

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

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

№ 4(20)
2012

Одеса
2012

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

Л.Д. Варбанець (Київ, Україна), А.І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Ю.Л. Волянський (Харків, Україна), Б.М. Галкін (Одеса, Україна), П.І. Гвоздяк (Київ, Україна), С.П. Гудзь (Львів, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Ю.П. Зайцев (Одеса, Україна), Г.О. Іутинська (Київ, Україна), Л.В. Капрельянц (Одеса, Україна), О.А. Кіпріанова (Київ, Україна), Н.К. Коваленко (Київ, Україна), І.К. Курдиш (Київ, Україна), Б.П. Мацелюх (Київ, Україна), Б.Н. Мілкус (Одеса, Україна), Г.Г. Мінічева (Одеса, Україна), М. Немялтовський (Варшава, Польща), В.П. Патики (Київ, Україна), В.С. Підгорський (Київ, Україна), В.К. Позур (Київ, Україна), В.П. Поліщук (Київ, Україна), А.А. Сибірний (Львів, Україна), Ю.М. Сиволап (Одеса, Україна), І.Г. Скрипаль (Київ, Україна), М.Я. Співак (Київ, Україна), Ф.І. Товкач (Київ, Україна), В.М. Тоцький (Одеса, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна), І.С. Щербатенко (Київ, Україна)

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

Свідоцтво: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

Затверджено до друку Вченою радою

Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

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

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс

Редактори: Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: 723-28-39,

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 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

I.V. Dovgal (Kyiv, Ukraine), V.O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B.M. Galkin (Odesa, Ukraine), P.I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), S.P. Gudz (Lviv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G.O. Iutynska (Kyiv, Ukraine), L.V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), O.A. Kiprianova (Kyiv, Ukraine), N.K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I.K. Kurdish (Kyiv, Ukraine), B.P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), B.N. Milkus (Odesa, Ukraine), G.G. Minicheva (Odesa, Ukraine), M. Niemialtowsky (Warsaw, Poland), V.P. Patyka (Kyiv, Ukraine), V.S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine), V.P. Polishuk (Kyiv, Ukraine), V.K. Pozur (Kyiv, Ukraine), I.S. Sherbatenko (Kyiv, Ukraine), I.G. Skrypal (Kyiv, Ukraine), M.Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A.A. Sybirny (Lviv, Ukraine), Yu.M. Sivolap (Odesa, Ukraine), V.M. Totsky (Odesa, Ukraine), F.I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L.D. Varbanets (Kyiv, Ukraine), A.I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), Yu.L. Volyanskiy (Kharkiv, Ukraine), Yu.P. Zaytsev (Odesa, Ukraine)

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov
University, 2012

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ	
Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, С.М. Шульга РЕГУЛЮВАННЯ ТА ШЛЯХИ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ЛІЗИНУ	6
Е К С П Е Р И М Е Н Т А Л Ь Н І П Р А Ц І	
Ж.Ю. Сергеева, К.Д. Крилова, Н.В. Ліманська, Н.Ю. Васильєва, Ф.І. Товкач, В.О. Іваниця ВПЛИВ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ONU 87 ТА АВТОЛІЗАТУ БАКТЕРІЙ <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> ZM1 НА ІНФЕКЦІЙНІСТЬ ЗБУДНИКІВ М'ЯКОЇ ГНИЛІ.....	18
Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун, В.О. Шамрайчук, А.С. Бисов, В.П. Поліщук ВІРУСИ ПЕРЦЮ СОЛОДКОГО У АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ ТА НАСІННЄВОМУ МАТЕРІАЛІ.....	29
Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп, А.Є. Бухтіяров, О.М. Захарія, Г.В. Лісютин, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця ВИЛУЧЕННЯ МІДІ (II) ТА НІКЕЛЮ (II) ІЗ КОНЦЕНТРОВАНИХ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ГЛИНОЮ, ХІТОЗАНОМ ТА ІММОБІЛІЗОВАНИМИ БАКТЕРІЯМИ	36
С.С. Декіна, А.М. Овсепян, А.Г. Артеменко, І.І. Романовська, В.Є. Кузьмін ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ЛІЗОЦИМУ МЕТОДОМ QSAR АНАЛІЗУ	44
Н.Ю. Васильєва, Т.В. Гудзенко, М.М. Панченко, В.О. Іваниця ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ШТАМУ <i>BACILLUS</i> <i>THURINGIENSIS</i> ONU 15.....	52
К.Г. Древаль, М.І. Бойко ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТІВ ЕКЗОЦЕЛЮЛАЗ БАЗИДІОМІЦЕТІВ ТА НИЖЧИХ ГРИБІВ	64
В.А. Іваниця, А.Е. Бухтіяров, Г.В. Лісютин, А.Н. Захарія, Т.В. Гудзенко АККУМУЛЯЦІЯ ТЯЖЕЛИХ МЕТАЛЛОВ БАКТЕРІЯМИ РОДА <i>PSEUDOMONAS</i>	76
А.К. Велигодська, О.В. Федотов ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ КАРОТИНОЇДІВ У ДЕЯКИХ ВИДІВ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ.....	84
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	101

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

G.S. Andriiash, G.M. Zabolotna, S.M. Shulga REGULATION AND INTENSIFICATION WAYS OF LYSINE BIOSYNTHESIS.....	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

Zh.U. Sergeeva, K.D. Krylova, N.V. Limanska, N.U. Vasyleva, F.I. Tovkach, V.O. Ivanytsia INFLUENCE OF BACTERIA <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ONU-87 AND AUTOLYSATE OF BACTERIA <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> ZM1 ON THE SOFT ROT DISEASE INFECTIOUS PROCESS.....	18
T.O. Rudnieva, T.P. Shevchenko, V.O. Tsvigun, V.O. Shamraichuk, A.S. Bysov, V.P. Polischuk VIRUSES OF SWEET PEPPER AT AGROCENOSIS OF UKRAINE AND SEED MATERIAL.....	29
T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beljaeva, I.P. Konup, A.E. Buchtiarov, O.M. Zacharia, G.V. Lisyutin, O.G. Gorshkova, V.O. Ivanytsia EXTRACTION OF COPPER (II) AND NICKEL (II) FROM CONCENTRATED AQUEOUS SOLUTIONS OF CLAY, CHITOSAN AND IMMOBILIZED BACTERIA.....	36
S.S. Dekina, I.I. Romanovska, A.M. Ovsepyan, A.G. Artemenko, V.E. Kuzmin INVESTIGATION OF METAL IONS INFLUENCE ON LYSOZYME ACTIVITY BY THE QSAR ANALYSIS METHOD	44
N.Yu. Vasylieva, T.V. Gydzenko, M.M. Panchenko, V.O. Ivanytsia OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA OF STRAIN <i>BACILLUS</i> <i>THURINGIENSIS</i> ONU 15	52
K.G. Dreval, M.I. Boyko ENZYMATIC ACTIVITY OF CELLULASE BASIDIOMYCETES PREPARATIONS AND LOWER FUNGI.....	64
V.O. Ivanytsia, A.E. Bukhtiyarov, G.V. Lisyutin, O.M. Zacharya, T.V. Gudzenko ACCUMULATION OF HEAVY METALS BY BACTERIA OF GENUS <i>PSEUDOMONAS</i>	76
A.K. Veligodska, O.V. Fedotov THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF GENERAL CAROTENOID CONTENT IN SOME SPECIES OF BASIDIOMYCETES.....	84
INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	97

УДК 612, 398:547.965

Г.С. Андріяш, Г.М. Заболотна, С.М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,
вул. Осиповського, 2а, 04123, Київ, Україна, e-mail: Shulga5@i.ua

РЕГУЛЮВАННЯ ТА ШЛЯХИ ІНТЕНСИФІКАЦІЇ БІОСИНТЕЗУ ЛІЗИНУ

В огляді проаналізовано шляхи інтенсифікації мікробіологічного синтезу лізину, що використовується у виробництві кормів, у харчовій і фармацевтичній промисловості. Приведено біохімічну схему регулювання та синтезу лізину бактеріями через діамінопімелат. Показано, що підвищений синтез незамінних амінокислот у мікроорганізмів пов'язаний з певними мутаційними порушеннями регуляторного контролю біосинтезу. Відображено технологічні способи підвищення біосинтезу лізину. За рахунок зміни технологічних параметрів біосинтезу лізину досягав рівня 30–50 г/дм³, а штами-мутанти у поєднанні з біотехнологічними прийомами продукували 50–70 г/дм³ та забезпечували 40% конверсію субстрату до амінокислоти.

Ключові слова: ауксотрофність, біосинтез, інтенсифікація, лізин, продуцент.

Незамінна амінокислота лізин (α , ϵ -амінокапронова кислота) є одним із джерел для синтезу ацетил-Коензиму А (Ацетил-КоА), регуляторним чинником у метаболізмі інших амінокислот, яка не синтезується в організмі тварин. Лізин (Lys), при достатньому та своєчасному його надходженні в організм сприяє секреції травних ферментів, упереджує розвиток атеросклерозу, остеопорозу, покращує короткотермінову пам'ять [1].

Мікробіологічне виробництво амінокислот за об'ємом продукції займає 2-е місце в світі після виробництва антибіотиків. Потреби сільського господарства, харчової промисловості та медицини зумовлюють інтенсивний розвиток промислового виробництва лізину [2, 3], зростання виробництва лізину складає близько 10% на рік [3]. В Україні та СНД виробництво лізину відсутнє [1].



Біотехнології лізину постійно вдосконалюють [1, 2, 4], впроваджують нові продуктивні штами, отримані селекційними та генно-інженерними методами [2, 5–7].

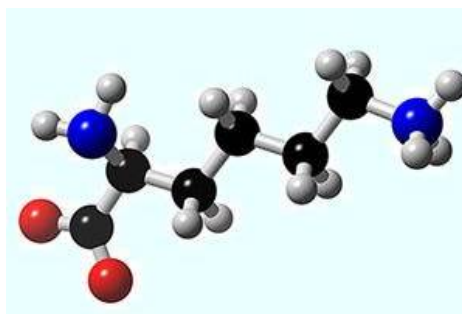
Бактерії, а саме корінебактерії та бревібактерії, синтезували лізин пентозофосфатним та гліколітичним шляхами (рис. 1) [2, 7]. За використання мічених атомів ^{13}C встановлено, що бактерії синтезували лізин через піруват, аспарагінову кислоту та α -діамінопімелінову кислоту (ДАП), а також метіонін, треонін та ізолейцин з аспартату. Встановлено, що на цьому метаболічному шляху діамінопімелатні будівельні блоки формували пептидоглікан для клітинної стінки бактерій [7,9].

У роботах [7, 18, 22, 24–29] показано, що біосинтез лізину це розгалужений ланцюг реакцій за участю понад 60 ферментів. Усі гени корінебактерій, що кодують ці ферменти, ізольовано та секвеновано [6, 7, 8, 17]. Для кожного гена визначені його місце і функція у метаболічному шляху та участь у транспортуванні лізину [10, 11, 12]. **Ключовими генами** у регуляції синтезу лізину визначені *pyc* (піруваткарбоксилаза), *lysC* (аспартаткіназа), *hom* (гомосериндегідрогеназа), *lysA* (діамінопімелат декарбоксилаза), *dapA* (дигідропіколінатсинтаза), *mgo* (малат:гуїнон оксидоредуктаза) [13-16].

Контроль біосинтезу лізину забезпечується за принципом зворотного зв'язку на рівні генів [16, 17], які відповідають за синтез відповідних ферментів (репресія) і на рівні самих ферментів, які в результаті надлишку амінокислот, що утворюються, можуть змінювати свою активність (ретроінгібування) [2, 18]. Даний механізм контролю виключав перевиробництво амінокислот, а також перешкоджає їх виділенню з клітин у навколишнє середовище [7, 16, 19, 20].

Шлях біосинтезу від аспарагінової кислоти до лізину у корінебактерій, на відміну від інших мікроорганізмів, має лише один контрольований кінцевим продуктом етап — фосфорилування аспарагінової кислоти (рис. 1). Реакція каталізується аспартаткіназою (АК), здатною у штамів дикого типу до полівалентного пригнічення лізином і треоніном [1,2].

Спільний попередник (напівальдегід аспарагінової кислоти) в синтезі лізину та треоніну витрачається у корінебактерій переважно на синтез треоніну (рис. 1). Ферментативна активність гомосериндегідрогенази (ГД) у 15 разів вища за активність дигідропіколінатсинтази, тому процес біосинтезу скеровується на виробництво треоніну. Біосинтез треоніну регулюється АК і ГД за принципом зворотного зв'язку та репресії [18, 21].



Модель молекули лізину
The model of lysine molecule

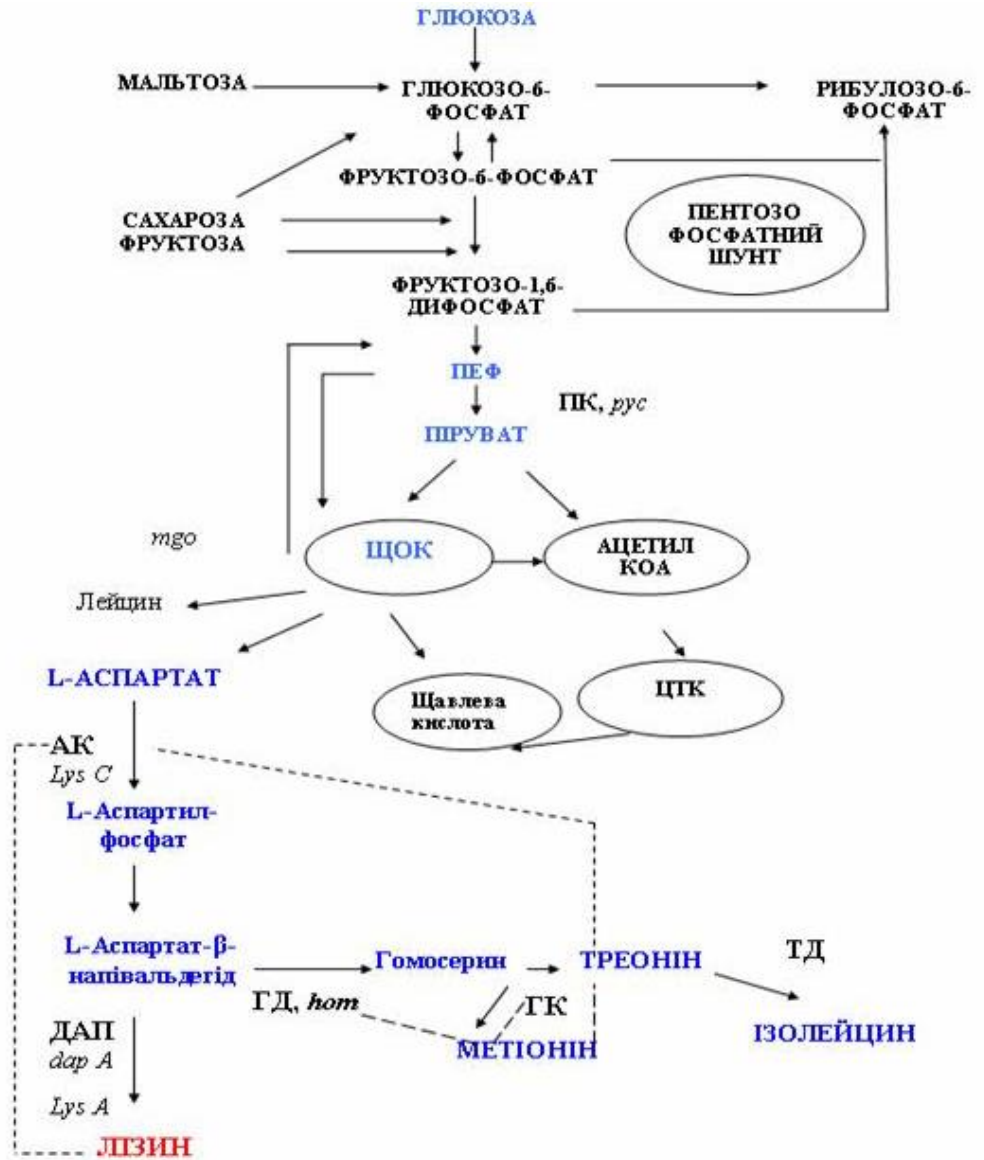


Рис. 1. Схема синтезу лізину через ДАП-шлях [7,9].

Примітка: — — — — репресія, — — — — ретроінгібування
 ЩОК — шавлевооцтова кислота, ДАП — діамінопімелат, ЦТК — цикл трикарбонових кислот, ГК — гомосеринкіназа, ТД — треоніндегідрогеназа,
 АК (аспарататкіназа) ген *lysC*, ПК (піруваткарбоксілаза) ген *rus*, ГД (гомосериндегідрогеназа) ген *hot*, ДАП (дігідропіколінатсинтаза) ген *dapA*,
 (малат:гуїнон оксидоредуктаза) ген *mgo*.

Fig. 1. Scheme of lysine synthesis through the DAP-way

Note: — — — — repression, — — — — retroinhibition
 ЩОК — oxaloacetic acid, ДАП — diaminopimelate, ЦТК — citric acid cycle, ГК — homoserine, ТД — threonine dehydrogenase, АК — (aspartatkinaza) gene *lysC*,
 ПК — (pyruvatecarboxylase) gene *rus*, ГД — (homoserine) gene *hot*, ДАП — (digidropikolinatsintaza) gene *dapA*, (malate: guinon oxidoreductase) gene *mgo*.



Біосинтез лізину у природних (диких) штамів розпочинається після насичення клітини треоніном, метіоніном та ізолейцином [2]. Для підвищення рівня синтезу лізину блокується їх синтез шляхом пригнічення активності ГД або гомосеринкінази (ГК). Для інтенсифікації синтезу лізину необхідно в першу чергу усунути пригнічення АК [1, 2, 7]. Цього досягали завдяки зниженню внутрішньоклітинного вмісту треоніну або ж генетичною зміною АК, що полягала в десенсибілізації до дії лізину та треоніну. Більшість промислових продуцентів це ауксотрофні або регуляторні мутанти. Вони не чутливі до впливу лізину та треоніну, і умовно розділені на основні класи мутантів, що продукують лізин [1]:

- ауксотрофи за гомосерином з відсутністю активності ГК;
- ауксотрофи за треоніном з відсутністю активності ГД;
- метіонін — чи треонінчутливі мутанти з низькою активністю ГД;
- резистентні мутанти до антиметаболітів лізину (найбільш вживаний S-(2-аміноетил)-L-цистеїн) або ж регуляторні, у яких АК нечутлива до ретроінгібування;

- ауксотрофи за лейцином;
- інші аналогорезистентні мутанти.

Найвищий рівень накопичення лізину (коефіцієнт конверсії глюкози складає 30-40%) мають ауксотрофи за гомосерином або лейцином [7, 16, 17].

Генетичне блокування ГД зупиняє у таких мутантів синтез треоніну та дозволяє, шляхом обмеження вмісту треоніну в середовищі, зняти пригнічення АК. За рахунок повного дефекту ГД спільні попередники лізину та треоніну витрачаються тільки на синтез лізину [18–21].

Ауксотрофи за треоніном та метіоніном, з генетичним блокуванням гомосеринкінази (ГК), продукують менше лізину та одночасно накопичують гомосерин із збереженням активності ГД [18].

Продуценти лізину *Brevibacterium flavum* мають знижену активність ГД (в 20–50 разів), проте це забезпечує потребу клітин у гомосерині. Особливий фенотип цих мутантів зумовлений властивостями ГД. Ріст продуцентів на мінімальному середовищі пригнічується у присутності високих концентрацій треоніну чи метіоніну внаслідок голодування за однією з цих амінокислот, що викликає пригнічення активності ГД треоніном чи репресією синтезу ГД метіоніном. Метіонін— чи треонінчутливі мутанти продукують лізин з концентрацією 20 г/дм³ на середовищах з глюкозою [1, 19].

Показано [13, 18–21], що аналогорезистентні мутанти синтезують лізин внаслідок генетичної зміни АК, яка стала не чутливою до дії лізину та треоніну. Аналогорезистентні мутанти, які мають тільки змінену АК продукують лізин з концентрацією 15 г/дм³ на середовищі з глюкозою. Мутанти стійкі до штучного пригнічувача аспартаткінази S-(2-аміноетил)-L-цистеїну (аналогу лізину), у яких вихід лізину досягає 33 г/дм³, синтезують фермент у 100 разів менш чутливий порівняно з вихідним штамом.

Регуляторні мутанти отримують за допомогою трансдукції, здійснюючи при цьому відбір спочатку окремих мутантів з розбалансованим механізмом регуляції. В результаті, у одного штаму послідовно закріплюється стійкість до кількох аналогів [5, 18, 20–22].

Характерною особливістю продуцентів є здатність до перетворення проміжної ланки лізину піперидин-2,6-дикарбоксилату до діамінопімелату двома шляхами. Перший шлях складають три реакції за участю сукциніл-амінокетопімелату, та сукциніл-амінопімелату, другий шлях — одна реакція з участю діамінопімелат дегідрогенази. Розподіл потоку за цими двома шляхами регулюється присутністю іонів амонію та біотину в середовищі, за допомогою ферментів, що кодували гени *mgo*, *lys*, *dap* [7, 9, 21].

«Потоком» від аспартату до лізину, керували аспартаткіназа (зворотний зв'язок) та дигідропіколінатсинтаза. Отримано мутанти з підвищеним синтезом лізину, у яких виявили посилену дію вказаних ферментів (гени *lys C* та/або *dapA*) [10, 13, 20, 21].

Підвищення біосинтезу лізину зумовлено ауксотрофними мутаціями, які блокують один з етапів синтезу треоніну та спрямовують процес на утворення лізину.

З метою розширення виробництва амінокислот та підвищення економічної ефективності технологій, розроблено та впроваджено способи, збільшення виходу цільової амінокислоти [2, 4]. Інтенсифікація біосинтезу здійснюється як використанням високопродуктивних штамів [2, 4, 5], так і біотехнологічними заходами (розширенням спектру використання субстратів, оптимізацією умов культивування, вдосконаленням масообмінних процесів та технологічного обладнання) [2, 11, 12, 23–25]. Шляхи інтенсифікації біосинтезу лізину представлено на рис. 2.

Сировиною для одержання лізину зазвичай є м'яса, сахароза, сульфат амонію, фосфати, кукурудзяний екстракт [2–4]. Штами-продуценти лізину використовують як субстрат окремі хімічні сполуки, природні полімери та відходи харчових і сільськогосподарських виробництв [2, 4, 18].

Використання в технології лізину ауксотрофних мутантів також пов'язано з інтенсифікацією біосинтезу. Це стосується, в першу чергу, складу поживних середовищ та умов культивування, які індивідуально підбирали для кожного нового штаму [4, 5, 19].

Для підвищення синтезу лізину суттєвим є процес забезпечення стабілізації основних параметрів культивування на стадії ферментації, оскільки вихід цільової амінокислоти залежить від температури середовища, інтенсивності аерації, тривалості ферментації, дози та віку інокуляту [2, 4, 18], а також від наявності біологічно активних речовин (БАР) у середовищі культивування штамів-продуцентів [2, 4].

Окрім джерел вуглецю, азоту та фосфору у середовище вносили як ростовий фактор та джерело БАР кукурудзяний екстракт (1,2–1,5% за сухою речовиною). Дослідження [18, 21] показали, що за наявності в се-



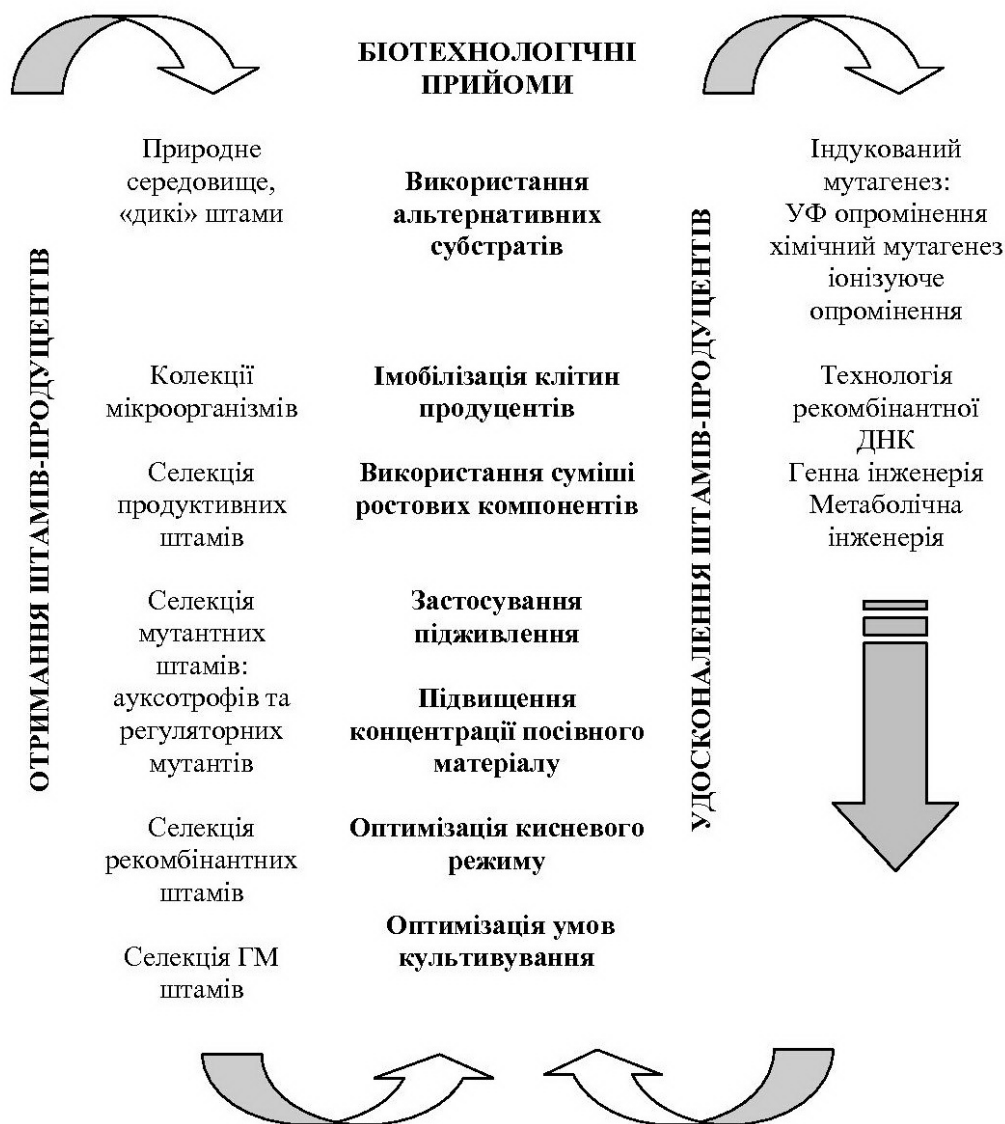


Рис.2. Шляхи інтенсифікації біосинтезу лізину

Fig.2. The ways to intensify the biosynthesis of lysine

редовищі метіоніну, треоніну та біотину з концентрацією 15–20 мкг/дм³, штам-продуцент синтезував лізин. При зменшенні концентрації біотину (7–13 мкг/дм³) у культуральній рідині накопичувалась глютамінова кислота. При зниженні вмісту біотину до 2,5 мг — утворювалась молочна кислота.

Оптимальним співвідношенням вуглецю та азоту в середовищі було 11:1, при збільшенні частки вуглецю (зсув вліво) вихід лізину знижувався, а при зменшенні частки азоту (зсув вправо) — накопичувався аланін.

Рівень аерації (повітря/середовище) за хвилину складав 1:1 (v/v). При зменшенні аерації утворювалась молочна кислота [22].

На першу добу ферментації за періодичних умов продуценти використовували до 25% цукрів і при цьому накопичували біомасу. Далі, на тлі зниження швидкості росту, клітини активно синтезували лізин. Для стабілізації рН періодично проводили титрування 25%-м розчином аміаку. При додатковому дробному внесенні цукру та азоту (підживлення) отримували підвищений вихід лізину. Такими технологічними заходами досягали кінцевих концентрацій лізину 40 г/дм³, а залишкова концентрація цукру складала 0,5–1,0 г/дм³ [19].

Одним із способів підвищення синтезу лізину є застосування підживлення (внесення додатково меляси) в процесі періодичної ферментації штаму *Brevibacterium sp.* та збільшення дози посівного матеріалу [2, 18].

У промисловому виробництві лізину відходи цукрового і крохмалепатокового виробництв було замінено на синтетичну оцтову кислоту [18]. В зв'язку з токсичністю ацетату для продуцента необхідно було поступове надходження ацетату у культуральну рідину, при цьому концентрація його в середовищі не повинна була перевищувати 2%. Додаткове внесення цукру (1%) у ферментаційне середовище підвищувало вихід лізину на 30–50%, коефіцієнт конверсії ацетату складав 27%. Концентрація лізину при цьому досягала 40–50 г/дм³ [18,19].

Мутантні штами *B. flavum*, здатні на ацетатному середовищі забезпечити вихід лізину до 73 г/дм³ [18]. За однакових параметрів культивування одержано вдвічі більше лізину при використанні оцтової кислоти, ніж при використанні меляси [19].

Підвищення концентрації лізину у КР (до 16,6 г/дм³) відмічено у штаму-продуценту *B. flavum*, (ауксотроф за гомосерином, стійкий до дії S-(2-аміноетил)-L цистеїну) при внесенні у середовище 2% диметилсульфоксиду. Інтенсифікація синтезу у цього мутантного штаму відмічена вже через 28 годин після початку ферментації [26]. Для підвищення синтезу використовували інтенсивне перемішування або збагачене киснем повітря [27].

Підвищення концентрації лізину до 58 г/дм³ отримано при культивуванні мутантного штаму, резистентного до S-(2-аміноетил)-L-цистеїну, залежного від гомосерину і лейцину та чутливого до 2-фторпірувату натрію [18].

Використання мутантів *Corynebacterium glutamicum 9366–AEC/100*, гомосеринзалежних і стійких до S-(2-аміноетил)-L-цистеїну, гідроксамату лізину дає вихід лізину в кількості 35 г/дм³ [5, 23, 24].

Штами-продуценти *Brevibacterium sp.*, іммобілізовані на кульках з гелю альгінату на середовищі з глюкозою протягом 120 годин синтезували лізин у концентрації 60 г/дм³ [28].



Мутантний штам *Brevibacterium sp.* 90 накопичував 65 г/дм³ лізину за 72 години культивування в лабораторних умовах та до 56 г/дм³ за 60 годин в промислових умовах. Конверсія цукру складала 45–49%. [18].

Максимальний рівень синтезу лізину досягнуто за умов безперервного культивування мутантного штаму *Corynebacterium glutamicum* В–6 (до 105 г/дм³) [29].

З метою інтенсифікації біосинтезу лізину розроблено генно-інженерні методи отримання надпродуцентів амінокислот з використанням *E. coli* [7, 30–33]. Такі надпродуценти за промислових умов виявилися не стійкими і не давали підвищеного виходу цільових амінокислот [2, 18, 19].

Таким чином, визначення метаболічних шляхів, шляхів регулювання біосинтезу [34], оптимальних параметрів культивування [2, 4, 35–37], уможливають інтенсифікацію мікробіологічного синтезу лізину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1 Андріяш Г.С., Заболотна Г.М., Шульга С.М. Ауксотрофність продуцентів лізину *Brevibacterium sp.* // К.: Біотехнологія. — 2012. — том 4, № 1 — С. 70–77.

2 Пирог Т.П., Ігнатова О.А. Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.

3. <http://www.biotechnolog.ru>.

4. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка. — 2010. — 328 с.

5. A. Haleem Shah, Hameed A., Saeed ur Rehman, A. Hamid Jan Nutritional and Mutational Aspects of Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum* Auxotrophs // Pakistan J. Zool. — 2012. — V. 44, № 1 — P. 141–149.

6. Ikeda M., Ohnishi J, Hayashi M., Mitsushashi S. A genome based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* for efficient L-lysine production // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2006. — V. 33. № 7 — P. 610–615.

7. Koffas Mattheos, Stephanopoulos Gregory Strain improvement by metabolic engineering: lysine production as a case study for systems biology // Current Opinion in Biotechnology.— 2005.— 16. — P. 361–366.

8. Ohnishi J, Mitsushashi S, Hayashi M, Ando S, Yokoi H, Ochiai K, Ikeda M A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine— producing mutant // Appl Microbiol Biotechnol. —2002.— №58. — P. 217–223.

9. Sindelar Georg, Wendisch Volker F. Improving lysine production by *Corynebacterium glutamicum* through DNA microarray-based identification of novel target genes //Appl Microbiol Biotechnol. — 2007. — № 76. — P. 677–689.



10. Eggeling L., Oberle S., Sahm H. Improved l-lysine yield with *Corynebacterium glutamicum* : use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation // Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 1998. — 49. — С. 24–30.
11. Abdul Haleem Shah, Abdul Jabbar Khan Direct Fermentative Production of Lysine // J. Chem. Soc. Pak. — 2008. — V. 30, № 1.— P. 158–164.
12. Savas Anastassiadis L-Lysine Fermentation // Recent Patent on Biotechnology. — 2007.— №1. — P. 11–24.
13. Hartmann Michael, Tauch Andreas, Eggeling Lothar, Bathe Brigitte, Mockel Bettina, Puhler Alfred, Kalinowski Jorn Identification and characterization of the last two unknown genes, *dapC* and *dapF*, in the succinylase branch of the L-lysine biosynthesis of *Corynebacterium glutamicum* // Journal of Biotechnology. — 2003. — V. 104.— P. 199–211.
14. Hayashi M, Mizoguchi H, Ohnishi J, Mitsuhashi S, Yonetani Y, Hashimoto S, Ikeda M. A *leuC* mutation leading to increased L-lysine production and rel-independent global expression changes in *Corynebacterium glutamicum* // Appl Microbiol Biotechnol. — 2006. — 72(4), № 10. — P. 783–789.
15. Ohnishi J, Katahira R, Mitsuhashi S, Kakita S, Ikeda M. A novel *gnd* mutation leading to increased L-lysine production in *Corynebacterium glutamicum* // FEMS Microbiol Lett. 242.— 2005. — V. 1, № 15. — P. 265–274.
16. Verte's Alain A., Inui Masayuki, Yukawa Hideaki Manipulating *Corynebacteria*, from individual genes to chromosomes // J. Appl. environ. microbiol. — 2005. — V. 71, № 12. — P. 7633–7642.
17. Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A. The complete *Corynebacterium glutamicum* genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins // J Biotechnol. — 2003.— № 104.— P. 5–25.
18. Жданова Н.И. Современные тенденции развития селекционных работ с продуцентами аминокислот / под ред. проф. Дебабова В.Г. сб. Генетика пром. микроорганизм. и биотехнология. — М.: Высш. шк., 1990. — С. 14–31.
19. Дебабов В. Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. — М.: Высш. шк. — 1988. — 208 с.
20. Толмачев О.Э., Ивановская Л.В., Гусятинер М.М. Получение мутаций в генах аспараткиназы *Corynebacterium glutamicum* с использованием космидного вектора и специфического фагоустойчивого мутанта *Brevibacterium flavum* // М.: Генетика. — 1993. — т. 29, № 8. — С. 1246–1255.



21. *Передельчук М.Ю., Буканов Н.О., Смирнов Ю.В.* и др. Клонирование генов *asd* и *lysC Corynebacterium glutamicum* // М.: Молекул. генет., микробиол. и вирусол. — 1992. — № 5/6. — С. 25–27.

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

23. *Abdul Haleem Shah, Abdul Hameed, Gul Majid Khan* Fermentative Production of L-Lysine // Bacterial Fermentation Journal of Medical Sciences. — 2002.— № 2, 3.— P. 152–157.

24. *Wittmann Christoph, Heinzle Elmar* Application of MALDI-TOF MS to lysine-producing *Corynebacterium glutamicum* // Eur. J. Biochem. — 2001.—268. — P. 2441–2455.

25. *Plachy J.* Lysine production by auxotrophic — regulatory mutants of *Corynebacterium glutamicum* // Acta biotechnol. — 1989. — 9, № 3. — С. 291 — 293.

26. *Zhong Zhu Xiao, Gong C.S., Tang Ren Tian* Effect of dimethyl sulfoxide on L — lysine production by a regulatory mutant of *Brevibacterium flavum* // Can. J. Microbiol. — 1989. — 35, № 6. — С. 668–670.

27. *Вальгер Е.И., Несиневич Л.С., Емельянов В.М., Рындовская Ю.Л.* и др Интенсификация процесса биосинтеза лизина с использованием переносчиков кислорода // 14 Менделеев. съезд по общ. и прикл. химии: сб. Реф. докл. и сообщ. М.: — 1989. — Т. 2. — С. 186.

28. *Moncef Nasci, Abdelhafidh Dhouib, Fathi Zorquani, Habib Kriaa, Radouan Ellour* Production of lysine by using immobilized living *Corynebacterium sp.* cells // Biotechnol. Lett. — 1989. — 11, № 12. — С. 865–870.

29. *Toshiko Hirao, Tetsuo Nakan, Tomoki Asuma, Masahiro Sugimoto, Nakanishi Toshihide* L-lysine production in continuous culture of a lysine hyperproducing mutant of *Corynebacterium glutamicum* // Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 1989. — 32, № 3. — С.269 — 273.

30. *Патент RU (11) 2207376 (13) С2№ 2027621.* Способ получения L-аминокислоты методом ферментации, штамм бактерии *Escherichia coli*— продуцент L-аминокислоты (варианты) /Гусятинер М.М.; Козлов Ю.И.; Птицын Л.Р.; Альтман И.Б.; Ворошилова Э.Б.; Йомантас Юргис Антанас Владович; Ямпольская Т.А. опубл. 2003.—06.—27.

31. *Wendisch Volker F, Bott Michael, Eikmanns Bernhard J* Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids // Current Opinion in Microbiology.— 2006.— P. 268–274.

32. *Schafer A., Tauch A., Jager W. et all* Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // Gene. — 1994. — 145. — С. 69–73.



33. Kirchner O., Tauch A. Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum* // J. of Biotechnol. — 2003.— №104.— P. 287–299.

34. Andriiash G., Zabolotna G., Shulga S. Study of strains *Brevibacterium* as producer of lysine // New Biotechnology, Abstract book 15th European congress on biotechnology, September 2012, Istanbul, Turkey. — 2012. — V. 29, Is. S. — P. 557.

35. Шульга С.М., Ткаченко А.Ф., Тигунова О.О., Бейко Н.Е., Андріяш Г.С. Інтенсифікація біосинтезу треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7//К.: Біотехнологія. — 2011. — том 4, № 5. — С. 97–103.

36. Шульга С.М., Ткаченко А.Ф., Тигунова Е.А., Бейко Н.Е., Хоменко А.И. Влияние компонентов энзиматической среды на биосинтез триптофана // К.: Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 51–55.

37. Ganguly S., Banik A.K. Optimization of physical conditions for the production of L-glutamic acid by a mutant *Micrococcus glutamicus* // International Journal of Pharma and Bio Sciences. — 2011. — № 22. — P. 4–6.

Стаття надійшла до редакції 05.06.2012 р.

УДК 612, 398:547.965

А.С. Андріяш, Г.М. Заболотная, С.М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины»,
ул. Осиповского, 2а, 04123, Киев, Украина, e-mail: Shulga5@i.ua

РЕГУЛИРОВАНИЕ И ПУТИ ИНТЕНСИФИКАЦИИ БИОСИНТЕЗА ЛИЗИНА

Реферат

В обзоре проанализированы пути интенсификации микробиологического синтеза лизина, который используется в производстве кормов, пищевой и фармацевтической промышленности. Представлена биохимическая схема регулирования и синтеза лизина бактериями через диаминопимелат. Показано, что повышенный синтез незаменимых аминокислот у микроорганизмов связан с определенными мутационными нарушениями регуляторного контроля биосинтеза. Отражены технологические способы повышения биосинтеза лизина. Указано, что за счет технологических приемов биосинтез лизина достигал уровня 30–50 г/дм³, а штаммы-мутанты в сочетании с биотехнологическими приемами производили 50–70 г/дм³ и обеспечивали 40% конверсию субстрата в аминокислоту.

Ключевые слова: ауксотрофность, биосинтез, интенсификация, лизин, продуцент.



УДК 612, 398:547.965

G.S. Andriiash, G.M. Zabolotna, S.M. Shulga

State organization «Institute of Food Biotechnology and Genomics»
of NASU, 2a, Osipovskogo str., 04123, Kyiv, Ukraine, e-mail: Shulga5@i.ua

REGULATION AND INTENSIFICATION WAYS OF LYSINE BIOSYNTHESIS

Summary

There were analysed in the review the ways of intensification of the microbiological synthesis of lysine, used in the production of food, feed and pharmaceutical industries. The biochemical synthesis scheme of lysine by bacteria through diaminopymelat and its regulation was examined. It was shown that increased synthesis of amino acids in microorganisms was associated with specific mutation disruption of regulatory control of biosynthesis. The technological ways of improvement of lysine biosynthesis were represented. It was shown lysine biosynthesis reached the level of 30–50 g/dm³ due to the technological methods and mutant strains in combination with the biotechnological techniques produced 50–70 g/dm³ and provided 40% conversion of the amino acid substrate.

Key words: auxotrophy, biosynthesis, intensification, lysine, producer.



УДК 579.6+ 578

Ж.Ю. Сергеева, К.Д. Крилова, Н.В. Ліманська, Н.Ю. Васильєва,
Ф.І. Товкач, В.О. Іваниця

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

ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU 87 ТА АВТОЛІЗАТУ БАКТЕРІЙ *ERWINIA CAROTOVORA* ZM1 НА ІНФЕКЦІЙНІСТЬ ЗБУДНИКІВ М'ЯКОЇ ГНИЛІ

Проведено вивчення впливу молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 87 та автолізу *Erwinia carotovora* ZM1, що містить бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини, на інфекційність 10 штамів збудників бактеріальної гнилі *Erwinia carotovora*. Інфекційний процес моделювали на бульбах картоплі (*Solanum tuberosum* L.), коренеплодах моркви (*Daucus carota* L.) та на проростках рослин томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Показано, що ступінь пригнічення інфекційної активності застосованих окремо молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 залежить від природи тест-об'єкта. За сумісної дії *Lactobacillus plantarum* ONU 87 і автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 повністю пригнічують інфекційність фітопатогенних ервіній в дослідках на коренеплодах моркви, бульбах картоплі та проростках рослин томатів.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, фітопатогени, інфекційність, *Lactobacillus plantarum*, автолизат *Erwinia carotovora*.

Фітопатогенні бактерії, що вражають важливі сільськогосподарські культури, обмежують ріст рослин і, відповідно, знижують їх врожайність [8, 9, 10]. Альтернативними хімічним методам для боротьби з фітопатогенами та перспективнішими є методи, що базуються на застосуванні бактерій-антагоністів, бактеріофагів та бактеріоцинів [7, 9, 11].

Бактерії *Lactobacillus plantarum* є нормальними мешканцями філосфери та ризосфери рослин. Їх антагоністичні та адгезивні властивості забезпечують селективну перевагу у конкуренції з патогенними мікроорганізмами [13]. Антагоністична активність лактобактерій зумовлена дією неспецифічних (органічні кислоти, низький окисно-відновний потенціал,

© Ж.Ю. Сергеева, К.Д. Крилова, Н.В. Ліманська, Н.Ю. Васильєва, Ф.І. Товкач, В.О. Іваниця, 2012



конкурентність за поживні речовини) та специфічних (антибіотики та бактеріоцини) факторів. Синтез лактобактеріями бактеріоцинів полегшує виживання штамів-продуцентів за умов змішаних популяцій [1].

Характерною рисою фітопатогенних бактерій *Erwinia carotovora* є дефектна полілізогенія, внаслідок чого вони утворюють значну кількість дефектних фагових часток — хвостових відростків, базальних пластинок, окремих капсидів [6]. В попередніх дослідженнях проведено детальний аналіз лізатів цих бактерій. Встановлено, що їх кілерна дія на споріднені бактерії зумовлена макромолекулярними бактеріоцинами типу дефектних фагових відростків з широким спектром антибактеріальної активності [2, 3, 12, 14].

Метою даної роботи було вивчення впливу молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 87 та автолізу клітин *Erwinia carotovora* ZM1, що містить бактеріофаги та макромолекулярні бактеріоцини, на інфекційність збудників м'якої гнилі.

Матеріали і методи

В роботі використано 10 фітопатогенних штамів *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc): 48A, 48A/7₄b, ZM1, 18, 10, J2, 18-40, 50RI, 5297, 5195 збудників м'якої гнилі рослин, штам *E. carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 (Ecc ZM1) — продуцент бактеріофагів та макромолекулярних бактеріоцинів і штам-антагоніст *L. plantarum* ONU 87 (OL87). Бактерії *E. carotovora*, для моделювання інфекційного процесу м'якої гнилі, культивували на середовищі LB до концентрації 10^8 КУО/мл. Молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU 87 вирощували на рідкому середовищі MRS та використовували у концентрації 10^8 КУО/мл.

Автолізат клітин штаму Ecc ZM1 одержували шляхом спонтанної індукції [6]. Для цього на чашку з твердим середовищем LB висівали бактерії штаму Ecc ZM1 та вирощували 24 год при 28 °С. Добову культуру висівали у рідке оптимізоване мінімальне середовище (Na_2HPO_4 — 8,2 г/л; KH_2PO_4 — 1,48 г/л; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,7 г/л, м'яса — 0,2%) та культивували впродовж 18 год при 28 °С (180 об/хв на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick) до досягнення культурою стаціонарної фази росту. Бактерії відокремлювали центрифугуванням при 9000 г впродовж 5 хв, ресуспендували у рідкому оптимізованому середовищі без м'яса та для синхронізації поділу клітини бактерій витримували за температури 4 °С впродовж 24 год.

Для стимуляції процесу автолізу синхронізовані клітини (у концентрації 1×10^{10} КУО/мл) вносили у кількості 1,0% до об'єму у поживне середовище з м'ясою та інкубували впродовж 36 год при 28 °С на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick при 180 об/хв. Інактивацію клітин ервіній, що залишилися після автолізу та центрифугування, здійснювали прогріванням при температурі 60 °С впродовж 15 хв. Автолізат звільняли

від уламків клітин шляхом їх осаджування при 9000 g впродовж 15 хв. Після цього автолізат перевіряли на наявність зон лізису та визначали ступінь їх прозорості на газоні чутливої культури штаму *Ecc* 18 [5].

Вплив бактерій *L. plantarum* ONU 87 та автолізату на інфекційний процес, зумовлений збудником м'якої гнилі, визначали на бульбах картоплі (*Solanum tuberosum* L.), коренеплодах моркви (*Daucus carota* L.) за методикою, що була модифікована авторами [4], та на паростках томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Бульби картоплі і коренеплоди моркви стерилізували фламбуванням та УФ-опроміненням впродовж 30 хв з кожної сторони. На поверхні половини бульби стерильним скальпелем робили лунки глибиною та діаметром приблизно 1 см. Моркву асептично розрізали на диски товщиною 1,5–2 см, посередині робили лунку глибиною і діаметром приблизно 1 см та поміщали у стерильні чашки Петрі. Усі дослідні варіанти виконували у 5 повторях. В лунки вносили дослідні препарати, після чого бульби герметично запаковували у стерильні поліетиленові пакети, а чашки Петрі з морквою перекидали парафільмом та залишали на 48 год при температурі 25 °С.

Для моделювання зараження та розвитку інфекції м'якої гнилі (позитивний контроль) в лунки на бульбі і коренеплодах вносили 0,25 мл суспензії клітин 10 штамів ервіній (кожна у концентрації 3×10^8 КУО/мл) у середині логарифмічної фази росту [13]. У дослідні варіанти за одну годину після або до інфікування вносили окремо 0,25 мл суспензії *L. plantarum* ONU 87 (у концентрації 10^8 КУО/мл) або 0,25 мл автолізату, або разом суспензію молочнокислих бактерій та автолізат по 0,25 мл.

Ступінь ураження ервініями бульб картоплі і коренеплодів моркви оцінювали за таким чином: «—» — негативний результат, зразки не відрізняються від інтактних; «0–25%» — зразки частково мокрі, розм'якшені; «25–50%» — зразки повністю мокрі, розм'якшені; «50–75%» — зразки повністю мокрі, розм'якшені, частково почорнілі до 50%; «75–100%» — зразки повністю мокрі, розм'якшені, почорнілі на 50–100%.

На паростках рослин *L. esculentum* дію двокомпонентного препарату та окремих компонентів перевіряли після появи третьої пари листків. Для цього кореневу систему паростків занурювали у дослідні препарати з такими ж концентраціями компонентів, як і у попередніх дослідженнях на бульбах картоплі та коренеплодах моркви, на 1 год, а потім повертали у ґрунт. На третю, п'яту та сьому добу обраховували результати. Кожний варіант досліду виконували у семи повторях.

Позитивним контролем слугували тест-об'єкти, оброблені суспензією клітин 10 штамів ервіній, негативним — стерильною дистильованою водою, лактобактеріями, автолізатом ервіній та стерильними поживними середовищами, використаними в дослідженнях.

Статистичне опрацювання результатів здійснювали загальноприйнятими методами варіаційного та кореляційного аналізу з застосуванням



програми Microsoft Excel 2007. Вірогідність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95%.

Результати та їх обговорення

Дослідження показали, що у варіантах негативного контролю молочнокислі бактерії, автолізат ервіній, дистильована вода, оптимізоване мінімальне середовище, поживні середовища LB та MRS не виявили негативного впливу на бульби картоплі і коренеплоди моркви.

Як видно із рис. 1 і 2 на бульбах картоплі патогенність ервіній була високою. В середньому на дослідних зразках ступінь ураження становив 62,5%. Показано, що в досліді, в якому бульби картоплі спочатку обробляли культурами патогенних ервіній, а потім автолізатом ервіній, інфекційність збудників знизилася в середньому до 27,5%. А після обробки лактобактеріями прояви інфекційності зменшилися в середньому до 24,5%. За одночасного внесення лактобактерій і автолізату, проявів інфекційного процесу на дослідних зразках не виявлено.

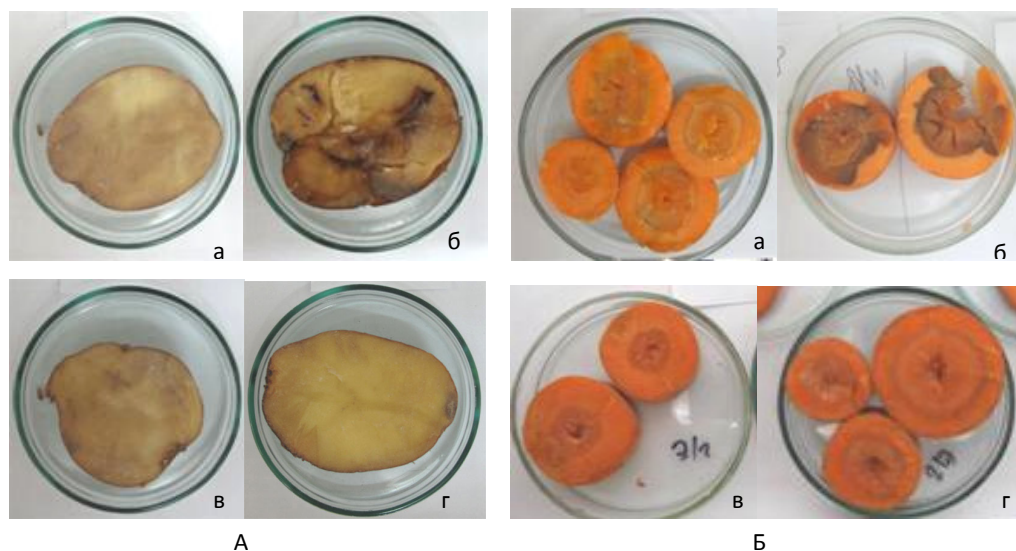


Рис. 1. Дослідні зразки бульб картоплі (А) і коренеплодів моркви (Б) інфіковані фітопатогенними ервініями та оброблені лактобактеріями і автолізатом ервіній *Ecc ZM1*

а — внесені лактобактерії та автолізат *Ecc ZM1*, б — інфіковані фітопатогенними ервініями, в — інфіковані фітопатогенними ервініями, а через годину внесені лактобактерії та автолізат *Ecc ZM1*, г — внесені лактобактерій та автолізат *Ecc ZM1*, а через годину інфіковані фітопатогенними ервініями.

Fig. 1. Test samples of potato tubers (A) and carrot roots (B) infected with phytopathogenic erwinias and treated with lactobacteria and autolysate of *Ecc ZM1*
а — treated with lactobacteria and autolysate of *Ecc ZM1*, б — infected with phytopathogenic erwinias, в — infected with phytopathogenic erwinias and an hour later — with lactobacteria and autolysate of *Ecc ZM1*; г — treated with lactobacteria and autolysate of *Ecc ZM1* and an hour later — with phytopathogenic erwinias.

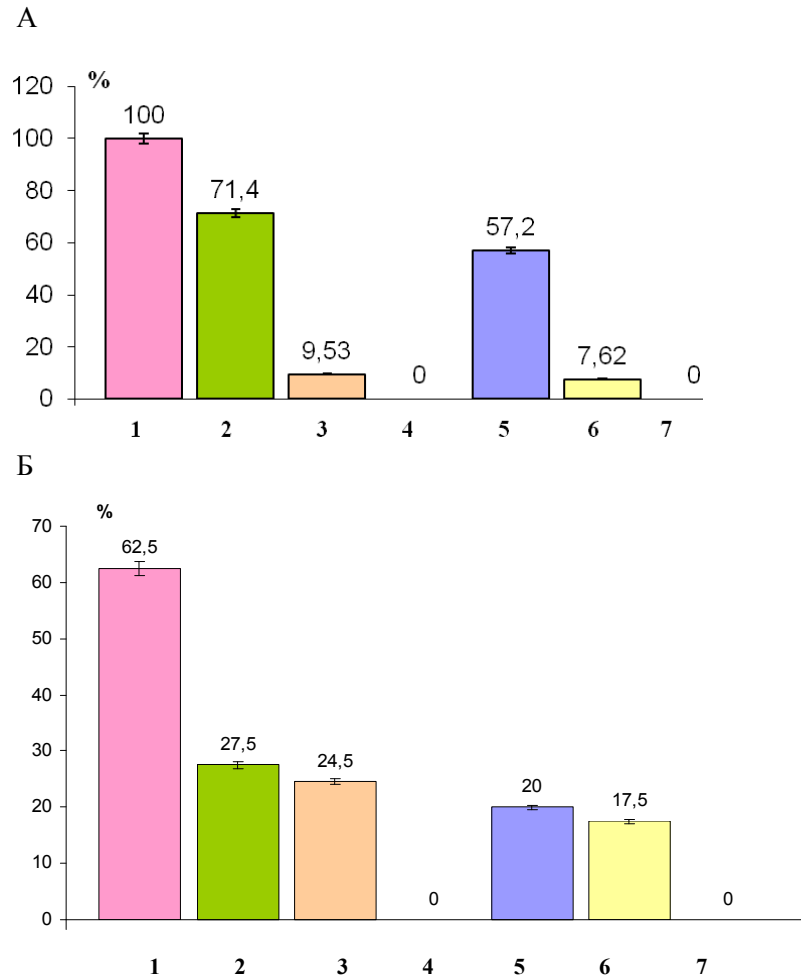


Рис. 2. Вплив *L. plantarum* ОНУ 87 та автолізуату *E. carotovora* ZM1 на інфекційність збудників бактеріальної гнилі в дослідях на коренеплодах моркви (А) і бульбах картоплі (Б)

1 – фітопатогенні ервінії, 2 – фітопатогенні ервінії, через годину внесено автолізат ервіній, 3 – фітопатогенні ервінії, через годину внесено лактобактерії, 4 – фітопатогенні ервінії, через годину внесено автолізат ервіній та лактобактерії, 5 – автолізат ервіній, через годину внесено фітопатогенні ервінії, 6 – лактобактерії, через годину внесено фітопатогенні ервінії, 7 – автолізат ервіній та лактобактерії, через годину внесено фітопатогенні ервінії.

Fig. 2. Effect of *L. plantarum* ОНУ 87 and autolysate of *E. carotovora* ZM1 on infectivity of soft rot pathogens in the experiments on carrot roots (A) and potato tubers (B)

1 – phytopathogenic erwinias, 2 – phytopathogenic erwinias, one hour later – autolysate of erwinias applied, 3 – phytopathogenic erwinias, one hour later – lactobacteria applied, 4 – phytopathogenic erwinias, one hour later – autolysate of erwinias and lactobacteria applied, 5 – autolysate of erwinias, one hour later – inoculated with phytopathogenic erwinias, 6 – lactobacteria, one hour later – inoculated with phytopathogenic erwinias, 7 – autolysate of erwinias and lactobacteria, one hour later – inoculated with phytopathogenic erwinias.



У разі, коли на бульби картоплі попередньо наносили культури лактобактерій і/або автолізат, а через годину патогенні ервінії, інфекційність останніх зменшилася в середньому до 20%. Одночасна дія лактобактерій і автолізату повністю пригнічувала процес пошкодження бульб патогенними ервініями.

Дослідження інфекційності патогенних штамів *E. carotovora* на коренеплодах моркви, показало (рис. 1 і 2), що вже на другу добу після внесення збудника на всіх без виключення дослідних зразках моркви виявлено появу зон м'якої чорної гнилі діаметром 2–2,5 см і пом'якшення тканин глибиною 0,5–0,7 см. Отже, патогенність дослідних штамів ервіній на дисках коренеплодів моркви була дуже високою, прояви інфекційного процесу встановлено на 100% дослідних зразків. Таку високу патогенність і тропність до тканин моркви може пояснити той факт, що ці штами ервіній були ізольовані із уражених коренеплодів цієї рослини.

Внесення автолізату ервіній на дослідні зразки моркви через годину після інфікування фітопатогенними бактеріями зменшило ураження коренеплодів до 71,4%, а за обробки лактобактеріями інфекційність в середньому складала лише 9,5%. За одночасної обробки молочнокислими бактеріями та автолізатом клітин ервіній через годину після зараження коренеплодів фітопатогенами патогенного ураження дослідних зразків виявлено.

У досліді, в якому через годину після нанесення автолізату диски моркви інфікували штамми ервіній, ураження моркви складало в середньому 57,2%. Попередня обробка дослідних зразків молочнокислими бактеріями знижувала інфекційність ервіній до 7,6%. Автолізат ервіній та лактобактерій одночасно внесенні за годину до зараження повністю пригнічували інфекційний процес ервіній на коренеплодах моркви.

Дослідження на проростках томатів *L. esculentum* показало, що у варіантах негативного контролю (суспензія молочнокислих бактерій, автолізат ервіній, дистильована вода, оптимізоване мінімальне середовище, поживні середовища LB та MRS) не виявлено негативного впливу на рослини (рис. 3).

Серед рослин томатів, оброблених ервініями, на третю добу після обробки кореневої системи патогенними ервініями загинуло 40% рослин (рис. 4, табл. 1). На сьому добу інфекційність дослідних штамів ервіній на рослинах томату досягла високого рівня, при цьому загинуло 80% рослин.

Дослідні паростки томатів, які спочатку інфікували суспензією бактерій 10 штамів ервіній, а потім вносили окремо або разом автолізат і лактобактерії, не виявили симптомів ураження рослин.

Симптомів ураження ервініями не було також виявлено у рослин, які спочатку обробляли окремо або разом автолізатом і лактобактеріями, а через годину фітопатогенними ервініями.

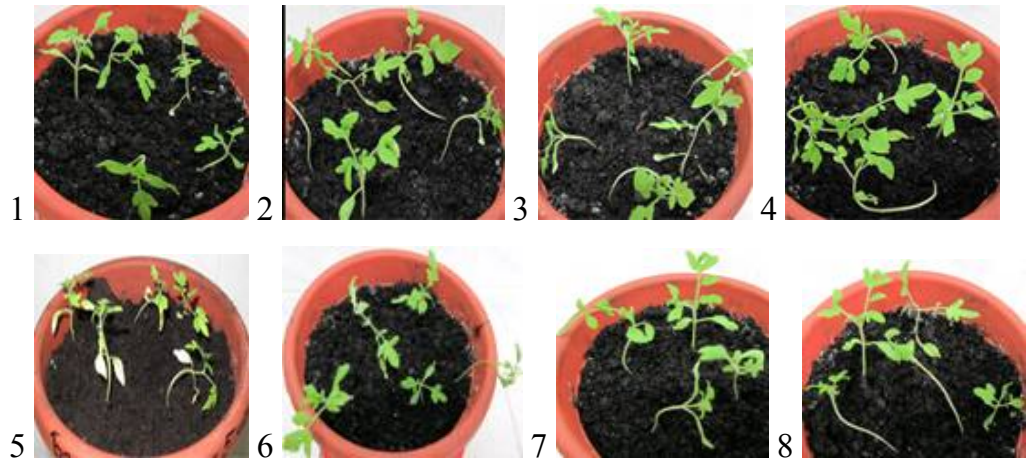


Рис. 3. Рослини томату *L. esculentum* за обробки стерильною водою (1), мінімальним оптимізованим середовищем (2), середовищем LB (3) та MRS (4), автолізатом ервіній (5), лактобактеріями (6), автолізатом ервіній та лактобактеріями (7, 8).

Fig. 3. Tomato plants *L. esculentum* treated with sterile water (1), minimal optimized medium (2), LB medium (3), and MRS medium (4), autolysate of erwinias (5), cells of lactobacteria (6), autolysate of erwinias with lactobacteria (7, 8).

Як видно із табл. 1, на тлі ураження на сьомий день 80% паростків у позитивному контролі, автолізат ервіній та *L. plantarum* ONU 87 повністю пригнічують інфекційність ервіній та забезпечують захист усіх дослідних рослин.



Рис. 4. Рослини томату *L. esculentum* за обробки фітопатогенними ервініями, лактобактеріями та автолізатом ервіній (7 доба)

1 — рослини, інфіковані фітопатогенними ервініями; 2 — рослини, інфіковані фітопатогенними ервініями, а через годину оброблені лактобактеріями та автолізатом ервіній; 3 — рослини, оброблені лактобактеріями та автолізатом ервіній, а через годину інфіковані фітопатогенними ервініями.

Fig. 4. Tomato plants *L. esculentum* treated with phytopathogenic erwinias, lactobacteria and autolysate of erwinias (7th day).

1 — plants treated with phytopathogenic erwinias; 2 — plants treated with phytopathogenic erwinias and an hour later — with lactobacteria and autolysate of erwinias; 3 — plants treated with lactobacteria and autolysate of erwinias, and an hour later — with phytopathogenic erwinias.

Таблиця 1

Вплив *L. plantarum* ONU 87 та автолізуату *E. carotovora* ZM1 на інфекційність збудників бактеріальної гнилі в дослідах на рослинах томату *L. esculentum*

Table 1

Influence of *L. plantarum* ONU 87 and *E. carotovora* ZM1 autolysate on the infectivity of soft rot pathogens in the experiments on tomato plants *L. esculentum*

Варіанти досліду	К-ть рослин з ознаками захворювання за 3 доби, %	К-ть рослин з ознаками захворювання за 7 діб, %
<i>E. carotovora</i> *	40	80
<i>E. carotovora</i> , через годину внесено автолізат ервіній**	0	0
<i>E. carotovora</i> , через годину внесено <i>L. plantarum</i> ONU 87	0	0
<i>E. carotovora</i> , через годину внесено <i>L. plantarum</i> ONU 87 і автолізат ервіній	0	0
Автолізат ервіній, через годину внесено <i>E. carotovora</i>	0	0
<i>L. plantarum</i> ONU 87, через годину внесено <i>E. carotovora</i>	0	0
<i>L. plantarum</i> ONU 87 і автолізат ервіній, через годину внесено <i>E. carotovora</i>	0	0

Примітка: * — суспензія бактерій 10 фітопатогенних штамів *E. carotovora*;

** — автолізат бактерій *Erwinia carotovora* ZM1.

Таким чином, проведені дослідження показали, що молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU 87 та автолізат ервіній, який містить бактеріофаги та бактеріоцини, пригнічують інфекційність фітопатогенних ервіній. Високу пригнічувальну активність досліджуваних лактобактерій можна, очевидно, пояснити здатністю їх конкурувати з фітопатогенними бактеріями за місця адгезії та продукувати антагоністичні речовини, що негативно впливає на процеси життєдіяльності збудників м'якої гнилі [10, 12]. Лактобактерії та бактеріофаги і бактеріоцини автолізуату ервіній у випробуваннях на бульбах *S. tuberosum*, коренеплодах *D. carota* та рослинах *L. esculentum* доповнюють дію один одного і повністю інгібують інфекційність збудників м'якої гнилі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Іваниця В.О., Єлинська Н.О., Ямборко Г.В., Кур'ята Н.В., Фабіянська І.В., Філіпова Т.О. Екологія та біологічні властивості молочнокислих бактерій півдня України // Тез. допов. Міжнародної наукової конференції «Мікробні біотехнології» (Одеса, 11–15 вересня, 2006). — Одеса, 2006. — С. 59.



2. Іваниця Т.В. Особливості дефектної лізогенії *Erwinia carotovora*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.06 «вірусологія» / Т.В. Іваниця. — К., 2008. — 20 с.
3. Крылова Е.Д., Товкач Ф.И. Характеристика колиспецифических бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ЕС 153 // Мікробіологічний журнал. — 2009. — 71, № 3. — С. 25–30.
4. Мямин В.Е., Песнякевич А.Г., Прокулевич В.А. Генетическая регуляция факторов патогенности и вирулентности у бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // Генетика. — 2004. — 40, № 8. — С. 1–5.
5. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 1998. — 67, № 6. — С. 767–774.
6. Товкач Ф.И. Лізогенія і бактеріофаги *Erwinia carotovora*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук : спец. 03.00.06 «вірусологія» / Ф.И. Товкач — Київ, 2002. — 39 с.
7. Balogh B., Jones J.B., Iriarte F.B., and Momol M.T. Phage therapy for plant disease control // Cur. Pharm. Biotech. — 2010. — 11, № 1. — P. 48–57.
8. Dye D.W. Control of *Pseudomonas syringae* with streptomycin // Nature. — 1953. — 172, № 4380. — P. 683–684.
9. Gilligan C.A. Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective // Philosophical Transactions of the Royal Society. — 2008. — 363, № 1492. — P. 741–759.
10. McManus P.S., Stockwell V.O., Sundin G.W., and Jones A.L. Antibiotic use in plant agriculture // An. Rev. of Phytopath. — 2002. — 40. — P. 443–465.
11. Ravensdale M., Blom T.J., Gracia-Garza J.A., Svircev A.M., and Smith R.J. Bacteriophages and the control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Canadian J. of Plant Path. — 2007. — 29, № 2. — P. 121–130.
12. Svircev A.M., Castle A.J., and Lehman S.M. Bacteriophages for control of phytopathogens in food production systems / Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens. — 2010. — ASM Press, Washington. — P. 79–102.
13. Ten Brink B. et al. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46 // J. Appl. Bacteriol. — 1994. — 77, № 2. — P. 140–148.
14. Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // International Microbiology. — 2008. — Vol. 11. — P. 231–236.

Стаття надійшла до редакції 26.11.2012 р.



**Ж.Ю. Сергеева, Е.Д. Крылова, Н.В. Лиманская, Н.Ю. Васильева,
Ф.И. Товкач, В.А. Иваница**

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

ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU 87 И АВТОЛІЗАТА БАКТЕРІЙ *ERWINIA CAROTOVORA* ZM1 НА ИНФЕКЦИОННОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЯГКОЙ ГНИЛИ

Реферат

Проведено изучение влияния молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* ONU 87 и автолизата клеток *Erwinia carotovora* ZM1, который содержит бактериофаги и макромолекулярные бактериоцины, на инфекционность 10 штаммов возбудителей бактериальной мягкой гнили *Erwinia carotovora*. Инфекционный процесс моделировали на клубнях картофеля (*Solanum tuberosum* L.), корнеплодах моркови (*Daucus carota* L.) и на проростках томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Показано, что степень угнетения инфекционной активности использованными отдельно молочнокислыми бактериями *Lactobacillus plantarum* ONU 87 и автолизатом бактерий *Erwinia carotovora* ZM1 зависит от природы тест-объекта. При совместном действии *Lactobacillus plantarum* ONU 87 и автолизат бактерий *Erwinia carotovora* ZM1 полностью подавляют инфекционность фитопатогенных эрвиний на клубнях картофеля, корнеплодах моркови и на проростках томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, фитопатогены, инфекционность, *Lactobacillus plantarum*, автолизат ервиній.

Zh.U. Sergeeva, K.D. Krylova, N.V. Limanska, N.U. Vasyleva,
F.I. Tovkach, V.O. Ivanytsia

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

**INFLUENCE OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU 87
AND AUTOLYSATE OF BACTERIA *ERWINIA CAROTOVORA*
ZM1 ON INFECTIVITY OF SOFT ROT DISEASE
PATHOGENS**

Summary

Influence of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* ONU 87 and autolysate of *Erwinia carotovora* ZM1 cells containing bacteriophages and macromolecular bacteriocins on infectivity of ten *Erwinia carotovora* strains (soft rot disease pathogens) has been studied. Infectious process has been modeled on potato tubers (*Solanum tuberosum* L.), carrot roots (*Daucus carota* L.) and tomato plantlets (*Lycopersicon esculentum* Mill.). The level of inhibition of infective activity by separately used *Lactobacillus plantarum* ONU 87 and *Erwinia carotovora* ZM1 autolysate depends on the origin of active substance and test-object. Coeffect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 and cell autolysate of *Erwinia carotovora* ZM1 results in complete inhibition of infectivity of phytopathogenic erwinias on all the test-objects.

Key words: *Erwinia carotovora*, phytopathogens, infectivity, *Lactobacillus plantarum*, autolysate of erwinias.



УДК 578.85/.86

Т.О. Руднева¹, Т.П. Шевченко², В.О. Цвігун^{1,2}, В.О. Шамрайчук²,
А.С. Бисов^{1,2}, В.П. Поліщук²

¹Інститут агроєкології і природокористування НААН,
вул. Метрологічна, 12, Київ, 03143, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна,
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tyvonchuk@ukr.net

ВІРУСИ ПЕРЦЮ СОЛОДКОГО У АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ ТА НАСІННЄВОМУ МАТЕРІАЛІ

*П'ятирічний моніторинг агроценозів України виявив циркуляцію семи вірусів на рослинах перцю солодкого (*Capsicum annuum* L.), а саме: вірусу плямистого зів'янення томатів, вірусу огіркової мозаїки, вірусу мозаїки люцерни, вірусу тютюнової мозаїки, Х-вірусу картоплі, вірусу мозаїки томатів та вірусу м'якої крапчастості перцю. При дослідженні насінневого матеріалу перцю солодкого на предмет вірусних патогенів було виявлено 4 види вірусів: вірус тютюнової мозаїки, вірус огіркової мозаїки, вірус мозаїки томату та вірус м'якої крапчастості перцю, останній був уперше детектований у агроценозах України як у насінневому, так і у рослинному матеріалі.*

Ключові слова: віруси перцю солодкого, агроценози, діагностика вірусів, насіннева інфекція.

На культурі перцю солодкого зареєстровано близько 35 вірусів, більшість з яких передається попелицями. Інші віруси, що уражують перець, переносяться нематодами, трипсами, цикадками, білокрилками, жуками, грибами, насінням, а також при контакті рослин та через ґрунт [8]. Втрати врожаю перцю солодкого від вірусних інфекцій у тепличних господарствах та на полях є досить значними. Віруси, що уражують дану культуру, індукують різноманітні симптоми: мозаїку, крапчастість, некрози та деформацію листків. З економічного погляду врожаї перцю солодкого часто є низькими і нестабільними, і причиною цього є саме вірусні хвороби, що призводять до низької урожайності і погіршення якості плодів [5]. Часто на листових пластинках рослин спостерігається слабкий прояв симптомів, а тому хвороба залишається непомітною впродовж тривалого часу. Як результат, віруси можуть передаватися на сусідні поля, а відсоток уражених рослин перцю різко збільшується [6, 7]. Більшість вірусів, що уражують культуру перцю солодкого, досить ефективно передається насінням. Зважаючи на це, особливу увагу потрібно приді-

© Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, В.О. Цвігун, В.О. Шамрайчук, А.С. Бисов,
В.П. Поліщук, 2012



ляти передпосівному обстеженню насіння з подальшим знешкодженням вірусних патогенів у разі їх виявлення. Таким чином, вчасна діагностика вірусних інфекцій дасть можливість провести обробку як інфікованого насіння, так і рослин і, як наслідок, запобігти втратам урожаю [1].

Метою даної роботи було проаналізувати сучасний стан поширення вірусів, що уражують перець солодкий, з визначенням їх видового складу в умовах відкритого ґрунту на території України, а також перевірити комерційне насіння різних сортів перцю солодкого на можливість вірусної контамінації для вчасного запобігання поширенню вірусних захворювань на території України.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень слугували рослини перцю солодкого з симптомами вірусної етіології, відібрані з різних агроценозів України, та комерційне насіння перцю солодкого.

Зразки на наявність вірусних антигенів аналізували імуноферментним аналізом (ІФА) у модифікаціях «сандвіч» та «непрямий». Аналіз проводили у полістиролових планшетах «Labsystem». Результати реєстрували на рідері Termo Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжині хвиль 405/630 нм [3, 2].

Рослинні зразки (вегетативні органи і плоди рослин) для ІФА готували шляхом гомогенізації інфікованого рослинного матеріалу у 0,1М фосфатно-солевого буферу та 0,001М ЕДТА у співвідношенні 1:2 з наступним центрифугуванням у режимі 4000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С на центрифугі РС-6 [4]. Отриманий гомогенат використовували у імуноферментному аналізі.

Зразки насіння для ІФА готували таким чином: спочатку пророшували 7 діб при +25 °С. Надалі пророщене насіння гомогенізували у 0,1М фосфатно-солевого буфері, рН 7,4 у співвідношенні 1:4. Для очистки матеріалу від рослинних компонентів отриманий гомогенат центрифугували у режимі 5000 об/хв протягом 20 хв при +4 °С на центрифугі РС-6. Відібраний надосад використовували для діагностики вірусних патогенів ІФА. Воду, у якій замочували насіння для пророшування, також аналізували ІФА на наявність вірусних антигенів, оскільки віруси, що уражують перець солодкий локалізуються саме на насінневих покривах і значний відсоток їх змивається у рідину при тривалій обробці.

При постановці ІФА використовували діагностичні антивірусні сироватки виробництва «Aeshersleben» (Німеччина), тест-системи Loewe (Німеччина), INRA (Франція) і DSMZ (Німеччина). Рослинні зразки аналізували на наявність таких вірусних антигенів: вірусу огіркової мозаїки (ВОМ), вірусу мозаїки люцерни (ВМЛ), вірусу м'якої крапчастості перцю (ВМКП), вірусу плямистого зів'янення томатів (ВПЗТ), Х-вірусу картоплі (ХВК), Y-вірусу картоплі (YBK), вірусу мозаїки томатів (ВМТо), вірусу



кільцевої плямистості томатів (ВКПТо), вірусу погримкуватості тютюну (ВПТ) та вірусу мозаїки пепіно (ВМПеп).

Результати та їх обговорення

Рослини перцю солодкого відбирали протягом п'яти років з агроценозів Вінницької, Київської, Полтавської, Харківської, Херсонської, Черкаської областей та Автономної Республіки Крим.

Найпоширенішими симптомами на рослинах перцю солодкого були системна жовто-зелена і темно-зелена мозаїка листкової пластинки, жовта мозаїка у вигляді кілець, деформація та викривлення молодих верхівкових листків, біла плямистість та локальні некротичні ураження листкової пластинки, а також локальні некротичні ураження та антоціанове забарвлення шкірки плоду і деформація плодів (рис. 1).

Результати досліджень показали наявність семи вірусів у рослинах перцю солодкого, а саме: вірусу плямистого зів'янення томатів, вірусу огіркової мозаїки, вірусу мозаїки люцерни, вірусу тютюнової мозаїки, Х-вірусу картоплі, вірусу мозаїки томату та вірусу м'якої крапчастості перцю. Вірус м'якої крапчастості перцю було детектовано в умовах відкритого ґрунту Полтавської області на рослинах, що мали симптоми жовто-зеленої мозаїки листкової пластинки та деформацію листкової пластинки у вигляді вдавлення (рис. 1а). Х-вірус картоплі виявляли в умовах відкритого ґрунту Полтавської області на рослинах з симптомами деформації листкової пластинки (рис. 1б). Що стосується вірусу мозаїки томату, то його було виявлено в умовах відкритого ґрунту Вінницької області на рослинах із симптомами жовтої мозаїки у вигляді кілець і деформації плодів та у Автономній Республіці Крим із симптомами жовто-зеленої листкової мозаїки (рис. 1 в, е). Вірус плямистого зів'янення томатів на культурі перцю солодкого діагностували у Херсонській області та Автономній Республіці Крим на рослинах, що мали симптоми локального некротичного ураження листкової пластинки (рис. 1г). Вірус мозаїки люцерни виявляли на рослинах перцю у Харківській області з симптомами білої плямистості та локальних некротичних ураженнях листкової пластинки (рис. 1д). Вірус огіркової мозаїки — у Київській, Полтавській та Херсонській областях з симптомами жовто-зеленої мозаїки листкової пластинки та локальних некротичних уражень шкірки плоду (рис. 1е). Вірус тютюнової мозаїки детектували на рослинах перцю у Полтавській області.

На предмет контамінації вірусними патогенами, типовими для даної культури, проаналізовано насіння 28 сортів насіння перцю солодкого: «Аден F1», «Адепт F1», «Айвенго», «Антей», «Атлант», «Білосніжка», «Вікінг», «Гурме», «Дружок», «Еней», «Золоте руно», «Золотий фазан», «Золотий ювілей», «Лагідний», «Мерседес», «Миролюбівський F1», «Піонер», «Подарунок Молдови», «Ред Стар (Holland)», «Сибіряк F1», «Скіф», «Сопікіко», «Султан», «Фентезі», «Шорокшари», «Юпітер», «Яна» та «Black diamond».

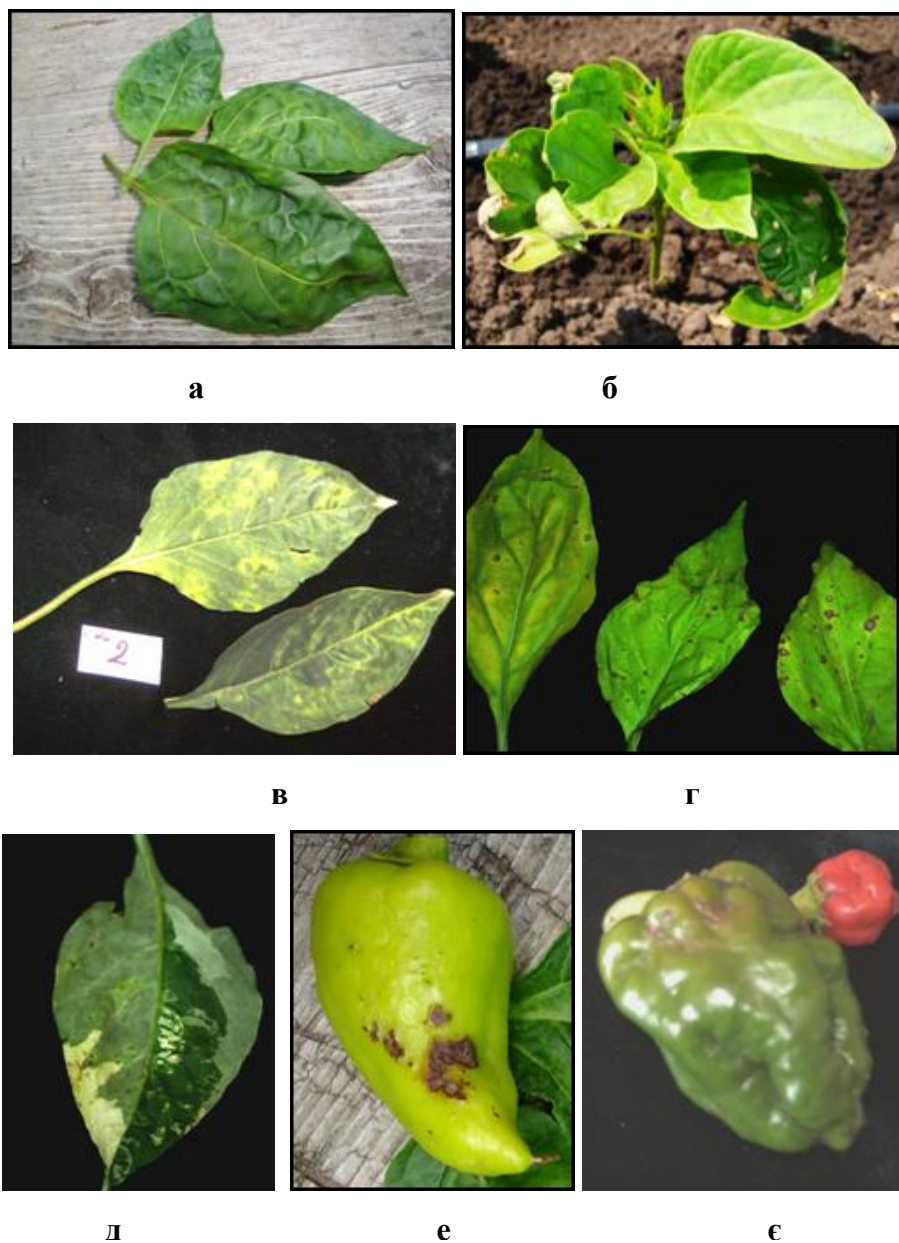


Рис. 1. Вірусіндуковані симптоми на рослині перцю солодкого
а — деформація листової пластинки у вигляді вдавлення; б — деформація листової пластинки; в — жовта мозаїка листової пластинки у вигляді кілець; г — локальні некротичні ураження листової пластинки; д — біла плямистість та локальні некротичні ураження листової пластинки; е — локальні некротичні ураження шкірки плоду; є — деформація плодів.

Fig. 1. Virus-induced symptoms on sweet pepper plants
а — impression-like pressing in leaf blade deformation; б — leaf blade deformation; в — yellow ring mosaics; д — local necrotic lesions on the leaves; е — white mottling and local necrotic lesions on the leaves; ф — local necrotic lesions on fruit; г — fruit malformation.

Насіння 16 сортів із 28 проаналізованих виявилось контамінованим. Вірусні антигени детектували у таких сортах насіння: «Адепт F1», «Айвенго», «Антей», «Атлант», «Білосніжка», «Дружок», «Еней», «Золотий фазан», «Лагідний», «Подарунок Молдови», «Сибіряк F1», «Сопііко», «Фентезі», «Юпітер», «Яна» та «Black diamond». Загалом, у комерційному насінні перцю солодкого було виявлено антигени чотирьох вірусів: вірусу тютюнової мозаїки, вірусу огіркової мозаїки, вірусу мозаїки томату та вірусу м'якої крапчастості перцю. Серед вірусифікованого насіння переважали моноінфекції, однак, було виявлено єдиний випадок змішаної вірусної інфекції, яка викликана вірусом огіркової мозаїки і вірусом м'якої крапчастості перцю.

Необхідно відмітити, що вірус м'якої крапчастості перцю детектували у агроценозах України вперше. Даний патоген є новим для агро-екологічних умов нашої країни. Приймаючи до уваги той факт, що вірус м'якої крапчастості перцю ефективно передається насінням, і оскільки раніше ми виявляли випадки контамінації насіння перцю даним патогеном, можна стверджувати, що на український ринок вірус м'якої крапчастості перцю був занесений саме з комерційним насінням.

Узагальнюючи отримані дані, можна сказати, що протягом останніх п'яти років на культурі перцю солодкого у агроценозах вищезгаданих областей України, головним чином, циркулювало сім видів вірусів. Оскільки для даних вірусів найбільш ефективними є насінневий та векторний (за допомогою комах) шляхи передачі, то комплекс захисних заходів повинен бути направлений, у першу чергу, на боротьбу з комахами-переносниками вірусів, особливо до початку їх міграції на поля, на знищення бур'янів-резерваторів вірусів, а також використання сертифікованого неконтамінованого вірусамі насіння.

Вищенаведені результати слугують підтвердженням необхідності комплексного підходу до захисту сільськогосподарських культур від вірусних інфекцій, починаючи з передпосівного тестування насіння до контролю стану посівів на різних стадіях вегетації.

Таким чином, у результаті п'ятирічного моніторингу агроценозів України встановлено, що на культурі перцю солодкого останнім часом циркулює сім видів вірусів, а саме: вірус плямистого зів'янення томатів, вірус огіркової мозаїки, вірус мозаїки люцерни, вірус тютюнової мозаїки, Х-вірус картоплі, вірус мозаїки томатів та вірус м'якої крапчастості перцю.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білик М.О. Захист овочевих культур від хвороб і шкідників у закритому ґрунті: навч. посібник / М.О. Білик, М.Д. Євтушенко, Ф.М. Марютін — Харків: Еспада, 2003. — 464 с.
2. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусом растений / Раиса Васильевна Гнутова. — М.: Наука, 1993. — 301 с.



3. *Crowther J.R.* (Ed.) ELISA. Theory and practice, Humana Press, N.Y. — 1995. — p. 223.

4. *Dijkstra J.* Practical Plant Virology: Protocols And Exercises / J. Dijkstra, Cees P. de Jager. — Berlin; — Springer-Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. — 459 p.

5. *Green S.K.* Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review / S.K. Green, J.S. Kim. — Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin №. 18, 1991. — 60 pp.

6. *Jarret R.L.* The occurrence and control of Pepper mild mottle virus (PMMoV) in the USDA/ARS Capsicum germplasm collection / R.L. Jarret, A.G. Gillaspie, N.A. Barkley, D.L. Pinnow // Seed technology. — 2008. — Vol. 30, — № 1. — P. 26–36.

7. *Virus* and virus-like diseases of major crops in developing countries [Gad Loebenstein, G. Thottappilly] — Gargening, 2003. — 800 pp.

8. *Virus* taxonomy. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff et al.] — London: Academic Press, 2006. — 1259 pp.

Стаття надійшла до редакції 10.12.2012 р.

Т.А. Руднева¹, Т.П. Шевченко², В.А. Цвигун^{1,2}, В.О. Шамрайчук²,
А.С. Бисов^{1,2}, В.П. Полищук²

¹Институт агроэкологии и природопользования НААН,
ул. Метрологическая, 12, Киев, 03143, Украина

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина,
тел.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tyvonchuk@ukr.net

ВИРУСЫ СЛАДКОГО ПЕРЦА В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАИНЫ И СЕМЕННОМ МАТЕРИАЛЕ

Реферат

Вследствие пятилетнего мониторинга агроценозов Украины на растениях сладкого перца (*Capsicum annuum L.*), было показано циркуляцию семи вирусов, а конкретно: пятнистого увядания томатов, огуречной мозаики, мозаики люцерны, табачной мозаики, X — вируса картофеля, мозаики томатов и мягкой крапчатости перца. При исследовании семенного материала сладкого перца на наличие вирусных патогенов было выявлено 4 вида вирусов: табачной мозаики, огуречной мозаики, мозаики томатов и мягкой крапчатости перца. Впервые в агроценозах Украины как в семенном, так и в растительном материале сладкого перца было детектировано вирус мягкой крапчатости перца.

Ключевые слова: вирусы перца сладкого, агроценозы, диагностика вирусов, семенная инфекция.



**T.O. Rudnieva¹, T.P. Shevchenko², V.O. Tsvigun^{1,2}, V.O. Shamraichuk²,
A.S. Bysov^{1,2}, V.P. Polischuk²**

¹Institute of Agroecology and Nature Management of NAAS of Ukraine, 12, Metrologichna st., Kyiv, 03143, Ukraine

²Taras Shevchenko National University of Kyiv, 60, Volodymyrska st., Kyiv, 01033, Ukraine, tel.: +38 (044) 521 35 02, e-mail: tyvonchuk@ukr.net

VIRUSES OF SWEET PEPPER AT AGROCENOSIS OF UKRAINE AND SEED MATERIAL

Summary

As the result of the 5-year monitoring of Ukrainian agrieocosystems we have demonstrated the circulation of seven viruses on sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) plants, namely *Tomato spotted wilt virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Alfalfa mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus*, *Potato virus X*, *Tomato mosaic virus*, and *Pepper mild mottle virus*. The analysis of commercial seed material of sweet pepper confirmed its contamination with 4 viruses: *Tobacco mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*, and *Pepper mild mottle virus*. *Pepper mild mottle virus* has been detected both in seed and plant material of sweet pepper in Ukraine for the first time.

Key words: viruses of sweet pepper, agrocenosis, virus diagnostics, seedborne infection.



УДК 579.695

Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп,
А.Є. Бухтіяров, О.М. Захарія, Г.В. Лісютин, О.Г. Горшкова,
В.О. Іваниця

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

ВИЛУЧЕННЯ МІДІ (II) ТА НІКЕЛЮ (II) ІЗ КОНЦЕНТРОВАНИХ ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ГЛИНОЮ, ХІТОЗАНОМ ТА ІММОБІЛІЗОВАНИМИ БАКТЕРІЯМИ

*Відпрацьовано метод сорбції на природних сорбентах як окрему стадію попередньої очистки концентрованих водних розчинів від міді (II) та нікелю (II) з вихідною концентрацією металу 100 мг/л. Вперше як сорбенти використано суміші бентонітової глини з хітозаном та експериментально підібрано їх оптимальне масове співвідношення компонентів, при якому суміш виявляє у порівнянні з окремими сорбентами синергетичний ефект по сорбції міді (II) та нікелю (II) із їх індивідуальних сульфатних слабо кислих і нейтральних водних розчинів. Експериментально показано, що попередня іммобілізація непатогенних бактерій роду *Pseudomonas* на суміші глини з хітозаном (1:1 по масі), дозволяє збільшити ступінь очистки води від міді (II) з 52,3 до 98,0% та нікелю (II) з 31,5 до 59,2%.*

Ключові слова: сорбенти, бентонітова глина, хітозан, бактерії роду *Pseudomonas*, мідь (II), нікель (II), вилучення.

Джерелами надходження важких металів, зокрема міді (II) та нікелю (II), у природні водойми є технологічні водні розчини гальванічних ліній, стічних вод промислових підприємств. Мідь (також присутня у стічних водах виробництв пестицидів, лакофарбового, скляного, текстильного підприємств. Водорозчинні сполуки нікелю надходять у водойми зі стічними водами цехів нікелювання, заводів синтетичного каучуку, фабрик збагачення нікелевих руд тощо [1–4].

Мідь і нікель, на відміну від таких важких металів як свинець, ртуть або кадмій, можуть спричиняти подвійний вплив на живі організми. Не зважаючи на те, що невеликі концентрації міді (II) необхідні клітинам для побудови мідь-вмісних білків і багатьох ферментів, значні концентрації міді (II) стають токсичними для усіх типів клітин, негативно впливають на органолептичні показники води. В дуже малих мікрограмових концентраціях нікель (II) відіграє важливу роль у кровотворних процесах. А при високих концентраціях нікель, згідно проведених досліджень на

© Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп, А.Є. Бухтіяров, О.М. Захарія, Г.В. Лісютин, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця, 2012



мишах, спричиняє канцерогенну дію, викликаючи злоякісні новоутворення [5, 6].

Відомо, що метод сорбції важких металів на природних сорбентах (цеоліт, активоване вугілля, бентонітова глина) широко використовують в основному для доочистки стічних вод [7–9].

Наші дослідження спрямовані на розробку методу сорбції важких металів на природних сорбентах (бентонітова глина, хітозан) як ефективної стадії передочищення концентрованих водних розчинів за рахунок вишукуваної оптимальної комбінації глини з хітозаном і утворення на їх поверхні бактеріальної біоплівки.

Метою роботи була розробка комбінації бентонітової глини і хітозану з іммобілізованими бактеріями роду *Pseudomonas* для ефективного вилучення міді (II) та нікелю (II) із концентрованих водних розчинів.

Матеріали та методи

Як природні сорбенти міді (II) та нікелю (II) використовували бентонітову глину (далі просто глина, або Г) та хітозан (Х), який складається з 15% хітину раків і 85% хітозану. Вибір природних сорбентів, в першу чергу, був зумовлений їх доступністю в Україні та екологічною безпечністю, оскільки вони широко використовуються як ентеросорбенти.

Бентонітові глини мають шарувату структуру, складаються із мінералів монтмориллонітової групи зі змінним складом $\text{Si}_8\text{Al}_4\text{O}_{20}(\text{OH})_4 \times n\text{H}_2\text{O}$, в яких катіони кремнію (Si^{4+}) можуть замінюватися катіонами Al^{3+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} і т.д. Частинки глинистих мінералів набухають у воді і характеризуються підвищеною катіонообмінною здатністю [7].

Для біологічної модифікації природних сорбентів – глини і хітозану використовували грамнегативні непатогенні бактерії роду *Pseudomonas* – штами *P. sepaia* ОНУ 327, *P. fluorescens* ОНУ 328, *P. maltophilia* ОНУ 329. Культивували бактерії при температурі 28 °С, рН 7, на поживному пептонно-сольовому середовищі М-9, що містить (г/л): KH_2PO_4 – 1,5; Na_2HPO_4 – 3; NaCl – 5; NH_4Cl – 1; пептон – 10; глюкоза – 2; дріжджовий екстракт – 5.

Вибраний діапазон значень рН середовища зумовлений тим, що більшість стоків, які містять мідь і нікель мають слабо кисле або нейтральне середовище, і саме при таких значеннях рН важкі метали перебувають у рухливій іонній формі та виявляють максимальну токсичність. Крім того, середовище з рН близьким до нейтрального є найсприятливішим для життєдіяльності мікроорганізмів роду *Pseudomonas*.

Іммобілізацію бактерій на природних носіях здійснювали шляхом змішування сорбентів (4 г) з суспензією (100 мл) життєздатних бактерій, яка містила 1×10^9 кл/мл, та витримування впродовж 60 хв.

Розчини солей відповідних металів (Cu, Ni) з вихідною концентрацією 100 мг/л по металу готували розчиненням у 1 л дистильованої води

0,3929 г солі $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ і 0,478 г солі $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при кімнатній температурі.

Процес сорбції Cu (II) та Ni (II) на природних сорбентах із концентрованих сульфатних водних розчинів здійснювали шляхом перемішування впродовж 60 хв на шутелі та 15 хв відстоювання проб. Після цього надосади фільтрували через паперовий фільтр і фільтрат аналізували на залишковий вміст важких металів.

Ступінь очистки води від Cu (II) та Ni (II) розраховували за рівнянням:

$$a = [(C_0 - C) / C_0] \times 100\% ,$$

де C_0 і C — вихідна і залишкова концентрації важких металів.

Залишкові концентрації Cu (II) та Ni (II) у водних розчинах визначали атомно-абсорбційним методом на полум'яному атомно-абсорбційному спектрофотометрі «Сатурн» у полум'ї суміші «повітря — пропан — бутан» при довжині хвилі для Cu (II) 324,7 нм, Ni (II) — 332,0 нм [10, 11].

Усі експерименти здійснювали в п'яти повторах. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми «SPSS 19 для Windows» і «Microsoft Office Excel 2003».

Результати та їх обговорення

Експериментально виявлено синергетичну дію сорбційних властивостей природних змішаних сорбентів: суміші глини з хітозаном (Г та Х) (1:1 по масі) щодо їх здатності краще сорбувати Cu (II) та Ni (II) із їх модельних концентрованих водних розчинів, ніж окремі природні сорбенти (час відстоювання проб — 24 год). Так, при витраті 0,1 г глини і 0,1 г хітозану на 100 мл відповідного розчину металу в слабко кислому середовищі ступінь очистки води від Cu (II) сягає 52,3%, а від Ni (II) — 31,5% у порівнянні з їх сорбцією хітозаном та глиною окремо (табл. 1).

В нейтральному середовищі або середовищі, близькому до нейтрального, синергетична дія природних змішаних сорбентів зникає Ni (II) або стає малопомітною Cu (II), і здатність їх адсорбувати важкі метали наближається до адсорбційної здатності індивідуального хітозану.

Із таблиці 1 видно, що ступінь очистки води від Cu (II), що при рН 6,5–7,2 зв'язуються з гідроксид-іонами у нерозчинну форму, сумішшю глини з хітозаном складає 78,6%, а чистим хітозаном — 76,2%.

Ступінь очистки води від Ni (II) (рН початку утворення гідроксидів складає 8–10) як сумішшю глини з хітозаном, так і чистим хітозаном складає 42,3%.

Слід зазначити, що у нейтральному середовищі, досліджувані важкі метали краще сорбуються хітозаном, ніж глиною в середньому на 10–15% при однаковій витраті сорбенту — 0,1 г на 100 мл розчину відповідного металу.



Таблиця 1

Очистка концентрованих модельних водних розчинів від Cu (II) та Ni (II) глиною, хітозаном і сумішшю глини з хітозаном

Table 1

Purification of concentrated aqueous model solutions from Cu (II) and Ni (II) by clay, chitosan and a mixture of clay with chitosan

Сорбент	Залишковий вміст важких металів у воді, мг/л		Ступінь очистки води, %	
	Cu (II)	Ni (II)	Cu (II)	Ni (II)
Глина	77,8 ± 3,87	76,9 ± 4,50	22,2	23,1
Хітозан	60,4 ± 4,55	84,6 ± 4,15	39,6	15,4
Глина та хітозан	47,7 ± 4,87	68,5 ± 3,76	52,3	31,5
Глина	38,1 ± 3,63	65,4 ± 3,85	62,0	34,6
Хітозан	23,8 ± 3,81	57,7 ± 2,28	76,2	42,3
Глина та хітозан	21,4 ± 2,70	57,7 ± 2,15	78,6	42,3

Примітка: витрата сорбентів — 0,1 г глини; 0,1 г хітозану та суміш 0,1 г глини та 0,1 г хітозану на 100 мл розчину металу

Встановлено, що в нейтральному середовищі використані сорбенти (Г, Х та разом Г, Х) поглинають Cu (II) приблизно на 75%, а Ni (II) — на 42%. В слабко кислому середовищі ефективність сорбції зменшується до 50% для міді і до 30% для нікелю (табл. 1).

Таким чином, виходячи із одержаних експериментальних результатів можна зробити висновок, що для очистки води від міді (II) та нікелю (II) доцільно використовувати 2 г суміші (1:1 по масі) глини з хітозаном на обробку 1 л води при рН 6,5–7,2, при цьому ступінь очистки води від міді (II) та нікелю (II) сягає 78,6 і 42,3%, відповідно.

Важливо підвищити ефективність сорбції важких металів природними змішаними сорбентами (Г та Х) у слабко кислому середовищі, оскільки більшість технологічних водних розчинів гальваніки і металооброблювальних стічних вод мають рН < 7. Саме за цих значень рН досліджувана суміш сорбентів характеризується синергетичною дією стосовно поглинання важких металів (табл. 1). Тому подальші дослідження були спрямовані на збільшення сорбційної ємності суміші глини з хітозаном (1:1 по масі) за рахунок іммобілізації на їх поверхні грамнегативних непатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, що зберігаються в колекції Одеського національного університету. В подальших дослідженнях використовували



штами *P. ceracia* ОНУ 327, *P. fluorescens* ОНУ 328, *P. maltophilia* ОНУ 329 та їх консорціум.

Дослідження показали, що ці мікроорганізми на досліджуваних природних носіях (глині та хітозані) утворювали біоплівку (в перерахунку на бактеріальні клітини не менше 10^7 на 1 г носія) і демонстрували високу сорбційну активність до токсичних катіонів металу.

Із експериментальних даних, представлених у таблиці 2, можна дійти висновку, що попередня іммобілізація бактерій на змішаних сорбентах (суміші глини з хітозаном у співвідношенні 1:1 по масі) дозволяє значно покращити (в середньому на 25%) результати вилучення важких металів [12].

Найбільший ступінь очистки води як від Cu (II) (98,0%), так і від Ni (II) (59,2%) досягається за використання штаму *P. fluorescens* ОНУ 328 [12]. При такій біологічній модифікації природних сорбентів залишкова концентрація Cu (II) та Ni (II) складала ($2,0 \pm 0,28$) мг/л і ($40,5 \pm 2,60$) мг/л, відповідно.

Таблиця 2

Очистка води від Cu (II) і Ni (II) глиною та хітозаном з іммобілізованими бактеріями роду *Pseudomonas*

Table 2

Water purification from Cu (II) and Ni (II) by clay and chitosan with immobilized bacteria of the genus *Pseudomonas*

Штам	Залишковий вміст важких металів у воді, мг/л		Ступінь очистки води, %	
	Cu (II)	Ni (II)	Cu (II)	Ni (II)
<i>P. fluorescens</i> ОНУ 328	$2,0 \pm 0,28$	$40,5 \pm 2,60$	98,0	59,5
<i>P. maltophilia</i> ОНУ 329	$21,1 \pm 3,00$	$49,2 \pm 3,40$	78,9	50,8
<i>P. ceracia</i> ОНУ 327	$2,0 \pm 0,37$	$51,5 \pm 5,50$	98,0	48,5
Консорціум	$2,0 \pm 0,23$	$59,2 \pm 3,20$	98,0	40,8

Примітка: витрата сорбентів — 0,2 г глини та 0,2 г хітозану на 100 мл розчину металу за рН 5,0–5,5.

Таким чином, експериментально доведено, що біологічна модифікація природних сорбентів — суміші глини з хітозаном (1:1 по масі) шляхом іммобілізації на них непатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, дозволяє збільшити ступінь очистки води від Cu (II) з 52,3 до 98,0% та Ni (II) з 31,5 до 59,2%. Отже, сорбцію важких металів на глині та хітозані (1:1 по масі) з іммобілізованими мікроорганізмами можна досить ефективно використовувати як окрему стадію попередньої очистки концентрованих



металовмісних технологічних водних розчинів гальванічних цехів, стічних вод металооброблювального виробництва, фабрик збагачення нікелевих руд тощо, і рекомендувати включити її до технологічних схем комплексної глибокої очистки води від важких металів [13]. Слід зазначити, що відпрацьовані природні техногенні сорбенти, що містять важкі метали, можуть бути використані у виробництві будівельних матеріалів та в інших цілях [14].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Вредные вещества в промышленности*. Т. 3. — 7-е изд., перераб. и доп. Л.: Химия. 1977. — 605 с.
2. *Грушко Я.М.* Вредные неорганические соединения в промышленных сточных водах. — Л.: Химия, 1979. — 161 с.
3. *Виноградов С.С.* Экологически безопасное гальваническое производство. — М.: Глобус. 1998. — 302 с.
4. *Варламова С.И., Климов Е.С.* Экологическая безопасность предприятий машиностроения (Обзор современного состояния проблемы). Изв. вузов. Северо-Кавказский регион. Технические науки. — 2005. — Приложение № 2. — С. 163—168.
5. *Некоторые вопросы токсичности ионов металлов* / Под ред. Х. Зигеля, А.М. Зигеля. — М.: Мир, 1993. — 230 с.
6. *Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П.* Тяжелые металлы во внешней среде. Современные гигиенические и токсикологические аспекты. — Минск: Наука и техника, 1994. — 285 с.
7. *Тарасевич Ю.И.* Природные сорбенты в процессах очистки воды. — К.: Наук. думка, 1981. — 208 с.
8. *Климов Е.С., Бузаева М.В.* Природные сорбенты и комплексоны в очистке сточных вод. — Ульяновск: УлГТУ, 2011. — 201 с.
9. *Оразова С.С., Белов В.М., Евстигнеев В.В.* Эффективность использования природных сорбентов Восточного Казахстана в очистке воды от ионов тяжелых металлов (Cu^{2+}) // Изв. Томского политехн. ун-та. — 2007. — Т. 311, № 2. — С. 150—152.
10. *Практическое руководство по неорганическому анализу*. Пер. с англ. Е.И. Гульдиной, Ю.Ю. Лурье / Под ред. Ю.Ю. Лурье. — М.: Изд-во хим. лит-ры, 1960 — 1016 с.
11. *Марченко З.М.* Фотометрическое определение элементов. — М.: Мир, 1971. — 502 с.
12. *Волювач О.В., Пузырева И.В., Иваница В.А., Гудзенко Т.В., Беляева Т.А., Конуп И.П., Бухтияров А.Е., Лисютин Г.В., Горшкова Е.Г., Захария А.Н.* Биотехнология очистки водной среды от меди // Материалы VIII междунар. конф. «Микробные биотехнологии: актуальность и будущее (daRostim-2012)». — Киев, 19—22 ноября 2012г. — С. 68—70.

13. Запольский А.К., Образцов В.В. Комплексная переработка сточных вод гальванического производства. — К.: Техника, 1989. — 197 с.

14. Дворкин Л.И., Шестаков В.Л., Пашков И.А., Дымчук А.П. Отходы химической промышленности в производстве строительных материалов. — К.: Будівельник, 1986. — 128 с.

Стаття надійшла до редакції 7.12.2012 р.

**Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.А. Беляева, І.П. Конуп, А.Є. Бухтияров,
А.Н. Захария, Г.В. Лисютин, Е.Г. Горшкова, В.А. Иваница**

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

ИЗВЛЕЧЕНИЕ МЕДИ (II) И НИКЕЛЯ (II) ИЗ КОНЦЕНТРИРОВАННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ГЛИНОЙ, ХИТОЗАНОМ И ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Реферат

Разработан метод сорбции на природных сорбентах как отдельная стадия предварительной очистки концентрированных водных растворов от меди (II) и никеля (II) с исходной концентрацией до 100 мг/л по металлу. Впервые использованы в качестве сорбентов смеси бентонитовой глины с хитозаном и экспериментально подобрано оптимальное соотношение компонентов (1:1 по массе), при котором смесь обнаруживает синергетический эффект по сорбции меди (II) и никеля (II) из их индивидуальных сульфатных слабокислых и нейтральных водных растворов. Экспериментально показано, что предварительная иммобилизация на смеси глины с хитозаном (1:1 по массе) непатогенных бактерий рода *Pseudomonas*, позволяет повысить степень очистки воды от меди (II) с 52,3 до 98,0% и никеля (II) с 31,5 до 59,2%.

Ключевые слова: сорбенты, бентонитовая глина, хитозан, бактерии рода *Pseudomonas*, медь, никель, извлечение.



**T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beljaeva, I.P. Konup,
A.E. Buchtiarov, O.M. Zacharia, G.V. Lisyutin, O.G. Gorshkova,
V.O. Ivanytsia**

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

EXTRACTION OF COPPER (II) AND NICKEL (II) FROM CONCENTRATED AQUEOUS SOLUTIONS OF CLAY, CHITOSAN AND IMMOBILIZED BACTERIA

Summary

There were tested the method of sorption on natural sorbents as a separate pre-treatment stage of concentrated aqueous solutions of copper (II) and nickel (II) with initial concentration of 100 mg/l for metal. There were used for the first time as a sorbent of bentonic clay with chitosan and experimentally selected the optimal weight ratio of components 1-1, which showed the mixture possessed a synergistic effect on sorption of copper (II) and nickel (II) from their individual sulfate weakly acidic and neutral aqueous solutions. It was shown experimentally that preliminarily immobilization in the mixture of clay with chitosan (1:1 by weight) of nonpathogenic bacteria of the genus *Pseudomonas*, can increase the degree of purification of water from copper (II) and nickel (II) from 52.3 to 98.0% and from 31.5 to 59.2%, respectively.

Key words: sorbents, clay, chitosan, bacteria of the genus *Pseudomonas*, copper, nickel, extraction.



УДК 577.152.311/547.8/548.73

**С.С. Декіна, А.М. Овсепян, А.Г. Артеменко,
І.І. Романовська, В.Є. Кузьмін**

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога 86, Одеса, 65080, тел.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: s.dekina@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІОНІВ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ ЛІЗОЦИМУ МЕТОДОМ QSAR АНАЛІЗУ

Досліджено вплив 16 хлоридів металів на гідролітичну активність лізоциму. Показано, що всі катіони пригнічують активність лізоциму, при цьому найбільш істотний вплив мають іони Al^{3+} , La^{3+} , Fe^{2+} , Li^+ , інгібуючи бактеріолітичну активність ферменту на 64,0–85,7% в концентрації 5 ммоль/дм³. Методом QSAR аналізу вперше отримано трьохпараметрову модель, з використанням як дескрипторів електронегативності за Полінгом, ентропії і ентальпії іонів металів у водному розчині, що описує вплив широкого набору хлоридів металів на активність лізоциму.

Ключові слова: лізоцим білка курячого яйця, іони металів, інгібування, QSAR аналіз.

Лізоцим (КФ 3.2.1.17) — гідролітичний фермент, що широко застосовується в терапії різних інфекційно-запальних та гнійно-септичних захворювань, для імунокорекції [6]. Незважаючи на досить високу стабільність, лізоцим частково або повністю втрачає гідролітичну активність в присутності іонів металів. З даних літератури відомо про вплив деяких катіонів (Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , тривалентні іони лантанідів та ін.) на активність лізоциму; дослідження проводили з використанням методів денситометрії, віскозиметрії, спектрометрії, рефрактометрії, мікрокалориметрії, рентгеноструктурного аналізу [8, 12–14]. Оцінити внесок фізико-хімічних параметрів, що описують властивості іонів металів, у втрату активності лізоцимом, ми спробували вперше за допомогою QSAR аналізу (Quantitative Structure Activity Relationship). Подібні дослідження були проведені для карбоксилестерази печінки свині, що дозволило з високим ступенем вірогідності прогнозувати активність ферменту в присутності іонів металів [1]. У літературі стосовно лізоциму метод QSAR успішно використовували для пошуку зв'язку структура-властивість в системі «лізоцим-антитіла», «лізоцим-біофлавоноїди» [9, 15].



Метою роботи було дослідження впливу низки іонів металів з широким набором характеристик на гідролітичну активність лізоциму методом QSAR.

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували комерційний препарат лізоциму яєчного білка («Applichem», Бельгія), ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) (Мерск, Німеччина), хлориди металів («ТОР», Україна).

Гідролітичну активність лізоциму визначали бактеріолітичним методом в буферному розчині (імідазол-хлористоводнева кислота, рН 6,2, 0,1 моль/дм³), використовуючи як субстрат ацетоновий порошок *Micrococcus lysodeikticus* (штам 2665) [4]. За одиницю активності ферменту приймали таку його кількість, яка знижує оптичну густину суспензії клітин на 0,001 за 1 хв при 55 °С.

Вміст білка в препараті визначали методом Лоурі-Хартрі [11].

Вплив іонів металів визначали за зміною гідролітичної активності лізоциму, попередньо витримуючи фермент від 10 до 120 хв в їх присутності (кінцева концентрація хлоридів металів становила 5 ммоль/дм³).

Для пошуку зв'язку «структура-властивість» використовувався метод множинної лінійної регресії [7]. Як дескриптори, що описують властивості іонів металів, аналізували близько 70 характеристик [2], у тому числі:

- ефективні заряди атомів в основному стані;
- ефективні заряди ядер для різних валентних станів атомів;
- потенціали іонізації елементів;
- енергії дисоціації для солей Cl;
- середні енергії зв'язків у молекулах типу MCl_x;
- електронегативність елементів за шкалою Полінга;
- термодинамічні електронегативності;
- іонізаційні електронегативності елементів;
- довжини зв'язків в галогенідах типу MeCl_x;
- атомні радіуси;
- іонні радіуси;
- рекомендовані електронегативності елементів;
- спорідненість до електрону;
- основні термодинамічні характеристики;
- термодинамічні характеристики іонів і нейтральних молекул у водному розчині;
- енергія кристалічних решіток іонних сполук;
- стандартні електронні потенціали у водних розчинах та ін.

Результати та обговорення

Дослідження впливу 16 хлоридів металів на гідролітичну активність лізоциму показало, що їх додавання до розчину ферменту та витримання

протягом 2 год, в усіх випадках призводить до зниження ферментативної активності.

Найнижча гідролітична активність спостерігається при взаємодії лізоциму з катіонами тривалентних металів La^{3+} (33,0%), Al^{3+} (14,3%) (рис. 1). Інгібування активності ензиму у випадку з залізом Fe^{2+} (37,8%) можливо відбувається через зміну валентості катіону з Fe^{2+} на Fe^{3+} , а Li^+ (активність ензиму 34,8%) (на відміну від Na^+ і K^+) належить до токсичних біологічно активних катіонів, і утворює з лізоцимом міцний комплекс, суттєво змінюючи конформацію білкової молекули [5, 10].

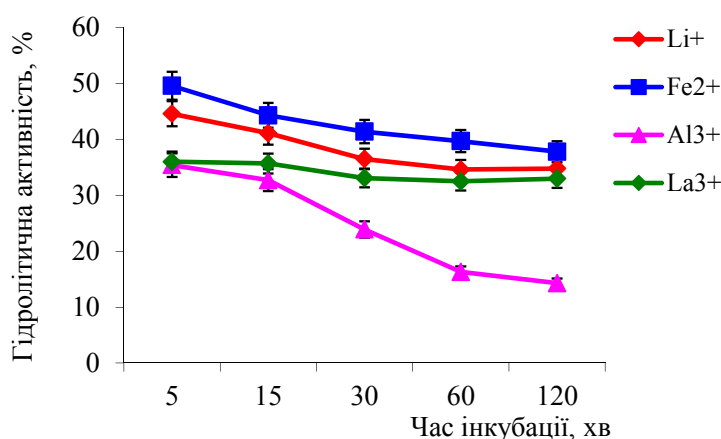


Рис. 1. Залежність гідролітичної активності лізоциму в присутності катіонів La^{3+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Li^+ від часу інкубації у 0,1 М буферному розчині імідазол- HCl (рН 6,2, 55 °С)

Fig. 1. Dependence of lysozyme hydrolytic activity in the presence of cations La^{3+} , Al^{3+} , Fe^{2+} , Li^+ (рН 6,2; 0,1 М imidazole- HCl , 55 °С)

Як показано в роботі [14], іони металів знижують ефективність перетворення субстрату в активному центрі лізоциму внаслідок можливого конкурентного інгібування, а також можливого зв'язування поза активним центром з вільними функціональними групами, що впливають на каталітичні властивості ензиму [3].

Для кількісної оцінки впливу іонів металів на каталітичну активність лізоциму був застосований метод покрокової лінійної регресії [7]. Вся вибірка була розділена на два набори: навчальний (13 іонів) і тестовий (3 іони). До тестового набору були віднесені випадкові іони металів з різних груп активності (Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+}). У результаті була отримана адекватна трьохпараметрова QSPR модель, що описує гідролітичну активність лізоциму (A, %) в присутності хлоридів металів:

$$A = -173 + 0,52 S^\circ + 151 \text{EN} - 0,22 \Delta fH^\circ,$$

де EN — електронегативність за Полінгом,

S° , ΔfH° — ентропія і ентальпія іонів металів у водному розчині.



Статистичні характеристики моделі: коефіцієнт кореляції $R=0,89$; середньоквадратична помилка прогнозування $SE=9,2$; критерій Фішера $F=12,56$, що перевищує критичне значення ($F_{кр}=7,49$) для рівня значущості $0,99$.

Моделі також є стійкою (коефіцієнт кореляції в умовах ковзного контролю $Q^2=0,66$), має хорошу здатність прогнозування ($R^2_{test}=0,96$).

Дослідні і прогнозовані значення збереження гідролітичної активності лізоциму в присутності хлоридів металів і вихідні значення структурних параметрів, задіяних в отриманій регресійній моделі, представлені в таблиці.

Таблиця

Дослідні і прогнозовані значення гідролітичної активності лізоциму і вихідні значення структурних параметрів, задіяних в отриманій регресійній моделі

Table

Observed and predicated values of lysozyme hydrolytic activity and output data of structural parameters used in the regressive model

Катіон	Активність лізоциму, А, %, $M \pm m$	Ентропія іонів в водному розчині, S° , Дж/моль · К	Електро-негативність за Полінгом, EN	Ентальпія іонів металів в водному розчині, ΔfH° , кДж/моль	Прогнозована активність, А, %
Li ⁺	34,8±2,4	13,4	1,0	278,5	42,2
Na ⁺	67,4±3,4	59,0	0,9	-240,1	50,2
K ⁺	50,0±2,5	102,5	0,8	-252,4	59,0
Cs ⁺	73,6±3,7	133,1	0,8	-258,3	71,8
Mn ²⁺	70,9±3,5	-73,6	1,6	-220,8	70,1
Fe ²⁺	37,8±1,9	-137,7	1,8	-89,1	50,1
Co ²⁺	72,9±3,7	-113,0	1,9	-58,2	63,8
Cu ²⁺	75,2±3,8	-98,7	1,9	-64,4	75,2
Mg ²⁺	68,4±3,4	-138,1	1,3	-466,9	53,8
Ca ²⁺	64,0±3,2	-53,1	1,0	-542,8	68,0
Zn ²⁺	47,1±2,4	-112,1	1,7	-153,9	50,5
Sr ²⁺	69,4±3,5	-32,6	1,0	-545,8	71,9
Cd ²⁺	58,3±2,9	-73,2	1,7	-75,9	59,9
Ba ²⁺	77,7±3,9	9,6	0,9	-537,6	83,1
Al ³⁺	14,3±0,7	-321,7	1,6	-531,0	16,9
La ³⁺	33,0±1,6	-217,6	1,1	-707,1	32,8

Співвідношення дослідних і прогнозованих значень активності лізоциму для навчальної та тестової виборки, представлено на рис. 2.

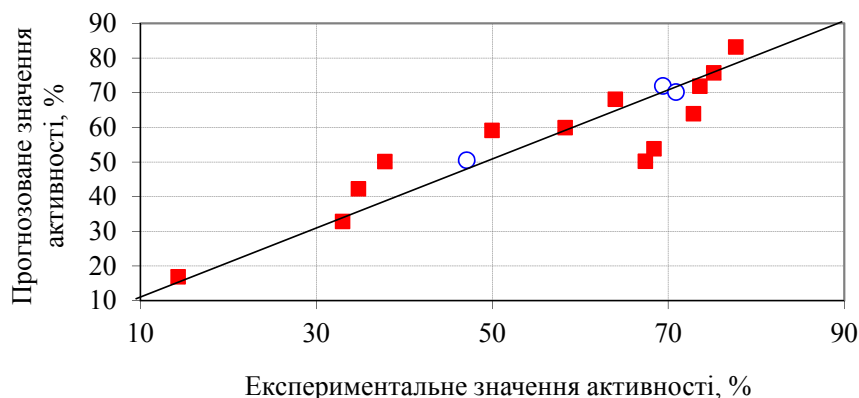


Рис. 2. Дослідні (■) і прогнозовані (○) значення гідролітичної активності лізоциму
 Fig. 2. Observed (■) and predicted (○) values of lysozyme hydrolytic activity

На діаграмі (рис. 3) наведені відсоткові співвідношення абсолютних величин нормованих внесків структурних параметрів у досліджувану активність — всі три параметри однаковою мірою впливають на зміну гідролітичної активності.

Виходячи з рівняння, гідролітична активність лізоциму збільшується у присутності іонів металів з високою електронегативністю і їх ентропією у водному розчині та низькою ентальпією у такому.

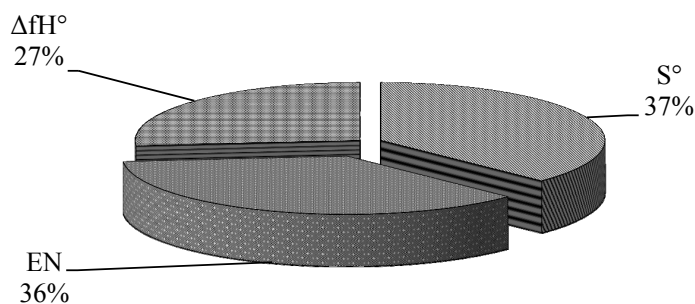


Рис. 3. Співвідношення абсолютних величин нормованих внесків структурних дескрипторів в досліджувану властивість

Fig. 3. Percentage of the absolute values of the normalized contributions of the structural parameters in the property under consideration

Встановлено пригнічувальний вплив хлоридів металів на каталітичну активність лізоциму. З використанням ентропії і ентальпії іонів металів у водному розчині, а також іонізаційної електронегативності, як дескрипторів, вперше отримана QSAR модель, що адекватно описує вплив іонів металів на активність лізоциму.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Андронати С.А., Шестеренко Е.А., Артеменко А. Г. и др. Исследование влияния ионов металлов на активность карбоксилэстеразы печени свиньи методом QSAR // Доповіді НАН України. — 2012. — № 9. — С. 154–158
2. Волков А.И., Жарский И.М. Большой химический справочник. — Минск: Современная школа, 2005. — 608 с.
3. Гудзенко Е.В., Борзова Н.В., Варбанец Л.Д. Влияние ионов металлов и специфических химических реагентов на активность α -L-рамнозидазы *Eupeucillium erubescens* // Укр. біохім. журн. — 2012. — Т. 84, № 2. — С. 30–40.
4. Декина С.С., Романовская И.И., Громовой Т.Ю. Влияние полимеров на процессы ассоциации молекул лизоцима // Biopolymers and cells. — 2011. — V. 27, № 6. — P. 442–445.
5. Коршун М.Н., Краснокутская Л.М. Соли как объект гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны // Український журнал з проблем медицини праці. — 2011. — Т. 25, № 1. — С. 35–41.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства. В двух томах. Т. 2. — Изд. 13-е, новое. — Харьков: Торсинг, 1997. — 432 с.
7. Фёрстер Э., Рёньц Б. Методы корреляционного и регрессионного анализа. — М.: Финансы и статистика, 1983. — 304 с.
8. Abad C., Trueba M., Campos A. Dilatometric, refractometric and viscometric study of lysozyme-cation interaction // Biophysical chemistry. — 1987. — V. 14. — P. 293–300.
9. Freyhult E.K., Andersson K., Gustafsson M.G. Structural modelling extends QSAR analysis of antibody-lysozyme interactions to 3D-QSAR // Biophysical journal. — 2003. — V. 84. — P. 2264–2272.
10. Hamaguchi K., Kurono A., Goto S. Structure of muramidase (lysozyme) II. Effect of lithium chloride and bromide on the stability of muramidase // The journal of biochemistry. — 1963. — 54, № 3. — P. 259–266.
11. 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.
12. Hughes A.J., Hussain R., Cosentino C. et al. A zinc complex of heparan sulfate destabilises lysozyme and alters its conformation // Biochemical and biophysical research communications. — 2012. — V. 425. — P. 794–799.
13. Ostroy F., Gams R.A., Glickson J.D. et al. Inhibition of lysozyme by polyvalent metal ions // Biochimica et biophysica acta. — 1978. — V. 527. — P. 56–62.
14. Olmo R., Huerta P., Blanco D. et al. Viscometric, densimetric, and spectrophotometric study of lysozyme-Zn (II) and lysozyme-Hg (II)



interactions // Journal of inorganic biochemistry. — 1992. — V. 47. — P. 89–97.

15. Yang R., Yu L., Zeng H., Liang R., Chen X., Qu L. The interaction of flavonoid-lysozyme and the relationship between molecular structure of flavonoids and their binding activity to lysozyme // Journal of fluorescence. — 2012. — V. 22 (6). — P. 1449–1459.

Стаття надійшла до редакції 05.12.2012 р.

УДК 577.152.311/547.8/548.73

С.С. Декина, И.И. Романовская, А.М. Овсепян, А.Г. Артеменко,
В.Е. Кузьмин

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дорога 86, Одесса, 65080, тел.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: s.dekina@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА МЕТОДОМ QSAR АНАЛИЗА

Реферат

Исследовано влияние 16 хлоридов металлов на гидролитическую активность лизоцима. Показано, что все катионы угнетают активность лизоцима, при этом наиболее существенное влияние оказывают ионы Al^{3+} , La^{3+} , Fe^{2+} , Li^{+} , ингибирующие активность фермента на 64–85,7% в концентрации 5 ммоль/дм³. Методом QSAR анализа впервые получена трехпараметровая модель, с использованием в качестве дескрипторов электроотрицательности по Полингу, энтропии и энтальпии ионов металлов в водном растворе, описывающая влияние широкого набора хлоридов металлов на активность лизоцима.

Ключевые слова: лизоцим белка куриного яйца, ионы металлов, ингибиторы, QSAR анализ.



**S.S. Dekina, I.I. Romanovska, A.M. Ovsepyan, A.G. Artemenko,
V.E. Kuzmin**

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine,
86, Lustdorfskaya St., Odesa, Ukraine, 65080, tel.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: s.dekina@gmail.com

INVESTIGATION OF METAL IONS INFLUENCE ON LYSOZYME ACTIVITY BY THE QSAR ANALYSIS METHOD

Summary

The influence of 16 metal chlorides on lysozyme hydrolytic activity was studied. All cations, as it was shown, depresses lysozyme activity, besides the most significant influence exerts Al^{3+} , La^{3+} , Fe^{2+} and Li^{+} ions, inhibiting the enzyme activity on 64–85.7% in concentration of 5 mmol/dm³. For the first time, by the QSAR analysis method, the three parametric model was obtained, using, as descriptors, the Pauling's electronegativity, entropy and enthalpy of metal ions in aqueous solution, describing the influence of a wide range of metal chlorides on lysozyme activity.

Key words: hen eggs white lysozyme, metal ions, inhibitors, QSAR analysis.



УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильєва, Т.В. Гудзенко, М.М. Панченко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ШТАМУ *BACILLUS THURINGIENSIS* ONU 15

Методом математичного планування експериментів оптимізовано склад поживного середовища для культивування штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15, ентомопатогенного для двокрилих комах-шкідників істівних грибів. Оптимізація середовища базувалася на плануванні з використанням центрального композиційного ортогонального плану. Параметрами оптимізації слугували загальна чисельність бактерій та спор штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15. В результаті проведених досліджень розроблено поживне середовище (пептон – 7,3 г/л, дріжджовий екстракт – 3,0 г/л, глюкоза – 2,5 г/л, K_2HPO_4 – 5,0 г/л, KH_2PO_4 – 5,0 г/л, Na цитрат – 3,0 г/л, Na_2HPO_4 – 1,5 г/л, $MgSO_4$ – 0,05 г/л, $MnSO_4$ – 0,03 г/л та $CaCl_2$ – 0,05 г/л), на якому кількість бактерій у порівнянні з вихідним середовищем зростає до $184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$ КУО/мл.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, оптимізація складу поживного середовища, центральний композиційний ортогональний експеримент.

Одними з найбільш перспективних напрямків захисту грибів, що культивуються, від комах-шкідників є застосування препаратів на основі ентомопатогенних бактерій [16]. В Одеському національному університеті вперше розроблено технологію культивування комах-шкідників *Bradysia pilistriata*, методику визначення ларвіцидної активності бактерій та отримано штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15 – патогенний для комах родини *Mycetophilidae*, *Sciaridae* та *Culicidae*, зокрема для брадисій – основного шкідника міцелію та плодових тіл істівних та лікарських грибів [2, 7]. За використання бактерій штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15 в лабораторних умовах гине до 90% личинок комах-шкідників [3].

Для одержання ентомопатогенного препарату постала задача підбору та оптимізації складу поживного середовища для культивування цих бактерій. Використання математичних методів планування і обробки результатів експериментів значно скорочує трудомісткість і тривалість цієї роботи. Планування експерименту дозволяє варіювати одночасно

© Н.Ю. Васильєва, Т.В. Гудзенко, М.М. Панченко, В.О. Іваниця, 2012



важливі фактори і отримувати кількісні оцінки як самих факторів, так і ефектів взаємодії між ними [5, 9].

Метою роботи було створення та оптимізація складу поживного середовища, здатного підвищити загальний урожай бактерій і ендоспор ентомопатогенного штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15, з застосуванням методу математичного планування експерименту на підставі центрального композиційного ортогонального плану.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам *Bacillus thuringiensis* ONU 15 ізольований у 2007 році на кафедрі мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова з тіла комахи — мешканця плодового тіла їстівного гриба *Pleurotus ostreatus* [3].

Штам *Bacillus thuringiensis* ONU 15 зберігається в колекції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова та задепоновано в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України як *Bacillus thuringiensis* IMB В-7370.

Культивування здійснювали на шейкері-інкубаторі Innova 43R NewBrunswick у флаконах з 50 мл середовища при 150 об/хв, впродовж 48 год при температурі 30 °С.

Приріст бактерій визначали за зміною показника оптичної щільності на спектрофотометрі Specol-10 (Perkin Elmer USA) при довжині хвилі 540 нм.

Титр клітин визначали методом серійних розведень з подальшим висівом на щільне середовище МПА, титр спор — методом серійних розведень після попередньої термічної обробки культури при 80 °С впродовж 30 хв [4].

Вихідним для проведення оптимізації був склад поживного середовища такого складу (г/л): пептон — 10,0; дріжджовий екстракт — 2,0; глюкоза — 6,0; K_2HPO_4 — 5,0; KH_2PO_4 — 5,0; Na цитрат — 3,0; Na_2HPO_4 — 1,5; $MnSO_4$ — 0,03; $MgSO_4$ — 0,05; $CaCl_2$ — 0,05.

Склад середовища оптимізували за допомогою центрального композиційного ортогонального експерименту [5, 9]. Критеріями оптимізації слугували показники загальної кількості життєздатних клітин і ендоспор [5, 8, 9].

Математичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2007 і MatLab R2009a.

Результати та їх обговорення

На першому етапі розробки оптимального складу поживного середовища було перевірено вплив джерел енергії та вуглецю і мінеральних компонентів на ріст бактерій штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15.

Виходячи з даних літератури, орієнтувалися на склад середовища, органічна складова якого збалансована за співвідношенням вуглецю та

азоту, що є необхідним для росту культури, оскільки саме ці компоненти впливають, як на конструктивний обмін гетеротрофного мікроорганізму, так і на синтез його ферментів. На думку деяких авторів, саме це визначає найкращий ріст бактерій, що утворюють спори [1, 6]. Внесення глюкози до середовища стимулює спорування і стабілізує стаціонарну фазу росту мікроорганізмів [11].

Для вибору найбільш оптимального складу поживного середовища для росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15, визначили показники росту бацил на середовищах з різними комбінаціями джерел енергії та вуглецю (табл. 1).

Таблиця 1

Комбінації джерел енергії та вуглецю в складі середовищ

Table 1

Combinations of the sources of energy and carbon in the experiments

Варіант	Органічний компонент (г/л)				
	пептон	казеїн	дріжджовий екстракт	глюкоза	МПБ
А	5,0	2,5	1,1	1,1	-
Б	5,0	5,0	1,0	5,0	-
Г	10,0	-	2,0	6,0	-
Д	5,0	2,5	1,0	1,0	3,0

До кожного з варіантів досліду додавали комбінацію солей $MgSO_4$ (0,05 г/л), $MnSO_4$ (0,03 г/л) та $CaCl_2$ (0,05 г/л). Ці фактори відносяться до групи мінеральних сполук, які є необхідними для росту бактерій. Марганець є кофактором фосфогліцеролмутази, яка бере участь в процесі спорування [1, 12], а кальцій входить до складу солі діпіколінової кислоти, що є важливим компонентом ендоспор бактерій роду *Bacillus* [1].

Як видно з кривих росту штаму *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15, наведених на рисунку 1, найкращою комбінацією органічних компонентів для цього штаму є варіант Г, який містить пептон, дріжджовий екстракт та глюкозу (табл. 1). У цьому випадку штам раніше виходив на стаціонарну фазу росту (28 год) і досягав максимального показника оптичної щільності. Найбільші показники питомої швидкості росту ($0,19 \text{ год}^{-1}$), загальної кількості життєздатних клітин ($140,6 \pm 15,8 \times 10^{10}$ КУО/мл) та кількості спор ($9,25 \pm 2,6 \times 10^8$ КУО/мл) також реєстрували на цьому варіанті середовища (табл. 2).

Ґрунтуючись на отриманих результатах, для подальшої роботи з оптимізації поживного середовища джерелом енергії та вуглецю вибрали комбінацію з пептону (10,0 г/л), дріжджового екстракту (2,0 г/л) та глюкози (6,0 г/л).



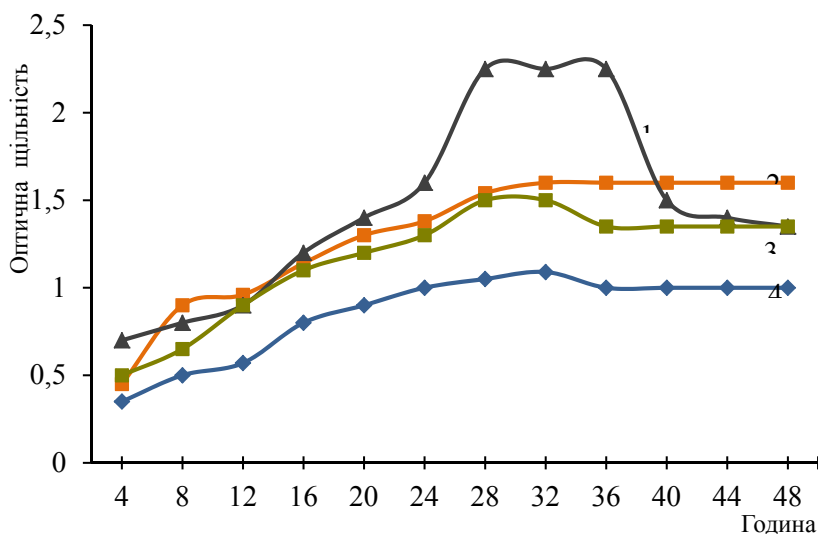


Рис. 1. Криві росту *Bacillus thuringiensis* ONU 15 за різних джерел енергії та вуглецю
1 – варіант А; 2 – варіант Б; 3 – варіант Г; 4 – варіант Д

Fig. 1. The growth curves of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15 at different sources of energy and carbon
1 – variant A; 2 – variant B; 3 – variant Г; 4 – variant Д

Мінеральним фоном обрали середовище Кантвелла (K_2HPO_4 – 5,0 г/л, KH_2PO_4 – 5,0 г/л, Na цитрат – 3,0 г/л, Na_2HPO_4 – 1,5 г/л). Як інший варіант мінерального фону використовували тільки гідроортофосфат калію (K_2HPO_4 – 1,0 г/л). Даний вибір базується на дослідженнях, які були проведені раніше. Також до кожного з варіантів дослідів, як і раніше, додавали комбінацію солей $MgSO_4$, $MnSO_4$ та $CaCl_2$.

Таблиця 2

Показники росту штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 15 за різних композицій джерел енергії та вуглецю

Table 2

The growth parameters of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15 at different combinations of sources of energy and carbon

Варіант дослідів	Показник оптичної щільності (D)	Питома швидкість росту (год ⁻¹)	Час подвоєння клітин (год)	Кількість спор/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)	Загальна кількість клітин/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)
А	1,00	0,11	6,30	$8,5 \pm 0,9 \times 10^8$	$1,5 \pm 0,5 \times 10^{10}$
Б	1,60	0,15	4,60	$2,3 \pm 0,1 \times 10^8$	$5,1 \pm 3,1 \times 10^{10}$
В	2,25	0,19	3,64	$9,2 \pm 2,6 \times 10^8$	$140 \pm 15 \times 10^{10}$
Г	1,35	0,12	5,70	$1,6 \pm 0,2 \times 10^8$	$3,0 \pm 0,4 \times 10^{10}$

На рис. 2 наведені криві росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 залежно від обраних мінеральних фонів у порівнянні з варіантом без них. Отримані дані повністю співпадають з літературними джерелами і підтверджують, що додавання до комбінації органічних компонентів мінеральних сполук, стабілізує ріст бацилярних штамів та продовжує стадію стаціонарного зростання [1, 6]. Показник загальної кількості клітин, свідчить про те, що мінеральний фон середовища Кантвелла сприяє збільшенню загальної чисельності клітин бактеріального штаму до $156,5 \pm 3,1 \times 10^{10}$ КУО/мл (табл. 3). Однак, показники кількості спор на цьому середовищі були мінімальними ($79,0 \pm 6,5 \times 10^7$ КУО/мл).

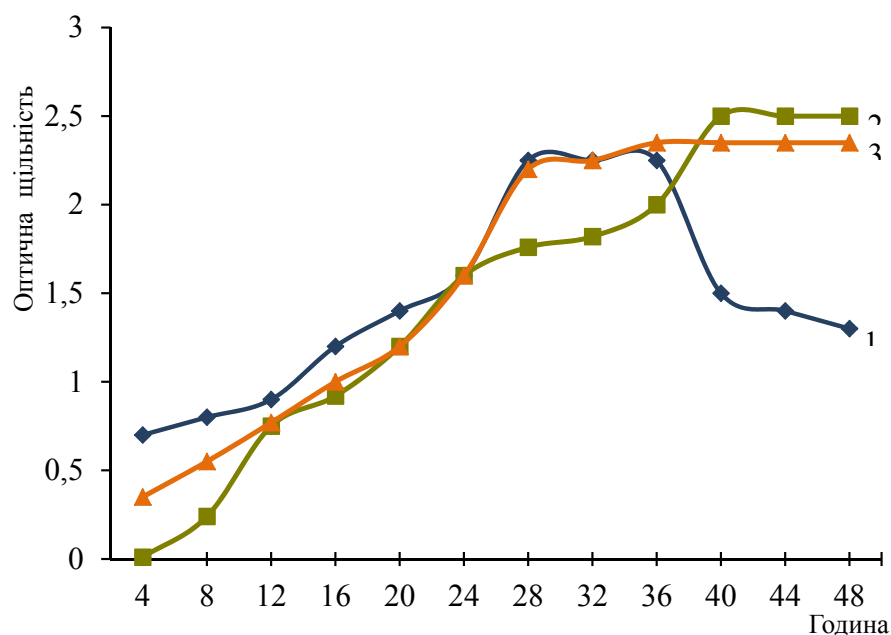


Рис. 2. Криві росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 в залежності від мінерального складу середовища

1 — поживне середовище без мінерального фону; 2 — поживне середовище з мінеральним фоном Кантвелла; 3 — поживне середовище с гідроортофосфатом калію

Fig. 2. The growth curves of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15 depending on the mineral composition of medium

1 — culture medium without mineral background; 2 — culture medium with Cantwell's mineral background; 3 — culture medium with potassium hydrogen phosphate

При використанні гідроортофосфату калію як мінерального фону, показано, що цей варіант середовища є найсприятливішим для процесу спороутворення бактеріями *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15. Концентрація спор досягала максимального значення — $81,1 \pm 4,2 \times 10^8$ КУО/мл за максимальної ($0,22 \text{ час}^{-1}$) питомої швидкості росту (табл. 3).



Таблиця 3

Показники росту *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 в залежності від мінерального складу середовища

Table 3

The parameters of growth of strain *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 in depending on various mineral composition

Варіант	Оптична щільність	Питома швидкість росту (год ⁻¹)	Час подвоєння (год)	Кількість спор/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)	Кількість бактерій кл/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)
Середовище без мінерального фону	2,25	0,19	3,64	$9,2 \pm 1,4 \times 10^8$	$140,6 \pm 15,8 \times 10^{10}$
Середовище з мінеральним фоном Кантвелла	2,5	0,2	3,46	$79,0 \pm 6,5 \times 10^7$	$156,5 \pm 3,1 \times 10^{10}$
Середовище з гідроортофосфатом калію	2,35	0,22	3,15	$81,1 \pm 4,2 \times 10^8$	$152,3 \pm 1,8 \times 10^{10}$

Таким чином, отримані дані свідчать про те, що значимими факторами для збільшення кількості вегетативних бактерій *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 є пептон, дріжджовий екстракт і глюкоза. У подальшій роботі з оптимізації поживного середовища ці компоненти позначатимуться як чинники: x_1 — пептон, x_2 — дріжджовий екстракт, x_3 — глюкоза. Кожен з цих факторів досліджували на трьох рівнях — нижньому, середньому і верхньому (табл. 4) та у «зоряних точках» (табл. 5).

Таблиця 4

Одиниці варіювання (λ) і концентрації компонентів середовищ на нижньому (-1), середньому (0) і верхньому рівнях (+1)

Table 4

Units of variation (λ) and the concentration of media components on the bottom (1), the middle and upper levels (+1)

Компонент середовища	Фактор	Нижній рівень (-1)	Середній рівень (0)	Верхній рівень (+1)	Одиниця варіювання (λ)
Пептон	x_1	5,0	7,5	10,0	2,5
Дріжджовий екстракт	x_2	1,0	3,0	5,0	2,0
Глюкоза	x_3	1	3,5	6,0	2,5

Оптимізацію середовища оцінювали за концентрацією вегетативних клітин (Y1) та спор (Y2) *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15. Грунтуючись на отриманих попередніх даних про вплив мінерального фону, при проведенні

Таблиця 5

Значення факторів матриці планування центрального композиційного ортогонального експерименту

Table 5

The numerical value of factors in the matrix for the central composite orthogonal design

№ досліджу	Рівні факторів											
	x_1	x_2	x_3	x_1^2	x_2^2	x_3^2	$x_1 x_2$	$x_1 x_3$	$x_2 x_3$	$x_1 x_2 x_3$	$x_1^2 x_2$	$x_1^2 x_3$
1	-1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	+1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	-1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	+1	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	-1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	-1	+1	-1	-1	-1
6	+1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	-1	-1	-1	+1	+1	+1
7	-1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	+1	+1
8	+1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	0	0	0	0	0	0
9	-1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	0	0
10	+1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	0	0
11	0	-1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	0	0
12	0	+1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	0	0
13	0	0	-1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	0	0
14	0	0	+1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	-0,73	-0,73	-0,73	0	0	0	0	0	0



оптимізації для першої моделі (Y1) додавали мінеральний фон Кантвелла, а для другої моделі (Y2) додавали гідроортофосфат калію.

Швидкість росту мікроорганізмів під впливом факторів (органічні сполуки) можна представити як залежність вигляду $y = f(x_1, x_2, x_3 \dots x_n)$.

Розробка математичної моделі передбачає принцип від «простого до складного». У вигляді полінома цей принцип означає перехід від полінома першого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j$ до полінома другого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n x_i^2$.

Проведення факторного експерименту полягає у визначенні впливу обраного чинника на показник оптимізації. Планування за такою схемою уможливорює реалізацію всіх можливих комбінацій, які наведені у таблиці 5.

Для розрахунку поточної дисперсії ($S_{y_u}^2$) кожен дослід здійснювали у трьох повторах, на основі чого отримували необхідні для 5% рівня значимості результати, за якими визначали дисперсію їх відтворюваності, а з урахуванням критерію Стьюдента — і межу значущості коефіцієнтів регресії.

На підставі коефіцієнтів регресії після проведення центрального композиційного ортогонального експерименту були отримані математичні моделі залежностей загальної кількості клітин *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 (Y1) від концентрацій у середовищі компонентів x_1, x_2, x_3 :

$$Y1 = 1,13 - 0,068x_1 + 0,031x_2 + 0,33x_3 - 0,11x_1x_2 + 0,035x_1x_3 + 0,105x_2x_3 - 0,45x_1^2 + 0,02x_2^2 + 0,02x_3^2,$$

та кількості спор *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 (Y2) від концентрацій у середовищі компонентів x_1, x_2, x_3 :

$$Y2 = -6,76 - 15,8x_2 + 21,79x_3 - 18,68x_1x_2 - 20,74x_2x_3 + 23,74x_1^2.$$

Після знаходження коренів рівнянь, обчислювали шукані концентрації факторів середовища використовуючи формулу:

$$c_i = x_i \lambda + c_{0i}$$

де x_i — кодоване значення фактора (безрозмірна величина); c_i та c_{0i} — натуральні значення фактора (відповідно поточне значення і значення на нульовому рівні); λ — натуральне значення інтервалу варіювання факторів (ΔC) [5, 8].

За розрахунковими показниками оптимізоване поживне середовище для збільшення кількості вегетативних клітин *Bacillus thuringiensis* ОНУ 15 (середовище ВК) має такий склад (г/л): пептон — 7,3; дріжджовий

екстракт — 3,0; глюкоза — 2,5; K_2HPO_4 — 5,0; KH_2PO_4 — 5,0; Na цитрат — 3,0; Na_2HPO_4 — 1,5; $MgSO_4$ — 0,05; $MnSO_4$ — 0,03; $CaCl_2$ — 0,05.

Оптимізоване середовище, що сприяє збільшенню кількості ендоспор *Bacillus thuringiensis* ONU 15 (середовище ЕС), має такий склад (г/л): пептон — 1,8; дріжджовий екстракт — 2,5; глюкоза — 3,8; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,05; $MnSO_4$ — 0,03; $CaCl_2$ — 0,05.

Зменшення кількісних показників джерел енергії та вуглецю для моделі оптимізованої за показником чисельності спор, підтверджує відомі дані про те, що спороутворення є відповідною реакцією культури на виснаження поживних речовин [8].

У таблиці 6 наведено значення концентрації вегетативних клітин та ендоспор, які отримали в експерименті з перевірки отриманих моделей.

Таблиця 6

Концентрація вегетативних клітин та ендоспор *Bacillus thuringiensis* ONU 15, отриманих на оптимізованих середовищах

Table 6

The concentration of vegetative cells and endospores of *Bacillus thuringiensis* ONU 15 on optimized media

Середовище	Кількість вегетативних клітин КУО/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)	Кількість ендоспор КУО/мл ($\bar{x} \pm \Delta$)
Оптимізоване середовище ВК (модель Y1)	$184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$	$21,6 \pm 0,9 \times 10^8$
Оптимізоване середовище ЕС (модель Y2)	$35,7 \pm 13,8 \times 10^{10}$	$53,3 \pm 1,8 \times 10^9$
Контрольне середовище	$26,0 \pm 2,7 \times 10^{10}$	$3,0 \pm 0,6 \times 10^8$

Як видно з наведених у таблиці 6 даних, концентрація вегетативних клітин *Bacillus thuringiensis* ONU 15 на оптимізованому середовищі ВК досягала значення $184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$ КУО/мл, що майже у 7 разів перевищує цей показник на контрольному середовищі ($26,0 \pm 2,7 \times 10^{10}$ КУО/мл). На оптимізованому середовищі ЕС концентрація ендоспор складала $53,3 \pm 1,8 \times 10^9$ спор/мл, що на два порядки вище ніж на контрольному середовищі ($3,0 \pm 0,6 \times 10^8$ спор/мл), проте концентрація вегетативних клітин на цьому середовищі незначно перевищує цей показник на контрольному середовищі — $35,7 \pm 13,8 \times 10^{10}$ КУО/мл та більш ніж в 5 разів нижча ніж на оптимізованому середовищі ВК.

Таким чином, в результаті проведених досліджень методом математичного планування експериментів з виростанням центрального композиційного ортогонального експерименту розроблено оптимізовані склади поживних середовищ, які дозволяють суттєво підвищити урожай бактерій та ендоспор *Bacillus thuringiensis* ONU 15.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дрегваль О.А. Вплив джерел мінерального живлення на ріст і токсинування ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* / О.А. Дрегваль, Н.В. Черватюк, А.І. Черевач, А.І. Вінніков // Мікробіологічний журнал. — 2003. — Т. 65, № 3. — С. 14–20.
2. Іваниця В.О. Методики визначення ентомоцидної активності мікроорганізмів щодо личинок грибного комарика (*Sciaridae*) / В.О. Іваниця, Н.М. Непомяща, С.П. Ужєвська, О.С. Багаєва, Т.М. Кривицька // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 4 (12), — С. 91–98.
3. Кривицька Т.М. Штами бактерій роду *Bacillus* з ларвіцидною активністю по відношенню до грибних комариків *Bradysia pilistriata* Frey (*Sciaridae*) / Т.М. Кривицька, О.С. Багаєва, С.П. Ужєвська, Н.М. Непомяща, В.О. Іваниця // Мікробіологія і біотехнологія — 2010. — № 3 (11), — С. 84–92.
4. *Методы* общей бактериологии / Под ред. Герхарта Ф.Т. в 3 томах. — М.: Мир, 1983. — 536 с.
5. *Монтгомери Д.К.* Планирование эксперимента и анализ данных. — Л.: Судостроение, 1980. — 384 с.
6. *Осадчая А.И.* Влияние источников углерода и азота на рост и развитие *Bacillus thuringiensis* H14 266/2-1 / А.И. Осадчая, С.Ф. Прокопченко, И.А. Василевская // Микробиологический журнал. — 1990. — Т. 52, № 3. — С. 34–40.
7. *Патент* на корисну модель № 60591. Спосіб випробування інсектицидної дії препаратів на грибних комариків / Іваниця В.О., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непомяща Н.М., Кривицька Т.М., Бобрєшова Н.С. — Опубл. 25.06.2011. — Бюл. № 12.
8. *Хилько Т.В.* Оптимизация питательных сред для роста ми споробразования бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* // Микробиологічний журнал. — 2004. — Т. 66, № 1. — С. 36–41
9. *Холодов В.И.* Планирование эксперимента. Конспект лекций для студентов 4-5-го курсов СевНТУ. — Севастополь: СевНТУ. — 2007. — 69 с.
10. *Царенко И.Ю.* Оптимизация питательной среды для культивирования *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 / И.Ю. Царенко, А.А. Рой, И.К. Курдиш // Микробиологічний журнал. — 2011. — Т. 73, № 2. — С. 13–19.
11. *Daniel Paredes-Sabja.* Inorganic Phosphate and Sodium Ions Are Cogermnants for Spores of *Clostridium perfringens* Type A Food Poisoning-Related Isolates / Daniel Paredes-Sabja, Pathima Udompijitkul, Mahfuzur R. Sarker. // *Appl Environ Microbiol.* — 2009. — Vol. 75(19). — P. 6299–6305.
12. *Hon Yeung Cheung.* Dependence of bacillus *stearothermophilus* spore germination on nutrient depletion and manganese / *Hon Yeung Cheung*, Ljubisa Vitkovic, Michael R. W. Brown // *Journal of General Microbiology.* — 1982. — № 128. — P. 2403–2409.

Стаття надійшла до редакції 10.12.2012 р.



УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильева, Т.В. Гудзенко, Н.Н. Панченко, В.А. Іваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ШТАМА *BACILLUS* *THURINGIENSIS* ONU 15

Реферат

С использованием методов математического планирования проведена оптимизация состава питательной среды для культивирования штамма *Bacillus thuringiensis* ONU 15, обладающего энтомопатогенными свойствами по отношению к двукрылым насекомым-вредителям съедобных грибов. Оптимизацию среды проводили с использованием центрального композиционного ортогонального плана. Параметрами оптимизации служили общая численность бактерий и количество эндоспор штамма *Bacillus thuringiensis* ONU 15. В результате проведенных исследований, предложена питательная среда такого состава: пептон — 7,3 г/л, дрожжевой экстракт — 3,0 г/л, глюкоза — 2,5 г/л, K_2HPO_4 — 5,0 г/л, KH_2PO_4 — 5,0 г/л, Na цитрат — 3,0 г/л, Na_2HPO_4 — 1,5 г/л, $MgSO_4$ — 0,05 г/л, $MnSO_4$ — 0,03 г/л, $CaCl_2$ — 0,05 г/л, на которой концентрация бактерий составляла $184,6 \pm 6,9 \times 10^{10}$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis* ONU 15, оптимизация состава питательной среды, центральный композиционный ортогональный эксперимент.



UDC 579.852.11.24

N.Yu. Vasylieva, T.V. Gydzenko, M.M. Panchenko, V.O. Ivanytsia

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA OF STRAIN *BACILLUS THURINGIENSIS* ONU 15

Summary

With the use of experimental design methods there were optimized the culture medium for the cultivation of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15, having entomopathogenic properties against dipteran pests of edible fungi. Optimization of culture medium was performed using the central composite orthogonal method. The parameters of optimization were the total number of bacteria and the number of endospores of strain *Bacillus thuringiensis* ONU 15. As a result of the research it is proposed the culture medium of the following composition: peptone – 7.3 g/l, yeast extract – 3.0 g/l, glucose – 2.5 g/l, K_2HPO_4 – 5.0 g/l, KH_2PO_4 – 5.0 g/l, Na citrate – 3.0 g/l, Na_2HPO_4 – 1.5 g/l, $MgSO_4$ – 0.05 g/l, $MnSO_4$ – 0.03 g/l, $CaCl_2$ – 0.05 g/l.

At the optimized culture medium the total number of bacteria, compared with the original culture medium, increased by 7 times and has reached the indicator – $184.6 \pm 6.9 \times 10^{10}$ CFU/ml.

Key words: *Bacillus thuringiensis* ONU 15, optimization of the culture medium, the central composite orthogonal method.



УДК 579.22:582.284

К.Г. Древаль, М.І. БойкоДонецький національний університет,
вул. Шорса, 46, Донецьк, 83050, Україна,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

ФЕРМЕНТАТИВНА АКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТІВ ЕКЗОЦЕЛЮЛАЗ БАЗИДІОМІЦЕТІВ ТА НИЖЧИХ ГРИБІВ

Проведено порівняльне вивчення активності препаратів екзоцелюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів комерційного та лабораторного походження. Визначено оптимуми рН та температури дії препаратів екзоцелюлаз, зниження активності компонентів целюлозолітичного комплексу залежно від терміну дії ферментів за оптимальних значень рН та температури. Показано, що целюлозолітичні ензими базидіоміцетів активніші ніж нижчих грибів. Ферментні препарати целюлаз як базидіоміцетів, так і нижчих грибів мають низку супутніх ферментативних активностей. Препарати целюлаз базидіального походження мають значно вищу ферментативну активність щодо крохмалю, пектину та лігніну.

Ключові слова: целюлази, ендоглюканази, целобіази, базидіоміцети, нижчі гриби.

Одним з основних чинників, що стримує промислове застосування ферментів, що гідролізують целюлозу є відсутність високоактивних та економічно ефективних продуцентів [6, 19, 21]. На сьогоднішній день традиційними джерелами отримання ензимів целюлозолітичної дії є бактерії та нижчі гриби відділів *Zygomycota* та *Ascomycota* [12, 15]. Природно, що саме цим організмам приділяється найбільша увага дослідників у багатьох країнах світу. В цей же час, велика роль базидіальних дереворуйнівних грибів у розкладанні лігноцелюлоз деревини не викликає сумніву [7, 20]. Останнім часом активізовано дослідження базидіальних грибів як продуцентів багатьох біологічно активних речовин [14], в тому числі ензимів дереворуйнівного комплексу [1]. Раніше [4] нами знайдено активні продуценти ферментів целюлозолітичної дії та проведено їх ґрунтовне дослідження. Для оцінки перспективи використання цих ензимів у біотехнології необхідним є порівняння активності ферментних препаратів екзоцелюлаз, синтезованих базидіоміцетами та нижчими грибами.

Метою роботи було порівняльне вивчення активності, рН та температурного оптимумів дії препаратів екзоцелюлаз, зміни активності

© К.Г. Древаль, М.І. Бойко, 2012



компонентів целюлозолітичного комплексу залежно від терміну їх дії та визначення спектру супутніх ферментативних активностей препаратів екзоцелюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на отриманих в лабораторних умовах препаратах целюлаз базидіоміцетів штамів *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. К-1, А-Дон-02, Д-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schrüft AnSc-1. Ферментні препарати із культуральної рідини одержували відповідно до стандартної методики виділення та очищення ензимів, адаптованої для целюлаз базидіальних грибів [5]. Целюлази базидіоміцетів порівнювали з такими препаратами: «Ксибетен-Ксил» та «Ксибетен-Цел» (JSC «Biovet», Болгарія), які надано д.х.н., професором Синіциним А.П. (Московський державний університет ім. М.В. Ломоносова, м. Москва, Росія), «Celluclast 1,5L» (Sigma, Німеччина), лабораторний препарат гриба *Penicillium* sp., які надано Марією Мартінез (Інститут дослідницької біології, м. Мадрид, Іспанія), а також «Целюлаза» (Ладжинський завод ферментних препаратів, Україна).

Ендоглюканазну активність визначали за гідролізом Na-карбоксиметилцелюлози (Sigma, Німеччина), целобіазну — за гідролізом целобіози (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей при визначенні ферментативних активностей та умови проведення реакцій відповідали рекомендаціям ІУРАС [16] та загальноприйнятим методикам [8, 17]. За одиницю активності (од) приймали таку кількість ферменту, за присутності якої утворювався 1 мкмоль редуруючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкмоль глюкози (для целобіози) протягом 1 хв. Редуруючі цукри визначали методом Шомоді-Нельсона (калібрувальний графік будували за глюкозою) [8]. Глюкозу визначали глюкозооксидазно-пероксидазним методом за методикою виробника (Дніпропетровськ, Україна). Вміст білка визначали спектрофотометричним методом на СФ-46 (Росія) [1]. Питому активність (од/мг білка) розраховували як відношення загальної активності культурального фільтрату (од/мл) до вмісту протеїну у культуральному фільтраті (мг/мл).

Температурний оптимум ферментів визначали в діапазоні температур від 30 до 80 °С з інтервалом 5–10 °С. Для визначення оптимуму рН ферментних препаратів розчини субстратів готували, використовуючи як розчинник 0,1 М цитратний (рН 3, 4, 5 та 6) або фосфатний буферні розчини (рН 7, 8 та 9) [16]. Стабільність ферментів залежно від терміну їх дії визначали за оптимальних значень температури та рН впродовж 420 хв.

Супутні ферментативні активності визначали використовуючи загальноприйняті методики [1, 8, 13, 18].



Всі дослідження проводили у трикратній повторності. Результати досліджень статистично опрацьовували методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних величин — методом Дункана [9].

Результати та їх обговорення

Результати досліджень, представлені в таблиці 1, свідчать про те, що ферментні препарати Д-1 та К-1 мають найвищі активності окремих компонентів целюлазного комплексу, однак нездатні гідролізувати фільтрувальний папір. Зважаючи на те, що така активність проявляється у вихідних культуральних фільтратах цих штамів, можна припустити, що під час очищення видаляється певний зв'язуючий компонент між цими ензимами або відбувається його автоліз.

Таблиця 1

Активність целюлазного комплексу ферментних препаратів (од/мг білка)

Table 1

Activity of cellulase complex of enzymatic preparations, U/mg protein

Препарат	Продуцент	Білок, мг/мл	Субстрат для визначення активності		
			ФП	Na-КМЦ	Целобіоза
Ксибетен-Ксил	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0,38	19,5	276,1	617,6
Ксибетен-Цел		0,54	18,0	224,8	506,5
Целюлаза	<i>Trichoderma viride</i>	0,20	9,9	455,9	301,6
<i>Penicillium crude</i>	<i>Penicillium sp.</i>	0,26	17,2	353,1	303,9
Celluclast 1,5L	<i>Trichoderma reesei</i>	0,24	76,0	534,8	406,8
А-Дон-02	<i>Irpex lacteus</i>	0,04	4,19	590,0	912,1
Д-1		0,03	0	1030,0	1531,9
К-1		0,03	0	1327,9	1807,2
AnSc-1	<i>Daedaleopsis confragosa f. confragosa</i>	0,16	5,6	174,9	481,53

Примітка: ФП — фільтрувальний папір, Na-КМЦ — Na-карбоксиметилцелюлоза; у таблиці наведено середні арифметичні величини, відхилення від середнього арифметичного не перевищувало 5%; $p < 0,05$.

Вивчення впливу рН на ендоглюканазну та целобіазну активності ферментних препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів показало, що оптимум ендоглюканазної активності для досліджуваних препаратів (рис. 1) знаходиться в межах від рН 4 (препарати А-Дон-02, Д-1 та К-1,



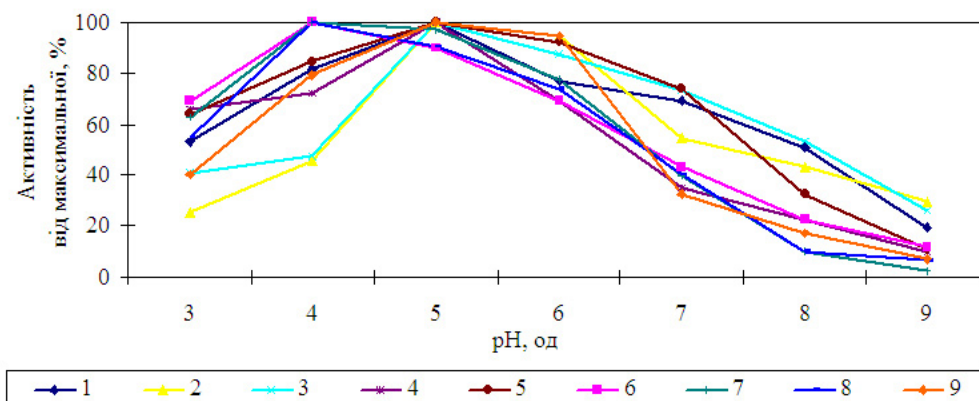


Рис. 1. Вплив рН на ендоглюканазну активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів (тут і далі: 1 – «Хыбетен-Хыл», 2 – «Хыбетен-Цел», 3 – «Целюлаза», 4 – *Penicillium crude*, 5 – Celluclast 1,5L, 6 – А-Дон-02, 7 – Д-1, 8 – К-1, 9 – AnSc-1)

Fig. 1. Endoglucanase pH optimum of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations (here and further: 1 – «Хыбетен-Хыл», 2 – «Хыбетен-Цел», 3 – «Cellulasa», 4 – *Penicillium crude*, 5 – Celluclast 1,5L, 6 – А-Дон-02, 7 – Д-1, 8 – К-1, 9 – AnSc-1)

синтезовані базидіальним грибом) до рН 5 (інші ферментні препарати), що узгоджується з даними літератури [10]. Високі значення рН негативно впливають на активність ендоглюканази як базидіоміцетів, так і нижчих грибів. В той же час, максимальна активність целобіаз знаходиться за більш високих значень рН середовища (рис. 2).

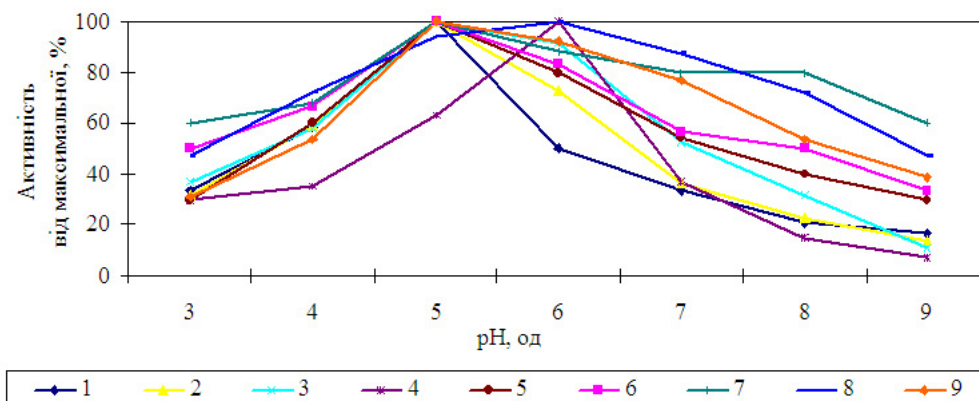


Рис. 2. Вплив рН на целобіазну активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів

Fig. 2. Cellobiase pH optimum of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations

Целобіази ферментних препаратів «Ксибетен-Ксил», «Ксибетен-Цел», «Целюлаза», Celluclast 1,5L, А-Дон-02, Д-1 та AnSc-1 максимально активні за рН 5, а препаратів *Penicillium crude* та К-1 — за рН 6.

Дослідження показали, що ендоглюканази препарату Celluclast 1,5L найбільш активні за температури 40 °С, препаратів «Ксибетен-Ксил», «Ксибетен-Цел» та Д-1 — за 45 °С, препаратів «Целюлаза», А-Дон-02, К-1 та AnSc-1 — за 50 °С, а препарату *Penicillium crude* — 55 °С (рис. 3). Ендоглюканази усіх досліджуваних препаратів не інактивувалися навіть на 50% за умов проведення реакцій при 30 або 80 °С.

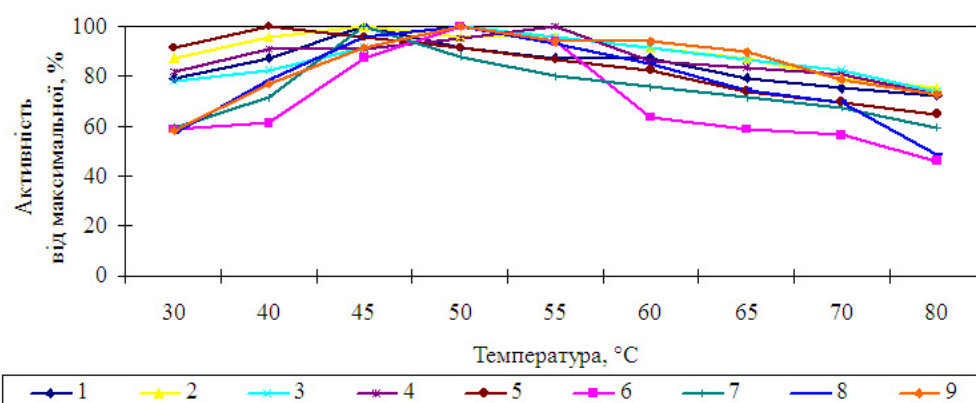


Рис. 3. Вплив температури на ендоглюканазну активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів

Fig. 3. Endoglucanase temperature optimum of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations

Оптимум активності целобіази варіював у більш широких температурних межах (рис. 4).

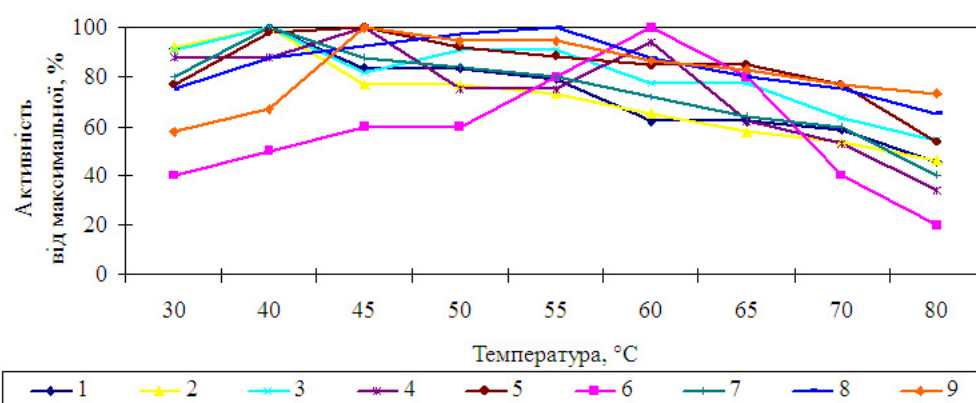


Рис. 4. Вплив температури на целобіазну активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів

Fig. 4. Cellobiase temperature optimum of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations



Активність цього ферменту у препаратів «Ксибетен-Ксил», «Ксибетен-Цел», «Целюлаза» та Д-1 була максимальною за температури 40 °С, у препаратів *Penicillium crude*, Celluclast 1,5L та AnSc-1 — за 45 °С, у препарату К-1 — за 55 °С, а у препарату А-Дон-02 — за 60 °С. Отже, оптимуми активності компонентів целюлозолітичного комплексу базидіоміцетів знаходяться в діапазоні більш високих температур, що дозволяє значно інтенсифікувати промислові процеси використання екзоцелюлаз, отриманих з базидіальних грибів.

Вивчення стабільності ферментативної активності препаратів залежно від терміну їх дії за оптимальних значень рН показало (рис. 5), що лише ендоглюканаза препарату «Целюлаза» за 420 хв інактивувалася більш ніж на половину, в той час як всі інші препарати за цей час інактивувалися на 40–50%.

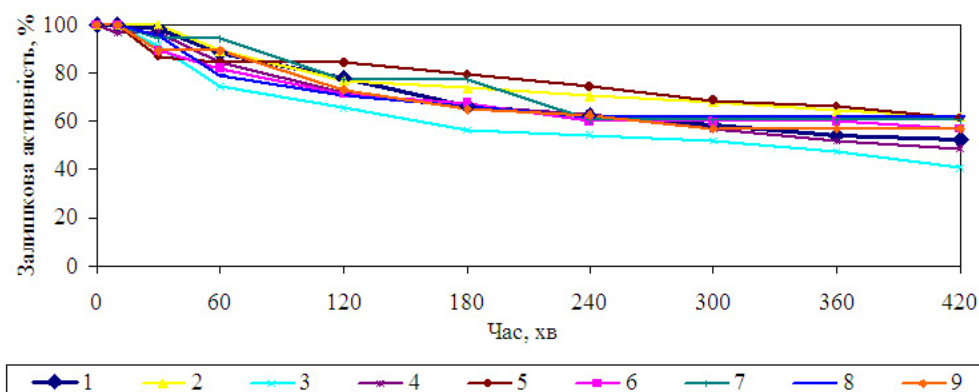


Рис. 5. Ендоглюканазна активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів в залежності від терміну проведення реакції за оптимального рН

Fig. 5. Dependence of endoglucanase activity of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations from holding time at optimal pH

Разом з тим, целобіаза в складі ферментативних препаратів за оптимальних значень рН з часом дії більше втрачає свою активність (рис. 6). Слід відзначити, що отримані нами ферментні препарати базидіоміцетів показали вищу стабільність активності целобіази за оптимального рН. Комерційні та лабораторні препарати, з якими проводили порівняння, інактивувалися наполовину вже на 240 («Ксибетен-Ксил», «Целюлаза» та Celluclast 1,5L) та 360 хв досліду (Ксибетен-Цел та *Penicillium crude*), в той час як целобіаза базидіоміцетів на 420 хв експерименту не втрачала 50% активності (рис. 6). Встановлено, що найменше втрачається активність целобіази за оптимального рН у препаратів Д-1 та AnSc-1. На 420 хв вона зберігала близько 80% активності, а найбільше втрачає активність целобіаза препарату «Целюлаза», яка за цей час зберігала лише 20% активності.

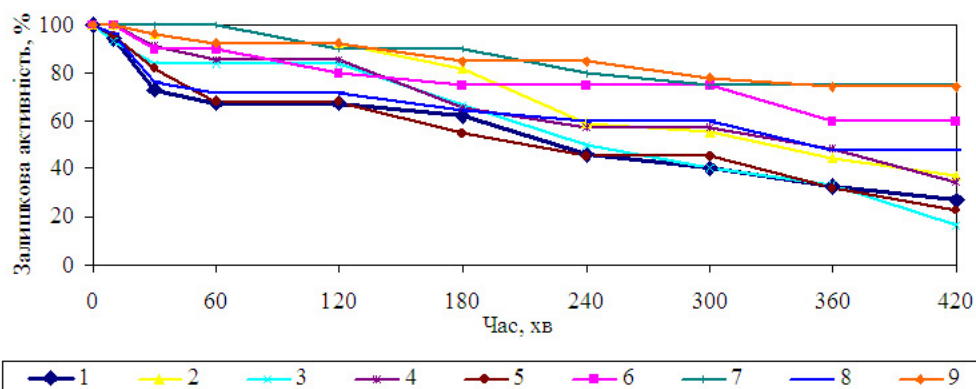


Рис. 6. Целобіазна активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів в залежності від терміну проведення реакції за оптимального рН

Fig. 6. Dependence of cellobiase activity of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations from holding time at optimal pH

Вивчення стабільності ендоглюканазної активності препаратів залежно від терміну їх дії за оптимальних значень температури показало, що найменше за таких умов змінюється активність у препараті А-Дон-02 (рис. 7). Для ендоглюканази вказаного препарату характерним є поступове зменшення активності майже до 60% від початкової впродовж перших 180 хв реакції за оптимальної температури, однак надалі активність ендоглюканази залишається на одному рівні до 420 хв досліджу. Встановлено, що за цих умов найбільше знижуються активність ендоглюканази нижчих грибів в складі препаратів *Penicillium crude* та «Целюлаза». Уже на 60 хв експерименту ці ферменти втрачали більше 50% від початкової активності.

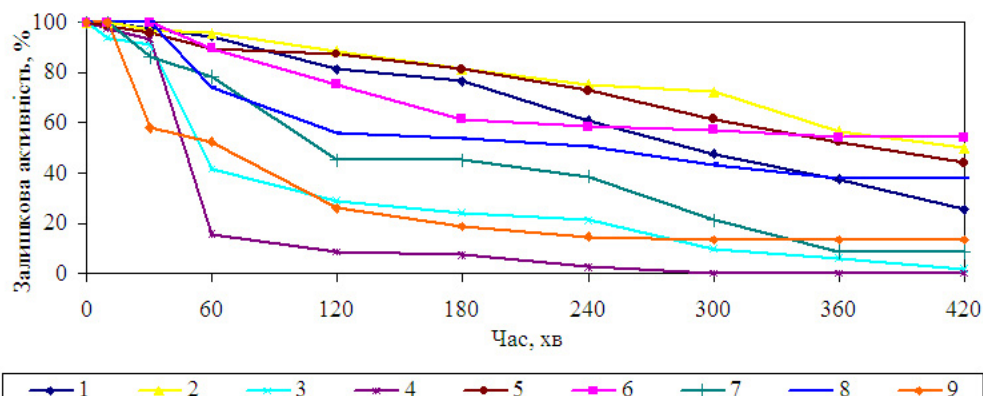


Рис. 7. Ендоглюканазна активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів в залежності від терміну проведення реакції за оптимальної температури

Fig. 7. Dependence of endoglucanase activity of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations from holding time at optimal temperature



Таблиця 2

Супутні активності препаратів целюлаз вищих та нижчих грибів (од/мг білка)

Table 2

Associated activities of basidiomycetes and lower fungus cellulases preparations (U/mg protein)

Препарат	Ферментативна активність												
	Загальна літнічна активність	Лакказя (КФ 1.10.3.2) (субстрат – сирінгалазин)	Лакказя (КФ 1.10.3.2) (субстрат – гваякол)	Лакказя (КФ 1.10.3.2) (субстрат – пірокатехін)	Ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4) (субстрат – ГЕЦ)	Пектинестераза (КФ 3.1.1.11)	Ендополігалактуроназа (КФ 3.2.1.1)	Мальтаза (КФ 3.2.1.20)	Інвертаза (КФ 3.2.1.26)	Амілоглюкозидаза (КФ 3.2.1.3)	α -Амілаза (КФ 3.2.1.1)	β -Амілаза (КФ 3.2.1.2)	β -Галактозидаза (КФ 3.2.1.23)
Celluclast 1,5L	24,2	4,1	5654,8	0,0	81,8	0,0	0,0	1,6	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Penicillium crude</i>	111,5	2,7	5769,2	0,0	7,1	0,0	12,0	1,5	9,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Целюлаза	0,0	1,5	4642,9	27,0	31,4	0,0	0,0	2,9	11,8	0,0	0,0	0,1	0,5
Ксибелен-Ксил	15,3	8,1	2255,6	28,4	22,4	0,7	19,1	1	8,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Ксибелен-Цел	0,0	2,7	0,0	0,0	28,1	0,2	12,8	0,7	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0
А-Дон-02	724,6	171,5	23214,3	0,0	643,3	5,0	233,6	14,7	58,8	0,0	0,5	0,4	2,4
Д-1	386,5	65,6	40476,2	360,4	80,0	4,4	1049,6	19,6	47,1	0,0	0,4	0,1	16,2
К-1	772,9	137,4	47619,0	540,5	431,9	8,9	853,5	26,1	62,7	0,0	0,3	0,4	9,7
AnSc-1	72,5	1,0	8928,6	33,8	42,8	2,1	36,8	4,9	29,4	0,0	0,1	0,1	1,5

Примітка: 1) вміст білка у препаратах наведено в табл. 1; 2) у таблиці наведено середні арифметичні величини, відхилення від середнього арифметичного не перевищували 5%; $p < 0,05$.

Показано, що залежно від терміну протікання реакції за оптимальних значень температури найменше змінювалася активність целобіази базидіоміцетів виду *Irpex lacteus* (рис. 8), яка не інактивувалася на 50% навіть впродовж 420 хв.

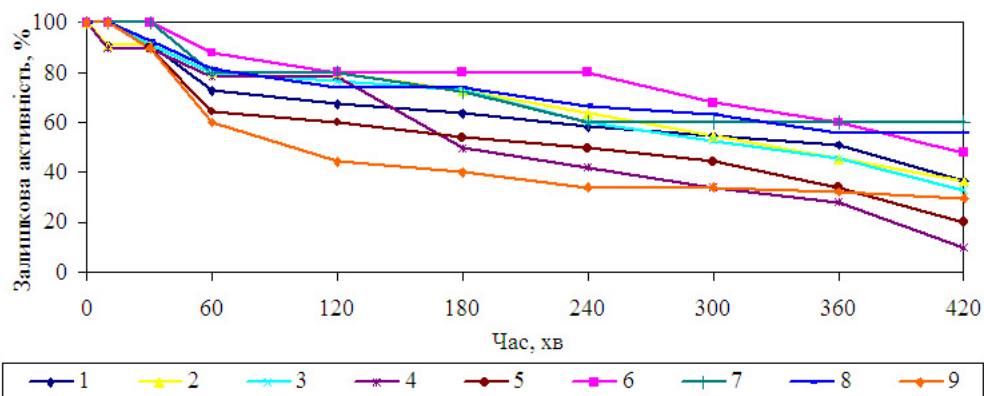


Рис. 8. Целобіазна активність препаратів целюлаз базидіоміцетів та нижчих грибів в залежності від терміну проведення реакції за оптимальної температури

Fig. 8. Dependence of cellobiase activity of basidiomycetes and lower fungus enzymatic preparations from holding time at optimal temperature

Відомо, що важливою характеристикою препаратів целюлаз є їх супутні активності [1, 6, 12, 15]. В результаті вивчення досліджуваних нами препаратів встановлено, що вони здатні до гідролізу сполук, супутніх целюлозі — лігніна, пектина та крохмалю. При цьому препарати целюлаз базидіоміцетів показали значну лігнолітичну активність, яка достовірно перевищує таку активність ферментативних препаратів нижчих грибів. Крім того, достовірно вищою у кілька разів є активність ферментних препаратів базидіоміцетів і відносно пектину та крохмалю. Можна стверджувати, що ферментативні препарати базидіоміцетів є більш перспективними для застосування у біотехнології, коли потрібна комплексна переробка рослинної сировини [11].

Отже, в результаті проведених досліджень показано, що за своїми фізико-хімічними показниками найкращим препаратом є А-Дон-02, синтезований базидіоміцетом *Irpex lacteus*, оскільки до його складу входять ендоглюканаза та целобіаза, активність яких найменше втрачається в процесі тривалої реакції за оптимальних значень температури та рН. Дослідження супутніх ензиматичних активностей показало, що препарати целюлаз як нижчих, так і базидіальних грибів здатні до перетворення цілої низки субстратів, однак препаратам базидіоміцетів притаманна значно вища активність щодо супутників целюлози — крохмалю, пектину та лігніну.

Роботу виконано за спонсорської підтримки громадської організації «Развитие» (м. Москва, Росія).



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
2. *Бойко С.М., Древаль К.Г.* Вплив температури на активність целюлозолітичних ферментів грибів *Irpex lacteus* Fr. *Coriolus sinuosus* Fr. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія, вип. 3, 2008. — С. 107–113.
3. *Дарбре А.* Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
4. *Древаль К.Г., Бойко М.И.* Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.
5. *Древаль К.Г., Бойко М.И.* Получение препаратов целлюлаз из культуральной жидкости базидиомицетов // Материалы 3-его Съезда Микологов России (г. Москва, 10–12 октября 2012 г.). — 2012. — С. 372.
6. *Зайцева Е. А.* Изучение биокатализаторов и возможностей их практического использования в рамках Федеральной целевой научно-технической программы России «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки» / Е.А. Зайцева, Т.А. Осипова // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. — 2006. — Т. 47, № 1. — С. 4–14.
7. *Семичаевский В.Д.* Целлюлазы высших базидиальных грибов. // Микология и фитопатология. — 1989. — Т. 23, № 6. — С. 581–590.
8. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. — 1993. — Т. 25. — 152 с.
9. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібник — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
10. *Baldrian P.* Enzymes of saprotrophic basidiomycetes / P. Baldrian // Ecology of saprotrophic basidiomycetes. — 2008. — V. 28. — P. 19–41.
11. *Bhat M.K.* Cellulases and related enzymes in biotechnology // Biotechnology advances. — 2000. — V. 18, № 5. — P. 355–383.
12. *Bothast R.J.* Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol / R.J. Bothast, M.A. Schlicher // Applied microbiology and biotechnology. — 2005. — V. 67, № 1. — P. 19–25.
13. *Chrysonila sitophila* (TFB-27441): a hyperlignolytic strain. / N. Duran, J. Rodriguez, A. Ferraz et al. // Biotechnology letters. — 1987. — Vol. 9, № 5. — P. 357–360.
14. *Fedotov O.V.* Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov — Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications — Tbilisi: Myza, 2007. — P. 125–126.

15. *Frontiers of engineering: Reports on leading-edge engineering from the 2007 symposium.* — Washington: The National Academies Press, 2008. — 208 p.
16. *Ghose T.K.* Measurement of cellulase activity // *Pure and Appl. Chem.* — 1987. — Vol. 59, № 2. — P. 257–268.
17. *Mullings R.* Measurement of saccharification by cellulases // *Enzyme Microb. Technol.* — 1985. — Vol. 7, № 12. — P. 586–591.
18. *Platt M.W.* The decolorization of the polymeric dye poly-blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin degrading fungi / M.W. Platt, Y. Hadar, I. Chet // *Applied microbiology and biotechnology.* — 1985. — Vol. 21. — P. 394–396.
19. *Sainz M.B.* Commercial cellulosic ethanol: the role of plant-expressed enzymes / M.B. Sainz // *In vitro cellular and developmental biology — Plant.* — 2009. — № 45. — P. 314–329.
20. *Tomsovsky M.* Production and regulation of lignocellulose-degrading enzymes of *Poria*-like wood-inhabiting basidiomycetes / M. Tomsovsky, P. Popelarova, P. Baldrian // *Folia Microbiol.* — 2009. — Vol. 54, № 1. — P. 74–80.
21. *The realm of cellulases in biorefinery development.* / A.K. Chandel, G. Chandrasechar, M.B. Silva et al. // *Critical reviews in biotechnology.* — 2012. — V. 32, № 3. — P. 187–202.

Стаття надійшла до редакції 18.12.2012 р.

К.Г. Древаль, М.И. Бойко

Донецкий национальный университет,
ул. Щорса, 46, Донецк, 83050, Украина,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ЭКЗОЦЕЛЛЮЛАЗ БАЗИДИОМИЦЕТОВ И НИЗШИХ ГРИБОВ

Реферат

Проведено сравнительное изучение активности препаратов экзоцеллюлаз базидиомицетов и низших грибов как коммерческого, так и лабораторного происхождения. Установлены рН и температурный оптимумы действия препаратов, изменение активности компонентов целлюлозолитического комплекса в зависимости от времени проведения реакции. Доказано, что целлюлозолитические ферменты базидиомицетов более активны по сравнению с ферментами, полученными из низших грибов. Показано, что ферментативные препараты целлюлаз как базидиомицетов, так и низших грибов проявляют ряд сопутствующих ферментативных



активностей, однак препарати целюлаз базидіального походження мають значительно більше високу активність по отношению к крахмалу, пектину и лігніну.

Ключевые слова: целюлазы, эндоглюканазы, целлобиазы, базидіомицеты, низшие грибы.

K.G. Dreval, M.I. Boyko

Donetsk National University,
46, Schorsa str., Donetsk, 83050, Ukraine,
tel.: +38(062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

ENZYMATIC ACTIVITY OF CELLULASE BASIDIOMYCETES PREPARATIONS AND LOWER FUNGI

Summary

There were conducted the comparative analysis of cellulases enzymatic preparations of basidiomycetes with lower fungi both commercial and laboratory origin. In the process of comparing the preparations were investigated as to their activity to hydrolyze filter paper, Na-carboxymethylcellulose and cellobiose. pH and temperature optima of preparations action, dependence of their activity upon holding time at optimal pH and temperature were determined. It is proved that cellulolytic enzymes from basidiomycetes are more active than those from lower fungi. It is found that cellulases from both basidiomycetes and lower fungi exhibit a number of associated enzymatic activities, but cellulolytic enzymes from basidiomycetes have significantly higher activity of enzymes that as to starch, pectin and lignin.

Key words: cellulases, endoglucanases, cellobiases, basidiomycetes, lower fungi.



УДК 579.695

**В.А. Иваница, А.Е. Бухтияров, Г.В. Лисютин, А.Н. Захария,
Т.В. Гудзенко**

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

АККУМУЛЯЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА PSEUDOMONAS

*Изучена способность четырех штаммов бактерий рода *Pseudomonas* аккумулировать из раствора медь, кадмий, цинк и свинец. Показано, что бактерии исследуемых штаммов псевдомонад извлекают из раствора от 7,4 до 64,5% меди, от 8,0 до 25,0% кадмия, от 23,6 до 45,5% цинка, от 51,1 до 83,8% свинца. Наибольшей способностью аккумулировать тяжелые металлы характеризуются бактерии штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329, которые больше других исследованных штаммов извлекают из раствора меди (64,5%), кадмия (25,0%), цинка (45,5%), свинца (83,8%). Из исследованных металлов бактериальные клетки лучше накапливают свинец (от 140,0 до 182,4 мг/г сухого веса биомассы), хуже – цинк (от 17,5 до 33,3 мг/г сухого веса биомассы).*

Ключевые слова: гетеротрофные бактерии, Cu, Cd, Zn, Pb, аккумуляция.

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является серьезной экологической проблемой. Поступление тяжелых металлов происходит как в результате геохимических процессов, так и антропогенного влияния, включающего добычу и переработку металлов, сельское хозяйство, производство электроэнергии, сброс сточных вод. Тяжелые металлы аккумулируются бактериями и другими организмами, переносятся по пищевой цепи и представляют опасность для здоровья человека [9].

Широко используемые на практике физические и химические методы для удаления ионов тяжелых металлов из промышленных сточных вод, основанные на осаждении, окислении, восстановлении, испарении, обратном осмосе и др., являются дорогими и не совсем эффективными. В качестве перспективной альтернативы физическим и химическим методам предлагаются биологические методы [6]. Детоксикация и трансформация соединений тяжелых металлов в природной среде зависит, в первую очередь, от жизнедеятельности микроорганизмов. К механизмам, способствующим извлечению металлов из растворов, следует отнести, в первую очередь, адсорбцию катионов металлов на поверхности клеток,

© В.А. Иваница, А.Е. Бухтияров, Г.В. Лисютин, А.Н. Захария, Т.В. Гудзенко, 2012



которая связана с наличием на ней отрицательно заряженных анионов (PO_4^{3-} , COO^- , SH^- , OH^-) [8].

Бактерии, выделенные из морской среды, характеризующейся постоянным изменением условий существования (температура, pH, соленость, содержание токсичных веществ и т.д.), приспособлены к неблагоприятным условиям, и, как следствие, обладают комплексом специфических адаптаций, в том числе, и к действию тяжелых металлов [6].

Для извлечения металлов из растворов используют представителей различных таксономических групп, в том числе, бактерий рода *Pseudomonas*, которые могут быть эффективными при аккумуляции меди, свинца, кадмия и других металлов из загрязненных сточных вод [9].

В последнее время отдается предпочтение комплексным бактериальным препаратам, включающим несколько видов аборигенных представителей, для проведения очистки загрязненных участков почв или сточных вод [1].

Целью данной работы было изучение способности бактерий рода *Pseudomonas* извлекать из раствора медь, кадмий, цинк и свинец.

Материалы и методы

Объектами исследования были резистентные к высоким концентрациям Cu (0,25–1 ммоль/л), Cd (0,25–0,5 ммоль/л), Pb (0,3–0,5 ммоль/л) штаммы морских гетеротрофных бактерий, изолированные из акватории прибрежных вод острова Змеиный (*Pseudomonas stutzeri* ОНУ 330), а также штаммы *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 327, *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 328, *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 из коллекции микроорганизмов Одесского национального университета.

Способность бактерий аккумулировать Cu, Cd, Zn и Pb определяли согласно методике, предложенной Sharron McEldowney [7]. Бактерии выращивали при 25 °С до ранней экспоненциальной фазы роста в течение суток на МПА. Микроорганизмы с питательной среды смывали и суспендировали в 0,2 ммоль малеатном буфере с pH 6,8 [5], доводя их до концентрации $(1,5 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл.

К бактериальной суспензии объемом 9,9 мл добавляли 100 мкл раствора меди в концентрации 3,1 мг/мл, кадмия — 4,0 мг/мл, цинка — 1,1 мг/мл, свинца — 3,7 мг/мл. Таким образом, в 10 мл испытуемых образцов содержалось 310 мкг меди, 400 мкг кадмия, 110 мкг цинка, 370 мкг свинца.

Контрольные образцы состояли из 9,9 мл малеатного буферного раствора и 100 мкл соответствующего металла. Фоновое содержание металлов определяли в бактериальной суспензии и в малеатном буферном растворе. Бактериальную суспензию инкубировали на качалке с вращением 150 об/мин в течение 2 часов при температуре 25 °С.

Клетки осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин при температуре +4 °С. После отбора надосадочной жидкости клетки микроорганизмов дважды промывали малеатным буферным раствором центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин при температуре +4 °С. В предварительно высушенные при 110 °С в течение 30 мин и взвешенные пенициллиновые флаконы переносили ресуспендированный бидистиллированной водой клеточный осадок из центрифужных пробирок. Затем флаконы повторно высушивали при 110 °С в течение 30 мин и взвешивали для определения веса биомассы бактерий. Для разрушения бактериальных клеток добавляли 2,5 мл 70% HNO₃ и выдерживали 30 мин при 180 °С. После остывания до комнатной температуры во флаконы добавляли по 4 мл бидистиллированной воды и закрывали пластиковыми крышками. Во все пенициллиновые флаконы и емкости с надосадочной жидкостью и промывными водами вносили 70% HNO₃ для получения конечной концентрации 20%. Содержание исследованных металлов как в опытных (клетках, надосадочной жидкости и промывных водах), так и в контрольных образцах определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Сатурн-2» при длине волны 324,7 нм для Cu, 228,8 нм для Cd, 213,9 нм для Zn и 283,3 нм для Pb [4].

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием программы «SPSS 19 для Windows» и «Microsoft Office Excel 2003».

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали (таблиц 1–4) способность бактерий рода *Pseudomonas* извлекать из раствора Cu, Cd, Zn и Pb, которые находились в концентрациях, на три порядка превышающих их содержание в морской воде и соответствующих уровням загрязнения сточных вод [3].

Бактерии исследуемых штаммов аккумулировали из раствора от 7,4 до 64,5% меди. При этом в надосадочной жидкости оставалось от 31,3 до 88,1% металла. Наибольшая способность извлекать медь показана для штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 (табл. 1).

Хуже других металлов исследуемые штаммы аккумулируют кадмий (от 8,0 до 25,0%). Штаммы *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 и *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 328 способны извлекать лишь до 25% растворенного кадмия (табл. 2).

Как видно из таблицы 3, исследованные штаммы псевдомонад извлекают от 23,6 до 45,5% цинка. Наибольшей способностью аккумулировать цинк характеризуется штамм *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329.

Наиболее активно исследуемые штаммы псевдомонад извлекают из раствора свинец — от 51,1 до 83,8%. Установлено (табл. 4), что бактерии штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 эффективно аккумулируют не только медь, кадмий и цинк, но и 83,8% свинца.



Таблица 1

Извлечение Си из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 1

Cu accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Си, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	58 ± 3,0	18,7	232,5 ± 16,0	75,0	7,5 ± 0,4	2,4	298,0	96,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	171 ± 9,0	55,2	128,7 ± 6,0	41,5	9,3 ± 0,5	3,0	309,0	99,7
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	200 ± 9,3	64,5	97,0 ± 5,1	31,3	10,0 ± 0,5	3,2	307,0	99,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	23 ± 1,0	7,4	273,0 ± 14,2	88,1	3,4 ± 0,1	1,1	299,4	96,6

В каждую пробу внесено 310 мкг Си.

Таблица 2

Извлечение Cd из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 2

Cd accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Cd, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	32 ± 1,1	8,0	346 ± 18,3	86,5	8,5 ± 0,5	2,1	386,5	96,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	100 ± 5,2	25,0	261 ± 13,1	65,3	23,0 ± 1,2	5,8	384,0	96,1
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	100 ± 5,1	25,0	265 ± 14,4	66,3	27,0 ± 1,3	6,8	392,0	98,1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	60 ± 3,3	15,0	331 ± 16,2	82,8	7,1 ± 0,3	1,8	398,1	99,6

В каждую пробу внесено 400 мкг Cd.



Таблица 3

Извлечение Zn из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 3

Zn accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Zn, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	28 ± 1,2	25,5	73 ± 2,0	66,4	5,6 ± 0,2	5,1	106,6	97,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	39 ± 2,1	35,5	56 ± 3,1	50,9	9,7 ± 0,5	8,8	104,7	95,2
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	50 ± 2,3	45,5	48 ± 2,7	43,6	12,0 ± 0,6	10,9	110,0	100,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	26 ± 1,2	23,6	78 ± 3,0	70,9	4,6 ± 0,2	4,2	108,6	98,7

В каждую пробу внесено 110 мкг Zn.

Таблица 4

Извлечение Pb из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 4

Pb accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Pb, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	190 ± 10,1	51,4	149 ± 7,4	40,3	30,0 ± 1,4	8,1	369	99,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	196 ± 9,3	53,0	136 ± 6,8	36,8	40,0 ± 2,0	10,8	370	100,0
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	310 ± 15,2	83,8	27 ± 1,2	7,3	32,0 ± 1,6	8,6	369	99,7
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	200 ± 9,2	54,1	144 ± 7,1	38,9	25,0 ± 1,2	6,8	369	99,7

В каждую пробу внесено 370 мкг Pb.



Результаты накопления тяжелых металлов бактериями в пересчете на грамм сухого веса бактериальной биомассы представлены в таблице 5.

Таблица 5

Накопление Cu, Cd, Zn и Pb клетками бактерий (n=3)

Table 5

Accumulation of Cu, Cd, Zn and Pb by bacterial cells (n = 3)

Штамм	мг металла на г сухого веса биомассы бактерий			
	Cu	Cd	Zn	Pb
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	44,6 ± 2,3	22,9 ± 1,8	17,5 ± 1,6	158,3 ± 6,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	90,0 ± 3,2	90,9 ± 4,4	22,9 ± 1,8	140,0 ± 5,6
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	111,0 ± 4,4	83,3 ± 4,2	33,3 ± 2,2	182,4 ± 7,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	17,7 ± 1,7	46,2 ± 2,5	20,0 ± 1,7	142,9 ± 5,5

Как следует из данных, представленных в таблице 5, наибольшей аккумулирующей емкостью по отношению к металлам обладают бактерии штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329. Они накапливают больше других исследованных штаммов меди, цинка и свинца на грамм сухой биомассы.

Лучше других металлов бактериальные клетки аккумулируют свинец (от 140,0 до 182,4 мг на грамм сухого веса биомассы), хуже — цинк (от 17,5 до 33,3 мг на грамм сухого веса биомассы).

Известно, что Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} накапливаются внутри клетки, хотя незначительное количество металлов связывается с их поверхностью. Благодаря системам транспорта магния, марганца и кальция часть кадмия поступает внутрь клетки, в то время, как большая его часть накапливается на поверхности [10, 11].

Из данных литературы известно, что накопление тяжелых металлов различными микроорганизмами может колебаться от нескольких десятков до сотен мг/г сухой биомассы. Максимальное накопление Cu, Cd, Zn и Pb составляло для *Pseudomonas stutzeri* 96,9 мг Cu, 278 мг Cd, 17,7 мг Zn и 270,4 мг Pb на г сухого веса бактериальной биомассы [11].

Исследования, проведенные нами в 2002 г., показали, что резистентные к тяжелым металлам бактерии рода *Pseudomonas*, изолированные из прибрежной части Одесского залива, аккумулировали кадмий до 7,5 мг/г сухой биомассы [2].

Таким образом, штамм *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329, эффективно извлекающий из раствора кадмий, цинк, медь и свинец, представляет интерес для дальнейших биотехнологических исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заєць І.Є., Вознюк Т.М., Ковальчук М.В., Крамаров С.М., Козировська Н.О. Активність консорціуму бактерій в агроценозах сої на забруднених важкими металами чорноземних територіях Придніпров'я // Наука та інновації. — 2007. — Т. 3. — № 6. — С. 26–37.
2. Іваниця В.А., Бухтияров А.Е., Захарія А.Н. Аккумуляція кадмія морськими бактеріями // Вісник Одеського національного університету. — 2002. — Т. 7. — № 1. — С. 200–204.
3. Іваниця В.О., Васильєва Н.Ю., Лісютин Г.В., Бухтияров А.Є., Гудзенко Т.В. Токсична і мутагена активність забруднення акваторії острова Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — № 2. — С. 36–42.
4. Сафронова Н.С., Венецианов Е.В., Ершова Е.Ю. Комплекс аналитических методов для определения содержания и форм существования тяжелых металлов в природных водных объектах // Водные ресурсы. — 1997. — Т. 24. — № 4. — С. 477–485.
5. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. — М.: Мир, 1991. — 358 с.
6. Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S., Das S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation // Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 2013. — V. 97. — № 2. — P. 561–571.
7. Kapoor A., Viraraghavan T. Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review // Bioresource Technology. — 1995. — V. 53. — № 3. — P. 195–206.
8. McEldowney S. Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass // Appl. and Environ. Microbiol. — 1994. — V. 60. — № 8. — P. 2759–2765.
9. Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. Heavy metal toxicity and the environment // EXS. — 2012. — V. 101. — P. 133–164.
10. Wang J., Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future // Biotechnology Advances. — 2009. — V. 27. — № 2. — P. 195–226.
11. Vijayaraghavan K., Yeoung-Sang Y. Bacterial biosorbents and biosorption // Biotechnology Advances. — 2008. — V. 26. — № 3. — P. 266–291.

Стаття надійшла до редакції 25.11.2012 р.



В.О. Іваниця, А.Є. Бухтіяров, Г.В. Лісютін, О.М. Захарія, Т.В. Гудзенко

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

АКУМУЛЯЦІЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ PSEUDOMONAS

Реферат

Вивчена здатність чотирьох штамів бактерій роду *Pseudomonas* нагромаджувати з розчину мідь, кадмій, цинк і свинець. Показано, що бактерії досліджуваних штамів псевдомонад вилучають з розчину від 7,4 до 64,5% міді, від 8,0 до 25,0% кадмію, від 23,6 до 45,5% цинку, від 51,1 до 83,8% свинцю. Найбільшою здатністю до акумуляції важких металів характеризувалися бактерії штаму *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329, які вилучають з розчину 64,5% міді, 25,0% кадмію, 45,5% цинку, 83,8% свинцю. Вони накопичують мідь, цинк і свинець більше інших досліджених штамів на грам сухої біомаси. Із досліджених металів бактеріальні клітини краще акумулюють свинець (від 140,0 до 182,4 мг/г сухої ваги біомаси), гірше — цинк (від 17,5 до 33,3 мг/г сухої ваги біомаси).

Ключові слова: гетеротрофні бактерії, Cu, Cd, Zn, Pb, акумуляція.

**V.O. Ivanytsia, A.E. Bukhtiyarov, G.V. Lisyutin, O.M. Zacharya,
T.V. Gudzenko**

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

ACCUMULATION OF HEAVY METALS BY BACTERIA OF GENUS PSEUDOMONAS

Summary

The ability of four strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* to accumulate copper, cadmium, zinc and lead from solution was investigated. It is shown that bacteria of the studied *Pseudomonas* strains remove from 7.4 to 64.5% of copper, 8.0 to 25.0% of cadmium, from 23.6 to 45.5% of zinc, from 51.1 to 83.8% of lead from the solution. The greatest ability to accumulate heavy metals is marked for bacteria of the strain *Pseudomonas maltophilia* ONU 329, which retrieve 64.5% of copper, 25.0% of cadmium, 45.5% of zinc, 83.8% of lead from the solution. They accumulate more copper, zinc and lead per gram of dry biomass than other strains. Bacterial cells accumulate lead better (from 140.0 to 182.4 mg/g of dry weight of biomass), and zinc worse (from 17.5 to 33.3 mg/g of dry weight biomass) than other metals.

Key words: heterotrophic bacteria, Cu, Cd, Zn, Pb, accumulation.



УДК 579.222: 547.979.8: 582.284

А.К. Велигодська, О.В. Федотов

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

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ КАРОТИНОЇДІВ У ДЕЯКИХ ВИДІВ БАЗИДІАЛЬНИХ ГРИБІВ

Досліджено загальний вміст каротиноїдів у карпофорах 50 видів базидіоміцетів з яких 27 належать до порядку Polyporales та 23 – порядку Agaricales. Карпофори видів Ganoderma applanatum, Fistulina hepatica та Laetiporus sulphureus мають найвищий загальний вміст каротиноїдів. Виділені в чисту культуру з дикоростучих плодових тіл 24 штами 8 видів базидіальних грибів, для яких визначена динаміка росту та накопичення каротиноїдів в міцелії та культуральному фільтраті при ферментації на глюкозо-пептонному середовищі. Відібрано штами видів Fistulina hepatica та Laetiporus sulphureus – перспективні для подальших досліджень з метою оптимізації умов культивування для отримання каротиноїдів міцеліального та позаклітинного походження.

Ключові слова: каротиноїди, базидіоміцети, карпофори, міцелій, культуральний фільтрат.

Широке коло проблем інтенсифікації різноманітних галузей виробництва від отримання нових медичних препаратів і речовин харчового та сільськогосподарського призначення до утилізації відходів вирішується шляхом залучення до цих технологій біологічно активних речовин (БАР) [2, 9, 15]. Одними з таких затребуваних БАР є каротиноїди. Це натуральні пігменти, полієнові ізопреноїди терпенового ряду, які широко розповсюджені в живій природі. До їх біосинтезу здатні рослини, гриби і деякі тварини та мікроорганізми [1, 6, 7]. Для каротиноїдів виявлено низку лікарських властивостей, зокрема антиоксидантну, радіопротекторну, антиканцерогенну, імуномодулюючу та інші. Зростаючий попит на ці пігменти обумовлює пошук потенційних джерел їх отримання з розширенням номенклатури біологічних агентів, в тому числі, за рахунок грибних організмів [2, 4, 12].

Ґрунтовне вивчення здатності до каротиногенезу у мікологічних об'єктів почалося нещодавно і торкається, переважно, нижчих грибів. Припускають, що близько третини представників цього царства спромож-



ні до синтезу каротиноїдів [1, 12, 14]. Зокрема, наряду з традиційними джерелами отримання каротиноїдів — рослинної сировини *Haematococcus*, туніки асцидії *Halocynthia aurantium*, використовують і біомасу пліснявих грибів *Blakeslea trispora* та *Neurospora crassa* [1, 4]. Досліджено вміст каротиноїдів в плодкових тілах вищих базидіальних грибів родів *Hygrophorus*, *Fistulina*, *Cantharellus*, *Boletus*, *Suillus* і ін. [14]. Однак, наявні дані дають недостатньо сформоване уявлення про якісний та кількісний вміст каротиноїдів у базидіоміцетах і міцелії та культуральному фільтраті при їх культивуванні, що обумовлює необхідність подальших скринінгових робіт у цьому напрямку.

Більшість базидіоміцетів у культурі невибагливі до складу живильних середовищ, є істивними та неотруйними, що виправдовує залучення їх до мікробіологічного виробництва [3, 11, 15].

Виходячи з вищезазначеного, метою роботи було вивчення загального вмісту каротиноїдів у карпофорах, міцелії і культуральному фільтраті деяких видів базидіоміцетів.

Матеріали і методи

На першому етапі дослідження визначали вміст каротиноїдів у карпофорах 50 видів макроміцетів, з яких 27 належать до порядку *Polyporales* та 23 — порядку *Agaricales*. Використовували дикорослі плодкові тіла і отримані у лабораторних умовах. На другому етапі вміст каротиноїдів досліджували у міцелії та культуральному фільтраті 24 штамів 8 видів базидіоміцетів, що були виділені в чисту культуру з дикоростучих плодкових тіл (ПТ), зібраних в різних місцевостях Донецької області. Це штамми: *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill. — T-10, Ff-09, Ff-1201; *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. — Ls-08, Ls-09, Ls-0912; *Fistulina hepatica* Schff. ex Fr. — Fh-08, Fh-18; *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. — F-03, F-06, F-1, F-202; *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. — Hk-35, P-004, P-01, P-039, P-107, P-192, P-208; *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. — Sc-10, Sc-1101, Sc-1102; *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. — Th-11 та *Trichaptum biforme* (Fr.) Ryv. — Tb-11 [11].

Систематичне положення досліджених базидіоміцетів встановлено згідно сучасних літературних джерел [13].

Карпофори промивали, висушували та подрібнювали до розміру часток $0,1 \pm 0,01$ мм. Для отримання міцелію та культурального фільтрату (КФ) дослідні штамми культивували поверхнево в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл на глюкозо-пептонному живильному середовищі (ГПС) з вихідним рН₀ $6,5 \pm 0,2$ од. об'ємом 50 мл. ГПС мало таких склад, г/л: глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,05; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 [3, 5]. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів вирощені на сусло-агарі. Термін культивування — 6, 9 та 12-ть діб при температурі 27,5 °С. Після закін-

чення терміну культивування, відокремлювали культуральний фільтрат і міцелій шляхом фільтрування культуральної рідини при 5 ± 1 °С. Міцелій додатково підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до $1 \pm 0,5$ °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання в охолодженій ступці з поступовим додаванням екстрагенту. В подальших дослідженнях використовували подрібнені карпофори (ПК), гомогенізований міцелій (МГ) та КФ.

Абсолютно суху біомасу (АСБ) ПК та міцелію визначали ваговим методом [5].

Визначення вмісту каротиноїдів проводили у ацетонових витяжках мікологічного матеріалу спектрофотометричним методом та розраховували за формулою Ветштейна [8].

Дослідження проводили у трикратній повторності. Статистичне опрацювання проводили згідно керівництву [10]. Результати представляли як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Рівень кореляції між вмістом каротиноїдів у міцелії та КФ одноікових культур визначали за допомогою коефіцієнту кореляції Пірсона (лінійний коефіцієнт кореляції).

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження було проведено оцінку загального вмісту каротиноїдів у 225 карпофорах 27 видів поліпоральних та у 220 – 23 видів агарикальних базидіоміцетів. Узагальнені результати цього дослідження представлені в табл. 1, де також наводяться дані з систематичного положення грибів і кількості досліджених зразків ПТ.

Таблиця 1

Загальний вміст каротиноїдів у карпофорах деяких видів базидіоміцетів

Table 1

Total content of carotenoids in basidiocarps of some species of Basidiomycetes

Вид	Кількість досліджених зразків ПТ	Вміст каротиноїдів, мг/г
Порядок <i>Polyporales</i>		
<i>Auricularia auricula-judae</i> *	12	$0,85 \pm 0,05$
<i>Laeticorticium roseum</i> *	3	$0,70 \pm 0,01$
<i>Chaetoporus ambiguus</i> *	6	$0,10 \pm 0,01$
<i>Sparassis crispa</i> *	9	$0,25 \pm 0,02$
<i>Fibuloporia mollusca</i> *	6	$1,05 \pm 0,03$
<i>Tyromyces lacteus</i> *	9	$1,60 \pm 0,02$



Продовження таблиці 1

Вид	Кількість досліджених зразків ПТ	Вміст каротиноїдів, мг/ г
<i>Tyromyces revolutus</i> *	3	1,20 ± 0,01
<i>Tyromyces undosus</i> *	6	1,03 ± 0,01
<i>Irpex lacteus</i> *	9	2,67 ± 0,03
<i>Amyloporia lenis</i> *	3	1,50 ± 0,02
<i>Hydnum ochraceum</i> *	3	1,00 ± 0,02
<i>Trametes squalens</i> *	6	1,50 ± 0,02
<i>Trametes campestris</i> *	6	2,01 ± 0,02
<i>Trametes versicolor</i> *	15	0,61 ± 0,11
<i>Trametes zonatus</i> *	9	0,64 ± 0,04
<i>Fomes fomentarius</i> *	12	5,83 ± 0,49
<i>Heterobasidion annosum</i> *	12	1,33 ± 0,06
<i>Fomitopsis pinicola</i> *	6	0,90 ± 0,41
<i>Daedalea quercina</i> *	6	0,90 ± 0,01
<i>Piptoporus betulinus</i> *	12	1,50 ± 0,10
<i>Polyporus squamosus</i> *	9	2,30 ± 0,07
<i>Laetiporus sulphureus</i> *	9	50,14 ± 10,74
<i>Ganoderma applanatum</i> *	9	55,04 ± 7,35
<i>Ganoderma lucidum</i> *	15	8,90 ± 0,15
<i>Inonotus obliquus</i> *	12	2,05 ± 0,03
<i>Phellinus igniarius</i> *	9	3,72 ± 0,76
<i>Phellinus pomaceus</i> *	9	1,90 ± 0,05
Порядок Agaricales		
<i>Agaricus arvensis</i> *	5	2,45 ± 0,40
<i>Agaricus bisporus</i> **	9	4,15 ± 0,16
<i>Agaricus campestris</i> *	5	2,34 ± 0,01
<i>Agrocybe cylindracea</i> **	9	16,10 ± 0,30
<i>Coprinus comatus</i> *	15	2,50 ± 0,05

Закінчення таблиці 1

Вид	Кількість досліджених зразків ПТ	Вміст каротиноїдів, мг/ г
<i>Coprinus micaceus</i> *	15	2,50 ± 0,05
<i>Fistulina hepatica</i> *	9	40,74 ± 1,20
<i>Flammulina velutipes</i> *	27	25,28 ± 5,31
<i>Flammulina velutipes</i> **	3	6,50 ± 0,09
<i>Lentinus edodes</i> **	9	0,81 ± 0,08
<i>Marasmius oreades</i> *	3	3,70 ± 0,05
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> **	3	3,75 ± 0,01
<i>Pleurotus eryngii</i> **	6	1,50 ± 0,02
<i>Pleurotus ostreatus</i> *	34	0,94 ± 0,45
<i>Pleurotus ostreatus</i> **	3	5,56 ± 0,03
<i>Pleurotus ostreatus</i> var.Florida **	3	5,30 ± 0,01
<i>Kuehneromyces mutabilis</i> *	9	4,88 ± 0,13
<i>Pholiota aurivella</i> *	3	1,80 ± 0,05
<i>Pholiota squarrosa</i> *	3	1,20 ± 0,05
<i>Schizophyllum commune</i> *	21	0,10 ± 0,04
<i>Stropharia aeruginosa</i> *	3	3,25 ± 0,05
<i>Stropharia rugosoannulata</i> **	6	5,95 ± 0,05
<i>Lyophyllum loricatum</i> *	5	2,13 ± 0,03
<i>Lyophyllum connatum</i> *	5	2,04 ± 0,12
<i>Tricholoma flavovirens</i> *	5	9,35 ± 3,08
<i>Tricholoma sejunctum</i> *	5	3,14 ± 0,02

Примітка: “ * ” — дикоростуче у природі ПТ, “ ** ” — комерційне ПТ.

Як видно з отриманих даних (табл. 1), спостерігаються значні коливання загального вмісту каротиноїдів у зразках плодових тіл як грибів одного виду (наприклад, *F. velutipes* та *P. ostreatus*), так і різних видів, що зумовлює необхідність проведення скринінгу з метою пошуку біосинтетично продуктивніших штамів. Встановлені внутрішньовидові відмінності за вмістом каротиноїдів ймовірно залежать від умов вирощування грибів, що показано в низці робіт [1, 2, 9]. Так, представлені дані вмісту



каротиноїдів у карпофорах *F. velutipes* та *P. ostreatus*, що отримані з дикоростучих та культивованих грибів суттєво відрізняються.

Як видно із наведених у табл. 1 даних, результати дослідження можна розподілити на три групи. До першої відноситься переважна частина (85%) карпофорів вивчених базидіоміцетів, що мають незначний вміст каротиноїдів, в межах від 0,10 мг/г (*S. ambiguus*) до 2,67 мг/г (*I. lacteus*). У другу групу входять 3 види поліпорових грибів (*P. igniarius*, *F. fomentarius* та *G. lucidum*) з вмістом каротиноїдів від 3,72 мг/г до 8,90 мг/г АСБ ПК. Найбільший вміст каротиноїдів: 50,14 мг/г і 55,04 мг/г АСБ мають плодові тіла *G. applanatum* та *L. sulphureus* відповідно.

Дослідження вмісту каротиноїдів в карпофорах агарикальних грибів показало що, агарикальні базидіоміцети у порівнянні з поліпоровими мають дещо вищий середній вміст каротиноїдів. Серед цих грибів переважна, але менша ніж у поліпорових, частина (52%) має вміст каротиноїдів у карпофорах, в межах від 0,10 (*S. commune*) до 2,50 мг/г (*S. micaceus*). У групу з помірним вмістом каротиноїдів від 3,14 (*T. sejunctum*) до 9,35 мг/г АСБ (*T. flavovirens*) можна віднести 11 видів. Найвищий загальний вміст каротиноїдів від 16,10 до 40,74 мг/г зареєстровано в плодових тілах 3 видів: *A. cylindracea*, *F. velutipes* та *F. hepatica*. Однак зазначимо, що ці показники є в 1,4 рази нижчими за вміст каротиноїдних речовин у плодових тілах трутового гриба *L. sulphureus*. Для порівняння отриманих даних зазначимо, що середній вміст каротиноїдів у міцелії *Blakeslea trispora* складає 18–36 мг/г АСБ [4].

Отже, вивчення загального вмісту каротиноїдів в екстрактах плодових тіл 50 видів базидіоміцетів дозволило виділити види трутових грибів — *G. applanatum* та *L. sulphureus* і види агарикових грибів — *A. cylindracea*, *F. velutipes* та *F. hepatica* з високим вмістом цих речовин.

Результати накопичення штамми АСБ при різних термінах культивування (рис.) показали, що всі культури досягають максимуму цього показника на 12-ту добу росту. Найпродуктивнішими тут є штамми *S. commune* Sc-1101 і Sc-10 та штам *F. velutipes* F-202. Найнижчі значення накопичення АСБ зафіксовані для штаму *P. ostreatus* P-192 та штаму *F. fomentarius* Ff-09. Отже, досліджені культури мають індивідуальні значення росту — накопичення біомаси в застосованих умовах культивування, що, ймовірно, відображає придатність цих умов для їх росту на ГПС.

Інтенсивність каротиногенезу досліджуваних штамів фіксували у культур такого самого віку, що і їх АСБ (табл. 2).

Встановлено, що більшість штамів здатні до поступового накопичення каротиноїдів в міцелії (83%) та близько половини — в культуральному фільтраті. Вміст каротиноїдів в КФ значно нижчий за такий в міцелії. Це можна пояснити роллю каротиноїдів для грибних організмів. Вважається, що вони беруть участь в окисно-відновних процесах в клітині і тому пов'язані з мітохондріями. Метаболічні процеси супроводжуються утворенням кисневих радикалів, що також, стимулює синтез у міцелії та

транспорт у живильне середовище цих антиокисних сполук. Утворення каротиноїдів та їх накопичення, як статевих гормонів, зростає з терміном культивування штамів [1, 4, 12]. Отже, виконуючи численні функції в грибному організмі, ці сполуки синтезуються та накопичуються в місцях локалізації зазначених процесів.

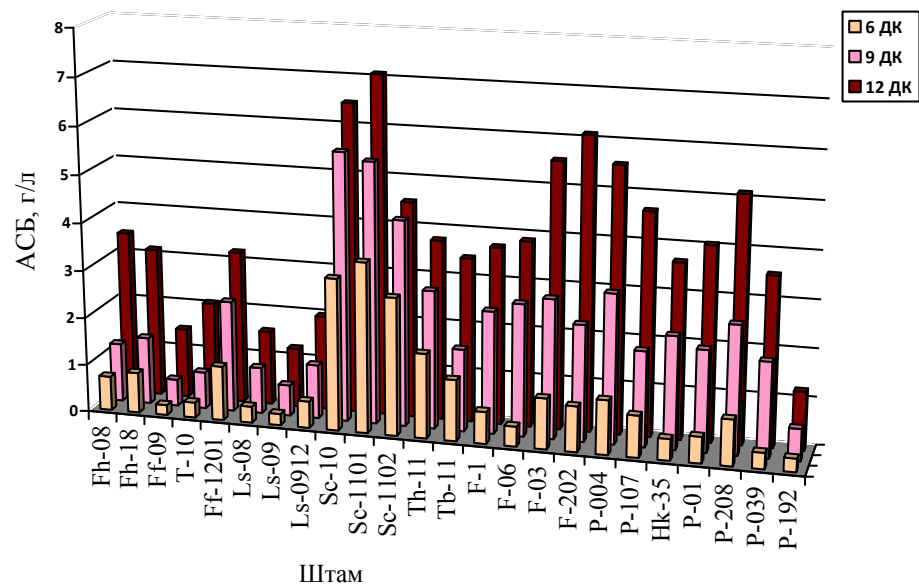


Рис. Динаміка накопичення біомаси штамми базидіоміцетів

Fig. Dynamic of accumulation of absolute dry biomass of the strains of Basidiomycetes

Для більшості штамів (75%) порядку *Polyporales* характерним є максимальне накопичення каротиноїдів в міцелії на 12 добу росту. Винятком є штами *T. hirsuta* Th-11 і *T. biforme* Tb-11, де такий максимум спостерігається на 9-ту добу. Максимальний вміст каротиноїдів в міцелії, серед поліпоральних грибів, зафіксовано для виду *L. sulphureus* з найбільшим значенням близько 5,13 мг/г у штаму *L. sulphureus* Ls-08. Щодо вмісту каротиноїдів в КФ, то для більшості штамів максимальний вміст цих речовин зафіксовано на 12-ту, а для штаму *F. fomentarius* T-10 – на 9-ту добу культивування. Найвищий рівень накопичення каротиноїдів у КФ спостерігався у штаму *L. sulphureus* Ls-0912, який достовірно не залежав від терміну культивування і коливався в межах від 0,12–0,15 мг/мл. Не зареєстровано вміст каротиноїдів в КФ штамів *T. hirsuta* Th-11 та *T. biforme* Tb-11.

Аналіз даних загального вмісту каротиноїдів у агарикальних грибів показав, що для більшості штамів (87%) найвищий вміст цих речовин в міцелії припадає на 12-ту добу культивування, а для штамів *P. ostrea-*



Таблиця 2

Динаміка накопичення каротиноїдів у міцелії та культуральному фільтраті штабів базидіоміцетів

Table 2

Dynamic of carotenoids accumulation at mycelium and culture filtrate of Basidiomycetes strains

Штам	Міцелій, мг/г			Термін культивування, доба			КФ, мг/мл		
	6	9	12	6	9	12	6	9	12
	Порядок <i>Polyporales</i>								
1	2	3	4	5	6	7			
<i>Fomes fomentarius</i> Ff-09	0,13 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,95 ± 0,11	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,02			
<i>Fomes fomentarius</i> Ff-1201	1,15 ± 0,52	2,06 ± 0,23	3,02 ± 0,34	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,11 ± 0,01			
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	0,45 ± 0,04	0,75 ± 0,12	1,05 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,04			
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	1,76 ± 0,23	3,07 ± 0,17	5,13 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,13 ± 0,01			
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-09	1,81 ± 0,07	2,98 ± 0,16	4,34 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02			
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-0912	1,95 ± 0,11	2,17 ± 0,45	3,56 ± 0,04	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,02			
<i>Trametes hirsuta</i> Th-11	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0	0	0			
<i>Trichaptum bifforme</i> Tb-11	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0	0	0			
Порядок <i>Agaricales</i>									
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	1,53 ± 0,02	2,20 ± 0,06	3,06 ± 0,12	0,14 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,25 ± 0,05			
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-18	1,78 ± 0,12	2,54 ± 0,05	3,44 ± 0,10	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,03			

Закінчення таблиці 2

1	2	3	4	5	6	7
<i>Flammulina velutipes</i> F-03	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0	0	0
<i>Flammulina velutipes</i> F-06	0,13 ± 0,03	0,16 ± 0,06	0,19 ± 0,02	0	0	0
<i>Flammulina velutipes</i> F-1	0,11 ± 0,01	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0	0	0
<i>Flammulina velutipes</i> F-202	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0	0	0
<i>Pleurotus ostreatus</i> Hk-35	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,15 ± 0,02
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-01	0,33 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,43 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-039	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0	0	0,07 ± 0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-107	0,18 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,47 ± 0,06	0,07 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,03
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-192	0,19 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0	0	0
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-208	0,15 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,31 ± 0,12	0,04 ± 0,01	0,09 ± 0,05	0,12 ± 0,05
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-004	0,14 ± 0,01	0,43 ± 0,05	0,55 ± 0,12	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,02
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	0,05 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0	0	0
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-1101	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0	0	0
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-1102	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0	0	0

Примітка: « 0 » — загальний вміст каротиноїдів не зафіксовано



tus P-01 і P-192 — на 9-ту добу. Серед вивчених штамів максимальний вміст каротиноїдів зафіксовано для штамів *F. hepatica* Fh-08 і Fh-18, який коливається в межах від 3,06 до 3,44 мг/г і в 1,5 рази менше за максимального значення для *L. sulphureus* Ls-08. Щодо вмісту каротиноїдів в КФ, то він не зафіксований для 9 штамів (56%) досліджених агарикальних грибів. Решта штамів, як і поліпоральні, мали значний рівень реєстрованих показників. Лідерами тут є *F. hepatica* Fh-18 та Fh-08 з рівнем загального вмісту каротиноїдів від 0,22 до 0,25 мг/мл на 12-ту добу культивування. Підвищення вмісту БАР, зокрема оксидоредуктаз, з терміном культивування, також зареєстровано для переважної більшості досліджених штамів базидіоміцетів [3].

Обчислення лінійного коефіцієнту кореляції (табл. 3) між вмістом каротиноїдів у міцелії та КФ показало, що позитивна кореляція має місце в діапазоні 12–67% дослідів.

Таблиця 3

Показники лінійної кореляції (r) між вмістом каротиноїдів у міцелії та культуральному фільтраті штамів базидіоміцетів

Table 3

The linear correlation (r) between the carotenoids content of mycelium and culture filtrate of Basidiomycetes strains

Штам	r	Штам	r
<i>F. hepatica</i> Fh-08	0,99	<i>L. sulphureus</i> Ls-09	0,97
<i>F. hepatica</i> Fh-18	0,99	<i>L. sulphureus</i> Ls-0912	0,31
<i>F. fomentarius</i> Ff-09	0,96	<i>P. ostreatus</i> P-004	0,53
<i>F. fomentarius</i> T-10	0,32	<i>P. ostreatus</i> P-107	0,94
<i>F. fomentarius</i> Ff-1201	0,97	<i>P. ostreatus</i> Hk-35	0,99
<i>L. sulphureus</i> Ls-08	0,99	<i>P. ostreatus</i> P-01	0,66
<i>P. ostreatus</i> P-208	0,97		

Таким чином, в результаті проведених досліджень показано, що найбільший загальний вміст каротиноїдів виявлено в плодових тілах штамів базидіоміцетів, які рекомендовано до виділення в чисту культуру. Це види поліпоральних грибів — *G. applanatum* і *L. sulphureus* та види агарикальних грибів — *A. cylindracea*, *F. velutipes* і *F. hepatica* з високим вмістом цих речовин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. — 230 с.
2. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
3. Волошко Т.Є. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз / Т.Є. Волошко, О.В. Федотов // Мікробіологія і біотехнологія. — Одеса: ОНУ ім. І.І. Мечнікова, 2011. — №. 4(16). — С. 69–81.
4. Гесслер Н.Н. Участие Я-каротина в антиоксидантной защите грибной клетки. / Н.Н. Гесслер, А.В. Соколов, Т.А. Белозерская // Прикладная биохим. и микробиол. 2003. — Т. 39. № 4. — С. 427–429.
5. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник. / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
6. Задорожный П.А. Технохимическая характеристика и перспективы применения дальневосточной асцидии *Halocynthia aurantium* / П.А. Задорожный, Е.С. Моторя, Т.Н. Пивненко, Л.И. Дроздова // Хранение и переработка сельхозсырья. 2009. — № 7. — С. 34–37.
7. Камінська М. Каротинсинтезуючі дріжджі *Phaffia rhodozyma* / М. Камінська, Л. Сологуб // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. — Вип. 37. — С. 3–12.
8. Мусиенко М.М. Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений / М.М. Мусиенко, Т.В. Паршикова, П.С. Славный. — К.: Фитосоцицентр, 2001. — 200 с.
9. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія / Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2010. — 623 с.
10. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
11. Федотов О.В. Колекція культур шапинкових грибів — основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету, Сер. А: Природничі науки, Вип. 1. — Донецьк: ДонНУ, 2012. — С. 209–213.
12. Goodwin T.W. The Biochemistry of carotenoids. Plants. / T.W. Goodwin // Chapman & Hall, London. — 1980. — Vol. 1. — P. 315.
13. Kirk P.M. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers — Wallingford, CAB International, 2001. — 655 p.
14. Ribeiro B. Do Bioactive Carotenoids Contribute to the Color of Edible Mushrooms? / B. Ribeiro P. Guedes de Pinho, P.B. Andrade, C. Oliveira,



A. Cysar, S. Ferreira, P. Baptista, P. Valentro // The Open Chemical and Biomedical Methods Journal. — 2011. — № 4 — P. 14–18.

15. Wasser S.P. Medicinal mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved problems / S.P. Wasser // Int. J. Med. Mush. — 2010. — 12 (1). — P. 1–16.

Стаття надійшла до редакції2012 р.

А.К. Велигодская, О.В. Федотов

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩЕГО СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНОИДОВ В НЕКОТОРЫХ ВИДАХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Реферат

Исследовано общее содержание каротиноидов в карпофорах 50 видов базидиомицетов из которых 27 относятся к порядку *Polyporales* и 23 — порядку *Agaricales*. Карпофоры видов *Ganoderma applanatum*, *Fistulina hepatica* и *Laetiporus sulphureus* имеют высокое общее содержание каротиноидов и рекомендованы к выделению в культуру. Выделено 24 штамма 8 видов базидиальных грибов, для которых определена динамика роста и накопления каротиноидов в мицелии и культуральном фильтрате при ферментации на глюкозо-пептонной среде. Отобраны штаммы видов *Fistulina hepatica* и *Laetiporus sulphureus* — перспективные для дальнейших исследований с целью оптимизации условий культивирования для получения каротиноидов мицелиального и внеклеточного происхождения.

Ключевые слова: каротиноиды, базидиомицеты, карпофоры, мицелий, культуральный фильтрат.



A.K. Veligodska, O.V. Fedotov

Donetsk National University, 46, Schorsa str., Donetsk, 83000, Ukraine,
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: bio.graif@yandex.ua

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF GENERAL CAROTENOID CONTENT IN SOME SPECIES OF BASIDIOMYCETES

Summary

There were investigated the total carotenoid content in fruiting bodies of 50 species of Basidiomycetes, 27 of which are belonging to order *Polyporales* and 23 to order *Agaricales*. The highest total carotenoid content in *Ganoderma applanatum*, *Fistulina hepatica* and *Laetiporus sulfureus* carpophorus was found out. The dynamics of growth and accumulation of carotenoids in the mycelium and cultural filtrate of 24 strains of 8 basidiomycetes species were studied. Promising for the further research to develop the methods for carotenoids mycelial and extracellular origin strains of species *Fistulina hepatica* and *Laetiporus sulphureus* were selected.

Key words: carotenoids, basidiomycetes, carpophorus, mycelium, cultural filtrate.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 10 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди — до 15 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

До рукопису додається електронний варіант статті мовою оригіналу та англійською мовою на дискі (Word, шрифт Times New Roman,



кегель 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

Текст статті має включати такі складові: вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; література.

До кожного примірника статті додається анотація мовою оригіналу та реферати українською / російською (в залежності від мови оригіналу статті), та англійською мовами (кожен реферат на окремому аркуші). Особливу увагу слід приділяти написанню резюме статті англійською мовою. Для цього доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором(ми).

Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, адреси, повну назву статті відповідною мовою. Після тексту реферату з абзацу розміщуються ключові слова.

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латинською мовою.

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

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

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

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі TIF, JPG). Осі координат



на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті та дублюються окремим файлом на CD.

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

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

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

У посиланні наводять прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел. Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. — 9th ed. — Baltimore; London, 1986. — Vol. 2. — 1599 p.

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

Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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

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

Зам. № 573. Тираж 100 прим.

Видавець та виготовлювач
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38 (048) 723 28 39