучение влияния условий криоконсервирования на жизнеспособность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммуобилизованных в альгинатном геле // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Вип. 2, Т. 1 (92). – С. 14–17.



16. *Algaier J., Himes R.H.* The effect of DMCO on the kinetics of tubulin assembly // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 954, № 3. – P. 235–243.

17. *Yamamoto N.* Effects of dimethyl sulfoxide on cytosolic ionized calcium concentration and cytoskeletal organization of hepatocytes in a primary culture // *J. Cell Struct. and Funct.* – 1989. – Vol. 14, № 14. – P. 75–85.

18. *Билич Г.Л., Крыжановский В.А.* Биология. Полный курс: В 4 т. – издание 5-е, дополненное и переработанное. – М.: Издательство Оникс, 2009. – Т. 1. – 864 с.

Стаття надійшла до редакції 04.06.2015 р.



**В.О. Іваниця, О.Г. Горшкова, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,
Т.В. Гудзенко, А.М. Остапчук**

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

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ ШТАМУ BACILLUS SP. O3-5, ВИДІЛЕНОГО ІЗ ЗАБРУДНЕНОГО НАФТОЮ ҐРУНТУ О. ЗМІЙНИЙ

Мета. Визначення складу жирних кислот клітинних ліпідів та ідентифікація штаму бактерій, виділеного із ділянки забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний. **Методи.** Аналіз складу жирних кислот штаму *Bacillus sp. O3-5* здійснювали з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI inc., USA) на базі газового хроматографа Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA). **Результати.** Охарактеризований за фенотиповими ознаками штаму *Bacillus sp. O3-5*, за складом жирних кислот ідентифіковано як *Bacillus megaterium O3-5 – GC subgroup A*. Аналіз одержаної хроматограми показав, що переважальними в жирнокислотному спектрі штаму *Bacillus megaterium O3-5* є розгалужені структурні ізомери довголанцюгових насичених жирних кислот з переважним вмістом 12-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ антеїзо, 39,6%) і 13-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ ізо, 32,93%) кислот, серед інших розгалужених ізомерів виявлено $C_{17}:0$ антеїзо (2,69%), $C_{17}:0$ ізо (1,88%), $C_{14}:0$ ізо (6,62%), $C_{16}:0$ ізо (1,76%), $C_{13}:0$ антеїзо (0,25%) та $C_{13}:0$ ізо (0,5%). **Висновок.** Аналіз жирнокислотного профілю досліджуваного штаму з використанням системи MIDI Sherlock дозволив віднести його до виду *Bacillus megaterium-GC subgroup A* з високим індексом подібності 0,731. Виявлені особливості спектру жирних кислот досліджуваного мікроорганізму систематизовані і відрізняють його від інших бактерій роду *Bacillus*.

Ключові слова: склад жирних кислот, ідентифікація, *Bacillus*.

Біологічні методи очищення ґрунту від нафти та нафтопродуктів розроблені із використанням бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти. Їх різноманітна і пластична ферментативна система дозволяє досить швидко перемикатися на споживання різних джерел карбону та енергії. Висока пластичність обмінних процесів, швидка адаптація до умов існування дозволяє нафтоокиснювальним бактеріям активно утилізувати вуглеводні, знижуючи вміст нафтопродуктів у ґрунті до фонових значень за низьких експлуатаційних витрат і простоті здійснення процесу очищення забруднених ґрунтів [3].

Використання острова Зміїний впродовж десятиліть у військових цілях призвело до значного нафтового забруднення, що становить до 10% ґрунтового покриття території острова, показано, що вміст нафтопродуктів сягає до



112,5 г/кг ґрунту. Проблема ремедіації ґрунту в цій місцевості ускладнюється його хімічним складом, а саме високим рівнем засоленості, так загальний вміст солей у верхніх горизонтах у більшості випадків знаходиться на рівні 0,05–0,07%, збільшуючись з глибиною до 0,1–0,2%. Джерелом засоленості є продукти вивітрювання щільних порід поверхні острова та аеральне надходження морської води з навколишньої акваторії Чорного моря [1].

Раніше із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний було ізольовано штам бактерій, здатний до утилізації аніонних поверхнево-активних речовин та нафтопродуктів.

Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів як важлива видова та внутрішньовидова хемотаксономічна характеристика [2, 4, 5], корелює, на думку більшості науковців [6, 7, 9], із даними молекулярно-генетичних показників. Для більшості мікроорганізмів він вивчений та використовується як хемотаксономічна ознака. Система MIDI Sherlock дозволяє автоматизувати процес ідентифікації мікроорганізмів за цією ознакою з використанням бібліотеки жирнокислотних профілів [16].

Науковий інтерес до детального вивчення жирнокислотного профілю бактерій посилюється ще й тому, що деякі з їх клітинних жирних кислот (ненасичені та розгалужені) є автоіндукторами у кворум-чутливій системі, яка забезпечує контакти як між членами популяції, так і з макроорганізмами [11], що є особливо важливим в біотехнології.

Метою роботи було визначення таксономічного положення штаму бактерій, виділеного із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний, за складом жирних кислот клітинних ліпідів.

Матеріали і методи

В роботі досліджували штам бактерій, ізольований із забрудненого впродовж десятків років ґрунту острова Зміїний. Попередньо проведені нами дослідження показали, що виділений штам здатний до утилізації аніонних поверхнево-активних речовин та нафтопродуктів. Ступінь деструкції нафтової плями (10 мг нафти /10 мл бактеріальної культури) у середовищі М-9 протягом 20 діб сягала 45%. На “голодному” агарі з 1% додецилсульфатом натрію (ДДСН) бактерії добре ростуть, що свідчить про їх здатність до утилізації аніонних поверхнево-активних речовин.

За фенотиповими (морфологічними, фізіолого-біохімічними, культуральними) ознаками, визначеними з використанням класичних бактеріологічних методів та тест-системи API 50 CHB Medium (bioMerieux, Франція) штам було попередньо віднесено до виду *Bacillus megaterium* [10]. Уточнення видової приналежності здійснювали за складом жирних кислот клітинних ліпідів.

Бактерії культивували на середовищі Tryptic soy agar (Merck, Germany) за температури 28 ± 1 °C впродовж 24 годин. Для аналізу складу клітинних ліпідів одну повну петлю вологої біомаси поміщали в скляні віали для подальшого хімічного лізису клітин та омилення ліпідів досліджуваного мікроорганізму. Омилення проводили шляхом додаванням 50% метанолу та 3,7 М NaOH.



Підготовлену пробу витримували впродовж 30 хв за температури 95–100 °С. Метилування жирних кислот проводили прогріванням реакційної суміші при 80 °С впродовж 10 хв після додавання розчину кислого метанолу. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [16].

Хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) з капілярною колонкою ULTRA-2 (25м×0,2мм×0,33мкм) і полум'яно-іонізаційним детектором. Пробу об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °С.

Розділення жирних кислот проводили в режимі програмування температури – початкова температура 170 °С з наступним градієнтом 5 °С/хв до 270 °С. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до загальної суми площ піків.

Для визначення жирнокислотного складу загальних ліпідів досліджуваного штаму та для його ідентифікації використали програмне забезпечення MIDI Sherlock 4.5 та бібліотеку жирнокислотних профілів аеробних мікроорганізмів RSTBA6 версії 6.2.

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень показано, що виділені із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний бактерії досліджуваного штаму *Bacillus* sp. O3-5 є аеробними, грампозитивними, каталазопозитивними прямими паличками з закругленими кінцями, що утворюють ендоспори. Бактерії розміром 1,2–1,5 мкм, ростуть у широкому діапазоні температур від 3 до 45 °С за оптимального рН 7,0. На агаризованому середовищі (МПА з додаванням $MnSO_4$ – 10 мг/л) досліджуваний штам утворює глянцеві, круглі колонії, здатний до гідролізу крохмалю, желатину, казеїну, утилізації низки цукрів з утворенням кислоти.

За сукупністю морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних ознак виділений із забрудненого нафтопродуктами ґрунту острова Зміїний штам був віднесений до виду *Bacillus megaterium*.

Спектр жирних кислот визначено на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) (рис. 1) і розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSA6 6.2 програми MIDI Sherlock (табл. 1).

Результати аналізу жирнокислотного профілю досліджуваного штаму (табл. 1) показали присутність ненасичених ізомерів жирних кислот $C_{16}:1$, $C_{17}:1$ в слідових кількостях (менше 1% кожна). Це відрізняє його від представників рРНК групи 2, які характеризуються значним вмістом ізомерів з ненасиченими зв'язками (17–28%) та дозволяє віднести до рРНК групи 1, де вміст ненасичених ізомерів складає менше 10%. В жирнокислотному профілі досліджуваного штаму також зафіксована присутність насичених ізомерів $C_{16}:0$ (5,86%), та $C_{14}:0$ (2,89%).

У роботах С. Ash зі співавторами [9] із секвенування 16S-РНК, серед представників роду *Bacillus* було виділено 5 окремих груп. До представників рРНК групи 1 віднесені *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. azotoformans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, тощо.



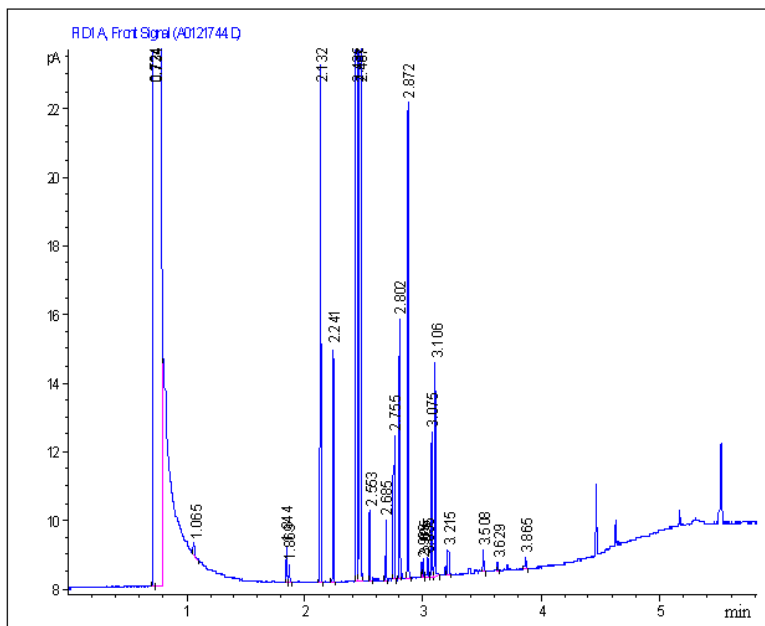


Рис. 1. Хроматограма жирних кислот загальних клітинних ліпідів штаму *Bacillus megaterium* O3-5

Fig. 1. Chromatogram of fatty acids of total cellular lipids of strain *Bacillus megaterium* O3-5

Жирнокислотний склад в більшості представлений $C_{15}:0$ антеїзо (25–66%), $C_{15}:0$ iso (22–47%), $C_{17}:0$ антеїзо (2–12%) за винятком представників групи *B. cereus*, які характеризуються підвищеним вмістом ненасичених жирних кислот (більше 10%) та меншим вмістом $C_{15}:0$ антеїзо (7–12%). Види *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. insolitus*, *B. pasteurii*, *B. psychrophilus* були віднесені до рРНК групи 2 [9]. Переважною в їх жирнокислотному складі є $C_{15}:0$ антеїзо. Також характерним для цієї групи є наявність значної кількості ненасичених жирних кислот (17–28%). До рРНК групи 3 віднесені представники роду *Paenibacillus*, жирнокислотні профілі, яких містять $C_{15}:0$ антеїзо (36–80%), $C_{16}:0$ iso (0,5–6,6%), $C_{15}:0$ iso (1–12%) та $C_{17}:0$ антеїзо (2–21%) [12, 17]. До рРНК групи 4 віднесені представники роду *Brevibacillus*. Для переважної більшості мікроорганізмів цієї групи характерний вміст $C_{15}:0$ iso (18–42%) та $C_{15}:0$ антеїзо (32–72%). Група 5 включає представників роду *Geobacillus*, які є термофілами та представляють цілісну і гомогенну групу. Основні жирні кислоти $C_{15}:0$ iso, $C_{16}:0$ iso та $C_{17}:0$ iso, складають 60–80% від всього пулу [8, 15].

Проведеними дослідженнями показано, що переважають у жирнокислотному профілі штаму *Bacillus* sp. O3-5 $C_{15}:0$ антеїзо (39,6%) та $C_{15}:0$ iso (32,93%), що є характерним для більшості представників роду *Bacillus* та для представників рРНК групи 1 зокрема. Серед інших розгалужених ізомерів виявлено $C_{17}:0$ антеїзо (2,69%), $C_{17}:0$ iso (1,88%), $C_{14}:0$ iso (6,62%), $C_{16}:0$ iso (1,76%), $C_{13}:0$ антеїзо (0,25%) та $C_{13}:0$ iso (0,5%).

Таблиця 1

**Жиринокислотний склад загальних ліпідів бактерій
Bacillus megaterium-GC subgroup A O3-5**

Table 1

**Fatty acid composition of total lipids of bacteria
Bacillus megaterium-GC subgroup A O3-5**

Жиринокислота	Відсоток від загальної суми площі піків (%)
C ₁₃ :0 ізо	0,50
C ₁₃ :0 антеізо	0,25
C ₁₄ :0	2,89
C ₁₄ :0 ізо	6,62
C ₁₅ :0 ізо	32,93
C ₁₅ :0 антеізо	39,60
C ₁₆ :0 ізо	1,76
C ₁₆ :0	5,86
C ₁₇ :0 ізо	1,88
C ₁₇ :0 антеізо	2,69
C ₁₈ :0	0,27
C ₁₆ :1 w7c alcohol	0,74
C ₁₆ :1 w11c	0,25
C ₁₇ :1 iso w10c	0,23
C ₁₈ :0 10-methyl	0,12
C ₁₈ :1 2OH	0,15
Σ ЖК _{насих} = 95,25%; К _{насих} = 21,84; Σ ЖК _{ненасич} = 4,36%; К _{ненасич} = 0,046.	

Вміст насичених жирних кислот розгалуженої структури складав 77,1% від загального пулу жирних кислот.

Наявність 7-гексадеценового спирту (C₁₆:1 w7c alcohol), хоча він присутній в малій кількості (0,74%) у спектрі жирних кислот, може слугувати характерною ознакою цього штаму, а також дає можливість з великою вірогідністю спрогнозувати його здатність утилізувати аліфатичні спирти, що є проміжним продуктом окиснення нафтопродуктів. На користь цього твердження вказує той факт, що саме із забрудненого нафтопродуктами ґрунту був виділений досліджуваний аборигенний штам.

Дослідження Т. Kaneda [13] жирнокислотних профілів представників групи *Bacillus* дозволили виділити 6 груп (A-F), в жирнокислотних профілях котрих



переважають розгалужені жирні кислоти з кількістю атомів карбону від 14 до 17 в різних діапазонах та залежно від вмісту ненасичених жирних кислот. Окремо виділяється група D з 70% вмістом циклогексанових жирних кислот з довжиною ланцюга від 17 до 19 атомів карбону як переважальних. Показано, що переважання розгалужених жирних кислот в спектрі є характерною ознакою бактерій роду *Bacillus* [6]. Встановлено, що вміст розгалужених жирних кислот у бацил варіює від 54 до 85% від загального жирнокислотного пулу клітини, включаючи як насичені, так і ненасичені кислоти з переважним вмістом $C_{15}:0$ ізо і $C_{15}:0$ антеїзо. Для бацил також є характерним наявність $C_{17}:0$ ізо і $C_{17}:0$ антеїзо жирних кислот [14].

Порівняльний аналіз та результат обробки жирнокислотного профілю бактерій досліджуваного штаму системою MIDI Sherlock з використанням бібліотек спектрів жирних кислот аеробних мікроорганізмів RSTBA6 6.2 дозволив віднести його до виду *Bacillus megaterium*-GC subgroup A з високим індексом подібності 0,731.

**В.А. Іваньця, О.Г. Горшкова, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,
Т.В. Гудзенко, А.Н. Остапчук**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: tgudzenko@ukr.net

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ ШТАММА *BACILLUS* SP. O3-5, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЫ О. ЗМЕИНЫЙ

Реферат

Цель. Определение состава жирных кислот клеточных липидов и идентификация штамма бактерий, выделенного с участка загрязненной нефтью почвы о. Змеиный. **Методы.** Анализ состава жирных кислот штамма *Bacillus* sp. O3-5 проводили с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI inc., USA) на базе газового хроматографа Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA). **Результаты.** Охарактеризованный по фенотипическим признакам штамм *Bacillus* sp. O3-5, по составу жирных кислот был идентифицирован как *Bacillus megaterium* O3-5 – GC subgroup A. Анализ хроматограмм показал, что доминирующими в жирнокислотном спектре штамма *Bacillus megaterium* O3-5 являются разветвлённые структурные изомеры длинноцепочечных насыщенных кислот с преобладающим содержанием 12-метилтетрадекановой ($C_{15}:0$ anteiso, 39,6%) и 13-метилтетрадекановой ($C_{15}:0$ iso, 32,93%) кислот, среди других разветвлённых изомеров обнаружены $C_{17}:0$ anteiso (2,69%), $C_{17}:0$ iso (1,88%), $C_{14}:0$ iso (6,62%), $C_{16}:0$ iso (1,76%), $C_{13}:0$ anteiso (0,25%) и $C_{13}:0$ iso (0,5%). **Вывод.** Анализ жирнокислотного профиля исследуемого штамма с использованием системы MIDI Sherlock позволил отнести его к виду *Bacillus megaterium*-GC subgroup A с высоким индексом сходства 0,731. Выявленные особенности спектра жирных кислот исследуемого микроорганизма систематизированы и отличают его от других бактерий рода *Bacillus*.

Ключевые слова: состав жирных кислот, идентификация, *Bacillus*.



V.O. Ivanytsia, O.G. Gorshkova, N.V. Korotaeva,
O.V. Voliuvach, T.V. Gudzenko, A.M. Ostapchuk

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: tgudzenko@ukr.net

FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF STRAIN *BACILLUS* SP. O3-5 ISOLATED FROM OIL- CONTAMINATED SOIL OF THE ZMIINY ISLAND

Summary

The aim. Determination of fatty acid composition of cell lipids and identification of a strain of microorganism selected in 2014 from a portion of the oil-contaminated soil of the Zmiiny island. **Methods.** Fatty acid analysis of the strains of genus *Bacillus* sp. O3-5 was carried using the automatic identification system of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA) based on gas chromatograph Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA). **Results.** Phenotypically characterized strain *Bacillus* sp. O3-5 was identified as *Bacillus megaterium* O3-5 – GC subgroup A by fatty acids composition. The analysis of obtained chromatograms revealed that dominant in the fatty-acid profile of strain *Bacillus* sp. O3-5 there were branched structural isomers of long-chain saturated fatty acids with predominant content of 12-metyltetradecane ($C_{15}:0$ anteiso, 39.6%) and 13-metyltetradecane ($C_{15}:0$ iso, 32.93%) acids also $C_{17}:0$ anteiso (2.69%), $C_{17}:0$ iso (1.88%), $C_{14}:0$ iso (6.62%), $C_{16}:0$ iso (1.76%), $C_{13}:0$ anteiso (0.25%) ma $C_{13}:0$ iso (0.5%) isomers were detected. **Conclusion.** By the fatty acid profile analysis with MIDI Sherlock system observable strain is identified as *Bacillus megaterium*-GC subgroup A with high level of similarity index 0.737. The peculiarities of the fatty acid profile of the investigated microorganism is systematized and can be used as an auxiliary key for distinguishing it as a genus and at the species level (based on the results of the study of the cellular fatty acid composition) from other bacteria of genus *Bacillus*.

Key words: fatty acid composition, identification, *Bacillus*.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біланчин Я.М., Жанталай П.І., ТортикМ.Й., Буяновський А.О. Дослідження ґрунтового покриву о. Зміїний // Острів Зміїний. Абіотичні характеристики: монографія; відп. ред. В.І. Медінець; Одес. нац. ун-т ім. І.І. Мечникова. – Одеса: Астропринт, 2008. – С. 54–79.
2. Васюренко З.П., Фролов А.Ф. Жирнокислотный состав бактерий как хемотаксономический критерий // Журн. гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии (Прага). – 1986. – 30, № 3. – С. 293–300.
3. Гудзенко Т.В., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Іваниця В.О. Склад жирних кислот ліпідів нафтоокиснювальних штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 3(27). – С. 31–40.
4. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных. – К.: Наук. думка, 1992. – 253 с.



5. Клочко В.В., Авдеева Л.В. Жиронокислотный состав *Alteromonas*-подобных бактерий Черного моря // Микробиол. журнал. – 2015. – Т. 77, № 5. – С. 47–54.
6. Сафронова Л.А., Зеленая Л.Б., Клочко В.В., Авдева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бацилл – компонентов эндоспорина // Микробиол. журн. – 2012. – Т. 74, № 5. – С. 55–65.
7. Шмырина А.С. Жирнокислотный профиль и структурное моделирование ДНК-связанных липидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. – 21 с.
8. Andersson M., Laukkanen M., Nurmiäho-Lassila E.-L., Rainey F.A., Niemelä S.I. & Salkinoja-Salonen M. *Bacillus thermosphaericus* sp. nov., a new thermophilic ureolytic *Bacillus* isolated from air // **Systematic and Applied Microbiology**. – 1995. – V. 18. – P. 203–220.
9. Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. & Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences // *Letters in Applied Microbiology*. – 1991. – V. 13. – P. 202–206.
10. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. – N.Y.: Springer, 2005. – V. 2. – 1108 p.
11. Carla C.C.R., de Carvalho, Maria-Jose Caramujo. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds // *Molecules*. – 2014. – V. 19. – P. 5570–5598.
12. Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Scheldeman P. *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994 is a later synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994: emended description of *P. validus* // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1997. – V. 45. – P. 661–669.
13. Kaneda T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preferences // *Bacteriological Reviews*. – 1977. – V. 41. – P. 391–418.
14. Kaneda T. Biosynthesis of branched chain fatty acids. IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by *Bacillus subtilis* // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1966. – V. 12. – P. 510–51.
15. Kämpfer P. Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus species* // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1994. – V. 17. – P. 86–96.
16. *MIS Operating Manual*. www.midi-inc.com, September 2012.
17. Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K. & Komagata K. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1997. – V. 47. – P. 299–306.

Стаття надійшла до редакції 25.11.2015 р.



І.С. Бровко, Л.В. Титова, Г.О. Іутинська

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
вул. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
e-mail: irinkacv26@gmail.com, тел.: +38(044) 526 55 57

ВПЛИВ ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ СОЇ НА ФОРМУВАННЯ СОЄВО-РИЗОБІАЛЬНОГО СИМБІОЗУ І РИЗОСФЕРНЕ МІКРОБНЕ УГРУПОВАННЯ

Мета. Вивчити вплив неризобіальних ендоефітних бактерій сої на формування симбіотичних соєво-ризобіальних систем та мікробних угруповань ризосфери.

Методи. Нітрогеназну активність визначали ацетилен-редуктазним методом. **Результати.** Показано, що досліджувані ендоефітні штами *Raenibacillus polytuxa* 1, *Bacillus cereus* 4 позитивно впливають на формування та загальну нітрогеназну активність симбіотичного апарату сої. Сумісна інокуляція *R. polytuxa* 1 або *Brevibacillus* sp. 5 з виробничим штамом бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 сприяє підвищенню нітрогеназної активності симбіотичного апарату та стимулює розвиток олігоазотрофних мікроорганізмів в ризосфері сої **Висновки.** Ендоефітні неризобіальні бактерії сої та їх композицій з азотфіксувальними бульбочковими бактеріями позитивно впливають на ріст та розвиток рослин, ризосферну мікробіоту, активність дихання ґрунту та нітрогеназну активність симбіотичного апарату.

Ключові слова: ендоефітні бактерії, *Bradyrhizobium japonicum*, *Raenibacillus polytuxa*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas brassicacearum*, *Glycine max*, нітрогеназна активність, симбіоз.

Дослідження останніх років показали, що бактерії-ендоефіти є широко розповсюдженими компонентами симбіотичних систем. Поряд з ризобіями, що здатні формувати на коренях специфічний симбіотичний апарат, з бульбочок ізольовані ендоефітні бактерії бобових рослин (сої, люцерни, конюшини, гороху), що відносяться до різних родів мікроорганізмів: *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Pseudomonas* і *Sphingomonas* [7].

Відомо, що ендоефіти синтезують біологічно активні метаболіти, які характеризуються антимікробною дією на фітопатогени або є індукторами системної стійкості рослин, попереджаючи цим розвиток хвороб у рослин [11]. Більшість бактерій-ендоефітів покращують ріст рослин, прискорюють їх розвиток, а також можуть підвищувати стійкість рослин до дії несприятливих факторів навколишнього середовища. Деякі ендоефітні бактерії здатні фіксувати молекулярний азот атмосфери, що покращує азотне живлення рослин [11].



В останні роки у технологіях вирощування бобових почали використовувати ендofітні бактерії різних родів для ко-інокуляції сумісно з бульбочковими бактеріями [4]. Так, бактерії роду *Bacillus*, ізольовані з бульбочок сої, застосовували сумісно з бульбочковими бактеріями, завдяки чому покращувались процеси нодуляції, збільшувалась кількість бульбочок та маса кореневої системи, а також підвищувалась стійкість рослин до низьких температур [2]. Показано, що деякі штами бактерій родів *Bacillus* та *Paenibacillus* не тільки здатні підвищувати імунні реакції та стимулювати ріст рослин, а також покращують живлення рослин та стимулюють симбіоз між ризобіями та бобовими рослинами [8].

Проте використання ендofітних бактерій як компонентів комплексних біопрепаратів для рослинництва залишається мало дослідженим. Тому метою роботи було вивчити вплив неризобіальних ендofітних бактерій сої на формування симбіотичних систем *Bradyrhizobium japonicum* – *Glycine max* (L.) Merr. та мікробних угруповань ризосфери.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктами досліджень були: високоефективний штам бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035, ендofітні бактерії неризобіальної природи виділені з бульбочок сої різних генотипів та ідентифіковані нами: *Paenibacillus polymyxa* 1, *Bacillus cereus* 4, *Brevibacillus* sp. 5, *Pseudomonas brassicacearum* 6 [12], а також композиції на їх основі. Досліди проводили на сої сорту Черемош (селекції ТОВ «НДІ сої») у вегетаційному будиночку Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Сою вирощували в керамічних посудинах об'ємом 3 дм³ на торфосуміші (ЗАТ НВФ ДП «Гаврощина торф»). Схема досліджень включала наступні варіанти: моноінокуляція культурами *Paenibacillus polymyxa* 1, *Bacillus cereus* 4, *Brevibacillus* sp. 5, *Pseudomonas brassicacearum* 6, *B. japonicum* УКМ В-6035 (виробничий штам), а також композиціями на їх основі. Бактеріальне навантаження становило 10⁷кл на насінину при моноінокуляції, у варіантах з подвійною інокуляцією (ендофітами з бульбочковими бактеріями) – 10⁷кл кожного штаму на насінину, тривалість експозиції одна година.

Для оцінки ефективності формування та функціонування симбіотичного апарату визначали масу надземної частини рослин, кількість та площу листових пластинок, кількість бульбочок [14]. Нітрогеназну активність бульбочок сої визначали ацетилен-редуктазним методом і виражали у кількості молей С₂Н₄ на рослину за годину (загальна активність) та на грам бульбочок за годину (питома активність) [5].

Кількість мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп (педотрофних, прототрофних, олігоазотрофних, фосфатмобілізуювальних) у ризосферному ґрунті сої вивчали традиційними методами ґрунтової мікробіології з використанням агаризованих селективних поживних середовищ [15]. Ґрунт ризосфери відбирали у фазі бутонізації-початку цвітіння.

Біологічну активність ризосферного ґрунту визначали за дихальною активністю [1] і виражали в мл СО₂ на грам сухого ґрунту за годину. Статистичну



обробку результатів експериментів, а саме розрахунок стандартного відхилення та величини найменшої істотної різниці виконували використовуючи стандартні комп'ютерні програми Statistica 10 та Excel 2013.

Результати досліджень та їх обговорення

При вивченні показників розвитку рослин сої у фазу бутонізації-початку цвітіння (період активної азотфіксації) встановлено, що за передпосівної обробки насіння сої штамами *P. polymyxa* 1, *B. cereus* 4 та *Brevibacillus* sp. 5 маса надземної частини суттєво не відрізнялася від такої у контрольному варіанті (без інокуляції насіння). Найбільше накопичення маси надземної частини отримано за обробки насіння композицією *B. japonicum* УКМ В-6035, *P. polymyxa* 1, де цей показник у 1,8 рази перевищував такий у контролі та у 1,9 рази був вищим за показник варіанту з інокуляцією виробничим штамом. Отримані дані підтверджують літературні про те, що деякі ендоефітні бактерії мають здатність стимулювати ріст та розвиток рослини-хазяїна [3, 10].

При застосуванні композицій *B. japonicum* УКМ В-6035, *B. cereus* 4 та *B. japonicum* УКМ В-6035, *P. brassicacearum* 6 маса надземної частини була на рівні контрольної.

Аналіз показників формування фотосинтетичного апарату виявив достовірне збільшення кількості листків і площі листової поверхні за обробки насіння штамом *B. cereus* 4, що в 1,6 та 1,8 рази ($p \leq 0,05$), відповідно, перевищувало контрольну величину.

Досліджуючи формування симбіотичної системи, звертали увагу на активність нодуляції (формування бульбочок). Відмічено, що нодуляційний апарат сформувався в усіх варіантах досліджу. У контрольному варіанті та у варіантах з обробкою ендоефітами він, очевидно, був утворений аборигенними популяціями ризобій, однак слід підкреслити, що обробка насіння *P. polymyxa* 1, *B. cereus* 4 та *B. japonicum* УКМ В-6035 сприяла підвищенню чисельності бульбочок порівняно з контрольним варіантом у 3,4; 1,7 і 1,8 рази, відповідно. Також статистично достовірному підвищенню кількості бульбочок у 1,1–1,4 рази ($p \leq 0,05$) сприяло застосування композицій ризобій з ендоефітними бактеріями *P. polymyxa* 1, *B. cereus* 4 та *P. brassicacearum* 6.

При дослідженні азотфіксувальної активності нодуляційного апарату сої сорту Черемош встановлено, що за моноінокуляції ендоефітними бактеріями показник питомої нітрогеназної активності у варіантах з обробкою штамами *P. polymyxa* 1 та *B. cereus* 4 перевищував контрольний у 4,6 та 4,9 разів, відповідно, але ці показники були меншими від такого у варіанті з виробничим штамом 20 та 10% рази (рис. 1).

Азотфіксувальна активність бульбочок, сформованих виробничим штамом, була в 5,4 рази вища порівняно з контролем. За обробки насіння композиціями ендоефітів та ризобій три композиції забезпечували високі рівні нітрогеназної активності, які перевищували таку за інокуляції промисловим штамом. По-



двійна інокуляція штамми *P. polymyxa* 1, *B. cereus* 4 та *Brevibacillus* sp. 5 сумісно з ризобіями підвищувала загальну нітрогеназну активність порівняно з моноінокуляцією *B. japonicum* УКМ В-6035 у 3,1, 2 та 3,9 разів, відповідно.

Таблиця 1

Біометричні показники рослин сої сорту Черемош за інокуляції насіння ендоефітними бактеріями та їх композиціями з *B. japonicum* УКМ В-6035

Table 1

Biometric indexes of Cheremosh variety soybean with inoculation of seeds by endophytic bacteria and their compositions with *B. japonicum* UCM В-6035

Варіанти дослідів	Маса сухої надземної частини, г	Кількість листків на рослину	Площа листової поверхні на см ² /рослину	Кількість бульбочок на рослину
Без інокуляції, контроль	1,86±0,05	16 ± 1	1768,79±197,79	28 ± 1
<i>P. polymyxa</i> 1	1,98±0,04	18 ± 2	1258,2±375,74	94 ± 5
<i>P. brassicacearum</i> 6	1,08±0,04	17 ± 1	1725,52±163,89	24 ± 2
<i>B. cereus</i> 4	2,4±0,4	25 ± 3	3240,4±345,28	41 ± 2
<i>Brevibacillus</i> sp. 5	1,95±0,13	15 ± 2	1458,69±535,05	19 ± 1
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	1,75±0,26	16 ± 1	1498,64±227,26	49 ± 4
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035 + <i>P. polymyxa</i> 1	3,27±0,3	16 ± 4	1876,84±455,87	39 ± 1
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035 + <i>P. brassicacearum</i> 6	1,98±0,15	17 ± 0	1916,84±464,47	32 ± 2
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035 + <i>B. cereus</i> 4	2,03±0,05	17 ± 0	2041,31±412,5	38 ± 1
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035 + <i>Brevibacillus</i> sp. 5	1,1±0,08	15 ± 1	1694,66±179,78	28 ± 1

$p \leq 0,05$; $n = 3$

Дослідження мікробного угруповання ризосфери показало, що інокуляція насіння штамом *P. polymyxa* 1 підвищувала чисельність педотрофних та олігоазотрофних мікроорганізмів на 10 та 20% відповідно, порівняно з показниками контрольного варіанту (рис. 2). При застосуванні *P. brassicacearum* 6 кількість педотрофних мікроорганізмів збільшувалась 1,7 рази, олігоазотрофних – в 1,1 рази ($p \leq 0,05$) та фосфатмобілізувальних в 1,4 рази.



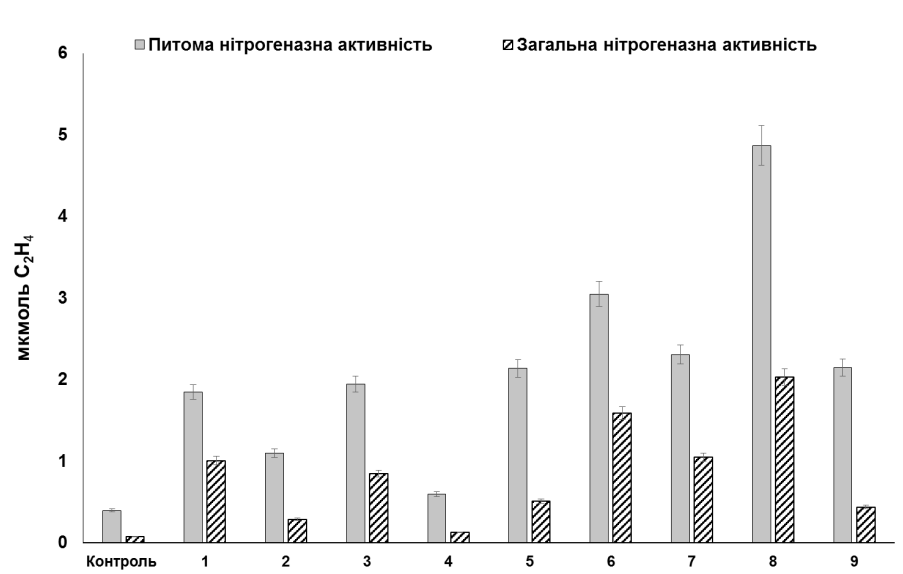


Рис. 1. Нітрогеназна активність бульбочок сої сорту Черемош за нокуляції обробки насіння ендofітними бактеріями та їх композиціями з *B. japonicum* УКМ В-6035.

Fig. 1. Nitrogenase activity of nodules the respiratory activity of the rhizosphere soil of Cheremosh variety soybean with inoculation seeds by endophytic bacteria and their compositions with *B. japonicum* UCM B-6035.

Control: 1 – *P. polymyxa* 1; 2 – *P. brassicacearum* 6; 3 – *B. cereus* 4; 4 – *Brevibacillus* sp. 5; 5 – *B. japonicum* UCM B-6035; 6 – *B. japonicum* UCM B-6035, *P. polymyxa* 1; 7 – *B. japonicum* UCM B-6035, *P. brassicacearum* 6; 8 – *B. japonicum* UCM B-6035, *B. cereus* 4; 9 – *B. japonicum* UCM B-6035, *Brevibacillus* sp. 5.

За інокуляції штамом *B. cereus* 4 збільшувалась лише кількість олігоазототрофних мікроорганізмів – даний показник був у 1,5 рази вищий за контроль. Інокуляція насіння сої ендofітним ізолятом *Brevibacillus* sp. 5 стимулювала ріст лише педотрофних мікроорганізмів. Обробка насіння виробничим штамом бульбочкових бактерій *B. japonicum* УКМ В-6035 сприяла збільшенню педотрофних та олігоазототрофних мікроорганізмів у 2,3 та 1,1 рази, відповідно, порівняно з контрольним варіантом.

При поєднаній ко-інокуляції штамми *B. japonicum* УКМ В-6035 і *P. brassicacearum* 6 чисельність олігоазототрофних мікроорганізмів у ризосферному ґрунті збільшувалась на 10%. Обробка насіння ризобіями сумісно з ізолятом *B. cereus* 4 також сприяла збільшенню кількості олігоазототрофів у ризосферному ґрунті рослин сої в 1,2 рази.

За передпосівної обробки насіння сої композицією ризобій та штаму *Brevibacillus* sp. 5 чисельність мікроорганізмів досліджуваних груп не відрізнялась суттєво від контролю.

Слід відмітити, що у ризосферному ґрунті інокульованих рослин у деяких випадках чисельність мікроорганізмів була нижчою, ніж у контролі. Так,



чисельність педотрофних мікроорганізмів знижувалась у всіх варіантах окрім варіанту із застосуванням штаму *P. polymyxa* 1, за подвійної інокуляції ризобіями та ендодітмом *P. brassicacearum* 6 цей показник був у 6,4 рази нижчим за такий у контролі, а за обробки насіння штамом *B. cereus* 4 та композиціями ризобій з ендодітмами *P. brassicacearum* 6, *B. cereus* 4 та *Brevibacillus* sp. 5 чисельність фосфатмобілізувальних мікроорганізмів зменшувалась у 1,3; 2,4; 2,2 та 1,4 рази відповідно, порівняно з контрольним варіантом.

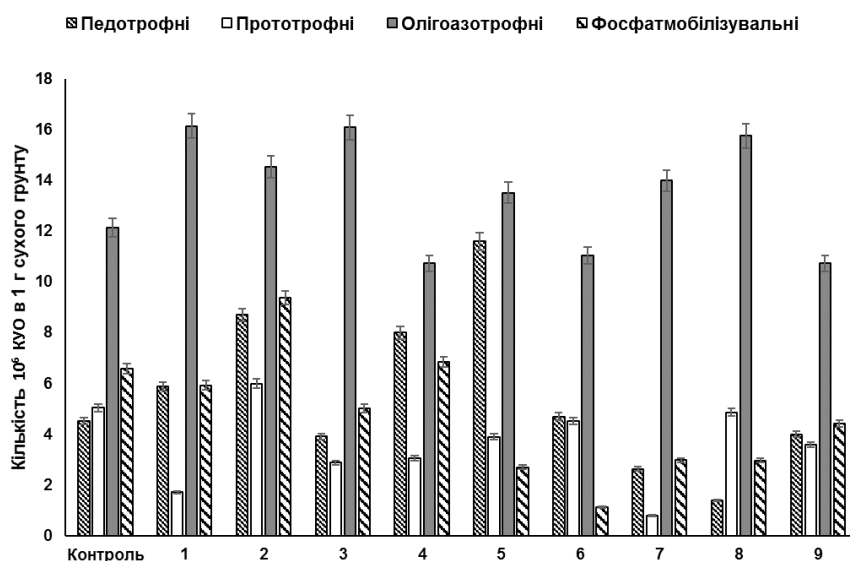


Рис. 2. Кількість мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп у ризосфері сої сорту Черемош за інокуляції насіння ендодітмними бактеріями та їх композиціями з *B. japonicum* УКМ В-6035.

Fig. 2. The quantity of microorganisms of ecological-trophic groups in the rhizosphere of Cheremosh variety soybean with inoculation by endophytic bacteria and their compositions with *B. japonicum* UCM B-6035.

Control: 1 – *P. polymyxa* 1; 2 – *P. brassicacearum* 6; 3 – *B. cereus* 4; 4 – *Brevibacillus* sp. 5; 5 – *B. japonicum* UCM B-6035; 6 – *B. japonicum* UCM B-6035, *P. polymyxa* 1; 7 – *B. japonicum* UCM B-6035, *P. brassicacearum* 6; 8 – *B. japonicum* UCM B-6035, *B. cereus* 4; 9 – *B. japonicum* UCM B-6035, *Brevibacillus* sp. 5.

Однією з важливих характеристик біологічної активності ґрунту є активність емісії CO_2 , яка зумовлена біологічним окисненням органічної речовини ґрунтовою біотою. Активність дихання ґрунту в контрольному варіанті становила 433,29 мкг CO_2 /г ґрунту за годину (рис. 3).

Дихальна активність ґрунту суттєво збільшувалась у варіантах із застосуванням штамів *P. polymyxa* 1, *P. brassicacearum* 6, *Brevibacillus* sp. 5 та *B. japonicum* УКМ В-6035, а також композицій *B. japonicum* УКМ В-6035, *P. polymyxa* 1 та *B. japonicum* УКМ В-6035, *P. brassicacearum* 6. Найбільшу активність дихання відмічено за обробки насіння композицією *B. japonicum*

УКМ В-6035, *P. brassicacearum* 6, яка у 1,9 рази перевищувала величину контрольного варіанту. Однак за обробки насіння ендоефітним штамом *B. cereus* 4 і його композицією ризобіями, а також композицією *B. japonicum* УКМ В-6035 з *Brevibacillus* sp. 5 показник дихальної активності ґрунту знижувався у 2,1, 3,1 та 4,1 рази відповідно порівняно з показником контролем. Отже інокуляція ендоефітами *P. polymyxa* 1, *P. brassicacearum* 6, та їх композиціями з ризобіями мала позитивний вплив на загальну біологічну активність ризосферного ґрунту.

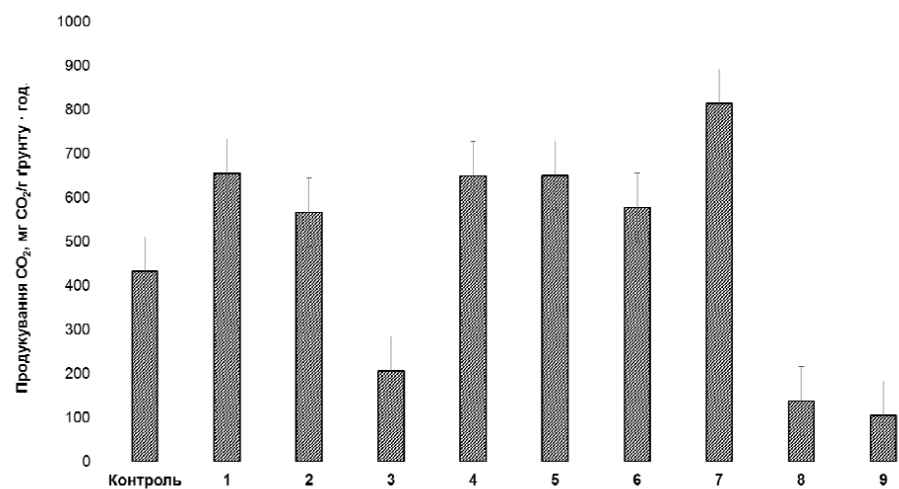


Рис. 3. Дихальна активність ризосферного ґрунту сої сорту Черемош за інокуляції насіння ендоефітними бактеріями та їх композиціями з *B. japonicum* УКМ В-6035.

Fig. 3. The respiratory activity of the rhizosphere soil of Cheremosh variety soybean with inoculation by endophytic bacteria and their compositions with *B. japonicum* UCM B-6035.

Control: 1 – *P. polymyxa* 1; 2 – *P. brassicacearum* 6; 3 – *B. cereus* 4; 4 – *Brevibacillus* sp. 5; 5 – *B. japonicum* UCM B-6035; 6 – *B. japonicum* UCM B-6035, *P. polymyxa* 1; 7 – *B. japonicum* UCM B-6035, *P. brassicacearum* 6; 8 – *B. japonicum* UCM B-6035, *B. cereus* 4; 9 – *B. japonicum* UCM B-6035, *Brevibacillus* sp. 5.

Відомо, що препарати на основі бульбочкових бактерій та бактерій роду *Bacillus*, а також монокультури останніх впливають на рослину, змінюючи рівень синтезу фітогормонів, зокрема індолілоцтової кислоти та цитокінінів. Можна припустити, що ендоефітні бактерії синтезують біологічно активні речовини, які сприяють органогенезу бульбочок, а також є атрактантами для більш ефективних популяцій аборигенних ризобій, ніж ті, якими був сформований симбіотичний апарат сої контрольного варіанту. Раніше нами була встановлена здатність штаму *Brevibacillus* sp. 5 фіксувати азот у чистій культурі [13]. Можливо, завдяки цій властивості ендоефітні бактерії сої здатні прямо чи опосередковано впливати на формування та функціонування симбіотичної системи *B. japonicum* УКМ В-6035 – соя та мікробіоту ризосфери. Пряма їх дія може бути



зумовлена азотфіксувальною активністю безпосередньо в тканинах бульбочки, а опосередкована може здійснюватися через вплив фізіологічно активних метаболітів (зокрема, фітогормонів) на формування нодуляційного апарату, як ми це бачимо у варіанті з моноінокуляцією штамом *R. polytuxa* 1. Також вірогідно, що ендоефіти за певних обставин корисні для рослини-господаря завдяки синтезу ними низки фізіологічно активних речовин [6] і можуть використовуватись як біопрепарати для підвищення урожайності рослин [9].

Отже, нами показано, що за передпосівної інокуляції насіння сої штамми *R. polytuxa* 1, *B. cereus* 4 збільшувалась надземна маса рослин, стимулювались процеси утворення симбіотичної системи між рослинами та аборигенними ризобіями, що забезпечило підвищення азотфіксувальної активності, активізувався ріст у ризосфері педотрофних, олігоазотрофних мікроорганізмів та підвищувалась загальна біологічна активність ґрунту. Сумісна інокуляція ендоефітних бактерій з ризобіями позитивно впливала на нодуляційний апарат рослин, стимулювала ріст олігоазотрофних мікроорганізмів та підвищувала питому азотфіксувальну активність бульбочок сої.

Отримані дані свідчать, що виділені ендоефітні бактерії можуть бути перспективними ко-інокулянтами існуючих препаратів азотфіксувальних бактерій. Подальше вивчення особливостей застосування ендоефітних бактерій, виділених з бульбочок сої, може дозволити оптимізувати функціонування мікробно-рослинних систем.

УДК 579.63 + 579.262

И.С. Бровко, Л.В.Титова, Г.А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина
e-mail: irinkacv26@gmail.com, тел.: +38(044) 526 55 57

ВЛИЯНИЕ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ СОИ НА ФОРМИРОВАНИЕ СОЕВО-РИЗОБИАЛЬНОГО СИМБИОЗА И РИЗОСФЕРНОЕ МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО

Реферат

Цель. Изучить влияние неризобияльных эндоефитных бактерий сои на формирование симбиотических соево-ризобияльных систем и микробных сообществ ризосферы. **Методы.** Микробиологические, ацетилен-редуктазной. **Результаты.** Показано, что исследуемые эндоефитные штаммы *Raenibacillus polytuxa* 1, *Bacillus cereus* 4 позитивно влияют на формирование и общую нитрогеназную активность симбиотического аппарата сои. Совместная инокуляция *R. polytuxa* 1 или *Brevibacillus* sp. 5 с производственным штаммом клубеньковых бактерий *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6035 способствует увеличению нитрогеназной активности симбиотического аппарата и стимулирует развитие олигоазотрофных микроорганизмов в ризосфере сои. **Выводы.** Эндоефитные неризобияльные бактерии сои и их композиции с азотфиксирующими клубеньковыми бактериями позитивно влияют на рост и развитие растений, ризосферную



микрофлору, активність дихання ґрунтової мікробіоти і нітрогеназну активність симбіотического апарату.

Ключевые слова: ендоситні бактерії, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas brassicacearum*, *Glycine max*, нітрогеназна активність, симбіоз.

I.S. Brovko, L.V. Tytova, G.O. Iutynska

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine;
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine
e-mail: irinkacv26@gmail.com, tel.: +38(044) 526 55 57

INFLUENCE OF ENDOPHYTIC SOYBEAN BACTERIA ON THE RHIZOBIUM-SOYBEAN SYMBIOSIS AND RHIZOSPHERE MICROBIAL COMMUNITY

Summary

Aim. To study the efficacy of action of non-rhizobial endophytic bacteria of soybean on the symbiotic systems formation. **Methods.** Microbiological, acetylene-ethylene assay. **Results.** It was shown that the investigated strains of endophytic bacteria *Paenibacillus polymyxa* 1, *Bacillus cereus* 4 have positively impacted on the formation and overall nitrogenase activity of soybean symbiotic apparatus. Joint inoculation of *P. polymyxa* 1 or *Brevibacillus* sp. 5 with the production strain of nodule bacteria *Bradyrhizobium japonicum* in UKM-6035 increases the nitrogenase activity of the symbiotic system and stimulates the development of micro-organisms in the rhizosphere oligoazotofnyh soybeans. **Conclusions.** Endophytic non-rhizobial soybeans bacteria and their compositions with nitrogen fixing nodule bacteria positively influence on growth and development of plants, rhizosphere microflora, respiration activity of soil microorganisms and nitrogenase activity of symbiotic system.

Key words: endophytic bacteria, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus* sp., *Pseudomonas brassicacearum*, *Glycine max*, nitrogenase activity, symbiosis.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Alef K., Nannipieri P. Soil respiration. Methods in applied soil microbiology and biocemistry // Academic Press, New York. – 1995. – P. 214–218.
2. Bai Y., Zhou X., Smith D. L. Enhanced Soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum* // Crop Science. – 2003. – V. 43, No. 5. – P. 1774–1781.
3. Bulgarelli D., Rott M., Schlaeppi K., Themaat E.L., Ahmadinejad N., Assenza F., Rauf P., Huettel B., Reinhardt R., Schmelzer E., Peplies J., Gloeckner F.O., Amman R., Eickhorst T., Schulze-Lefert P. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota // Nature. – 2012. – V. 488, Issue 7409. – P. 91–95.



4. *Estévez J., Dardanelli M.S., Megías M., Rodríguez-Navarro D.N.* Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions // *Symbiosis*. – 2009. – V. 49, Issue 1. – P. 29–36.
5. *Hardy R.W.F., Burns R.C., Holsten R.D.* Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // *Soil. Biol. Biochem.* – 1973. – 5, № 1. – P. 41–83.
6. *Jalgaonwala R. E., Mahajan R. T.* Bacterial endophytes and their bioprospecting // *Juornal of pharmacy research*. – 2011. – V. 4, Issue 3. – P.795–799.
7. *Khan M.S., Zaidi A., Musarat J.* *Microbes for Legume Improvement* / (Eds.). Wien: Springer-Verlag, 2010. – 554 p.
8. *McSpadden Gardener B. B.* Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus spp.* in Agricultural Systems // *Phytopathology*. – 2004. – V. 94, № 11. – P. 1252–1258.
9. *Saini R., Dudeja S.S., Giri R., Rumar V.* Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India // *Journ. of Basic Microbiol.* – 2015. – V. 55. – P. 74–81.
10. *Selvakumar G., Kundu S., Gupta A.D., Shouche Y.S., Gupta H.S.* Isolation and characterization nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of *Kudzu (Pueraria thunbergiana)* and their effect on Wheat seedling growth // *Curr. Microbiol.* – 2008. – V. 56. – P. 134–139.
11. *Sturza A.V., Christieb B.R., Nowack J.* Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2010. – V. 19, Issue 1. – P. 1–30.
12. *Бровко И.С., Титова Л.В., Иутинская Г.А., Сухачева М.В., Кравченко И.К.* Эндофитные неризобияльные бактерии из клубеньков сои (*Glycine Max. (L.) Merr.*) // Материалы III междуна. научно-практической конф. «Биоразнообразие и устойчивое развитие», г. Симферополь. Крым, 15–19 сентября 2014 года (к 100-летию Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского, 80-летию географического факультета Таврического национального университета им. В.И. Вернадского). – Симферополь 2014. – С. 46-47.
13. *Бровко И.С., Титова Л.В., Иутинская Г.А., Сухачева М.В., Кравченко И.К.* Идентификация и азотфиксирующая активность неризобияльных бактерий из клубеньков сои // *Наукові записки ТНПУ ім. В. Гнатюка. Серія: Біологія*. – 2014. – № 3 (60). – С. 52–55.
14. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1985. – 352 с.
15. *Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии / под ред. В. К. Шильниковой. – 6-е издание. – М.: Дрофа, 2005. – 256 с.

Стаття надійшла до редакції 14.09.2015 р.



УДК 577.15 (088.8)

С.С. Декіна¹, І.І. Романовська¹, О.П. Сотнікова²

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

²ДУ “Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова НАМН України”, Французький
бульвар, 49/51, Одеса, 65061

ЛІЗОЦИМВМІСНИЙ ПРЕПАРАТ «ШТУЧНА СЛЬОЗА»: ОТРИМАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ

Мета. Розробка і дослідження хімічних і фізичних властивостей лізоцимвмісних очних крапель «штучна сльоза» – перспективного препарату для лікування синдрому «сухого ока». **Методи.** Бактеріологічну активність лізоциму визначали турбідиметрично, використовуючи як субстрат *Micrococcus lysodeikticus* 4698. Вміст протеїну визначали за методом Лоурі-Хартрі, в'язкість на віскозиметрі Оствальда, густину за допомогою ареометра, осмоляльність препарату – осмометром *Tear Lab Osmolarity System*. **Результати.** Запропоновано перспективний для сльозозамінної терапії препарат «штучна сльоза» у формі очних крапель, що містять лізоцим як природний антибактеріальний компонент сльози. Відзначено повне збереження високої бактеріологічної активності включеного ензиму (38200 ± 2000 од/мл). Показано, що розроблені краплі мають близькі зі слізною рідиною значення в'язкості, густини і осмоляльності, що відповідає вимогам, пред'явленим до таких. Встановлено, що лізоцим, стабілізований в препараті декстраном і гідроксипропілметилцелюлозою, після попередньої стерилізуючої фільтрації зберігається в умовах низьких температур (0–4 °C) протягом 12 місяців з 96,4% збереженням вихідної бактеріологічної активності. **Висновки.** В результаті проведених досліджень вперше розроблено препарат «штучної сльози» у вигляді крапель з включенням лізоцимом. Розроблений препарат перспективний для подальших біологічних досліджень.

Ключові слова: лізоцим, штучна сльоза, декстран, гідроксипропілметилцелюлоза, синдром «сухого ока».

Однією з найбільш важливих проблем у сучасній офтальмології є синдром “сухого ока”, що зустрічається у 9–18% населення розвинених країн світу [3]. Це стан, при якому кількості слізної плівки на рогівці недостатньо, щоб зволжити поверхню ока, в результаті чого можуть виникати зміни, що супроводжуються дискомфортом, а у тяжких випадках – втратою зору. Серед причин захворювання називають безконтрольний прийом антидепресантів і антигістамінних препаратів, використання контактних лінз, косметичних засобів недостатньої якості, тривале перебування в приміщеннях з кондиціонерами, робота за комп'ютером та ін. [2, 4, 8]. Одним з основних методів лікування синдрому «сухого ока» є сльозозамінна терапія [4]. На фармацевтичному ринку України представлений

© С.С. Декіна, І.І. Романовська, О.П. Сотнікова, 2015



широкий спектр препаратів – штучних замінників сльози, що відрізняються між собою в'язкістю і хімічним складом, а також випускаються у вигляді очних крапель, гелів або плівок [1, 2]. Однак серед великої кількості застосовуваних препаратів відсутні “штучні сльози”, що містять лізоцим. Лізоцим (КФ 3.2.1.17), також відомий як мурамідаза або N-ацетилмурамоїлгідролаза, є одним з найбільш важливих бактерицидних компонентів слізної рідини. Ензим секретується основними і допоміжними слізними залозами і на його долю припадає від 20 до 30% загального протеїна [7]. Як правило, при захворюваннях очей, а також при синдромі “сухого ока”, рівень лізоциму в слізній рідині знижується.

Метою роботи була розробка і дослідження хімічних і фізичних властивостей лізоцимвмісних очних крапель «штучна сльоза» як перспективного препарату для лікування синдрому «сухого ока».

Матеріали і методи

У роботі використовували гідроксипропілметилцелюлозу (ГПМЦ) («Benecel™», «Ashland Inc.», США), декстран 60 («Biotika Bohemia s.r.o», Чехія), лізоцим з протеїну курячого яйця (40000 од/мг, «Sigma-Aldrich», Канада), клітини *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 («Sigma-Aldrich», США).

Очні лізоцимвмісні краплі готували наступним чином: змішували 0,39% розчин ГПМЦ, 0,1% розчин лізоциму і 0,1% розчину декстрану 60 у співвідношенні 2:1:1, відповідно. Суміш ретельно перемішували при кімнатній температурі. Як розчинник використовували фізіологічний стерильний розчин NaCl. Отримані краплі піддавали стерилізуючій фільтрації із застосуванням фільтрів «Millipore» в стерильні флакони і зберігали при температурі 0–4 °С. Активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом [5]. За одиницю активності ензиму приймали таку його кількість, що за 1 хв знижує оптичну густину суспензії клітин *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 на 0,001. Вміст протеїну контролювали методом Лоурі-Хартрі [6]. Визначення в'язкості проводили на віскозиметрі Оствальда з діаметром капіляра 0,73 мм. Визначення густини розчину лізоциму, стабілізованого розчинами полімерів, проводили за допомогою ареометра. рН – оптимум активності лізоциму у препараті визначали, додаючи до однакових за активністю проб суспензію клітин у буферних розчинах (0,1 моль/дм³, цитратно- фосфатний 3,0–7,0, фосфатний 8,0–9,0). Термооптимум гідролітичної активності лізоциму визначали у діапазоні температур від 20 до 50 °С. Визначення осмоляльності препарату проводили за допомогою осмометра – Tear Lab Osmolarity System. Досліджуваний розчин заливали у чашку Петрі (10 см³), спеціальним щупом приладу забирали аліквоту розчину і розміщували у приладі.

Дані експериментів піддавали статистичній обробці згідно [9]. Оцінювали ступінь вірогідності різниці результатів досліджень між серіями експериментів при кількості повторень n=3, і відносно вихідної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму).



Результати та обговорення

Серед існуючих препаратів “штучної сльози” як полімери найбільш широко використовують декстран і ГПМЦ, структура яких наведено на рис. 1.

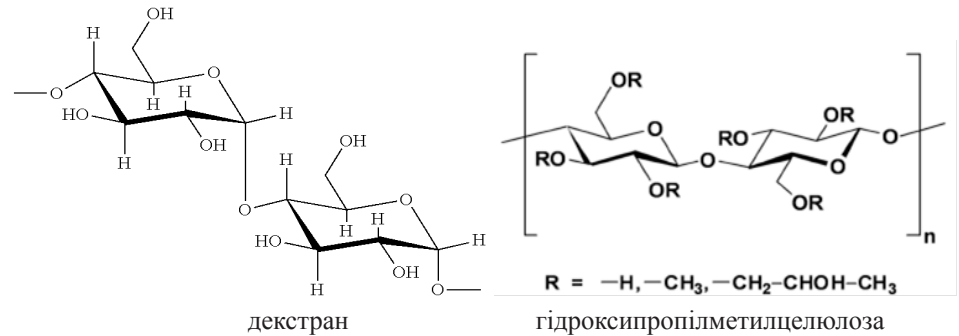


Рис. 1. Структура декстрану і гідроксипропілметилцелюлози

Fig. 1. Structure of dextran and hydroxypropyl methylcellulose

Такі полімерні структури мають велику кількість вільних функціональних груп і можуть утворювати водневі зв'язки з лізоцимом, не порушуючи конформацію ензиму і приводячи до його стабілізації.

Кількість лізоциму для включення в розчини полімерів було вибрано відповідно до його нормального вмісту в сльозі людини ($0,81 \pm 0,31 - 1,68 \pm 0,66$ мг/см³) [7]. Оскільки препарати схожого полімерного складу випускаються і широко використовуються в медицині, основним завданням було дослідити вплив полімерів на біохімічні та фізико-хімічні особливості функціонування лізоциму. Основні характеристики отриманого препарату представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика очних крапель з лізоцимом

Table 1

Characteristics of eye drops with lysozyme

Показник	Результати визначення, $M \pm m$
Гідролітична активність*, од/см ³	38200±2000
Вміст лізоциму, мг/см ³	1,00±0,05
Органолептичні показники	Прозорі, безбарвні, без запаху, липкі
pH-оптимум	7,0–7,4
Термооптимум, °C	40–50
Густина, г/см ³	0,996 ± 0,003
Осмоляльність, мОсм/дм ³	298 ± 2

Примітка. *Достовірність відмінностей між активністю вільного і стабілізованого ферменту $P < 0,05$ при $n=3$



Слід зазначити, що бактеріолітична активність лізоциму при включенні його в розчини полімерів повністю зберігається, що вказує на стабільність ензиму. Отримані результати значень густини розроблених лізоцимвмісних крапель становлять $0,996 \pm 0,003 \text{ г/см}^3$, і близькі до густини слъози людини (1 г/см^3). Осмоляльність препарату становить $298 \pm 2 \text{ мОсм/дм}^3$, дане значення знаходиться також в межах норми слізної рідини ($275\text{--}316 \text{ мОсм/дм}^3$).

При дослідженні в'язкості полімерів відзначено, що в залежності від складу розчину змінюється його кінематична в'язкість (рис. 2).

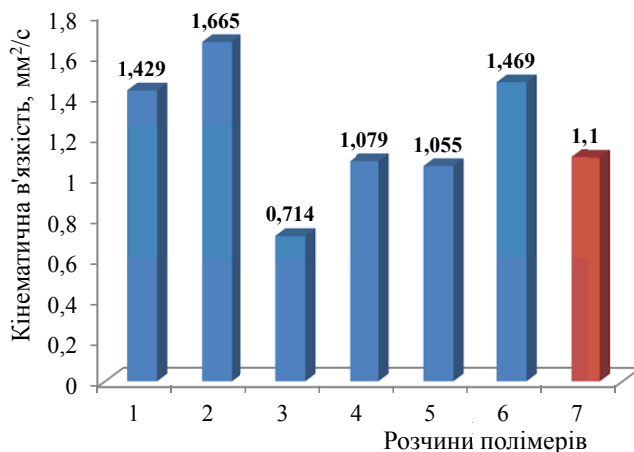


Рис. 2. Кінематична в'язкість розчинів полімерів різного складу:

1 – ГПМЦ (0,39%); 2 – декстран (0,1%); 3 – лізоцим (0,1%); 4 – ГПМЦ + лізоцим; 5 – декстран + лізоцим; 6 – ГПМЦ + декстран; 7 – декстран + ГПМЦ + лізоцим.

Fig. 2. Kinematic viscosity of polymers solutions of different composition:

1 – HPMC (0.39%); 2 – dextran (0.1%); 3 – lysozyme (0.1%); 4 – HPMC + lysozyme; 5 – dextran + lysozyme; 6 – HPMC + dextran; 7 – dextran + HPMC + lysozyme.

Додавання лізоциму у всіх випадках знижує в'язкість полімерів, що може бути обумовлене міжмолекулярними взаємодіями компонентів. Для комплексного препарату кінематична в'язкість становить $1,1 \text{ мм}^2/\text{с}$, що відповідає нормі слізної рідини людини.

Для стерилізації розроблених крапель з лізоцимом використовували метод стерилізуючої фільтрації. Результати досліджень тривалості зберігання препарату свідчать про повну втрату активності водним розчином лізоциму протягом перших тижнів, тоді як стабілізований розчинами полімерів препарат зберігає бактеріолітичну активність протягом 1 року в умовах низьких температур ($0\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$) (табл. 2).

В результаті проведених досліджень розроблено препарат «штучної слъози», що містить лізоцим, з високою бактеріолітичною активністю включеного ензиму ($38200 \pm 2000 \text{ од/см}^3$). Показано, що препарат має близькі до слізної рідини значення в'язкості, густини і осмоляльності, що відповідає вимогам

до таких. Лізоцим, стабілізований розчинами полімерів, після попередньої стерилізуючої фільтрації зберігається в умовах низьких температур (0–4 °С) протягом 12 місяців з 96,4% збереженням бактеріолітичної активності. Розроблений препарат перспективний для подальших біологічних досліджень.

Таблиця 2

Бактеріолітична активність розчинів лізоциму в процесі зберігання

Table 2

Bacteriolytical activity of lysozyme solutions during storage

Час зберігання, міс.	Бактеріолітична активність			
	лізоцим у водному розчині		лізоцим, стабілізований розчином полімерів	
	од/мг (M±m)	%	од/мг (M±m)	%
0,2	40000±2100 *P < 0,05	100	40000±2171 *P < 0,05	100
0,5	13600±884 *P < 0,05, **P < 0,01	34	38200±2130 *P < 0,05, **P > 0,05	100
1	3880±272 *P < 0,05, **P < 0,01	9,7	38200±2084 *P < 0,05, **P > 0,05	100
2	1520±81 *P < 0,05, **P < 0,01	3,8	39200±1370 *P < 0,01, **P > 0,05	98
3	0	0	39120±2190 *P < 0,05, **P > 0,05	97,8
4	0	0	39040±1854 *P < 0,05, **P > 0,05	97,6
5	0	0	38800±2211 *P < 0,05, **P > 0,05	97
6	0	0	38600±1810 *P < 0,01, **P > 0,05	96,5
7	0	0	38720±1664 *P < 0,01, **P > 0,05	96,8
8	0	0	38640±1662 *P < 0,01, **P > 0,05	96,6
9	0	0	38560±2043 *P < 0,05, **P > 0,05	96,4
10	0	0	38600±1845 *P < 0,05, **P > 0,05	96,5
11	0	0	38600±1880 *P < 0,05, **P > 0,05	96,5
12	0	0	38560±1680 *P < 0,01, **P > 0,05	96,4

Примітка. * достовірність між бактеріолітичною активністю лізоциму в водному розчині та лізоциму, стабілізованого розчином полімеру за різних термінів зберігання (n=3). ** достовірність відносно вихідної активності вільного лізоциму (40000 од/мг ензиму).



С.С. Декина¹, И.И. Романовская¹, Е.П. Сотникова²

¹Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, тел.: +38(048)766 20 44, e-mail: s.dekina@gmail.com
²ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины»,
Французский бульвар, 49/51, Одесса, 65061

ЛИЗОЦИМСОДЕРЖАЩИЙ ПРЕПАРАТ «ИСКУССТВЕННАЯ СЛЕЗА»: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА

Реферат

Цель. Разработка и исследование химических и физических свойств лизоцим-содержащих глазных капель «искусственная слеза» – перспективного препарата для лечения синдрома «сухого глаза». **Методы.** Бактериолитическую активность лизоцима определяли турбидиметрически, используя в качестве субстрата *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698. Содержание протеина определяли методом Лоури-Хартри, вязкость на вискозиметре Оствальда, плотность с помощью ареометра, осмоляльность препарата – осмометром Tear Lab Osmolarity System. **Результаты.** Предложен перспективный для слезозаменительной терапии препарат «искусственная слеза» в форме глазных капель, содержащих лизоцим – естественный антибактериальный компонент слезы. Отмечено полное сохранение высокой бактериолитической активности включенного энзима (38200 ± 2000 ед/см³). Показано, что разработанные капли имеют близкие со слезной жидкостью значения вязкости, плотности и осмоляльности, что соответствует требованиям, предъявляемым к таковым. Установлено, что лизоцим, стабилизированный декстраном и гидроксипропил-метилцеллюлозой, после предварительной стерилизующей фильтрации хранится в условиях низких температур (0–4 °С) в течение 12 месяцев с 96,4% сохранением исходной бактериолитической активности. **Выводы.** В результате проведенных исследований впервые разработан препарат «искусственная слеза» в виде капель с включенным лизоцимом. Разработанный препарат перспективен для дальнейших биологических исследований.

Ключевые слова: лизоцим, искусственная слеза, декстран, гидроксипропил-метилцеллюлоза, синдром «сухого глаза».

S.S. Dekina¹, I.I. Romanovska¹, E.P. Sotnikova²

¹A.V. Bogatsky's Physico-chemical institute, NAS of Ukraine,
86, Lustdorfka dor., Odesa, Ukraine, 65080, tel.: (048) 765 94 31, e-mail: s.dekina@gmail.com
²SI "The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the NAMS of Ukraine",
49/51, Frantsuzskii Boulevard, Odesa, Ukraine, 65061

LYSOZYME-CONTAINING PREPARATION "ARTIFICIAL TEARS": OBTAINING, PROPERTIES

Summary

Aim. The development and study of the chemical and physical properties of eye drops with lysozyme as a perspective drug for the treatment of the syndrome of "dry eye." **Methods.** Activity of egg white lysozyme was determined by bacteriolytic method (with *Micrococcus lysodeikticus* ATCC № 4698 as substrate). Protein content was determined by the Lowry-Hartree method, determination of osmolality of the drug was carried out by osmometer – Tear Lab Osmolarity System. **Results.** A perspective



preparation “artificial tears” for dry eye therapy in form of eye drops with lysozyme was developed. There were noted the complete preservation of bacteriolytic activity of the included enzyme (38200 ± 2000 U/ml). The developed drops have the same values of lacrimal fluid viscosity, density and osmolality. Dextran and hydroxypropylmethyl cellulose stabilized lysozyme in the formulation, with usage of sterilizing filtration stored at low temperatures ($0-4$ °C) for 12 months with 96.4% retention of the original bacteriolytic activity. **Conclusions.** We propose a perspective preparation “artificial tears” for dry eye therapy in form of eye drops with lysozyme as a natural antibacterial component of tears. We have noted the high bacteriolytic activity of the included lysozyme (38200 ± 2000 U/ml). It was shown, that developed drops have the same values of lacrimal fluid viscosity, density and osmolality. It is found that dextran stabilized lysozyme in the formulation and hydroxypropylmethylcellulose, with usage sterilizing filtration stored at low temperatures ($0-4$ °C) for 12 months with 96.4% retention of the original bacteriolytic activity.

Key words: lysozyme, artificial tears, dextran, hydroxypropyl methylcellulose, “dry eye” syndrome.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кольчик О.В., Сорокин П.В. Гидрогели при лечении «синдрома сухого глаза» // Нижегородский медицинский журнал. – 2006. – № 8. – С. 193–196.
2. Полунин Г.С., Куренков В.В., Сафонова Т.Н. и др. Новая клиническая классификация синдрома сухого глаза // Рефракционная хирургия и офтальмология. – 2003. – Т. 3, № 3. – С. 53–56.
3. Придачина Д.В., Жилякова Е.Т., Новикова М.Ю. Современное состояние исследований по офтальмологическим лекарственным формам, направленным на профилактику и лечение синдрома «сухого глаза» // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. – www.science-education.ru/100-4990
4. Bron A.J. The Definition and Classification of Dry Eye Disease. Part of the series Essentials in Ophthalmology. Dry Eye. – 2015. – P. 1–19.
5. Gorin G., Wang S.F., Papapavlou L. Assay of lysozyme by its lytic action on *M. lysodeikticus* cells // Anal. Biochem. – 1971. – V. 39, № 1. – P. 113–127.
6. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – V. 48, № 2. – P. 422–427.
7. McDermott A.M. Antimicrobial compounds in tears // Experimental Eye Research. – 2013. – V. 117. – P. 53–61.
8. Stapleton F., Garrett Q., Chan C., Craig J.P. The Epidemiology of Dry Eye Disease // Part of the series Essentials in Ophthalmology. Dry Eye. – 2015. – P. 21–29.
9. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион, 2000, 320 с.

Стаття надійшла до редакції 12.11.2015 р.



Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.С. Бондар, О.П. Третяк

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка,
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

ВПЛИВ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АМОНІЮ НА РІСТ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

Мета: порівняти ріст монокультур сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfomicrobium* і *Desulfovibrio* за умов інгібування корозії інгібіторами-біоцидами – четвертинними солями амонію. **Методи.** Біокорозію досліджували гравіметричним методом, використовуючи зразки сталі Ст3пс. Чисельність бактерій у планктоні та біоплівці визначали методом граничних десятикратних розведень, концентрацію біогенного сірководню у середовищі Постгейта «В» – йодометричним титруванням. **Результати.** Планктонна та біоплівкова форми бактерій штаму *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 чутливіші до четвертинної солі амонію, яка містить незаміщений фенільний радикал (ЧСА I). Це зумовило більше пригнічення сульфатвідновлювальної активності та ефективніше інгібування корозії. Планктонна форма бактерій штаму *Desulfovibrio* sp.М-4.1 чутливіша до четвертинної солі амонію з заміщеним фенільним радикалом (ЧСА II). При однаковому пригніченні чисельності бактерій *Desulfovibrio* sp. М-4.1 солями амонію у біоплівці, спостерігається більше зниження сульфатвідновлювальної активності сполукою ЧСА II порівняно з ЧСА I та більший ступінь захисту сталі. **Висновки.** При розробці і використанні інгібіторів-біоцидів в практиці протикорозійного захисту металевих споруд необхідно враховувати переважання в корозійному середовищі певного штаму сульфатвідновлювальних бактерій. Досліджені четвертинні солі амонію є ефективними для попередження мікробної корозії викликаної бактеріями роду *Desulfovibrio*.

Ключові слова: штами сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp.М-4.1 та *Desulfomicrobium* sp. ТС 4, біокорозія, четвертинні солі амонію, інгібітори-біоциди.

Одним із факторів впливу на процес корозії металевих конструкцій є корозійне мікробне угруповання з переважанням сульфатвідновлювальних бактерій, які розповсюджені за анаеробних умов (морські і континентальні водойми, підземні води нафтових і рудних родовищ, ґрунти та ін.) [1, 9, 14]. Метаболічна активність сульфатвідновлювальних бактерій у складі корозійно активного угруповання визначає інтенсивність корозійного процесу на поверхні металу. Для попередження мікробної корозії широко використовують інгібітори з біоцидною дією щодо сульфатвідновлювальних бактерій. Їх ефективність може суттєво розрізнятися в залежності від того, який штам бактерій є пере-



важальним у корозійному середовищі [1, 8]. Вивчення особливостей розвитку різних штамів сульфатвідновлювальних бактерій за присутності біоцидів дозволить більш обґрунтовано підходити до розробки та прогнозування захисних властивостей інгібіторів.

Метою роботи було порівняти ріст монокультур сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfomicrobium* та *Desulfovibrio* за умов інгібування корозії інгібіторами-біоцидами – четвертинними солями амонію.

Матеріали і методи

Досліджували сульфатвідновлювальні бактерії штамів *Desulfovibrio* sp. М-4.1 та *Desulfomicrobium* sp. ТС 4. Штам *Desulfovibrio* sp. М-4.1 виділено нами із сульфідогенного природного угруповання феросфери та ідентифіковано молекулярно-біологічними методами [4]. Штам *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 (із продуктів корозії обростань латунних трубок водогону теплових мереж) взято як тест-об'єкт для вивчення перебігу процесу мікробної корозії з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України [9].

Дослідження біокорозії, індукованої зазначеними штамми бактерій, проводили гравіметричним методом [5] в герметичних скляних ємностях об'ємом 100 мл, заповнених середовищем Постгейта «В» та інокульованих відповідною культурою бактерій. Використану культуру бактерій стандартизували прямим підрахунком числа клітин. Використовували зразки конструкційної малоуглецевої сталі марки Ст3пс (площа поверхні 24 см²) виробництва підприємства „Криворіжсталь” підготовлені загальноприйнятим методом [5]. Вміст елементів в сталі (% за масою): Fe – 98,876; C – 0,190; Mn – 0,540; Si – 0,070; Ni – 0,010; S – 0,038; P – 0,007; Cr – 0,020; N – 0,007; Cu – 0,02; As – 0,004; Ti – 0,002; B – 0,0006; Al – 0,005. Сталь Ст3пс зазвичай використовують для виготовлення зварних, безшовних конструкцій та деталей, які працюють за позитивних температур.

Після експозиції у корозійному середовищі з поверхні зразків сталі видаляли продукти корозії механічним та хімічним способами. За втратою маси зразків розраховували швидкість корозії (K_m , г/(м²год)), коефіцієнт гальмування корозійного процесу (γ_m) та ступінь захисту (Z_m %) за формулами: $K_m = \Delta m / (S \cdot \tau)$; $\gamma_m = K_m / K_m'$; $Z_m = (1 - 1/\gamma_m) \times 100$ % [8], де Δm – втрата маси зразка (г), S – площа поверхні зразка (м²), τ – тривалість експозиції (год), K_m та K_m' – швидкість корозії в середовищі без четвертинних солей амонію (ЧСА) та в середовищі з ЧСА, відповідно. Концентрація досліджуваних солей 0,01 ммоль/л. Тривалість експозиції при температурі 28 ± 2 °С становила 14 діб.

Формули досліджених солей амонію з зазначенням зарядів на адсорбційно-реакційних центрах наведено в таблиці 1. Сполуки синтезовано на кафедрі хімії Чернігівського національного педагогічного університету імені Т.Г. Шевченка під керівництвом д.фарм.н. Демченка А.М. Склад та будова сполук підтверджена методами ЯМР ¹H-спектроскопії (Bruker-300) та хроматомас-спектрометричним аналізом (LC/MSD, прилад серії Agilent 1200 (США)).



Таблиця 1

Хлориди (2-гідроксиетил)-N,N-диметиларилкарбомілметил амонію

Table 1

(2-Hydroxyethyl)-N,N-dimethyl-phenylcarbamoylmethyl-ammonium chlorides

Умовне позначення	Формула	Молярна маса, г/ моль
ЧСА I		258,5
ЧСА II		337,5

Вибір солей для дослідження зумовлено перспективністю сполук даного класу в якості інгібіторів-біоцидів [2]. Для оцінки розвитку сульфатвідновлювальних бактерій штамів за умов мікробної корозії досліджували чисельність бактерій у планктоні та біоплівці методом граничних десятикратних розведень та концентрацію біогенного сірководню – методом йодометричного титрування [3]. Найбільш ймовірне число мікроорганізмів в одиниці об'єму розраховували за таблицями Мак-Креді [7]. Клітини біоплівки, що прикріпились за час експозиції до металевої пластини знімали у фіксований об'єм 0,1н фосфатного буфера (рН 7,0) за допомогою ультразвуку на приладі УЗМ-003/н за частоти 22 кГц (30 с) двічі з інтервалом 60 с.

Відносний ступінь впливу солей на сульфатредукцію бактерій розраховували за формулою:

$$S = (C_{\text{контр.}} - C_{\text{досл.}}) \times 100 / C_{\text{контр.}}$$

де S – відносний ступінь впливу речовини на сульфатредукцію; $C_{\text{досл.}}$ та $C_{\text{контр.}}$ – концентрація сірководню в досліджуваній пробі, що містить речовину, і в контрольній, яка не містить речовини, мг/мл [10].

Статистичне опрацювання даних щодо швидкості корозії (середнє значення та його похибка) здійснювали за допомогою пакету “Описова статистика” програми Microsoft Excel для рівня надійності 95%. Відносна похибка не перевищує 10%. Повторність дослідів триразова.

Показник ліпофільності ЧСА (IgP) та їх кватерно-хімічні показники (заряди на адсорбційно-реакційних центрах молекул; $E_{\text{НОМО}}$ – енергія вищої зайнятої молекулярної орбіталі; $E_{\text{ЛУМО}}$ – енергія нижньої вакантної молекулярної орбіталі) розраховували з використанням пакету програм ChemOffice 9.0. (Cambridgesoft Inc.).



Результати та їх обговорення

Штам сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp. M-4.1 представлений клітинами, що мають паличкоподібну форму з заокругленими кінцями. Ці бактерії – мезофільні, грамнегативні, факультативні анаероби, спор не утворюють. За фізіолого-біохімічними ознаками бактерії штаму M-4.1 можуть використовувати сульфати та елементну сірку в якості акцепторів електронів. Як донори електронів та джерело карбону – лактат, етанол, пропанол, ізоаміловий спирт, ацетат, стеарат, малат, олеат, бензоат, фумарат, цитрат, аланін, аргінін, аспарагін, лізин, серин, триптофан. При цьому такі сполуки, як фенол бактерії штаму M-4.1 використовувати не здатні. Штам *Desulfomicrobium* sp. TC 4 охарактеризовано авторами в [9]. Певна відмінність у фізіолого-біохімічних властивостях зазначених штамів, зокрема використання аргініну штамом M-4.1 в якості джерела карбону, дозволяють передбачити різницю у впливі інгібіторів-біоцидів на їх розвиток.

Порівняльну оцінку розвитку монокультур сульфатвідновлювальних бактерій родів *Desulfomicrobium* та *Desulfovibrio* здійснювали за умов мікробної корозії інгібованої четвертинними солями амонію.

Результати дослідження біокорозії сталі Ст3пс індукованої штамми бактерій *Desulfovibrio* sp. M-4.1 та *Desulfomicrobium* sp. TC 4 показали, що чисельність бактерій обох штамів у планктоні однакова (рис. 1, а). Але у перебігу експерименту бактерії штамів утворили різну за щільністю біоплівку: чисельність бактерій штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1 виявилася на порядок більшою порівняно з *Desulfomicrobium* sp. TC 4 (рис. 1, б). Більш щільна біоплівка, сформована штамом *Desulfovibrio* sp. M-4.1, може бути зумовлена різницею у хемотаксисі бактерій [1].

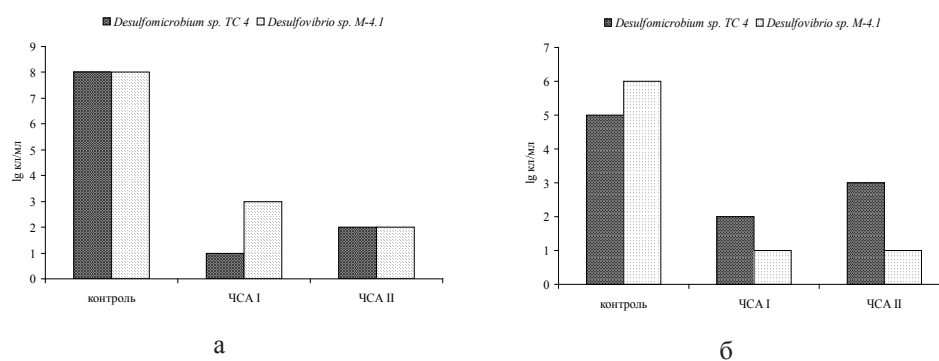


Рис. 1. Кількість клітин сульфатвідновлювальних бактерій за дії ЧСА у планктоні (а) та у біоплівці (б). Контроль – корозійне середовище без додавання солей.

Fig. 1. Quantity of sulphatereducing bacteria cells at the presence of QSA of plankton (a) and biofilm (b). Control – corrosive medium without introducing salts.

За присутності у середовищі четвертинних солей амонію чисельність бактерій обох штамів зменшилась. Але їх вплив на планктонну та біоплівкову

форми штамів різний. Бактерії планктонної форми обох штамів відповіли на біоцидну дію ЧСА II зменшенням чисельності на 6 порядків. Відповідь планктону на ЧСА I була різною: бактерії *Desulfomicrobium* sp. TC 4 знизили свою чисельність на 7 порядків, а *Desulfovibrio* sp. M-4.1 – на 5 порядків.

Бактерії біоплівки (місце активного перебігу біокорозії [13]) по іншому відреагували на присутність ЧСА. Хоча у контролі спостерігалась найбільша чисельність *Desulfovibrio* sp. M-4.1, більше пригнічення розвитку (на 5 порядків) відмічено саме для цього штаму бактерій. Бактерії штаму *Desulfomicrobium* sp. TC 4 зменшили свою чисельність лише на 2–3 порядки. За умов мікробної корозії бактерії штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1 мали вищу в 1,45 рази сульфатвідновлювальну активність порівняно зі штамом *Desulfomicrobium* sp. TC 4 на що вказує концентрація сірководню у корозійному середовищі (табл. 2). Це і зумовлює більшу в 1,53 рази швидкість корозії сталі Ст3пс.

Четвертинні солі амонію впливають на сульфатвідновлювальну активність бактерій обох штамів: ступінь пригнічення становить 77,7–87,8%. Найбільше (87,8%) ЧСА II пригнічує ріст бактерій штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1, що призводить до найбільшого уповільнення швидкості корозії (табл. 2). Це узгоджується з уявленнями про суттєве значення мікробіологічного чинника у процесі мікробної корозії [1, 12, 14].

Таблиця 2

Вплив четвертинних солей амонію на процес мікробної корозії сталі Ст3пс

Table 2

Influence of quarter ammonium salts on the process of biocorrosion St3ps steel

Інгібітор	<i>Desulfomicrobium</i> sp. TC 4				<i>Desulfovibrio</i> sp. M-4.1			
	Вміст H ₂ S, мг/л	S, %	K _m × 10 ⁻³ , г/(м ² × год)	γ _m	Вміст H ₂ S, мг/л	S, %	K _m × 10 ⁻³ , г/(м ² × год)	γ _m
Контроль	175±11	–	15,6±1,2	–	254±8	–	23,9±1,9	–
ЧСА I	31±3	82,3	3,4±0,3	4,6	55±4	78,3	5,5±0,4	4,4
ЧСА II	39±3	77,7	4,8±0,4	3,2	31±2	87,8	2,7±0,2	8,9

Примітка: контроль – корозійне середовище без внесення солей.

Control – corrosive medium without introducing salts.

Встановлено, що ріст бактерій досліджуваних штамів за присутності інгібіторів корозії виявився різним. Планктонна та біоплівкова форми бактерії *Desulfomicrobium* sp. TC 4 виявилися більш чутливими до сполуки ЧСА I, що зумовило більше пригнічення як сульфатвідновлювальної активності (порівняно з дією ЧСА II), так і ефективніше інгібування корозії.

Планктонна форма бактерій штаму *Desulfovibrio* sp. M-4.1 чутливіша до сполуки ЧСА II (порівняно з ЧСА I). При однаковому пригніченні бактерій



Desulfovibrio sp. М-4.1 четвертинними солями амонію у біоплівці, спостерігається більше зниження сульфатвідновлювальної активності сполукою ЧСА II і, відповідно, більший ступінь захисту.

Таким чином, при розробці і використанні інгібіторів-біоцидів в практиці протикорозійного захисту металевих споруд необхідно враховувати переважання в корозійному середовищі певного штаму сульфатвідновлювальних бактерій та їх розвиток за дії інгібітора-біоцида. Досліджені четвертинні солі амонію є ефективними для попередження мікробної корозії викликаной бактеріями роду *Desulfovibrio*.

Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, Е.С. Бондарь, А.П. Третьак

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,
ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,
тел.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ СОЛЕЙ АММОНИЯ НА РОСТ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Цель: Сравнить рост монокультур сульфатвосстанавливающих бактерий родов *Desulfomicrobium* и *Desulfovibrio* в условиях ингибирования коррозии ингибиторами-биоцидами – четвертичными солями аммония. **Методы.** Исследование биокоррозии проводили гравиметрическим методом, используя образцы конструкционной малоуглеродистой стали марки СтЗпс. Численность бактерий в планктоне и биопленке определяли методом предельных десятикратных разведений. Концентрацию биогенного сероводорода в среде Постгейта «В» – методом йодометрического титрования. **Результаты.** Планктонная и биопленочная формы бактерий штамма *Desulfomicrobium* sp. ТС 4 более чувствительны к четвертичной соли аммония, которая содержит незамещенный фенильный радикал (ЧСА I). Это обусловило большее угнетение как сульфатвосстанавливающей активности так и более эффективное ингибирование коррозии. Планктонная форма бактерий штамма *Desulfovibrio* sp. М-4.1 более чувствительна к четвертичной соли аммония с замещенным фенильным радикалом (ЧСА II). При одинаковом угнетении численности бактерий *Desulfovibrio* sp. М-4.1 солями аммония в биопленке, наблюдается большее снижение сульфатвосстанавливающей активности веществом ЧСА II и, соответственно, большая степень защиты. **Выводы.** При разработке и использовании ингибиторов-биоцидов в практике противокоррозионной защиты металлических сооружений необходимо учитывать преобладание в коррозионной среде определенного штамма сульфатвосстанавливающих бактерий. Исследованные четвертичные соли аммония являются эффективными для предупреждения микробной коррозии вызванной бактериями рода *Desulfovibrio*.

Ключевые слова: штаммы сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio* sp.М-4.1 и *Desulfomicrobium* sp. ТС 4, биокоррозия, четвертичные соли аммония, ингибиторы-биоциды.



N.R. Demchenko, I.M. Kurmakova, O.S. Bondar, O.P. Tretyak

Chernigiv National Pedagogical University named after T.G. Shevchenko,
53, Getman Polubotok Str., Chernigiv, 14013, Ukraine,
tel.: +38 (0462) 95 69 88, e-mail: nata_demch@ukr.net; kurmakova@mail.ru

INFLUENCE OF QUATERNARY SALTS OF AMMONIUM ON GROWTH OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA

Summary

Aim. To compare the growth of the monocultures of sulphate-reducing bacteria of *Desulfomicrobium* and *Desulfovibrio* genera under conditions of corrosion inhibition by biocide inhibitors – quaternary ammonium salts. **Methods.** Biocorrosion was analyzed by means of the gravimetric method, with the application of St3ps steel samples. The quantity of bacteria in plankton and biofilm was calculated by the method of boundary ten-fold dilutions, biogenic hydrogen sulfide concentration in medium Postgate “B” – by the iodometric titration. **Results.** The plankton and biofilm forms of bacteria of *Desulfomicrobium* sp. TC 4 strain turned out to be more sensitive to the quaternary ammonium salt containing the unreplaced phenyl radical (QAS I). This has caused both more extensive inhibition of sulphate-reducing activity and more efficient inhibition of corrosion. The plankton form of the bacteria of *Desulfovibrio* sp. M-4.1 strain has demonstrated a greater sensitivity to the quaternary ammonium salt with the replaced phenyl radical (QAS II). **Under identical inhibition of the quantity of *Desulfovibrio* sp. M-4.1 bacteria by the ammonium salts in biofilm, a greater reduction of sulphate-reducing activity by means of QAS II compound and a greater level of protection have been observed.** **Conclusions.** In the development and use of inhibitors-biocides in the practice of anti-corrosion protection of metal constructions it must be taken into consideration the prevalence of certain corrosive medium sulfate-reducing bacteria strain. Investigated quaternary ammonium salts are more effective in preventing microbial corrosion caused by bacteria of *Desulfovibrio* genus.

Key words: strains of sulphate-reducing bacteria *Desulfovibrio* sp. M-4.1 and *Desulfomicrobium* sp. TC 4, biocorrosion, quaternary ammonium salts, biocide inhibitors.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрюк К.І., Козлова І.П., Коптєва Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуріш Л.М. Мікробна корозія підземних споруд. – Київ: Наук. думка, 2005. – 259 с.
2. Белоглазов С.М. Джафаров З.И., Поляков В.Н., Демушин Н.Н. Четвертичные аммониевые соли как ингибиторы коррозии стали в присутствии СРБ // Защита металлов. – 1991. – Т. 27, № 6. – С. 1041–1045.
3. Васильев В.П. Аналитическая химия : в 2-х ч. Ч. 1. Гравиметрические и титриметрические методы анализа : [учеб. для хим.-технол. спец. вузов.] – М. : Высш. шк., 1989. – 319 с.
4. Демченко Н.Р., Курмакова І.М., Третьак О.П. Особливості корозійно активного мікробного угруповання феросфери газопроводу, прокладеного у піщаному ґрунті. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 90–98.



5. Фокин М.Н., Жигалова К.А. Методы коррозионных испытаний металлов / Под ред. Я. М. Колотыркина. – М. : Металлургия, 1986. – 78 с.
6. Орлов В.Д., Липсон В.В., Иванов В.В. Медицинская химия : [учеб. для студ. хим. спец. высших учеб. зав.] – Х. : Фолио, 2005. – 460 с.
7. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та., 1976. – 306 с.
8. Пуриш Л.М., Погребова И.С., Козлова И.А. Влияние сульфатредуцирующих бактерий на коррозию стали в присутствии ингибиторов // Мікробіол. журн. – 2002. – Т. 64, № 6. – С. 67–72.
9. Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Иутинская Г.А. Биоразнообразие сульфатредуцирующих бактерий, развивающихся на объектах теплосетей / Л.М. Пуриш, Л // Мікробіологічний журнал. – 2014. – Т. 76, № 3. – С. 11–17.
10. Резанова И.Б. Предупреждение биодеструкции химвеществ при разработке нефтяных месторождений: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. Уфа, 1999. – 26 с.
11. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* // Second edition, Volume two, Part C, Eds D.Brenner, N.R.Krieg, J.T.Staley. – New York: Springer, 2005. 1388 p.
12. Maluckov B.S. Corrosion of steels induced by microorganisms // Metall. Mater. Eng. – Vol. 18 (3). – 2012. – P. 223–231.
13. Melo I.R., Filho S.L.U., Oliveira F.J.S., França F.P. Formation of Biofilms and Biocorrosion on AISI-1020 Carbon Steel Exposed to Aqueous Systems Containing Different Concentrations of a Diesel/Biodiesel Mixture // International Journal of Corrosion. – Vol. 2011. – 2011. – P. 1706–1712.
14. Liengen T., Feron D., Basseguy R., Beech I.B. Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications. – Woodhead Publishing, 2014. – 446 p.

Стаття надійшла до редакції 15.09.2015 р.



С.С. Муродова, К.Д. Давранов

Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека,
ул. Студенческая, 4, 100174, Ташкент, Узбекистан,
e-mail: ssmuradova@rambler.ru, k_davranov@mail.ru

АНАЛИЗ ПЛАЗМИДНОГО СОСТАВА ДНК СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ ШТАММОВ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Целью исследований являлось изучение и анализ состава плазмид солеустойчивых бактерий *Bacillus subtilis* СКБ-309, *Bacillus megaterium* СКБ-310 и *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, входящих в состав препарата «Замин-М». Микробная композиция «Замин-М» на основе высокоактивных и устойчивых к стрессовым условиям внешней среды бактериальных штаммов, успешно используется в сельскохозяйственной практике Узбекистана. **Методы.** Бактерии, служащие объектами исследований, выделены из среднесоленых почв и ризосферы сельскохозяйственных культур и отселекционированы путем ступенчатого скрининга штаммов, растущих, в присутствии 3–5 и 7% NaCl в питательной среде и идентифицированы по Bergey. **Результаты.** В результате электрофоретического анализа плазмидной ДНК солеустойчивых штаммов микроорганизмов по методу Birnboim и Dollı были выявлены плазмидные ДНК размерами 48,5; 30 и 13,3 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) у *B. subtilis*, 23,1 т.п.н. у *B. megaterium* и 55 т.п.н. у *P. stutzeri* СКБ-308. Предполагается, что эти плазмиды могут нести гены устойчивости бактерий к неблагоприятным условиям среды, в том числе к высокому содержанию (7%) токсических ионов Cl⁻.*

Ключевые слова: бактерии, плазмидная ДНК, микробная композиция «Замин-М», электрофоретический анализ.

Плазмиды, являясь необязательными генетическими элементами бактерий, могут включать детерминанты, обеспечивающие в ряде случаев селективное преимущество, содержащим их клеткам [3]. Они обеспечивают устойчивость к антибиотикам, солям тяжелых металлов, ультрафиолетовому облучению, определяют продукцию токсинов, антибиотиков, бактериоцинов, содержат гены общего клеточного метаболизма, функции систем рестрикции и модификации, деградации органических и неорганических соединений, детерминировать признаки вирулентности, фиксации азота, и многие другие свойства бактерий. Вышеперечисленные особенности являются причиной широкого распространения плазмид-содержащих бактерий в природной среде обитания. В зависимости от свойств, некоторые виды бактерий могут приносить значительный ущерб сельскому хозяйству, однако другие могут быть полностью противоположными по своему действию, стимулируя рост и развитие



растений в различных условиях. Именно благодаря этим свойствам ростстимулирующие бактерии стали использоваться в качестве основы микробных биопрепаратов в практике растениеводства. [4]. Одним из таких препаратов является микробная композиция «Замин-М», разработанная нами на основе высокоактивных и устойчивых к стрессовым условиям внешней среды, штаммов *B. subtilis* СКБ-309, *B. megaterium* СКБ-310, *P. stutzeri* СКБ-308. Препарат с большой эффективностью используется в сельскохозяйственной практике Узбекистана [1]. Многолетними исследованиями доказано, что наибольший урожай хлопка-сырца получен в варианте с Замин-М при замочке семян нормой 2,5 л/т и опрыскивании в фазах бутонизации и цветения-плодообразования нормой расхода 2,0 л/га, при этом прибавка урожая составила 3,3 ц/га, что на 8,8% больше контроля. Препарат зарегистрирован Государственной комиссией по средствам химизации и защиты растений республики Узбекистан (Госхимкомиссия) в качестве стимулятора роста и развития хлопчатника в условиях среднего засоления почв.

Целью настоящих исследований являлось изучение плазмидного состава бактерий, входящих в состав препарата «Замин-М».

Материалы и методы

Объектами исследований служили бактерии *B. subtilis* СКБ-309, *B. megaterium* СКБ-310, *P. stutzeri* СКБ-308, выделенные из средnezасоленных почв и ризосферы сельскохозяйственных культур, которые были отселекционированы путем ступенчатого скрининга штаммов, растущих в присутствии 3–5 и 7% раствора NaCl питательной среды LB и идентифицированы по Bergey [6]. Для идентификации были использованы общепринятые методы изучения культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков [2]. Штаммы хранятся в коллекции промышленно-важных микроорганизмов Института микробиологии АНРУз.

Культивирование бактерий проводили на термостатированной установке для выращивания микроорганизмов УВМТ-12-250 (НПО ЭЛИОН, Россия) с частотой вращения 220 об/мин при 28 °С в течение 72 часов в 250 мл мясо-пептонного бульона (МПБ, продукт компании HIMEDIACA), концентрация посевного материала составляла 5–10%. К концу культивирования титр клеток составлял 10^9 КОЕ/мл. В посевном материале посторонняя микрофлора отсутствовала.

Выделение плазмидной ДНК бактерий осуществляли по методу, описанному Birnboim и Dolli [7].

Для выделения плазмидной ДНК использованы свежие культуры микроорганизмов, выращенные в жидкой среде мясо-пептонного бульона (МПБ, продукт компании HIMEDIACA), содержащей 7% (1,2М) NaCl в течение 3 дней, при 28 °С интенсивной аэрации. Сферопласты бактериальных культур получены при обработке клеток лизоцимом (2 мкг/мл) в GTE буфере (Glukosa, Tris, EDTA), состоящим из 0,025 М трис-НСl и 0,01 М ЭДТА, рН 8,0 содержащим 0,05 М глюкозу в течение 30 мин во льду. Полученные сферопласты осаждали



центрифугированием при 3500 об/мин и температуре 4 °С на центрифуге К-24 (Германия) в течение 15 мин. Осадок сферопластов ресуспендировали в среде с 0,15 М NaOH и 2% SDS, выдерживали в течение 5 мин на льду, добавляли 150 мкл 3М ацетата натрия. Суспензию сферопластов осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об/мин, удалив осадок к супернатанту добавляли 2,5 объема этилового спирта. После этого центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин. Осадок промывали 70% раствором спирта и растворяли в ТЕ буфере (10 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0).

Электрофорез ДНК проводили в горизонтальных 1% агарозных пластинках в буфере 1xTAE pH 8,2 (Трис – 4,84 г, 1,14 мл – ледяной уксусной кислоты, 4 мл – 0,5 М ЭДТА в расчете на 1 л), при силе тока 20–80 мА.

Ширину ячеек и размер геля во всех случаях подбирали в зависимости от условий эксперимента. К пробам в качестве антиконвекционной жидкости добавляли глицерин до 25%, а в качестве маркеров использовали красители бромфеноловый синий и ксиленианол.

По окончании электрофореза гель окрашивали в течение 30 мин в электродном буфере, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Гель фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете (на приборе Alphamager, USA).

Результаты и их обсуждение

В течение нескольких лет проводятся испытания нового биопрепарата комплексного действия «Замин-М», который составлен на основе солеустойчивых штаммов *B. subtilis* СКБ-309, *B. megaterium* СКБ-310, *P. stutzeri* СКБ-308. Изучение солеустойчивости штаммов было проведено путем выращивания изолятов при концентрации 3–5 и 7% NaCl в питательной среде LB. Штаммы, которые образовали колонии в присутствии 7% NaCl отбирали как солеустойчивые и использовали как основу биопрепарата. Солеустойчивые штаммы в комплексе проявили высокую активность в росте и развитии растений хлопчатника в условиях хлористого засоления. Однако, механизм влияния микроорганизмов на растения, участвующих в составе вышеназванного биопрепарата, остается не выясненным.

В настоящее время в научной литературе широко обсуждается вопрос о механизмах солеустойчивости ризосферных микроорганизмов и их влияние на растения [8, 10, 11, 12]. По данным литературы ризосферные бактерии, стимулирующие рост растений, синтезируют фермент, способный регулировать уровень этилена в растении. Этот фермент, 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат – деаминаза, гидролизует 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат – непосредственный предшественник этилена при биосинтезе в растениях [5] и играет важную роль во взаимодействии растения и микроорганизмов [11].

На сегодняшний день предложена модель регуляции транскрипции гена, кодирующего АЦК-деаминазу. Выделено и охарактеризовано как минимум 6 генов, которые кодируют АЦК-деаминазу у различных микроорганизмов. Большая часть из этих генов имеет структурные различия [11]. Существуют



предположения, что бактериальные *acdS*-гены могут передаваться путем горизонтального переноса, т.е. с помощью плазмид широкого круга хозяев [5, 10, 11]. Итак, исходя из того что гены, ответственные за солеустойчивость ризобактерий, могут располагаться во внехромосомных элементах бактерий, наши исследования были направлены на изучение плазмидного состава солеустойчивых штаммов микроорганизмов.

С целью получения «мини-препаратов» плазмидной ДНК была использована щелочная денатурация, в результате которой обнаружены несколько крупных плазмид. Электрофоретическим анализом (рис.) были выявлены плазмидные ДНК размерами 48,5; 30 и 13,3 т.п.н. у *B. subtilis* СКБ-309, 23,1 т.п.н. у *B. megaterium* СКБ-310 и 55 т.п.н. у *P. stutzeri* СКБ-308 (рис.).

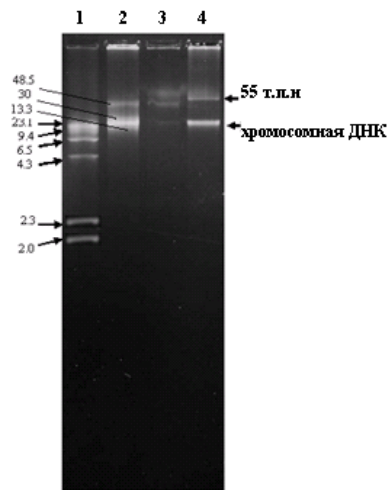


Рис. Электрофореграмма тотальной ДНК бактерий в 1% агарозном геле.

1 – Маркер молекулярной массы ДНК (ДНК фага λ , расщепленный ферментом рестрикции HindIII); 2 – *Bacillus subtilis* СКБ-309; 3 – *Bacillus megaterium* СКБ-310; 4 – *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308.

Fig. The electrophoregram of bacterial total DNA in 1% agarose gel.

1 – marker of molecular DNA mass (DNA phage λ , decomposed by restriction HindIII enzyme); 2 – *Bacillus subtilis* СКБ-309; 3 – *Bacillus megaterium* СКБ-310; 4 – *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308.

Сравнительный электрофоретический анализ показал, что изученные бактерии содержат плазмидные ДНК размерами 48,5, 30 и 13,3 т.п.н. – *B. subtilis* СКБ-309, 23,1 т.п.н. – *B. megaterium* СКБ-310 и 55 т.п.н. – *P. stutzeri* СКБ-308 (рис.). Все изученные штаммы микроорганизмов проявляют высокую отзывчивость колонизацию, антагонистическую активность к фитопатогенам в условиях хлоридного стресса по сравнению с другими коллекционными штаммами [1].

Аналогичные данные встречаются в работах Zowadzki [13] при изучении плазмидных ДНК трех видов бактерий рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. licheniformis*), где были выявлены 18 плазмид из пустынных почв разных географических регионов. Размер выделенных плазмид варьировал от 6,9 до 16 т.п.н и две из них размером 8,5 до 7,5 т.п.н имели доминантные сайты генов солеустойчивости, которые возможно находятся в пределах 4470 и 4870 н.т. Hasnain и др. [9] при изучении солеустойчивых бактерий *Bacillus pumilus* были выделены и секвенированы две плазмиды *pSH1418* и *pSH1451*. Авторы предполагают, что продукты *orf4* и *orf5* (openreadingframes – *orf*) могут работать вместе, чтобы транспортировать молекулы, такие как аспарат ионы, что может способствовать осмоотолерантности бактерий.

На основе полученных результатов и анализа литературных данных можно сделать вывод, что устойчивость вышеуказанных штаммов к солевому стрессу, возможно, связана с наличием в них плазмид, содержащих гены солеустойчивости. Возможно, эти гены участвуют в транспорте аспаратат ионов, либо содержат *acdS*-гены, которые косвенно участвуют в осмотолерантности ризосферных бактерий.

S.S. Murodova, K.D. Davranov

National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek,
Vuzgorodok, Student street-4, 100174, Tashkent, Uzbekistan
e-mail: ssmuradova@rambler.ru, k_davranov@mail.ru

ANALYSIS OF DNA PLASMID COMPOSITION OF SALT TOLERANT STRAINS OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS

Summary

The aim. The object of researches was study and analysis of plasmids composition of salt tolerant bacteria *Bacillus subtilis* SKB-309, *Bacillus megaterium* SKB-310 and *Pseudomonas stutzeri* SKB-308 which are the part of "Zamin-M" preparation. The microbial composition «Zamin-M» on the basis of high-active and stable to stressful environmental conditions bacterial strains is successfully applied in agricultural practice of Uzbekistan. **Methods.** Bacteria which were the objects of researches are isolated from middle-saline soils and crops rhizosphere and selected by step screening of the strains growing in presence of 3–5 and 7% NaCl in growth medium and identified by Bergey. **Results.** As a result of electrophoretic analysis of plasmid DNA of salt-tolerant microbial strains by Birnboim and Dolli method the plasmid DNA with dimensions 48.5, 30 and 13.3 kb (kilobase) at *B. subtilis*, 23.1 kb at *B. megaterium* and 55 kb at *P. stutzeri* SKB-308 have been revealed. It is supposed that these plasmids can keep the genes of bacterial resistance to adverse environmental conditions, including high content (7%) of Cl⁻ toxic ions.

Key words: bacteria, plasmid DNA, "Zamin-M" microbial composition, electrophoretic analysis.

С.С. Муродова, К.Д. Давранов

Національний університет Узбекистану імені Мирзо Улугбека,
вул. Студентська, 4, 100174, Ташкент, Узбекистан,
e-mail: ssmuradova@rambler.ru, k_davranov@mail.ru

АНАЛІЗ ПЛАЗМІДНОГО СКЛАДУ ДНК СОЛЕСТІЙКИХ ШТАМІВ РИЗОСФЕРНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Реферат

Метою досліджень було вивчення складу плазмід солестійких бактерій *Bacillus subtilis* СКБ-309, *Bacillus megaterium* СКБ-310 і *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308, що входять до складу препарату «Замін-М». Мікробна композиція «Замін-М» на основі високоактивних та стійких до стресових умов зовнішнього середовища бактеріальних штамів, з успіхом застосовується в сільськогосподарській практиці Узбекистану. **Методи.** Бактерії, що слугували об'єктами досліджень,



вилучені з середньозасолених ґрунтів та ризосфери сільськогосподарських культур і відселекціоновані шляхом посходинкового скринінгу штамів, що ростуть у присутності 3–5 і 7% NaCl в живильному середовищі та ідентифіковані по Bergey. **Результати.** В результаті електрофоретичного аналізу плазмідної ДНК солестійких штамів мікроорганізмів за методом Birnboim і Dolli були виявлені плазмідні ДНК розміром 48,5; 30 і 13,3 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) у *B. subtilis*, 23,1 т.п.н. у *B. megaterium* та 55 т.п.н. у *P. stutzeri* СКБ-308. Припускається, що ці плазмиди можуть нести гени стійких бактерій до несприятливих умов середовища, в тому числі до високого вмісту (7%) токсичних іонів Cl⁻.

Ключові слова: бактерії, плазмідна ДНК, мікробна композиція «Замін-М», електрофоретичний аналіз.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Муродова С.С., Гафурова Л.А., Файзуллаев Б.А., Махкамова Д.Ю., Тиллаев Э.Т., Сайдалиев Б. Новый полифункциональный биопрепарат для повышения биологической активности засоленных почв // Вестник НУУз. – 2013. – № 4/2, – С. 201–207.
2. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
3. Туток М.А. Плазмиды грамположительных бактерий. — Мн.: БГУ, 2004. – 130 с.
4. Муродова С.С., Давранов К.Д. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике // Biotechnologia Acta, V. 7, № 6, 2014. – С. 92–101.
5. Шульга А.О., Мельникова А.А., Кысса Ю.И., Лагодич А.В., Храмова Е.А. Клонирование *acds*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 // Труды БГУ. – 2013. № 8. – С. 196–201.
6. Berge's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition / Eds. Kreig N.R., Holt J.G. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., 1994.—787 p.
7. Birnboim H.C., Dolly J.A. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucleic Acids Res. – 1979. 24;7(6): P. 1513–1523.
8. Glick B.R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment / B.R. Glick // Biotechnol. Adv. – 2003. – V. 21. – P. 383–393.
9. Hasnain S., Thomas C.M. Two related rolling circle replication plasmids from salt-tolerant bacteria // Plasmid. – 1996. № 36. – P. 191–199.
10. Hontzeas N. et al. Dobritsa A.P., Dobritsa S.V., Tanyashin V.L. Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var Q.-B. Cells // Mol. Gen. Genet. – 1978. – № 164. – P. 195–204.
11. Hontzeas N. et al. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – V. 71. – P. 7556–7558.
12. Principles of Plant-Microbe Interactions // Lugtenberg (ed). Switzerland.: Springer international Publishing, 2015. – 450 p.
13. Zawadzki P., Riley M.A., and Cohen F.M. Homology among nearly all plasmids infecting three *Bacillus* species // J. Bacteriol. – 1995. – № 178.–P. 191–198.

Стаття надійшла до редакції 11.06.2015 р.



УДК:579.61:615.28

Г.К. Палій¹, О.А. Назарчук¹, В.В. Бобир², О.О. Гончар¹, Т.Л. Гридiна³,
Д.В. Палій¹, I.В. Коваленко¹, В.М. Буркот¹

¹Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України,
вул. Пирогова 56, Вінниця, 21018, Україна,
тел.: (0432) 570379, e-mail: admission@vnmnu.edu.ua

²Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, бульвар Т. Шевченка,
13, Київ, 01601, Україна, e-mail:nmu@nmu.ua

³Одеський національний медичний університет МОЗ України, Валiховський провулок, 2, Одеса,
65082, Україна, e-mail:office@odmu.edu.ua

ОЦІНКА АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ТА ПРОТИГРИБКОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СУЧАСНИХ АНТИСЕПТИКІВ

Мета. Оцінка антимікробних властивостей декаметоксину, етонію, декасану, мірамістину, хлоргексидину біглюконату щодо бактерії та *Candida albicans*.

Методи. Досліджували антисептики декаметоксин (ДКМ), декасан (ДС), мірамістин (МР), хлоргексидину біглюконат (ХГ), етоній (ЕТ). Визначали вплив ДКМ, ЕТ на інфузорії *Colpoda steinii*, культуру клітин хоріоналантоїсної оболонки (ХАО) курячих ембріонів з допомогою стандартних методів. Визначали антимікробну дію методом двократних серійних розведень ДКМ, ДС, МР, ХГ, ЕТ на клінічні антибіотикорезистентні штами *S. aureus* (n 65), *Enterococcus spp.* (n 23), *E. coli* (n 55), *P. aureginosa* (n 18), *A. baumannii* (n 46), *Enterobacter spp.* (n 10), *K. pneumoniae* (n 12), *Proteus spp.* (n 15) *C. albicans* (n 20). **Результати.** Доведено, що ДКМ проявляє токсичну дію на культури *Colpoda steinii*, культуру клітин ХАО в меншій дозі (до 25 мкг/мл), ніж етоній (до 125 мкг/мл) протягом 3 годин. Встановлено протимікробну дію ДС, МР, ХГ, ЕТ на *S. aureus*, *Enterococcus spp.* *S. aureus*. Мінімальні бактерицидні, концентрації (МБцК) ДС – 4,31±0,48 мкг/мл; МБцК ЕТ – 17,94±6,63 мкг/мл. *Enterococcus spp.* були чутливими до ДС (МБцК 4,45±0,38 мкг/мл), ХГ (МБцК 21,37±1,91 мкг/мл), ЕТ (21,37±1,71 мкг/мл). ДС діяв на *E. coli* (МБцК 9,43±0,49 мкг/мл). Штами *C. albicans* були більш стійкими до МР, ХГ, ЕТ в порівнянні з ДС. **Висновок.** Лікарський засіб декаметоксин (25 мкг/мл) та етоній (125 мкг/мл) не мають токсичної дії на *Colpoda steinii*, культуру клітин ХАО протягом 3 годин. ДС, МР, ХГ та ЕТ мають виражену протимікробну дію на антибіотикорезистентні штами грампозитивних бактерій, *C. albicans*. ДС, МР проявляють кращу протимікробну активність на антибіотикорезистентні штами бактерії в порівнянні з хлоргексидином, етонієм.

Ключові слова: антимікробна дія, декаметоксин, декасан, мірамістин, хлоргексидин, етоній.

© Г.К. Палій, О.А. Назарчук, В.В. Бобир, О.О. Гончар, Т.Л. Гридiна, Д.В. Палій, I.В. Коваленко, В.М. Буркот, 2015



Інфекційні захворювання становлять загрозу здоров'ю людей та є причиною смертності серед населення. Щорічно у світі реєструють близько 30% летальних випадків, що складає 14–17 млн. чоловік. За даними ВООЗ, високу смертність пов'язують із захворюваннями та ускладненнями, збудниками яких є бактерії, віруси, гриби та найпростіші. За даними CDC's National Nosocomial Infections Surveillance (США), європейських та вітчизняних джерел мікробний спектр збудників інфекційних ускладнень останні роки суттєво не змінився. Найчастішою причиною гнійної інфекції виступають *S. aureus* (5,5–83,7%), *S. epidermidis* (11,5 – 82,7%), *Streptococcus spp.* (3–7,4%), *E. coli* (1,8–19,4%), *Acinetobacter spp.* (9,3%), *P. aeruginosa* (1,3–8,1%) представники родини *Enterobacteriaceae* (24,5%) – *E. coli* (8%), *Enterobacter spp.* (7%), *Proteus mirabilis* (3%). Частка інших мікроорганізмів значно менша, наприклад: *A. calcoaceticus* (1,2%), *P. vulgaris* (0,6–7,8%), *P. mirabilis* (3,0%), *P. rettgeri* (1,2%), *K. oxytoca* (4,8%), *K. pneumonia* (1,2%), *Citrobacter spp.* (2,2–4,7%) *Enterobacter spp.* та ін. (1,2–13,8%) [5].

З цих позицій профілактика та лікування інфекційних захворювань залишається однією з важливих проблем сучасної медичної науки. Тривалий час для профілактики, лікування інфекційних ускладнень бактеріальної етіології успішно застосовували антибіотики. Проте, їх широке використання призвело до корінних змін в етіологічній структурі інфекційних ускладнень – зросла роль асоціацій грампозитивних і грамнегативних бактерій та грибів родини *Candida*, стійких до антибіотиків. Висока резистентність збудників інфекційних захворювань до антибіотиків стала головною причиною їх неефективного застосування і потребує внесення корективів у мікробіологічну технологію профілактики та лікування інфекційних захворювань [3].

Сучасний фармацевтичний ринок насичений десятками нових антимікробних препаратів, проте проблема пошуку активних хіміотерапевтичних засобів проти збудників вірусних інфекцій залишається актуальною. Недостатність арсеналу, токсичність існуючих лікарських препаратів, висока ймовірність формування резистентних форм збудників обґрунтовують доцільність розробки, застосування лікарських засобів. Особливу цінність набувають антисептики з широким спектром антибактеріальної, протигрибкової дії, ефективно діють на резистентні збудники інфекційних захворювань, що розкриває можливості їх багатовекторного застосування [1].

Мета. Оцінка антимікробних властивостей декаметоксину, етонію, декасану, мірамістину, хлоргексидину біглюконату щодо бактерій та дріжджів *Candida albicans*.

Матеріали і методи

Для дослідження в роботі використовували антисептичні лікарські засоби декаметоксин (ДКМ), декасан (ДС), мірамістин (МР), хлоргексидину біглюконат (ХГ), етоній (ЕТ), які дозволені МОЗ України для профілактики та лікування інфекційних захворювань [1].



У дослідженні проводили попередню оцінку токсичності декаметоксину та етонію шляхом біотестування на інфузоріях *Colpoda steinii* (препарат виробництва ООО “Відродження М”, м. Одеса). За допомогою даного методу визначали можливий рівень токсичності водночас як на клітинному, так і на організменному рівнях. Токсичність досліджуваних препаратів визначали на тканинній культурі ХАО 11–14-добових курячих ембріонів стандартним методом [4].

Цитотоксичність антисептиків визначали на культурах перещеплюваних клітин RK13 і Нер-2, первинно трипсинізованій культурі курячих фібробластів (ККФ). Токсичні концентрації (ТК) досліджуваних препаратів визначали на культурах клітин RK13 і Нер-2, що перещеплювались, а також на первинно трипсинізованій культурі ККФ, використовуючи не менше десяти рядків лунок у пластинці з культурою клітин для кожного розведення препаратів на поживному середовищі. Пластинки з культурою клітин інкубували при 37 °С з подачею 5% CO₂ протягом 5 днів. Дослідні та контрольні зразки переглядали щодня з метою виявлення наявності або відсутності цитопатичної дії (ЦПД) на клітини (зміни морфології клітин, їх округлення, зморщування; відторгнення від верхніх лунок клітин, що дегенерували). За токсичну концентрацію препарату приймали його найбільшу кількість, яка не спричиняла дегенерації клітин.

Досліджували антимікробну дію ДКМ, ДС, МР, ХГ, ЕТ на ріст культур умовнопатогенних бактерій; дріжджоподібних грибів роду *Candida*. Як тест-об’єкти використовували ізольовані від хворих з інфекційними ускладненнями різної локалізації штами *S. aureus* (n 65), *Enterococcus spp.* (n 23), *E. coli* (n 55), *P. aeruginosa* (n 18), *A. baumannii* (n 46), *Enterobacter spp.* (n 10), *K. pneumoniae* (n 12), *Proteus spp.* (n 15) *C. albicans* (n 20) з типовими морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями.

Клінічні штами *S. aureus* були стійкими до оксациліну (67,2%), амоксициліну/клавуланату (10,5%), цефтриаксону, (34,2%), цефоперазону/сульбактаму (34,2%), стрептомицину (41,07%), доксицикліну (50,0%), еритроміцину (63,2%), азитроміцину (37,5%), левофлоксацину (39,5%). Досліджувані штами *E. coli* володіли антибіотикорезистентними властивостями до цефтриаксону (48,5%), цефтазидиму (45,5%), гентаміцину (76,9%), амікацину (75%). *K. pneumoniae* мали стійкість до цефепіму (43,5%), гентаміцину (86,2%), меропенему (44,3%).

Резистентність штамів *A. baumannii* відмічали до цефоперазону (97,3%), цефтазидиму (93,6%), меропенему (61,1%), ципрофлоксацину (75,7%), левофлоксацину (83,3%), гатіфлоксацину (64,9%). У штамів *P. aeruginosa* також встановлено резистентність до амоксициліну/клавуланату (33,3%), піперациліну/тазобактаму (19%), цефтазидиму (86,7%), цефепіму (90%), гентаміцину (56%), амікацину (36%), меропенему (52,4%), іміпенему (81%), ципрофлоксацину (84,6%), левофлоксацину (82,6%), гатіфлоксацину (73,9%).

Оцінку чутливості мікроорганізмів до антисептиків визначали за показником мінімальної бактерицидної, фунгіцидної концентрацій (МБцК, МФцК), які визначали методом двократних серійних розведень препаратів [2].



Статистичний аналіз даних проводили за непараметричним критерієм знаків для пов'язаних вибірок та t-критерієм Стьюдента з використанням комп'ютерної програми Statistica 6.0.

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті визначення токсичності досліджуваних препаратів встановлено, що ДКМ був нетоксичним для культури *Colpoda steinii*, на культуру клітин ХАО в дозі нижчій за 25 мкг/мл, а етоній – нижчій за 125 мкг/мл. Відсутність токсичної дії ДКМ і етонію в цих дозах на *Colpoda steinii* спостерігали не менше трьох годин. Токсичні концентрації ДКМ визначали для РК13 – 7,75 мкг/мл, Нер-2 – 5 мкг/мл, ККФ – 4 мкг/мл. У етонію відповідні ТК для культур клітин РК13, Нер-2 становили 125 мкг/мл, а для ККФ – 35 мкг/мл. В результаті дослідження токсичності антисептиків на тканинній культурі ХАО 11–14-добових курячих ембріонів встановлено, що декаметоксин був нетоксичним у дозі меншій 30 мкг/мл, а етоній – в дозі меншій 125 мкг/мл.

Антимікробна дія досліджуваних антисептичних лікарських препаратів щодо полірезистентних клінічних штамів бактерій та *S. albicans* наведена в таблиці. Як видно з даних таблиці штами *S. aureus* виявилися високочутливими до декасану. Так, чутливість *S. aureus* до декасану проявлялася в присутності $4,31 \pm 0,48$ мкг/мл. Антистафілококова активність мірамістину поступалась декасану в 2,4 рази, ефективність хлоргексидину біглюконату була меншою в 3,3 рази, етонію в 4,16 разів. Встановлено високі антимікробні властивості досліджуваних антисептиків до *Enterococcus spp.*, з перевагою декасану. Бактерицидні властивості ДС перевищували протимікробну активність МР в 1,8 разів, ХГ та етонію – в 4,8 рази ($p < 0,001$) (табл. 1).

З високою достовірністю визначено суттєві переваги бактерицидної активності ДС (МБцК – $9,43 \pm 0,49$ мкг/мл) щодо ізолятів кишкової палички в порівнянні з іншими досліджуваними антисептичними засобами ($p < 0,001$). Встановлено, що клінічні штами *E. coli* були найменш чутливими до етонію (МБцК $64,75 \pm 4,72$ мкг/мл).

Дослідження протимікробних властивостей антисептичних лікарських засобів показало ефективність ДС та МР щодо *Enterobacter spp.* (МБцК – $18,75 \pm 2,08$ мкг/мл; $24,21 \pm 2,96$ мкг/мл, відповідно). ХГ та етоній поступалися даним антисептикам за бактерицидною активністю щодо клінічних штамів ентеробактерій.

Вищі бактерицидні концентрації антисептиків встановлено щодо клінічних штамів *Proteus spp.* Найбільш чутливими протеї були до дії лікарських засобів ДС (МБцК – $84,38 \pm 5,98$ мкг/м) та МР (МБцК – $90,63 \pm 5,04$ мкг/мл). Бактерицидну дію ХГ на *Proteus spp.* визначали в присутності $156,25 \pm 17,12$ мкг/мл. Антимікробна активність етонію щодо *Proteus spp.* була меншою за активність ДС в 2,9 разів ($p < 0,001$).



Таблиця

Мінімальні бактерицидні/фунгіцидні концентрації лікарських засобів
для тест-штамів, мкг/мл ($M \pm m$)

Table

Minimal bactericidal/fungicidal concentrations of remedies for test-strains,
mkg/ml ($M \pm m$)

Мікроорганізм (n)	декасан	мірамістин	хлоргексидину біглюконат	етоній
<i>S. aureus</i> (n 65)	4,31±0,48	10,50±1,02*	13,65±1,01*	17,94±6,63***
<i>Enterococcus spp.</i> (n 23)	4,45±0,38	8,14±0,34*	21,37±1,91*	21,37±1,71*
<i>E. coli</i> (n 55)	9,43±0,49	17,51±1,01*	21,49±1,57*	64,75±4,72*
<i>Enterobacter spp.</i> (n 10)	18,75±2,08	24,21±2,96*	32,03±4,11**	53,13±4,77*
<i>Proteus spp.</i> (n 15)	84,38±5,98	90,63±5,04†	156,25±17,12*	241,67±37,53*
<i>K. pneumoniae</i> (n 12)	20,83±1,78	24,08±2,63***	42,32±5,48*	83,97±9,77*
<i>A. baumannii</i> (n 46)	31,79±2,19	58,7±2,83*	73,34±5,93*	120,24±9,01*
<i>P. aeruginosa</i> (n 35)	80±4,2	92,86±3,0***	142,86±11,62*	410,71±23,24*
<i>C. albicans</i> (n 20)	13,82±0,88	21,05±2,09**	19,71±1,58**	20,52±2,19**

Примітка: * $p < 0,001$ – порівняно з декасаном; ** $p < 0,01$ – порівняно з декасаном; *** $p < 0,05$ – порівняно з декасаном; † $p > 0,05$ – порівняно з декасаном.

Чутливість клінічних штамів *K. pneumoniae*, які спричиняли інфекційні ускладнення у пацієнтів, визначали до всіх антисептиків. Найвищу протимікробну дію проявляли ДС, МР, ХГ. В етонію встановлено бактерицидну дію на штами *K. pneumoniae* в присутності 83,97±9,77 мкг/мл. Така активність ЕТ була в 4 рази меншою, ніж у ДС та в 3,5 рази меншою, ніж у МР – ($p < 0,001$).

В результаті проведеного дослідження встановлено, що серед умовнопатогенних мікроорганізмів значно меншу чутливість до антисептичних засобів мали клінічні штами *P. aeruginosa*. В експерименті встановлено, що для досягнення бактерицидної дії необхідні значно вищі концентрації антисептиків. Ефективну антипсевдомонадну дію встановили у ДС (МБцК – 80±4,2 мкг/мл), МР (МБцК – 92,86±3,0 мкг/мл). Нижчу антимікробну дію на *P. aeruginosa* встановили у ХГ (МБцК – 142,86±11,62 мкг/мл). Етоній виявився малоефективним щодо *P. aeruginosa*. Його бактерицидна дія була нижчою в 5 разів ніж у ДС та МР ($p < 0,001$).



Вивчення протимікробної активності антисептиків щодо клінічних штамів *C. albicans* показали потужні фунгіцидні властивості ДС. Була встановлена фунгіцидна дія на *C. albicans* у ХГ (МФцК $19,71 \pm 1,58$ мкг/мл), МР (МФцК $21,05 \pm 2,09$ мкг/мл) та етонію (МФцК $20,52 \pm 2,19$ мкг/мл).

Дослідженнями встановлено, що антисептичний лікарський засіб декаметоксин не діє на культури *Colpoda steinii* та клітини хоріоантаної оболонки в дозі нижчій за 25 мкг/мл, а етоній – нижчій за 125 мкг/мл протягом трьох годин. Оцінка протимікробних властивостей антисептиків засвідчує, що декасан, мірамістин, хлоргексидину біглюконат та етоній мають ефективну дію на антибіотикорезистентні штами *S. aureus*, *Enterococcus spp.*. Декасан проявляє високу антимікробну дію на *E. coli* порівняно з мірамістином, хлоргексидину біглюконатом та етонієм ($p < 0,001$). Декасан, мірамістин проявляють ефективний бактерицидний вплив на антибіотикорезистентні штами *Enterobacter spp.*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.* та переважають за активністю щодо даних збудників хлоргексидину біглюконат в 1,5–3,8 рази ($p < 0,01$), етоній в 2,8–5 разів ($p < 0,001$). Мірамістин, хлоргексидин, етоній поступаються в два рази фунгіцидною активністю щодо клінічних ізолятів *Candida albicans* порівняно з декасану

G.K. Paliy¹, O.A. Nazarchuk¹, V.V. Bobyr², O.O. Gonchar¹, T.L. Grydina³,
D.V. Paliy¹, I.V. Kovalenko¹, V.M. Burcot¹

¹Vinnitsya National Pirogov Memorial Medical University Ministry of Health of Ukraine,
56, Pirogov Str., Vinnitsya, 21018, tel.: (0432) 57 03 79,
e-mail: admission@vnmnu.edu.ua

²Bogomolets National Medical University Ministry of Health of Ukraine, 13, Shevchenko boulevard, Kyiv,
01601, e-mail: nmu@nmu.ua

³Odesa National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, 2, Valikhovskii lane, Odesa,
65082, e-mail: office@odmu.edu.ua

ESTIMATION OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL QUALITIES OF MODERN ANTISEPTICS

Summary

Aim. Estimation of antimicrobial characteristics of decamethoxin, aethonium, decasan, miramistin, chlohexidine digluconate against bacteria and *Candida albicans*.
Methods. There were studied such antiseptics as decamethoxin (DCM), aethonium (AET), decasan (DC), miramistin (MR), chlohexidine digluconate (CHG). The influence of DCM, AET on infusorium *Colpoda steinii*, cultures of cells of chorionic allantois membrane (CAM) of chick's embryo was studied by means of standard methods. Antimicrobial activity of DCM, DC, MR, CHG, AET against clinical strains of *S. aureus* (n 65), *Enterococcus spp.* (n 23), *E. coli* (n 55), *P. aeruginosa* (n 18), *A. baumannii* (n 46), *Enterobacter spp.* (n 10), *K. pneumoniae* (n 12), *Proteus spp.* (n 15) *C. albicans* (n 20) was determined by means of serial dilution method. **Results.** It was proved, that DCM after 3 hour of exposition had toxic action on *Colpoda steinii* culture and culture of CAM cells in lower dose (less than 25 mkg/ml), than AET (less than 125 mkg/kg). Antimicrobial activity of DC, MR, CHG, AET was found against *S. aureus*, *Enterococcus spp.* *S. aureus*. Minimal bactericidal concentrations (MBcC) of



DC were above 4.31 ± 0.48 mkg/ml, MBcC of AET – 17.94 ± 6.63 mkg/ml. *Enterococcus spp.* were found to be sensitive to DC (MBcC 4.45 ± 0.38 mkg/ml), CHG – (MBcC 21.37 ± 1.91 mkg/ml). DC was active against *E. coli* (MBcC 9.43 ± 0.49 mkg/ml). Clinical strains of *C. albicans* were more resistant to MR, CHG, AET comparatively to DC. **Conclusion.** Decamethoxin remedy (25 mkg/ml) and aethonium (125 mkg/ml) did not have any toxic action on *Colpoda steinii*, culture and culture of CAM cells for 3 hours of exposition. DC, MR, CHG and AET have strong antimicrobial activity against antibiotic-resistant strains of Gram-positive bacteria, *C. albicans*. DC, MR have better antimicrobial activity against antibiotic-resistant strains of bacteria in comparison of chlorhexidine, aethonium.

Key words: antiseptics, microorganisms, decamethoxin, decasan, miramistin, chlorhexidine, eathonium.

Г.К. Палий¹, А.А. Назарчук¹, В.В. Бобыр², О.О. Гончар¹, Т.Л. Гридина³,
Д.В. Палий¹, И.В. Коваленко¹, В.М. Буркот¹

¹Винницкий национальный медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ Украины,
ул. Пирогова, 56, Винница, 21018, Украина,
тел.: (0432) 57 03 79, e-mail: admission@vnmu.edu.ua

²Национальный медицинский университет им. А.А. Богомольца МЗ Украины,
бульвар Т. Шевченка, 13, Киев, 01601, Украина, e-mail: nmu@nmu.ua

³Одесский национальный медицинский университет МЗ Украины, Валиховский переулок, 2,
Одесса, 65082, Украина, e-mail: office@odmu.edu.ua

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ И ПРОТВОГРИБКОВЫХ СВОЙСТВ СОВРЕМЕННЫХ АНТИСЕПТИКОВ

Реферат

Цель. Оценка антимикробных свойств декаметоксина, этония, декасана, мирамистина, хлоргексидина биглюконата в отношении бактерий и *Candida albicans*.

Методы. Исследовали антисептики декаметоксин (ДКМ), декасан (ДС), мирамистин (МР), хлоргексидина биглюконат (ХГ), этоний (ЕТ). Определяли влияние ДКМ, ЕТ на инфузорию *Colpoda steinii*, культуру клеток хориоалантоисной оболочки (ХАО) куриных эмбрионов при помощи стандартных методов. Определяли антимикробное действие методом двукратных серийных разведений ДКМ, ДС, МР, ХГ, ЕТ на клинические антибиотикорезистентные штаммы *S. aureus* (n 65), *Enterococcus spp.* (n 23), *E. coli* (n 55), *P. aureginosa* (n 18), *A. baumannii* (n 46), *Enterobacter spp.* (n 10), *K. pneumoniae* (n 12), *Proteus spp.* (n 15) *C. albicans* (n 20). **Результаты.** Доказано, что ДКМ проявлял токсическое действие на культуры *Colpoda steinii*, культуру клеток ХАО в меньшей дозе (до 25 мкг/мл), чем этоний (до 125 мкг/мл) на протяжении 3 часов. Установлено противомикробное действие ДС, МР, ХГ, ЕТ на *S. aureus*, *Enterococcus spp.* *S. aureus*. Минимальные бактерицидные концентрации (МБцК) ДС – $4,31 \pm 0,48$ мкг/мл; МБцК ЕТ – $17,94 \pm 6,63$ мкг/мл. *Enterococcus spp.* были чувствительны к ДС (МБцК $4,45 \pm 0,38$ мкг/мл), ХГ (МБцК $21,37 \pm 1,91$ мкг/мл), ЕТ ($21,37 \pm 1,71$ мкг/мл). ДС действовал на *E. coli* (МБцК $9,43 \pm 0,49$ мкг/мл). Штаммы *C. albicans* были более устойчивыми к МР, ХГ, ЕТ по сравнению с ДС. **Вывод.** Лекарственные средства декаметоксин (25 мкг/мл) и этоний (125 мкг/мл) не имеют токсического действия на *Colpoda steinii*, культуру клеток ХАО на протяжении 3 часов. ДС, МР, ХГ и ЕТ имеют



*выраженное противомикробное действие на антибиотикорезистентные штаммы грамположительных бактерий, *S. albicans*. ДС, МР проявляют лучшую противомикробную активность на антибиотикорезистентные штаммы бактерий по сравнению с хлоргексидином, этонием.*

Ключевые слова: микроорганизмы, декаметоксин, декасан, мирамистин, хлоргексидин, этоний.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Машиковский М.Д.* Лекарственные средства. 15 издание, переработанное и дополненное – М.: Новая волна. Издатель Умеренков, 2007. – 953 с.
2. *Некрасова Л.С., Свита В.М., Глушкевич Т.Г., [та ін.]*. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки МВ 9.9.5 – 143. – К. –2007. –74 с.
3. *Палій Г.К., Ковальчук В.П., Деркач Н.М.* [та ін.] Обґрунтування ефективності антисептичного препарату декасан в лікуванні хворих на гнійно-запальні захворювання // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2010. – № 1–2(23). – С. 78–82.
4. *Патент №15629 А Україна, МПК (2006) G01N 33/15, C12Q 1/18.* «Спосіб оцінки ступеня цитотоксичності біологічно активних сполук та фармакологічних препаратів» / Лозицький В.П., Григорашева І.М., Федчук А.С., Бощенко Ю.А., Позднякова Л.І., Славіна Н.Г., Віноходов Д.О., Полежаєв Ф.І. Заявка №u200512542 від 26.12.2005. Опубл. 17.07.2006, Бюл.№ 7.
5. *Хохлова В.Н., Карелин А.А., Белоцерковский М.В.* [и др.]. Анализ спектра бактериальных патогенов, выделенных у пациентов с осложненными инфекциями кожи и мягких тканей, предположительно вызванными грамположительной или смешанной флорой, в странах Центральной и Восточной Европы // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – Т. 56, № 5 – 6. – С. 19–29.

Стаття надійшла до редакції 09.10.2015 р.



Шановні автори!

До правил оформлення рукописів статей внесено зміни, які будуть діяти з 2016 року. До розгляду редколегія буде приймати рукописи оформлені належним чином за вимогами журналу.

Внесення змін до оформлення списку використаних джерел продиктовано вимогами міжнародних наукометричних баз, для ідентифікації авторів, визначення індекса цитування авторів.

«ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ»

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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



До друку приймаються рукописи (2 примірники) обсягом не більше 15 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів),
 - місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail).
 - Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
 - реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
 - ключові слова (не більше 5-ти);
- Реферат англійською мовою:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація
 - місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail).
 - Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
 - реферат із зазначенням новизни дослідження (200 – 250 слів);
 - ключові слова (не більше 5-ти);
- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

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

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

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);



– структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки.

– англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англійськомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;

– компактним (200-250 слів).

• ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

• **Розділ «Матеріали і методи»:**

– Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.

– Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.

– Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.

– Концентрацію розчинів подавати в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).

– Молекулярку масу (Мм) – Да (дальтони) або кДа.

– При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.

– Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммоль/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.

– Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).



– Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

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

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі Word, TIF, JPG. Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті. Підписи, а також пояснення, примітки до рисунків подаються мовою оригіналу та англійською мовою.

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

• Список використаної літератури

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

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

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

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

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

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

Назви статей наводять англійською мовою.

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



ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

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

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

Андрюк 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 Е // 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. «Мікробіол. журн.» – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-В92.



На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

Зразки посилянь літератури латиницею.*References*

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

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

Статті в журналах:

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

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

Книги:

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

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

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

Матеріали з їздів, конференцій:

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

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

Дисертаційні роботи:

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



Збірники:

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

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

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

Патенти, заявки:

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

Статті з електронних журналів:

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

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

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

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

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

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

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



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

Верстка В.Г. Вітвицька

Підписано до друку 21.12.2015 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 6,55. Тираж 100 пр.
Зам. № 1296.

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