

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

**№ 1(13)
2011**

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 1

•
2011

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

I.V. Dovgal, V.O. Fedorenko, B.M. Galkin, P.I. Gvozdyak, R.I. Gvozdyak, S.P. Gudz, G.O. Iutynska, L.V. Kapreliants, O.A. Kiprianova, N.K. Kovalenko, I.K. Kurdish, B.P. Matselyukh, B.N. Milkus, G.G. Minicheva, M. Niemialtowsky, V.P. Patyka, V.S. Pidgorsky, V.P. Polishuk, V.K. Pozur, I.S. Sherbatenko, I.G. Skrypal, M.Ya. Spivak, A.A. Sybirny, Yu.M. Sivolap, V.M. Totsky, F.I. Tovkach, L.D. Varbanets, A.I. Vinnikov, Yu.L. Volyanskiy, Yu.P. Zaytsev, N.M. Zhdanova

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established by Odesa National Mechnykov University.
Registration certificate: KV № 11462-335R. Date of issue 07.07.2006.

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).

PUBLISHERS

Odesa National Mechnykov University
Society of Microbiologists of Ukraine named after S.M. Vinogradsky
Odesa Society of Biologists and Biotechnologists

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

Publishing editor N.G. Yurgelaitis
Editors: I.M. Omelchenko, 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, 748-11-01
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2011

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 1



2011

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

Л.Д. Варбанець, А.І. Вінников, Ю.Л. Волянський, Б.М. Галкін, П.І. Гвоздяк, Р.І. Гвоздяк, С.П. Гудзь, І.В. Довгаль, Н.М. Жданова, Ю.П. Зайцев, Г.О. Іутинська, Л.В. Капрельянц, О.А. Кіпріанова, Н.К. Коваленко, І.К. Курдиш, Б.П. Мацелюх, Б.Н. Мілкус, Г.Г. Мінічева, М. Немялтовський, В.П. Патица, В.С. Підгорський, В.К. Позур, В.П. Поліщук, А.А. Сибірний, Ю.М. Сиволап, І.Г. Скрипаль, М.Я. Співак, Ф.І. Товкач, В.М. Тоцький, В.О. Федоренко, І.С. Щербатенко

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 № 11462-335Р від 07.07.2006 р.

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

ВИДАВЦІ

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
Товариство мікробіологів України імені С.М. Виноградського
Товариство біологів і біотехнологів м. Одеси

Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс
Редактори: І.М. Омельченко, 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, 748-11-01

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

www.mbt.onu.edu.ua

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko, I.G. Uspenskyi
SCREENING OF LACTOBACTERIA AND BIFIDOBACTERIA STRAINS
BY PROBIOTIC PROPERTIES 6

N.S. Vodzinska, O.V. Kondratyuk, T.O. Filipova
INFLUENCE OF QUINOLINILPORPHYRIN BISMUT AND TIN
COMPLEXES ON *LACTOCOCCUS LACTIS* PHAGES ACTIVITY..... 17

I.I. Romanovska, S.S. Dekina
THE DEVELOPMENT OF TEXTILE WOUND COATING WITH
ACREMONIUM CHRYSOGENUM PROTEASE C 26

M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, S.G. Soboleva, T.O. Filipova
THE PHENOTHIAZINE COMPOUND ANTIMICROBIAL ACTIVITY 34

T.M. Kornya, S.O. Ignatova
SELECTION *IN VITRO* OF THE WINTER COMMON WHEAT
UNDER THE INFLUENCE OF FUSARIC ACID..... 41

**N.S. Shcheglova, O.V. Karpenko, R.I. Vildanova, M.V. Prystay,
N.Yu. Lisova, T.M. Nogina**
INFLUENCE OF BIOGENIC SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES
ON FORMATION OF SYMBIOSIS *SYNORHIZOBIUM MELILOTI*
WITH ALFALFA 48

L.S. Yastremska
EFFECT OF REDOX POTENTIALS ON PHYSIOLOGICAL
STATE OF MICROORGANISMS OF GENUS
CLOSTRIDIUM 57

L.V. Avdeeva, A.I. Osadcha, M.A. Kharkhota
PROPERTIES OF THE CELLULASES PRODUCED BY BACTERIA
OF GENUS *BACILLUS* 69

I.S. Zambriborchsh
RESEARCH OT ANDROGENESIS IN VITRO OF RICE
(*ORYZA SATIVA L.*)..... 78

PAGES OF HISTORY

V.Yu. Barshteyn
PAGES OF HISTORY OF MICROBIOLOGY
IN MEDALIC ART 86

INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 99

З М І С Т

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

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко, І.Г. Успенський
СКРИНІНГ ШТАМІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ТА
БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗА ПРОБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ..... 6

Н.С. Водзінська, О.В. Кондратюк, Т.О. Філіпова
ВПЛИВ ВІСМУТОВОГО ТА ОЛОВ'ЯНОГО КОМПЛЕКСІВ
ХІНОЛІНІЛПОРФІРИНУ НА АКТИВНІСТЬ ФАГІВ *LACTOCOCCUS*
LACTIS..... 17

І.І. Романовська, С.С. Декіна
РОЗРОБКА ТЕКСТИЛЬНОГО РАНОВОГО ПОКРИТТЯ З
ПРОТЕАЗОЮ С *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* 26

М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, С.Г. Соболева, Т.О. Філіпова
АНТИМІКРОБНА ДІЯ ФЕНОТІАЗИНОВИХ СПОЛУК 34

Т.М. Корня, С.О. Ігнатова
СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ВПЛИВУ
ФУЗАРІЄВОЇ КИСЛОТИ..... 41

**Н.С. Щеглова, О.В. Карпенко, Р.І. Вільданова, М.В. Пристай,
Н.Ю. Лісова, Т.М. Ногіна**
ВПЛИВ БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА
ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ *SYNORHIZOBIUM MELILOTI* З
ЛЮЦЕРНОЮ 48

Л.С. Ястремська
ВПЛИВ ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ
НА ФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ
CLOSTRIDIUM 57

Л.В. Авдеева, А.І. Осадча, М.А. Хархота
ВЛАСТИВОСТІ ЦЕЛЮЛАЗ, ПРОДУКОВАНИХ БАКТЕРІЯМИ
РОДА *BACILLUS*..... 69

І.С. Замбріборщ
ДОСЛІДЖЕННЯ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* РИСУ
(*ORYZA SATIVA L.*) 78

С Т О Р І Н К И І С Т О Р І І

В.Ю. Барштейн
СТОРИНКИ ІСТОРІЇ МІКРОБІОЛОГІЇ В МЕДАЛЬЄРНМУ
МИСТЕЦТВІ..... 86

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 95

УДК 576.8.095.38

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко, І.Г. Успенський

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Ак. Заболотного, 154, Київ, Д 03143, Україна,
тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

СКРИНІНГ ШТАМІВ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ ЗА ПРОБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

*Досліджено пробіотичні властивості штамів біфідобактерій, ізольованих від людей різних вікових груп. Відібрані штами *B. animalis* subsp. *lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium* sp. 271 та *B. bifidum* 278 як перспективні для створення пробіотиків для дітей, а штами *Lactobacillus* sp. 25А, *Bifidobacterium* sp.82Д та *B. bifidum* 34s – для людей середнього та похилого віку. Дані штами є антагоністами широкого спектру умовно патогенних мікроорганізмів, активно адгезують до клітин макроорганізму, відрізняються високою швидкістю росту і активністю кислотоутворення. Штами, ізольовані від дорослих людей, є толерантними до присутності фізіологічної концентрації жовчі у середовищі та низьких значень рН (штам *Lactobacillus* sp. 25А).*

Ключові слова: біфідобактерії, молочнокислі бактерії, адгезія, чутливість до антибіотиків, скринінг, пробіотики.

Одним з досягнень кінця ХХ ст. є розробка і впровадження у життя концепції «пробіотики і функціональне харчування». Практика застосування біопрепаратів та біопродуктів показала в цілому позитивний вплив на відновлення кишкового мікробіоценозу та підвищення загальної резистентності макроорганізму.

Хоча для виготовлення пробіотиків і продуктів харчування використовуються представники різних видів, і навіть родів, найбільш популярними в наш час є препарати та біопродукти на основі біфідобактерій [1]. Згідно вимогам Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), пробіотиками називаються лише ті препарати, що відповідають критеріям відбору штамів. Зокрема, вони повинні проявляти високу антагоністичну активність проти патогенних мікроорганізмів (в тому числі, продукувати специфічні антимікробні речовини) та мати здатність до адгезії на клітинах епітелію макроорганізму, мати природ-



ну стійкість до широкого спектру антибіотиків [2]. Крім того, пробіотичні культури повинні зберігати життєздатність при проходженні через шлунково-кишковий тракт та при зберіганні. На жаль, за даними літератури, штами біфідобактерій, що широко використовуються у наш час у складі біопрепаратів та біопродуктів часто не відповідають вищезазначеним вимогам. Тому, актуальною і перспективною є направлена селекція штамів біфідобактерій за заданими властивостями для створення більш ефективних пробіотичних препаратів і функціональних продуктів нового покоління.

Метою даної роботи був скринінг та вивчення пробіотичних властивостей штамів молочнокислих бактерій та біфідобактерій, ізольованих від людини, для подальшого створення на їх основі пробіотичних препаратів і біопродуктів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були біфідобактерії та молочнокислі бактерії, ізольовані з кишкового тракту людей різних вікових груп: здорові та хворі на пневмонію діти (віком 2—3 роки), люди середнього віку (25—30 років) та люди похилого віку (63—81 років). Серед 129 виділених штамів був попередньо проведений скринінг за ознакою антагоністичної активності проти широкого спектру умовно патогенних мікроорганізмів (дані не наведені). У результаті скринінгу було відібрано 29 штамів біфідобактерій та 4 штами молочнокислих бактерій — найбільш активних антагоністів, які були включені у подальші дослідження. Штами були ідентифіковані на рівні роду із застосуванням загальноприйнятих мікробіологічних методів, а також методу ПЛР з використанням родоспецифічних праймерів. На видовому рівні штами були ідентифіковані за допомоги мультиплекс-ПЛР-аналізу з видоспецифічними праймерами [3]. Список штамів наведений у таблиці 1.

Стійкість до дії шлункового соку вивчали за методом *Matto* зі співавт. [4]. Штами біфідобактерій вирощували протягом 48 год в анаеробних умовах при 37 °С в рідкому середовищі MRS з 0,05% цистеїну (MRSC). Бактеріальні клітини центрифугували, відмивали та ресуспендували у PBS буфері (рН 7,2). Порцію суспензії клітин у кількості 0,2 мл змішували з 0,2 мл PBS буфера рН 3,0 (дослідна суспензія) та з 0,2 мл PBS буфера рН 7,2 (контроль). Суспензію клітин інкубували при 37 °С на водяній бані і робили серійні розведення до 10^{-7} . З кожного розведення переносили по 10 мкл на MRSC агар: з дослідної суспензії — після 2 год інкубації, з контролю — безпосередньо перед інкубацією та після 2 годин інкубації. Посіви інкубували протягом 48 год в анаеробних умовах при 37 °С. Отримані результати виражали як різницю десятичних логарифмів між контрольними та дослідними показниками.

Здатність рости у присутності жовчі вивчали, використовуючи MRSC агар, до якого додавали жовч у кількості 0,1, 0,2 та 0,3% [5]. Кожен штам вирощували при 37 °С протягом 48 год. Фіксували наявність росту на поверхні агару.



Таблиця 1
Штами біфідобактерій та молочнокислих бактерій, використані в роботі

Table 1

Strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria used in the study

Джерело виділення	Штам	Вид
Здорові діти	99	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
	102, 152, 174, 175	<i>B. bifidum</i>
	139, 142, 143, 144, 145	<i>B. longum</i>
	460	<i>B. catenulatum</i>
Хворі діти	271	<i>Bifidobacterium</i> sp. *
	272, 278	<i>B. bifidum</i>
	276	<i>B. longum</i>
Люди середнього віку	25a	<i>Lactobacillus</i> sp.*
	62a, 75a, 76a	<i>Lactobacillus</i> sp. *
Люди похилого віку	81д, 82д	<i>Bifidobacterium</i> sp. *
	34s, 35s, 77s	<i>B. bifidum</i>
	50s, 52s	<i>Bifidobacterium</i> sp. *
	47s, 51s, 53s, 55s, 66/2s, 66/3s, 69s	<i>B. dentium</i>

* — не ідентифіковані до виду

З метою первинного скринінгу високоадгезивних штамів біфідобактерій було використано метод Choo зі співавт. на моделі «букальний епітеліоцит — бактерія» [6]. У дослідних центрифужних пробірках поєднували по 0,5 мл попередньо підготовлені суспензії ентероцитів і біфідобактерій, у відповідних концентраціях 10^6 та 10^9 клітин, та інкубували при 37°C протягом 30 хв, періодично струшуючи. Потім готували мазки, забарвлювали за Грамом і мікроскопували при збільшенні $\times 1500$. Про ступінь адгезивності штаму судили по індексу адгезивності мікроорганізму (ІАМ) — середня кількість мікробних клітин на одному епітеліоциті з урахуванням 50 епітеліоцитів, що беруть участь у адгезивному процесі.

Гідрофобність клітин біфідобактерій досліджували за методом Р.Ф. Perez зі співавт. [7]. Як «допоміжну» субстанцію використовували ксилол. Добову культуру біфідобактерій ретельно перемішували, відбирали 2 мл і вимірювали її оптичну густину при довжині хвилі 620 нм. До бактеріальної суспензії додавали 0,4 мл ксилолу і інтенсивно перемішували протягом 2 хв, після чого витримували при 37°C протягом 1 год для розділу фаз ксилол:зразок. Потім водяну (нижню) фазу ретельно



відбирали і вимірювали її оптичну густина при довжині хвилі 600 нм. Значення гідрофобності виражали як:

$$\frac{\text{оптична густина водної фази}}{\text{оптична густина всієї суспензії до екстрагування ксилолом}} \times 100\%$$

Дослідження антибіотикочутливості. В роботі використовували різні за механізмом біологічної дії класи антибіотиків, а саме (ОД): бензилпеніцилін (10); оксацилін (1); карбеніцилін (100); піперацилін (100); цефалексин (30); цефотаксим (30); цефепим (30); іміпенем (10); ванкомицин (10); нетілміцин (30); лінкомицин (15); кліндаміцин (2); тетрациклін (30); фузидин (10); нітрофурантоїн (300); еритроміцин (15); рокситроміцин (30); хлорамфенікол (30); норфлоксацин (10); офлоксацин (5); рифампіцин (5); клотримазол (10); флуконазол (40).

Визначення антибіотикочутливості біфідобактерій проводили за диско-дифузійним методом, описаним Charteris зі співавт. [8]. Отримані результати виражали як: Ч – чутливі, СЧ – середньо чутливі, Р – резистентні.

Для дослідження гемолітичної активності штами біфідобактерій вирощували на Колумбія-агарі з 5% овечої крові при 37 °С протягом 4 діб, після чого чашки витримували на повітрі протягом 5 год. Наявність реакції гемолізу визначали візуально.

З метою первинного скринінгу штамів з високою швидкістю росту штами біфідобактерій вирощували в рідкому середовищі MRS з цистеїном в анаеробних умовах при 37 °С і вимірювали оптичну густина суспензії клітин при довжині хвилі 620 нм через 24 год вирощування. Ріст вважали активним, якщо оптична густина суспензії OD_{620} сягала 4 одиниць за стандартом Макфарланда (що відповідає $1,2 \times 10^9$ КУО/мл).

Активність кислотоутворення біфідобактерій визначали титрометричним методом після вирощування мікроорганізмів у печінковому середовищі Блаурока. Активність кислотоутворення виражали в градусах Тернера (°Т) .

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакету комп'ютерної програми «Excel XP» за загальноприйнятими методиками, рівень вірогідності складав 95% [3].

Результати та обговорення

Окремою частиною вивчення властивостей бактерій, перспективних для використання у складі пробіотиків, є дослідження їх здатності виживати в умовах шлунку, а саме за низьких значень рН [5]. Саме хлоридна кислота та травні ферменти є головними агресивними агентами шлункового вмісту щодо мікроорганізмів. Результати досліджень представлені у таблиці 2. Як видно, практично всі досліджувані штами є чутливими



до дії низьких значень рН. Лише клітини одного штаму – *Lactobacillus* sp. 25А витримували двогодинну експозицію в умовах шлунку. Отримані результати підтверджують дані, описані іншими авторами, які свідчать про високу чутливість біфідобактерій до кислого середовища, та толерантність до нього багатьох представників роду *Lactobacillus* [4].

Дослідження штамів щодо росту в присутності різних концентрацій жовчі (табл. 3) показало залежність даної властивості від джерела виділення штаму. Більш чутливими до присутності жовчі виявилися штами, отримані від дітей. Так, лише десять з п'ятнадцяти штамів росли при концентрації жовчі 0,1%. За вищих концентрацій жовчі у середовищі росту даних штамів не спостерігалось. Штами, виділені від людей середнього віку та літніх людей, були стійкими до присутності у середовищі 0,1% жовчі, майже всі штами – до 0,2% (окрім *B. dentium* 55s). У присутності 0,3% жовчі був здатний активно рости лише штам *B. bifidum* 77s, ще у 9 штамів спостерігався слабкий ріст.

Залежність здатності досліджуваних штамів рости в присутності жовчі від джерела їх виділення та від віку людини, очевидно, пов'язано з фізіологією кишкового тракту людини у різному віці. Так, за даними інших авторів, у дітей концентрація жовчі в тонкому кишечнику коливається від 0,1 до 0,3%, тоді як у дорослої людини вона складає 0,3% і вище [1,4,5]. Висловлено думку, що штами, ізольовані від дорослих людей, піддавалися в кишковому тракті дії високих концентрацій жовчі і тому є більш стійкими до неї.

Як зазначалося вище, наявність адгезивних властивостей у пробіотичних культур є критерієм їх ефективності при використанні в біопрепаратах. У результаті проведених досліджень виявилось, що всі штами здатні адгезувати до букального епітелію людини, причому індекс адгезивності варіював в широкому діапазоні – від $1,76 \pm 0,09$ до $48,1 \pm 0,08$. Адгезивна активність не залежала ні від виду мікроорганізму, ні від джерела виділення і мала штамову специфічність, що підтверджують дані інших авторів [6,7]. Найактивніше до букального епітелію адгезували штами *B. animalis* subsp. *lactis* 99 (IAM $48,1 \pm 0,08$), *B. longum* 144 (IAM $34,7 \pm 0,02$), *B. bifidum* 278 (IAM $28,7 \pm 0,14$), *B. bifidum* 34s (IAM $27,31 \pm 0,01$) та *B. catenulatum* 460 (IAM $27,31 \pm 0,01$). Слабку адгезивну активність проявили штами 62А (IAM $3,30 \pm 0,17$), *B. longum* 145 (IAM $2,93 \pm 0,17$) та *B. longum* 143 (IAM $1,76 \pm 0,09$).

Звертає на себе увагу той факт, що штами 47s, 51s, 53s, 55s та 69s, які відносяться до виду *B. dentium* – представника мікробіоти ротової порожнини, що викликає карієс зубів, не проявили високої адгезивної активності до букального епітелію (IAM від $4,60 \pm 0,02$ до $15,21 \pm 0,01$).

За даними літератури, гідрофобність поверхні клітин мікроорганізмів обумовлює (хоча і частково) їх адгезивну активність. Крім того, спостерігається кореляція між ступенем гідрофобності клітинни і здатності мікроорганізмів прикріплюватися до клітин макроорганізму [7].



Таблиця 2

Пробіотичні властивості досліджуваних штамів біфідобактерій та молочнокислих бактерій

Table 2

Probiotic properties of the studied strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria

Штам	Ріст в присутності жовчі**			OD ₆₂₀	Кислотоутворення, °Т	Адгезія (ІАМ)	Гідрофобність клітин, %
	0,1%	0,2%	0,3%				
<i>B. animalis subsp. lactis</i> 99	—	—	—	4,1±0,2	218,3±6,9	48,10±0,08	5
<i>B. bifidum</i> 102	+	—	—	4,1±0,2	161,7±2,6	7,60±0,15	47
<i>B. longum</i> 139	—	—	—	4,2±0,2	161,7±2,6	12,40±0,05	5
<i>B. bifidum</i> 142	—	—	—	1,7±0,1	216,7±2,6	8,60±0,02	9
<i>B. longum</i> 143	—	—	—	1,1±0,1	181,7±2,6	1,76±0,09	5
<i>B. longum</i> 144	+	—	—	1,3±0,1	183,3±2,6	34,70±0,02	40
<i>B. longum</i> 145	—	—	—	1,0±0,0	218,3±6,8	2,93±0,17	38
<i>B. bifidum</i> 152	+	—	—	4,1±0,2	180,0±0,0	13,73±0,05	9
<i>B. bifidum</i> 174	+	—	—	4,5±0,2	143,3±2,6	14,40±0,08	2
<i>B. bifidum</i> 175	+	—	—	0,9±0,1	181,7±2,6	4,20±0,03	—6
<i>B. catenulatum</i> 460	+	—	—	1,9±0,1	203,3±5,2	27,31±0,01	—10
<i>Bifidobacterium sp.</i> 271	+	—	—	4,5±0,1	203,3±5,2	34,80±0,05	63
<i>B. bifidum</i> 272	+	—	—	4,3±0,2	165,0±4,5	9,80±0,02	70
<i>B. longum</i> 276	+	—	—	2,1±0,1	211,7±2,6	8,50±0,05	0
<i>B. bifidum</i> 278	+	—	—	4,1±0,2	153,3±2,6	28,70±0,14	6
<i>Lactobacillus sp.</i> 25A	+	+	±	4,1±0,1	241,7±2,6	11,80±0,09	6
<i>Lactobacillus sp.</i> 62A	+	±	—	1,6±0,0	218,3±2,6	3,30±0,17	—43
<i>Lactobacillus sp.</i> 75A	+	±	±	1,8±0,1	213,3±5,2	5,70±0,08	46
<i>Lactobacillus sp.</i> 76A	+	±	±	1,8±0,1	216,7±5,2	22,50±0,03	—27
<i>Bifidobacterium sp.</i> 81Д	+	±	±	2,0±0,0	201,7±2,6	9,90±0,02	—33
<i>Bifidobacterium sp.</i> 82Д	+	+	±	4,6±0,1	211,7±2,6	17,21±0,01	6
<i>B. bifidum</i> 34s	+	+	±	4,7±0,1	183,3±2,6	28,30±0,03	53
<i>B. bifidum</i> 35s	+	±	—	0,7±0,0	191,7±2,6	25,60±0,09	30
<i>B. dentium</i> 47s	+	+	±	4,3±0,2	203,3±5,2	7,61±0,01	31
<i>Bifidobacterium sp.</i> 50s	+	+	±	0,7±0,0	211,7±2,6	18,10±0,08	36
<i>B. dentium</i> 51s	+	±	—	0,5±0,0	136,7±2,6	11,30±0,14	—111
<i>Bifidobacterium sp.</i> 52s	+	±	±	0,8±0,0	150,0±4,5	5,17±0,03	30
<i>B. dentium</i> 53s	+	±	—	1,3±0,1	158,3±2,6	4,60±0,02	—163
<i>B. dentium</i> 55s	+	—	—	4,0±0,0	161,7±2,6	15,21±0,01	0
<i>B. dentium</i> 69s	+	±	—	2,2±0,1	150,0±4,5	9,70±0,08	—122
<i>B. bifidum</i> 77s	+	+	+	3,8±0,2	198,3±2,6	8,16±0,09	75
<i>B. dentium</i> 66/2s	+	±	—	3,5±0,1	181,7±6,9	9,70±0,01	—150
<i>B. dentium</i> 66/3s	+	±	—	4,7±0,2	141,7±2,6	9,40±0,03	55

* — Штам *Lactobacillus sp.* 25A витримував двогодинну експозицію в умовах шлунку. Решта штамів — чутливі.

** — «+» — активний ріст, «±» — слабкий ріст, «—» — відсутність росту. $p \leq 0,05$



При вивченні гідрофобності клітини досліджуваних штамів було встановлено, що дана властивість має штамову специфічність (як і адгезивна активність), але при цьому не було встановлено взаємозв'язку між цими властивостями у досліджуваних штамів (табл. 2).

Під час селекції пробіотичних штамів біфідобактерій та молочнокислих бактерій необхідно також враховувати і технологічні критерії відбору штамів [8]. Зокрема, штами, перспективні для створення біопрепарату, повинні мати високу швидкість росту та кислотоутворювальну активність. За даними літератури, промислово перспективний штам повинен максимально накопичувати мікробну біомасу до 12–24 год культивування та мати активність кислотоутворення не нижчу за 90 °Т для біфідобактерій та не нижчу за 200 °Т для лактобацил [9].

Вивчення досліджуваних штамів за цими ознаками показало, що активність кислотоутворення у всіх досліджуваних штамів була високою і варіювала в широкому діапазоні значень від 140 до 240 °Т. Найактивнішими кислотоутворювачами виявилися штами *Lactobacillus sp.* 25А (активність кислотоутворення 241,7±2,6 °Т), штами *Lactobacillus sp.* 76А, *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 142, *B. longum* 145 (218,3±6,9, 216,7±2,6 та 218,3±6,8 °Т відповідно), *B. longum* 276 (211,7±2,6 °Т) та *Bifidobacterium sp.* 271 (203,3±5,2 °Т).

Первинний скринінг досліджуваних штамів біфідобактерій і молочнокислих бактерій за показником швидкості росту дозволив виявити 14 культур, здатних накопичувати необхідну кількість біомаси, а саме — понад 10⁹ КУО/мл за 24 год культивування (табл. 2).

Оскільки пробіотичні препарати часто використовуються на фоні антибіотикотерапії при лікуванні хвороб різної етіології, було актуальним вивчити відношення досліджуваних штамів до широкого спектру антимікробних препаратів, зокрема антибіотиків. Результати дослідження представлені в таблиці 3.

Більшість досліджуваних штамів виявилися чутливими до широкого спектру антибіотиків: пиперациліну (окрім *Lactobacillus sp.* 25А), карбеніциліну (окрім *Bifidobacterium sp.* 52s), бензилпеніциліну (окрім *B. dentium* 51s та *Lactobacillus sp.* 25А), цефалексину (окрім *Lactobacillus sp.* 25А), цефатоксиму, цефепіму (окрім *Lactobacillus sp.* 25А), кліндаміцину (окрім *B. dentium* 51s), лінкоміцину, рокситроміцину, еритроміцину (окрім *B. dentium* 69s n1 66/2), офлоксацину, ванкоміцину (окрім штаму *Lactobacillus sp.* 76А та *Lactobacillus sp.* 25А), хлорамфеніколу, рифампіцину та іміпенему (окрім *B. dentium* 51s).

Усі досліджувані штами виявили стійкість лише до двох антибіотиків — нетілміцину (в анаеробних умовах вирощування така стійкість до аміноглікозидних препаратів є природною для біфідобактерій та молочнокислих бактерій) та норфлоксацину.



Таблиця 3
Відношення досліджуваних штамів біфідобактерій та молочнокислих бактерій до антибіотиківTable 3
Relation of the studied strains of bifidobacteria and lactic acid bacteria to antibiotics

Штам	Карбеніцилін	Оксацілін	Бензилпеніцилін	Цефепім	Кліндаміцин	Тетрациклін	Фузидин	Рокситроміцин	Еритроміцин	Ванкоміцин	Рифампіцин	Іміпенем	Флуконазол	Клотримазол
	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. animalis subsp. lactis</i> 99	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 102	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 139	ч	р	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 142	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 143	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 144	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. longum</i> 145	ч	р	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 152	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 174	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. bifidum</i> 175	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. catenulatum</i> 460	ч	р	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 271	ч	р	ч	ч	ч	р	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 272	ч	р	ч	ч	ч	р	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. longum</i> 276	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 278	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 25A	ч	р	сч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 62A	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 75A	ч	ч	ч	ч	ч	р	сч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Lactobacillus sp.</i> 76A	ч	ч	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	р	ч	ч	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 81Д	ч	ч	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
<i>Bifidobacterium sp.</i> 82Д	ч	ч	ч	ч	ч	ч	сч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч
<i>B. bifidum</i> 34s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. bifidum</i> 35s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 47s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 50s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 51s	ч	ч	р	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р	р	р
<i>Bifidobacterium sp.</i> 52s	р	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч
<i>B. dentium</i> 53s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 55s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 69s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. bifidum</i> 77s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р
<i>B. dentium</i> 66/2s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	ч	ч	ч	ч	р
<i>B. dentium</i> 66/3s	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	ч	р	р

Примітка: до нетилміцину, норфлоксацину, офлоксацину усі штами резистентні, до піперациліну, цефатоксиму, цефалексину, лінкоміцину, хлорамфеніколу, нітрофурантоїну — чутливі.

ч — чутливі, сч — середньочутливі, р — резистентні.



До решти препаратів досліджувани штамми виявили різне відношення в залежності від штаму. Штами *B. dentium* 51s та *Lactobacillus sp.* 25A були стійкі до широкого спектру антимікробних препаратів. Відношення досліджуваних штамів до антибіотиків не залежало ні від джерела їх виділення, ні від виду мікроорганізму. Зокрема, наше припущення щодо стійкості досліджуваних штамів, виділених від хворих на пневмонію дітей, до більш широкого спектру антимікробних препаратів (як наслідок контакту даних штамів з препаратами і набутої резистентності) не підтвердилося. Спираючись на дані літератури, можна зробити висновок, що відношення досліджуваних культур до антибіотиків носить штамоспецифічний характер.

Необхідно зазначити, що значна частина досліджуваних штамів була чутливою до антифунгальних препаратів — клотримазолу та флуконазолу. Хоча їх фармакологічна дія направлена на пригнічення синтезу клітинної стінки грибів, ці препарати можуть проявляти інгібуючу активність і проти представників нормальної мікробіоти кишечника людини. Даний факт обов'язково слід враховувати при проведенні антифунгальної терапії.

Усі досліджувані штамми не виявили гемолітичної активності на Колумбія-агарі з 5% овечої крові (дані не наведені).

Таким чином, вивчення біологічної активності біфідобактерій та молочнокислих бактерій показало, що досліджені культури є досить чутливими до умов шлунково-кишкового тракту, особливо до низьких значень рН середовища. Штами, виділені від дорослих людей, є більш толерантними до присутності жовчі, у порівнянні з штамми, ізольованими від дітей. Цей факт означає, що при створенні пробіотичних препаратів варто враховувати вікову категорію людей, тобто при створенні пробіотика для людей середнього та похилого віку слід обирати штамми, виділені від людей даного віку.

Отримані нами результати свідчать про чутливість досліджуваних штамів до широкого спектру антибіотичних препаратів. Відношення біфідобактерій до окремих антибіотиків не залежить від джерела виділення і варіює в залежності від штаму. Усі досліджувані штамми виявилися активними кислотоутворювачами, що, ймовірно, і пояснює здатність досліджуваних культур пригнічувати ріст небажаної мікробіоти.

Проведений скринінг досліджуваних культур біфідобактерій і молочнокислих бактерій дозволив рекомендувати *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium sp.* 271 та *B. bifidum* 278 як перспективні для створення пробіотиків для дітей, а штамми *Lactobacillus sp.* 25A, *Bifidobacterium sp.* 82Д та *B. bifidum* 34s — для створення пробіотиків для людей середнього та похилого віку. Дані штамми є антагоністами широкого спектру умовно патогенних мікроорганізмів, активно адгезують до клітин макроорганізму, відрізняються високою швидкістю росту і активністю кислотоутворення. Крім того, штамми, ізольовані від дорослих людей, є толерантними до присутності фізіологічної концентрації жовчі



у середовищі та низьких значень рН (штам *Lactobacillus sp.* 25A), що відповідає необхідним вимогам ВООЗ до пробіотичних препаратів [2].

У подальших дослідженнях виявлення конкретних молекулярних елементів, що зумовлюють пробіотичний ефект (такі як біологічно активні пептиди, олігоцукри, ферменти, вільні амінокислоти, коротколанцюгові жирні кислоти, вітаміни та ін.) буде слугувати ключовим фактором для відбору пробіотичних штамів.

Автори висловлюють щирю вдячність науковому співробітникові відділу фізіології промислових мікроорганізмів ІМВ НАНУ Зелений Л.Б. за проведення генетичної ідентифікації досліджуваних штамів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание // Сборник материалов Международной конференции «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы». — Москва (Россия). — 2004. — С. 12–14.
2. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food* // Report of Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. — London, 2002. — P. 3–56.
3. Коваленко Н.К., Полтавская О.А., Зеленая Л.Б. Видовой состав бифидобактерий пищеварительного тракта людей различных возрастных групп в норме и патологии // Микробиол. журн. — 2011. — № 6. — (у друку)
4. Matto J., Malinen E., Suihko M.-L. et al. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria // J. Appl. Microbiol. — 2004. — V.97. — P. 459–470.
5. Коваленко Н.К., Лівінська О.П., Полтавська О.А., Гармашева І.Л., Шинкаренко Л.М., Олещенко Л.Т. Пробиотичні властивості промислових штамів лактобацил і бифідобактерій // Мікроб. журнал. — 2010. — Т. 72, № 1. — С. 5–17.
6. Choo S.Y., Choi I.H., Kim J.D. Bacterial Adherence to Human Buccal Epithelial Cells and Its Possible Role in Bacterial Colonization in Human Oral Cavity // Yonsei Medical Journal. — 1982. — V. 23, № 1. — P. 26–29.
7. Peretz P.F., Minnaard J., Disalvo E.A., Antoni G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol. 64, № 1. — P. 21–26.
8. Charteris W.P., Kelli P.M., Morelli L. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* species // Letters in Applied Microbiology. — 1998. — Vol. 26, № 1. — P. 333–337.
9. Charteris W.P., Kelli P.K., Morelli L., Collins J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional foods // Int. J. of Dairy Techn. — 1998. — Vol. 51, № 4. — P. 23–37.



О.А. Полтавская, Н.К. Коваленко, И.Г. Успенский

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д 03143, Украина,
тел.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

СКРИНИНГ ШТАММОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И БИФИДОБАКТЕРИЙ ПО ПРОБИОТИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ

Реферат

В результате скрининга, проведенного в соответствии с современными требованиями ВОЗ, отобраны штаммы бифидобактерий *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium sp.* 271 и *B. bifidum* 278 как перспективные для создания пробиотиков для детей, а штаммы *Lactobacillus sp.* 25А, *Bifidobacterium sp.* 82Д и *B. bifidum* 34s — для создания пробиотиков для людей среднего и пожилого возраста.

Ключевые слова: бифидобактерии, молочнокислые бактерии, адгезия, чувствительность к антибиотикам, скрининг, пробиотики.

O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko, I.G. Uspenskyi

Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ. Zabolotny Str.,
Kyiv, D 03143, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

SCREENING OF LACTOBACTERIA AND BIFIDOBACTERIA STRAINS BY PROBIOTIC PROPERTIES

Summary

As a result of screening carried out in accordance with modern requirements of WHO, strains of bifidobacteria *B. animalis subsp. lactis* 99, *B. bifidum* 102, *Bifidobacterium sp.* 271 and *B. bifidum* 278 have been selected as promising to create the probiotics for children, and strains of *Lactobacillus sp.* 25A, *Bifidobacterium sp.* 82D and *B. bifidum* 34s — for creation of the probiotics for the middle-aged and elderly.

Keywords: bifidobacteria, lactic acid bacteria, adhesion, sensitivity to antibiotics, screening, probiotics.



Н.С. Водзінська, О.В. Кондратюк, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: nsvod@ukr.net

ВПЛИВ ВІСМУТОВОГО ТА ОЛОВ'ЯНОГО КОМПЛЕКСІВ ХІНОЛІНІЛПОРФІРИНУ НА АКТИВНІСТЬ ФАГІВ *LACTOCOCCUS LACTIS*

*Досліджено вплив вісмутового та олов'яного комплексів хінолінілпорфірину на активність лактофагів E3, E5 і E17 та фагову інфекцію у *L. lactis*. Результати досліджень показали, що присутність вісмутового комплексу хінолінілпорфірину у поживному середовищі у концентраціях 10 мкМ, 20 мкМ та 40 мкМ повністю зупиняє розвиток фагової інфекції. Визначення прямої дії цього порфірину на лактофаги показало, що зниження інфекційності фагів під впливом цієї сполуки досягає 64%. Антифагова активність олов'яного комплексу складає 21–29%. Обидві сполуки не мають значного впливу на адсорбцію лактофагів на бактеріальній клітині. Інгибування процесу адсорбції фагів досліджуваними порфіринами не перевищує 36%.*

Ключові слова: лактофаги, антифагова активність, хінолінілпорфірини.

Фаги молочнокислих бактерій викликають постійний інтерес, передусім, через економічні втрати, які несуть підприємства молочної промисловості внаслідок фагової інфекції. Оскільки у виробництві ферментованих молочних продуктів найчастіше використовують молочнокислі бактерії роду *Lactococcus*, саме лактококові фаги найбільш розповсюдженні на молочних комбінатах та є причиною більшості неефективних технологічних процесів [7]. Лактофаги викликають загибель заквасочних мікроорганізмів, що призводить до уповільнення виробництва продукції, погіршення її якості. Порушення процесів кисломолочного бродіння може призвести не тільки до зниження якості та втрат сировини, але й до виникнення харчових отруень, адже у нормі заквасочна мікробіота інгібує умовно-патогенні мікроорганізми, присутні у молоці [1, 3]. На сьогодні існують різні підходи, завдяки яким можна зменшити ризик фагової інфекції: ротація стартерних культур, використання генетичних методів для збільшення фагорезистентності стартерних культур, пряма інокуляція стартерів у закриті ферментери та використання середовищ з антифаговими властивостями для зберігання і розмноження стартерних культур [7].



Порфірини вважаються одними з перспективних сполук для лікування інфекційних хвороб, та широко використовуються у протираковій фотодинамічній терапії. Терапія основана на використанні фотосенсибілізаторів, які після активування світлом можуть викликати різні порушення структури клітин. На сьогоднішній день показано, що порфірини проявляють антимікробні властивості щодо патогенних та умовно-патогенних бактерій не лише при фотоактивації, а й у темнових умовах [4]. Ці сполуки виявляють також антивірусний ефект. Використовувати порфірини як антивірусні агенти запропоновано, перш за все, для стерилізації крові та її компонентів [11]. Останнім часом показана можливість інгібування цими сполуками фітовірусної інфекції *in vitro* та *in vivo* [5, 6]. У деяких випадках для вивчення механізмів їх дії як моделей вірусів були використані бактеріофаги [2, 12].

Метою цієї роботи було перевірити здатність нових синтетичних порфіринів пригнічувати інфекційність лактофагів.

Матеріали та методи

Штам бактерії *Lactococcus lactis subsp. lactis* 502 та лактофаги E3, E5 і E17 були отримані з колекції Білоруського державного технологічного університету. Культивування бактерій проводили на середовищі M17 з додаванням 0,5% глюкози.

У роботі вивчалася антифагова активність вісмутового та олов'яного комплексів хінолінілпорфіринів (Bi(III)-ТХП та Sn(IV)-ТХП), синтезованих у лабораторії синтезу нових лікарських засобів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

При вивченні прямої дії порфіринів на бактеріофаги їх інкубували разом протягом 24 годин. Після цього бактеріофаги титрували за стандартним методом подвійних агарових шарів [12]. Антифагову активність виражали у відсотках та обчислювали за формулою:

$$A = (1 - N_o/N_k) \cdot 100\%,$$

де N_o , N_k — кількість негативних колоній у досліді та контролі, відповідно.

Для того, щоб перевірити вплив порфіринів на розвиток фагової інфекції, суспензію бактерій та бактеріофагів одночасно додавали до поживного середовища, яке містило порфірини. Кінцеві концентрації *L. lactis* та фагів становили $1 \cdot 10^3$ кл/мл та $5 \cdot 10^4$ БУО/мл, відповідно. Для спостереження за перебігом нормальної інфекції бактеріальну культуру та фаги додавали в тих же концентраціях до середовища, що не містило порфірини. Контролем слугували пробірки з поживним середовищем, до якого додавали тільки бактеріальну культуру. Після 24 годин інкубації вимірювали оптичну густину середовища та порівнювали інтенсивність росту бактерії в досліді та контролі.

З метою вивчення впливу порфіринів на адсорбцію лактофагів до поживного середовища, що містило різні концентрації порфіринів, додавали бактеріальну культуру і бактеріофаг та інкубували 10 хв при



30 °С. Контрольні пробірки містили середовище без порфіринів. Після закінчення часу інкубації для зупинки процесу адсорбції фага 50 мкл суміші додавали до 4,5 мл охолодженого фізіологічного розчину, після чого піддавали низькошвидкісному центрифугуванню (5000 об/хв) протягом 5 хв. Фаги в надосаді титрували за методом подвійних агарових шарів. Ступінь адсорбції визначали у відсотках адсорбованих фагів у досліді відносно контролю за формулою:

$$A = (1 - T_3/T_n) \cdot 100 \%,$$

де T_3 – залишковий титр фага, T_n – початковий титр фага [9].

Результати та їх обговорення

На початку досліджень з'ясували вплив порфіринів на саму культуру *L. lactis* та визначили концентрації сполук, що не пригнічують ріст бактерій. Такими концентраціями для вісмутового комплексу хінолінілпорфірину виявилися 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ, а для олов'яного комплексу хінолінілпорфірину – 0,1 мкМ, 1 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ.

Таблиця

Накопичення біомаси *L. lactis subsp. lactis* 502 у присутності лактофагів та порфіринів ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$)

Table

***L. lactis subsp. lactis* 502 biomass in presence of lactophages and porphyrins ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$)**

Концентрація хінолінілпорфірину, мкМ		Лактофаг		
		Е3	Е5	Е17
Bi(III)-ТХП	0,1	1397 ± 187	431 ± 92	324 ± 49
	1	1567 ± 217	870 ± 145	756 ± 113
	10	2405 ± 81*	2170 ± 72*	2323 ± 48*
	20	2420 ± 55*	2325 ± 72*	2453 ± 53*
	40	2540 ± 102*	2418 ± 92*	2498 ± 40*
Sn(IV)-ТХП	0,1	940 ± 189	351 ± 25	297 ± 39
	1	1070 ± 206	549 ± 135	676 ± 169
	10	1530 ± 160*	1166 ± 171*	1299 ± 197*
	20	1047 ± 101*	1129 ± 240*	1000 ± 135*
К+		418 ± 55	370 ± 28	313 ± 26
К-		2380 ± 76	1998 ± 64	2381 ± 49

Примітка: К⁺ – бактерія + фаг у середовищі без порфіринів, К⁻ – бактерія у середовищі без порфіринів та фагів, * – різниця достовірна у порівнянні з контролем
 Note: К⁺ – bacterium + phage in medium without porphyrins, К⁻ – bacterium in medium without porphyrins and phages, * – significant different from the control



Дослідження впливу порфіринів на розвиток лактофагової інфекції у рідкому середовищі показало, що обидві сполуки здатні у тому чи іншому ступені стримувати або зовсім перешкоджати лізису бактеріальної культури.

Накопичення біомаси лактококу у присутності лактофагів не перевищувало 20% від контролю (табл.). Присутність у середовищі досліджуваних сполук у концентрації 0,1 мкМ майже ніяк не змінювала цей показник, тоді як накопичення біомаси бактерії при концентрації 1 мкМ було у 2–3 рази вищим, ніж у контролі з фагом. Найбільш ефективною сполукою виявився вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину, присутність якого у середовищі у концентраціях 10 мкМ, 20 мкМ та 40 мкМ повністю зупиняла розвиток фагової інфекції. У присутності 10 та 20 мкМ олов'яного комплексу хінолінілпорфірину концентрація бактерій була у 3–4 рази вищою ніж у контролі з фагом.

Визначення прямої дії порфіринів на лактофаги показало, що більш активним є вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину. Так, присутність цієї сполуки у концентрації 10 мкМ зменшує літичну активність лактофагів на 33–42%, у концентрації 20 мкМ — на 42–61% та 40 мкМ — на 56–64%. Інші концентрації цього порфірину пригнічували інфекційність фагів на 14–24% (рис. 1).

Антифагова активність олов'яного комплексу в усіх досліджуваних концентраціях була майже на одному рівні та складала 21–29%.

Зважаючи на отримані дані, що свідчать про наявність у досліджуваних сполук антивірусного ефекту, було доцільно перевірити здатність даних речовин впливати на початкові стадії інфекції, а саме — на процес адсорбції. Ефект інгібування цього процесу сполуками може вказувати на блокування певних структурних ділянок фага, що відповідають за адсорбцію.

Результати дослідження показали, що олов'яний комплекс хінолінілпорфірину не інгібував процес адсорбції фага E3 на *L. lactis*, але гальмував цей процес у фага E5 на 9–33%, а у фага E17 — на 5–13% (рис. 2).

Вісмутовий комплекс знижував відсоток адсорбції фага E5 на 33% у найбільшій концентрації та на 9–17% у інших концентраціях.

Для фагів E3 та E17 ефективною виявилася тільки концентрація цієї сполуки у 40 мкМ, яка затримувала процес адсорбції на 14% та 36%, відповідно (рис. 2).

Отже, результати досліджень показали, що досліджувані сполуки не мають значного впливу на процес адсорбції лактофагів. Можливо, додатковою мішенню дії порфіринів виступає ДНК бактеріофага. Дослідження McMillin *et al.* свідчать про те, що порфірини можуть зв'язуватися ззовні або інтеркалювати у ДНК у залежності від природи ДНК субстрату [10].



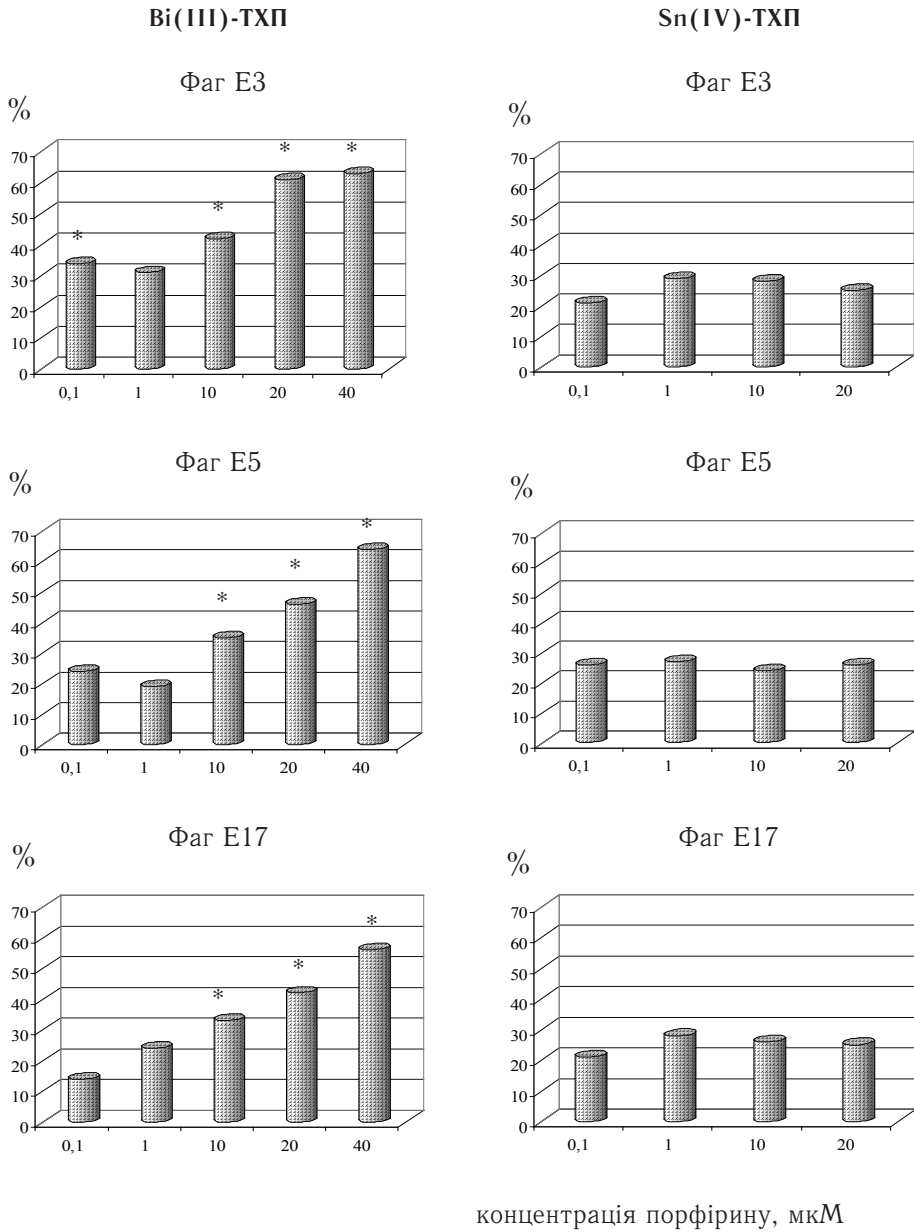


Рис. 1. Антифагова активність досліджуваних хінолінілпорфіринів щодо фажів *L. lactis*

Примітка: вісь ординат – антифагова активність сполук, %;
* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. The antiphage activity of studied quinolinilporphyrins in *L. lactis*

Note: y-axis – antiphage activity of compound, %;
* – significant different from the control



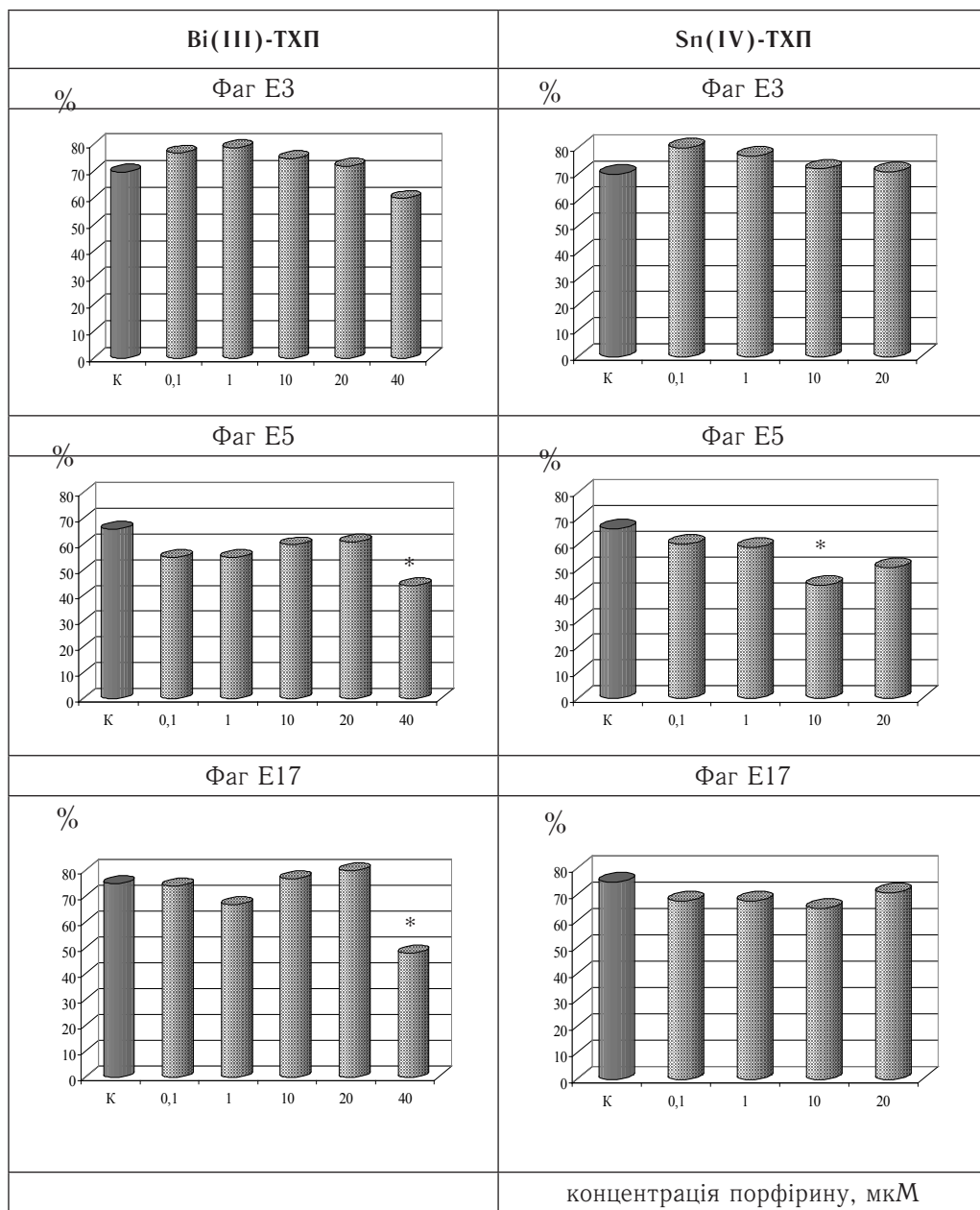


Рис. 2. Адсорбція лактофагів на клітинах *L. lactis* у присутності досліджуваних хінолінілпорфіринів

Примітка: вісь ординат – відсоток адсорбованих бактеріофагів;
* – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. Lactophage adsorption on the *L. lactis* cells in presence of studied porphyrin

Note: y-axis – percent of adsorbed bacteriophage;
* – significant different from the control



Вивчення конкурентного зв'язування цих сполук із ДНК показало, що не послідовність, а композиційний склад азотистих основ визначає характер зв'язування. Інші вчені доводять, що характер взаємодії залежить від типу центрального атому й варіює від інтеркалятивного зв'язування до агрегації на поверхні ДНК [8]. Вивчення характеру взаємодії катіонних порфіринів з ізольованою та внутрікапсидною ДНК бактеріофага Т7 показали, що присутність білкового капсиду не виключає взаємодію між порфіринами та внутрішньофаговою ДНК [13].

Таким чином, після проведення подальших досліджень та остаточного з'ясування механізму дії вісмутовий комплекс хінолінілпорфірину можна рекомендувати для використання як компонент поживного середовища для стартерних культур лактококів, що запобігає розвитку фагової інфекції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Борисова Г.В., Рыбакова Н.А. Предупреждение развития бактериофагов в заквасках как фактор повышения качества кисломолочных продуктов // Материалы научно-практической конференции «Научные и практические аспекты совершенствования традиционных и разработки новых технологий молочных продуктов». — Вологда, 2001. — С. 138—139.

2. Водзінська Н.С., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Ішков Ю.В., Кіриченко А.М. Інактивація стафілококового бактеріофага у присутності синтетичних порфіринів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 3. — С. 82—88.

3. Волкова И.Р., Цыганова Е.С., Ганина В.И. Аспекты получения биологически безопасных ферментированных молочных продуктов // Материалы IV Международной научной конференции студентов и молодых учёных «Живые системы и биологическая безопасность населения». — М: МГУПБ, 2005. — С. 111—113.

4. Зінченко О.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Іваниця В.О., Жиліна З.І., Водзінський С.В., Водзінська Н.С. Антимікробні властивості асиметрично мезо-заміщених порфіринів // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — Т. 10, № 7, біологія. — С. 110—116.

5. Крулько І.В., Заїка С.А., Харіна А.В., Водзінська Н.С., Поліщук В.П. Порфірини як інгібітори розвитку вірусної інфекції в культурі рослинних тканин // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — № 2. — С. 47—52.

6. Крулько І.В., Харіна А.В., Водзінська Н.С., Філіпова Т.О., Поліщук В.П. Антифiтовірусна активність синтетичних порфіринів у системі *in vivo* // Агроєкологічний журнал. — 2008. — Спец. випуск. — С. 138—139.

7. Перфильев Г.Д., Кувалдина Н.Ф. Бактериофаги и их роль в сыроделии. Методы предотвращения фаголизиса заквасочной микрофлоры



// Научно-практический семинар «Бактериальные закваски и концентраты в производстве ферментированных молочных продуктов». — Углич, 2000. — С. 37–48.

8. Li J., Wei Y., Guo L., Zhang C., Jiao Y., Shuang S. and Dong C. Study on spectroscopic characterization of Cu porphyrin/Co porphyrin and their interactions with ctDNA // *Talanta*. — 2008. — V. 76. — P. 34–39.

9. Lucey M., Daly C., Fitzgerald G. Cell surface characteristics of *Lactococcus lactis* harbouring pCI528, a 46 kb plasmid encoding inhibition of bacteriophage adsorption // *Journal of General Microbiology*. — 1992. — V. 138. — P. 2137–2143.

10. McMillin D.R., Shelton A.H., Bejune S.A., Fanwick P.E. and Wall R.K. Understanding binding interactions of cationic porphyrins with B-form DNA // *Coordination Chemistry Reviews*. — 2005. — V. 249. — P. 1451–1459.

11. North J., Neyndorff H., Levy J.G. Photosensitizers as virucidal agents // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. — 1993. — V. 17. — P. 99–108.

12. Ramezani M., Behravan J., Arab M., Farzad S.A. Antiviral activity of *Euphorbia helioscopia* extract // *Journal of Biological Sciences*. — 2008. — V. 8. — P. 809–813.

13. Zupan K., Herenyi L., Toth K., Majer Z., Csik G. Binding of cationic porphyrin to isolated and encapsidated viral DNA analyzed by comprehensive spectroscopic methods // *Biochemistry*. — 2004. — V. 43. — P. 9151–9159.

УДК 578.282

Н.С. Водзінська, А.В. Кондратюк, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: nsvod@ukr.net

ВЛИЯНИЕ ВИСМУТОВОГО И ОЛОВЯННОГО КОМПЛЕКСОВ ХИНОЛИНИЛПОРФИРИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ФАГОВ *LACTOCOCCUS LACTIS*

Реферат

Исследовано влияние висмутового и оловянного комплексов хинолинилпорфиринов на активность лактофагов E3, E5 и E17 и фаговую инфекцию у *L. lactis*. Результаты исследований показали, что наличие ви-



смутового комплексу хинолинилпорфирина в питательной среде в концентрациях 10 мкМ, 20 мкМ и 40 мкМ полностью останавливает развитие фаговой инфекции. Определение прямого действия этого порфирина на лактофаги показало, что снижение инфекционности фагов под действием данного соединения достигает 64%. Антифаговая активность оловянного комплекса составляет 21–29%. Оба порфирина не оказывают значительного влияния на адсорбцию лактофагов на бактериальной клетке. Ингибирование процесса адсорбции фагов исследуемыми соединениями не превышает 36%.

Ключевые слова: лактофаги, антифаговая активность, хинолинилпорфирины.

UDC 578.282

N.S. Vodzinska, O.V. Kondratyuk, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: nsvod@ukr.net

INFLUENCE OF QUINOLINILPORPHYRIN BISMUTH AND TIN COMPLEXES ON *LACTOCOCCUS LACTIS* PHAGES ACTIVITY

Summary

Influence of quinolinilporphyrin bismuth and tin complexes on lactophages E3, E5 and E17 activity and phage infection process in *L. lactis* has been studied. The results of investigation show that bismuth quinolinilporphyrin complex presence in the nutrient medium at 10 μM , 20 μM and 40 μM concentrations completely inhibits phage infection process. Determination of direct influence of this compound on the lactophage shows that reduction of phage activity reaches up 64%. Antiphage activity of tin complex is equal to 21–29%. Both compounds have no significant influence on the lactophage adsorption process. Inhibition of phage adsorption by the compounds does not exceed 36%.

Key words: lactophages, antiphage activity, quinolinilporphyrins.



І.І. Романовська, С.С. Декіна

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

РОЗРОБКА ТЕКСТИЛЬНОГО РАНОВОГО ПОКРИТТЯ З ПРОТЕАЗОЮ *C ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

*На основі біогелю з бурих морських водоростей *Laminaria japonica Aresch* «Ламідан» з іммобілізованою протеазою *C*, закріпленого на текстильному матеріалі (ефект «подвійного депо»), розроблено ранове покриття з високою протеолітичною активністю (475 од/г ферментного препарату) пролонгованої дії (24 год). Отримання стабілізованої форми ферменту підтверджено дослідженням фізико-хімічних характеристик (рН- і термооптимуму, рН- і термостабільності, в'язкості розчину полімеру з протеазою *C*). Іммобілізований препарат в умовах ранового вмісту (рН 5,5) на 90% переважає за активністю вільний фермент.*

*Ключові слова: протеаза *C*, «Ламідан», «подвійне депо», ранове покриття пролонгованої дії, іммобілізація.*

Незважаючи на існуюче різноманіття форм сучасних перев'язувальних матеріалів з протеолітичною активністю (полімерні плівки, аерозолі, гідроколоїди, губки), текстильні покриття залишаються традиційним засобом терапії ран. Переваги їх застосування зумовлені високою сорбційною здатністю, паропроникністю, драпуванням на рані та ін. [2, 4, 6–8, 10]. В даний час перспективне створення на їх основі препаратів з комплексною біологічною активністю, пролонгованої дії, що виключають необхідність частих перев'язок.

Новим перспективним носієм для закріплення (іммобілізації) протеолітичних ферментів на текстильному матеріалі є природний біогель «Ламідан», одержуваний з бурої морської водорості ламінарії японської (*Laminaria japonica Aresch*); його основу на 35% складає альгінат натрію – біодеградуємий полімер, що має гемостатичні, сорбційні властивості [2]. «Ламідан» також містить поліненасичені жирні кислоти, хлорофіл і його похідні, рослинні волокна (8,6%), ряд мікроелементів (кальцій, йод, селен, магній, цинк, мідь) і вітамінів (А, В₁₂, С, Е, D, К), що сприяють прискоренню процесів ранозагоєння.

Метою даного дослідження є створення текстильного ранового покриття пролонгованої протеолітичної дії з використанням біогелю «Ламідан».



Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували папаїн («Мерск», ФРН); трипсин («Мерск», ФРН), терилітин (ФС 42-2245-84, Росія); лужну протеазу (ДП «Ензим», Україна), протеазу *C Acremonium chrysogenum*, штам 291-1, (ДП «Ензим», Україна); гель «Ламідан» з *Laminaria japonica Aresch* (ТУ У 15.2-34396838-001:2006).

Протеолітичну активність визначали згідно [5] з використанням стандартного низькомолекулярного субстрату для протеаз — N- α -бензоїл-D,L-аргінін-*n*-нітроанлід гідрохлориду. За одиницю протеолітичної активності приймали таку кількість ферменту, що за 1 хв при 37 °С сприяє утворенню 1 мкмоль *n*-нітроанліну. Вміст білка визначали методом Лоурі-Хартрі [9]. Дослідження білково-фракційного складу протеази *C* та протеолітичної активності (за бензоїл-DL-аргінін-нафтиламідом) проводили методом електрофорезу в 10% ПААГ згідно [3], з використанням наступних маркерних білків: фосфорилаза В (97 кДа), бичачий сироватковий альбумін (66 кДа), овальбумін (45 кДа), карбоангідраза (30 кДа), інгібітор трипсину з сої (20 кДа), L-лактальбумін (14 кДа). Імобілізацію здійснювали згідно [11].

Для вивчення залежності протеолітичної активності лужної протеази від рН, рівні за активністю проби іммобілізованого і вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (рН 3,0–12,0), з наступним визначенням активності. Вплив температури на протеолітичну активність вільного і іммобілізованого ферменту вивчали в діапазоні 10–70 °С при рН 7,4. Для вивчення термостабільності рівні за активністю проби термостатували при 60 °С і визначали залишкову активність з інтервалом 10–20 хв. Константи термоінактивації обчислені з використанням кінетичної схеми дисоціативної термоінактивації для іммобілізованого препарату, і за тангенсом кута нахилу прямої графіку залежності натурального логарифму величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії для вільного [1].

Результати дослідження та їх обговорення

Для отримання ранового покриття на текстильній основі з «Ламіданом» та протеолітичними ферментами нами досліджена іммобілізація у «Ламідан» низки протеаз, що застосовуються у рановій та опіковій терапії, масові співвідношення фермент: носій, фізико-хімічні особливості функціонування, можливість довготривалого зберігання протеолітичної активності.

У табл. 1 наведені результати іммобілізації досліджуваних протеаз в біогель «Ламідан». Втрата протеолітичної активності папаїном, трипсином, терилітином, лужною протеазою в ході іммобілізації може бути обумовлена інактивуючою дією носія, внаслідок наявності значної іонної сили гелю. Показано, що зміна масових відношень матриця: фермент у межах 1:0,02 — 1:1 також не призвела до позитивних результатів [11].



Таблиця 1
Активність вільних та іммобілізованих у гель «Ламідан» протеолітичних ферментівTable 1
Activity of free and immobilized in to «Lamidан»gel proteolytic enzymes

Фермент	Протеолітична активність, од/г	
	до іммобілізації	після іммобілізації
Папаїн	365,2 ± 18,1	0
Трипсин	273,4 ± 12,9	53,3 ± 2,9
Терилітин	34,5 ± 1,8	0
Лужна протеаза	83,7 ± 4,5	0
Протеаза С	494,9 ± 26,7	473,0 ± 24,3

Тому об'єктом для іммобілізації у «Ламідан» була обрана протеаза С, яка відрізнялася кількісним збереженням протеолітичної активності масових відношеннях ламідан : фермент 1: 0,04. Значне зменшення приведеної в'язкості полімеру (альгінату натрію, який є основною складовою біогелю) при додаванні ферменту може свідчити про утворення білкового асоціату альгінат-білок, при цьому відбувається компактизація білкових молекул за рахунок іонних взаємодій (рис. 1).

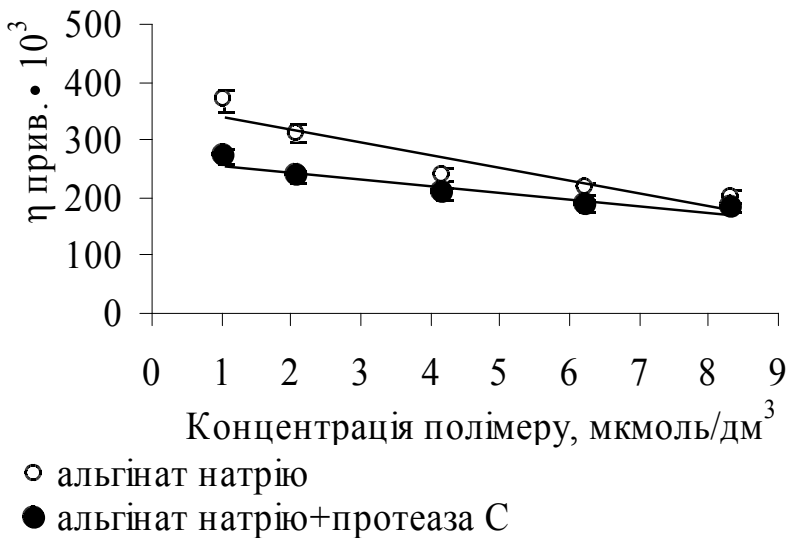


Рис. 1. Вплив ферменту на реологічні характеристики альгінату натрію
Fig. 1. The effect of enzyme on sodium alginate rheological characteristics

Вивчення фракційно-білкового складу протеази дозволило виявити 13 білкових фракцій в діапазоні молекулярних мас від <10 до 43 кДа: М.м. основних білків: 10–16 кДа ($\approx 50\%$), 19–20 кДа ($\approx 20\%$) і 24–43 кДа ($\approx 30\%$) (рис. 2 а). Показано, що 65% білка препарату має протеолітичну активність (рис. 2 б), найбільш висока активність (43,10%) визначена для фракції № 2.

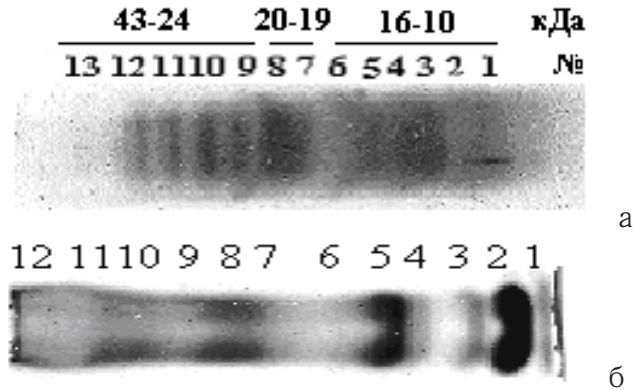


Рис. 2. Електрофореграми препарату протеази С:
а – SDS-електрофорез, б – нативний електрофорез.

Fig. 2. Protease C preparation electrophoregramms:
a – SDS-electrophoresos, b – native electrophoresis

При закріпленні іммобілізованої протеази С на тканинній основі (марлі) отримані текстильні покриття, основні характеристики яких наведені в табл. 2. Відзначено кількісне включення білку і 95% збереження протеолітичної активності (475 од/г).

Таблиця 2

Характеристики текстильного покриття з іммобілізованою протеазою С

Table 2

The characteristics of textile coatings with immobilized protease C

Показники	Одиниці вимірювання	Результати визначення
Протеолітична активність	од/г ферменту	$475,0 \pm 15,6$
Вміст ферменту	мг/г препарату	$40 \pm 2,7$
Площа	см ²	$36 \pm 2,1$
Маса	г	$0,83 \pm 0,05$
Розчинність у воді, у фіз. розчині	—	нерозчинні, набрякають
Строк зберігання	рік	1,5

Максимальна активність препарату спостерігається через 4 год і протягом тривалого часу (24 год) вона залишається постійною (рис. 3).

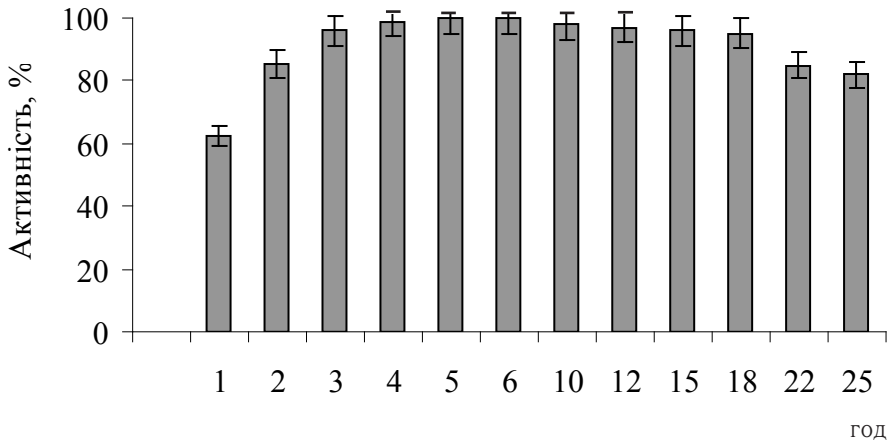


Рис. 3. Залежність протеолітичної активності іммобілізованої протеази С від часу її інкубації у водному розчині (37 °С)

Fig. 3. The dependence of immobilized protease C proteolytic activity on the incubation time in water solution (37 °C)

Пролонгованість протеолітичної дії препарату забезпечується ефектом «подвійного депо» [4], що створюється завдяки включенню ферменту в «Ламідан» з наступним закріпленням на текстильному матеріалі. Отриманий іммобілізований препарат стабільний при зберіганні в умовах низьких температур (0–4 °С) протягом 1,5 років.

При вивченні залежності протеолітичної активності від рН середовища не спостерігалось значних змін рН-профілю іммобілізованого ферменту порівняно з вільним, однак слід зазначити, що при вивченні рН-стабільності при рН 5,5 (37 °С) через 2 години інкубації активність іммобілізованої протеази становила 60%, тоді як вільна в даних умовах не функціонувала (рис. 4). Така поведінка іммобілізованого ферменту пояснюється стабілізуючою дією матриці.

Вивчення температурних залежностей протеолітичної активності протеази С виявило стабілізацію іммобілізованого препарату в умовах високих температур (60–70 °С); порівняння констант термоінактивації вільної та іммобілізованої протеази С показало, що іммобілізований фермент більш стійкий за високих температур, ніж його вільна форма (0,176 хв⁻¹ і 0,209 хв⁻¹, відповідно).

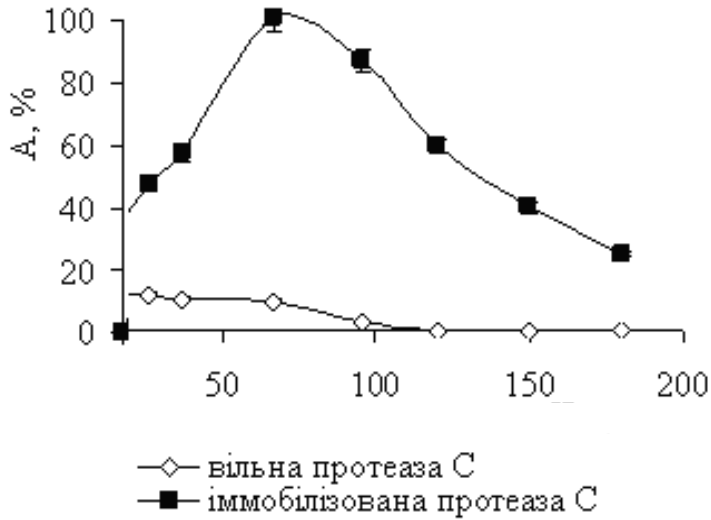


Рис. 4. Протеолітична активність вільної і іммобілізованої протеази С в умовах ранового вмісту (рН 5,5)

Fig. 4. Free and immobilized protease C proteolytic activity in wound content (pH 5,5) conditions

В результаті проведеної роботи досліджено вплив біогелю «Ламідан» на збереження активності при іммобілізації протеолітичних ферментів різного походження (папаїн, трипсин, терилітин, лужна протеаза, протеаза С), методом електрофорезу вивчений молекулярно-масовий склад білкових фракцій і активність препарату протеази С, отримані текстильні покриття пролонгованої дії, з підвищеною рН- і термостабільністю, з 95% збереженням протеолітичної активності для потенційного використання у терапії ран і опіків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики — М: Изд-во МГУ, 1976. — 321 с.
2. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Андронати С.А. Иммобилизация биологически активных веществ. Обзор // Микробиол. і біотехнол. — 2009. — Т. 6, № 2. — С. 8–22.
3. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. — М.: Наука, 1976. — 332 с.
4. Олтаржевская Н.Д., Коровина М.А., Савилова Л.Б. Текстиль и медицина. Перевязочные материалы с пролонгированным лечебным действием // Рос. хим. журн. — 2002. — Т. 46, № 1. — 133–141.

5. *Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В.* Определение активности ферментов. — М: ДеЛи принт. — 2003. — 385 с.

6. *Романовская И.И., Давиденко Т.И., Декина С.С., Пашкин И.И., Андронати С.А.* Иммуобилизация биологически активных веществ с целью создания потенциальных диагностических и лекарственных средств // Журн. органіч. та фармацевтич. хімії. — 2009. — Т. 7, № 3 (27). — С. 69–78.

7. *Шапалов С.Г.* Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. — 2005. — Вып. 8. — С. 38–46.

8. *Юданова Т.Н., Решетов И.В.* Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Хим.-фарм. журн. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 24–31.

9. *Hartree E.F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48, № 1. — P. 422–427.

10. *Seabra J.I., Gil M.H.* Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical application // Braz. J. Pharm. Scinces — 2007. — V. 43, № 4. — P. 535–542.

11. *Пат.* на винахід 83786 Україна, МПК(2006) С12N11/00 Спосіб іммобілізації протеази С / Романовська І.І., Декіна С.С.; заявник та власник патенту Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України. — № а 2007 13084; заявл. 26.11.07; опубл. 11.08.08, Бюл. № 15.

УДК 615.355:577.152.34

И.И. Романовская, С.С. Декина

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

РАЗРАБОТКА ТЕКСТИЛЬНОГО РАНЕВОГО ПОКРЫТИЯ С ПРОТЕАЗОЙ С *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

Реферат

На основе биогеля из бурых морских водорослей *Laminaria japonica* Aresch «Ламидан» с иммобилизованной протеазой С, закрепленного на текстильном материале (эффект «двойного депо»), разработано раневое покрытие с высокой протеолитической активностью (475 ед/г) пролон-



гированного действия (24 ч). Получение стабилизированной формы фермента подтверждено исследованием физико-химических характеристик (рН- и термооптимума, рН- и термостабильности, вязкости раствора полимера с протеазой С). Имобилизованный препарат в условиях раневого содержимого (рН 5,5) на 90% превосходит по активности свободный фермент.

Ключевые слова: протеаза С, «Ламидан», «двойное депо», раневое покрытие пролонгированного действия, иммобилизация.

UDC 615.355:577.152.34

I.I. Romanovska, S.S. Dekina

A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute, NASU, 86, Lyustdorfska road,
Odesa, 65080, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 94 31,
e-mail: irinaroma@gmail.com, s.dekina@gmail.com

THE DEVELOPMENT OF TEXTILE WOUND COATING WITH *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* PROTEASE C

Summary

Basing on the brown marine algae *Laminaria japonica* Aresch «Lamidan» biogel with immobilized protease C, fixed on the textile material («double depot» effect), the wound coating with high proteolytic activity (475 U/g), prolonged action (24 h) was developed. Obtaining of enzyme stabilized form was confirmed by investigation of physico-chemical features (pH- and thermooptima, pH- and thermostability, viscosity of polymer solution with protease C). The immobilized preparation in conditions of wound content (pH 5,5) on 90% surpasses in activity free enzyme.

Key words: protease C, «Lamidan», «double depot», the wound coatings of prolonged action, immobilization.



М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, С.Г. Соболева, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: rusamariya@yandex.ru

АНТИМІКРОБНА ДІЯ ФЕНОТІАЗИНОВИХ СПОЛУК

*В роботі вивчена дія фенотіазинових сполук на *Staphylococcus aureus* та *Escherichia coli*. Показано що ефективність досліджуваних речовин щодо *E. coli* після попередньої світлової активації перевищує активність метиленового синього. *S. aureus* виявив стійкість до впливу похідних фенотіазину, як у темних умовах, так і за фотоінактивації.*

*Ключові слова: антимікробна активність, фенотіазинові сполуки, фотоінактивація, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.*

В останні роки багатьма дослідниками відзначається тенденція прискорення розвитку стійкості патогенних мікроорганізмів до антимікробних препаратів [7]. У зв'язку з цим велика увага приділяється пошуку альтернативних методів боротьби зі штамми збудників, які є резистентними до традиційних лікарських засобів [4].

Антимікробна фотохіміотерапія (ФХТ) полягає у селективній деструкції патогенних мікроорганізмів при комбінованому впливі сполуки — фотосенсибілізатора (ФС) та випромінювання відповідного спектрального складу [10]. До об'єктів антимікробної ФХТ відносять віруси, бактерії та інш. [12]. Природа клітинних мішеней переважно визначається локалізацією ФС, яка у свою чергу залежить від його фізико-хімічних властивостей. Перебуваючи в фотозбудженому стані, молекули ФС генерують активні форми кисню, які індукують пошкодження та інактивацію клітин [5]. Селективність методу обумовлена локальним опроміненням інфікованих ділянок і більш високою (у 20—200 разів залежно від видової приналежності) у порівнянні з клітинами еукаріотів чутливістю мікроорганізмів до фотосенсибілізуючого впливу [2].

Здатність ФС зв'язуватися з мікроорганізмами залежить від особливостей структури останніх, і перш за все, клітинної стінки [5, 9]. Негативний заряд зовнішньої поверхні бактерій обумовлює активне зв'язування з ними і, відповідно, виражену антибактеріальну активність саме катіонних сполук, таких як фенотіазини [8]. Серед представників даного класу єдиною сполукою, що використовується у ФХТ, є метиленовий синій [3, 11]. Протимікробна дія барвника переважно базується на витисканні його катіонами протонів з ендогенних сполук мікроорганізмів,



а також утворенні комплексів з COOH-групами амінокислот, які трудно дисоціюють, що вилучає їх з процесів обміну [13, 14].

Метою даної роботи було визначення чутливості мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* до дії нових фенотіазинових сполук в темнових умовах, а також за світлової активації речовин.

Матеріали і методи

В роботі вивчено антимікробну активність похідних фенотіазину, що синтезовані в БНЦ Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, із загальною формулою $C_{12}H_8NSR^1R^2$, де Φ_1 ($R^1=H$, $R^2=C_3H_6NO$), Φ_2 ($R^1=CF_3$, $R^2=C_3H_6NO$), Φ_3 ($R^1=CF_3$, $R^2=C_9H_9O_3$) (рис. 1). Як тест-об'єкти використовували штами мікроорганізмів, що були отримані з музею кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: *S. aureus* ATCC 2592, *E. coli* ATCC 25922.

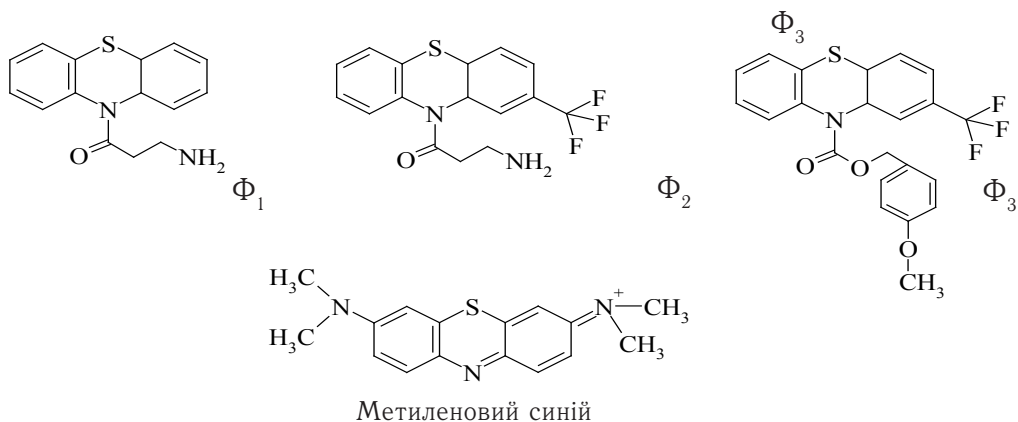


Рис. 1. Структура досліджуваних сполук

Fig. 1. The studied compounds structure

У всіх експериментах використовували добові культури бактерій. Для вивчення впливу досліджуваних сполук готували середовище Гісса з глюкозою без індикатора Андреде [1]. Поживне середовище розливали у пробірки та вносили розчини досліджуваних сполук в диметилсульфоксиді (ДМСО). Концентрація фенотіазинів, а також метиленового синього, в ньому становила 0,005, 0,01, 0,02 і 0,05%.

Вихідна концентрація клітин бактерій в пробірках з досліджуваними сполуками становила $1 \cdot 10^3$ КУО/мл. Культури в присутності фенотіазинів інкубували при температурі 37 °С впродовж 24 годин. Накопичення біомаси штамів визначали за оптичною густиною, яку вимірювали при довжині хвилі 540 нм ($ОГ_{540}$).

Для вивчення рівня фотоінактивації клітини мікроорганізмів після 30-хвилинної інкубації зі сполуками опромінювали видимим світлом. Інтенсивність випромінювання становила 20 Вт/см² на рівні зразка, час експозиції – 15 хв [2].

Кожний варіант експерименту проводили у 5 повторах. Всі експерименти повторювали тричі. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням критерію Стьюдента за допомоги комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

Аналіз антибактеріальної активності досліджуваних сполук у темних умовах виявив стимулюючий вплив на ріст культур мікроорганізмів (табл.). З підвищенням концентрації фенотіазинів у діапазоні від 0,005% до 0,020% цей ефект щодо *S. aureus* зростає.

Таблиця

Ріст культур в присутності досліджуваних похідних фенотіазину
за темних умов (ОГ₅₄₀)

Table

The culture growth in the studied phenothiazine derivatives
presence under dark conditions (OD₅₄₀)

Варіант		Концентрація, %			
		0,005	0,010	0,020	0,050
<i>S. aureus</i>	Ф1	0,369±0,010	0,369±0,012*	0,365±0,012*	0,320±0,012
	Ф2	0,342±0,008	0,345±0,010*	0,458±0,009*	0,383±0,011*
	Ф3	0,361±0,011	0,349±0,008*	0,439±0,010*	0,370±0,010*
	Метиленовий синій	0,390±0,010*	0,335±0,011*	0,380±0,009*	0,320±0,013
	Контроль**	0,309±0,010			
<i>E. coli</i>	Ф1	0,406±0,010*	0,443±0,020*	0,377±0,014	0,344±0,011
	Ф2	0,430±0,012*	0,419±0,011*	0,463±0,022*	0,354±0,003
	Ф3	0,452±0,014*	0,464±0,009*	0,456±0,013*	0,381±0,008
	Метиленовий синій	0,438±0,010*	0,400±0,015*	0,405±0,010*	0,355±0,017
	Контроль	0,363±0,011			

Примітка: * – P < 0,05 у порівнянні з контролем. ** – Контроль – культура мікроорганізмів, яка вирощувалася в присутності ДМСО.



Найбільший рівень оптичної густини суспензії (у 1,5 рази вищий за контроль) спостерігався в присутності 0,020% речовини Φ_2 . Що стосується 0,050%-го вмісту досліджуваних сполук, то всі похідні сприяли зменшенню біомаси *S. aureus* у порівнянні з нижчими концентраціями, але в той же час перевищення контрольного значення залишилося.

Інтенсивний приріст *E. coli* також визначався під впливом 0,005–0,020% фенотіазинових сполук, але на відміну від золотистого стафілококу не мав чіткої залежності від їх концентрації. Так, 0,010% речовин Φ_1 та Φ_3 , а також 0,020% Φ_2 , викликали підвищення оптичної густини приблизно на 25% проти відповідного контролю.

Всі використані концентрації досліджуваних сполук та метиленового синього за темнових умов викликали 10–50% стимуляцію мікроорганізмів, як *S. aureus*, так і *E. coli*. За даними літератури відомо, що в клітинах деяких бактерій має місце модифікація антибіотиків із феназиновими циклами під час розвитку NO-опосередкованої резистентності до них [6]. Це, можливо, призводить не тільки до інактивації антимікробної дії даних сполук, але й до інтенсифікації росту клітин бактерій.

Якщо у темнових умовах фенотіазини стимулювали розвиток бактеріальних штамів, то попередня активація світлом викликала затримку росту культур (рис. 2).

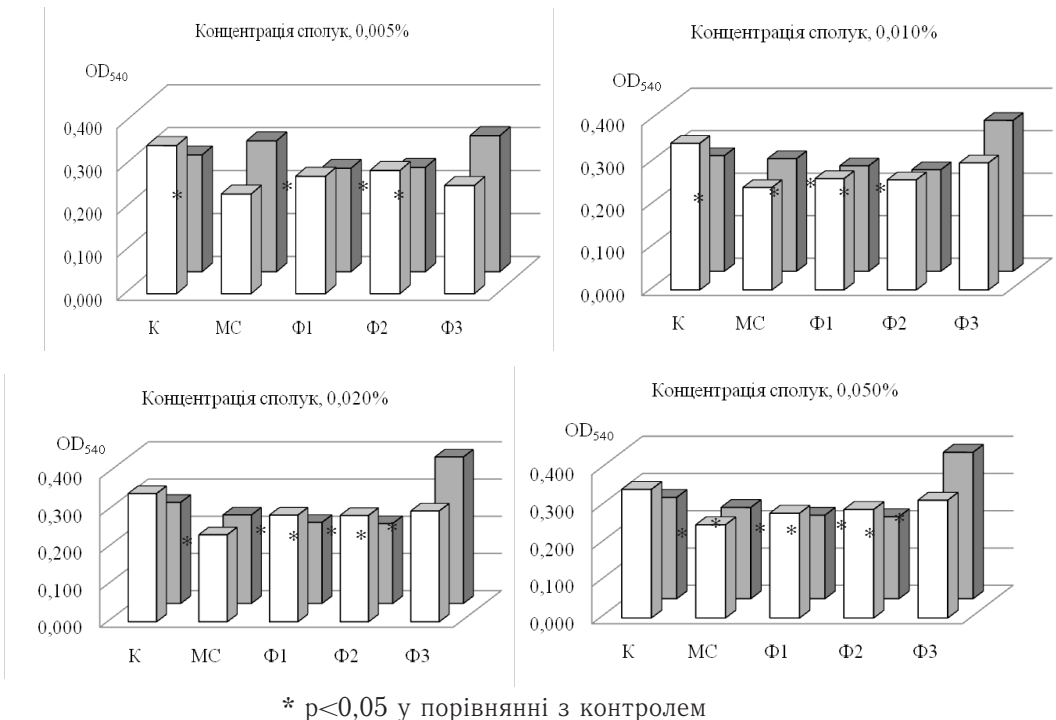


Рис. 2. Ріст бактеріальних культур за фотоіндукованої дії досліджуваних фенотіазинів: □ – *S. aureus*, ■ – *E. coli*, К – контроль, МС – метиленовий синій

Fig. 2. The bacterial culture growth under photoinduced action of the studied phenothiazines: □ – *S. aureus*, ■ – *E. coli*, C – the control, MB – methylene blue

Виняток склало похідне Φ_3 , яке спричинило 1,2–1,7-кратне збільшення оптичної густини суспензії *E. coli* у порівнянні з контролем. Цей ефект зростав під час підвищення концентрації Φ_3 в середовищі. Але на *S. aureus* дана сполука чинила пригнічуючу дію, що призвело до зниження біомаси практично на 30% відносно контролю при внесенні 0,005% Φ_3 . Це, можливо, пов'язано із наявністю в структурі сполуки ароматичного радикалу.

За винятком наведеного випадку *S. aureus* характеризувався вищою стійкістю до фотосенсибілізуючої дії сполук у порівнянні з *E. coli*. Практично всі досліджувані концентрації Φ_1 та Φ_2 знижували приріст культури до 20%. Але на відміну від метиленового синього, дані похідні були менш активними.

Що стосується *E. coli*, то сполуки Φ_1 та Φ_2 пригнічували дану культуру, навіть інтенсивніше ніж метиленовий синій. Максимальне зниження оптичної густини кишкової палички було зафіксовано для 0,005% першого похідного фенотіазину.

Отже, в роботі було встановлено, що активність досліджуваних сполук характеризувалася відсутністю чіткої залежності від концентрації похідних, але змінювалася згідно з будовою їх молекул. Бактерії *S. aureus* виявилися стійкішими до дії похідних фенотіазину, як після попереднього опромінення, так і у темнових умовах, що є характерною особливістю впливу багатьох катіонних ФС на грампозитивні мікроорганізми [4]. За результатами фотоінактивуючої активності щодо *E. coli* Φ_1 та Φ_2 в усіх досліджуваних концентраціях були більш ефективними, ніж метиленовий синій.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под. ред. М.О. Биргера. — М.: Медицина, 1982. — С. 229–231.
2. *Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R.* Mechanisms in photodynamic therapy. I. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization // *Photodiagn. Photodyn. Therapy.* — 2004. — № 1. — P. 279–293.
3. *Clifton J., Leikin J. B.* Methylene blue // *Am. J. Therapy.* — 2003. — 10. — P. 289–291.
4. *Dahl T.A., Midden W.R., Neckers D.C.* Comparison of photodynamic action by Rose Bengal in gram-positive and gram-negative bacteria // *Photochem. Photobiol.* — 1998. — 48. — P. 607–612.
5. *Demidova T.N., Hamblin M.R.* Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation // *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* — 2005. — 49. — P. 2329–2335.



6. *Gusarov I., Shatalin K., Starodubtseva M., Nudler E.* Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics // *Science*. — 2009. — 325. — P. 1380–1384.

7. *Hamblin M.R., Hasan T.* Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // *Photochem. Photobiol. Science*. — 2004. — № 3. — P. 436–450.

8. *Kaatz G.W., Moudgal V.V., Seo S.M., Kristiansen J.E.* Phenothiazines and thioxanthenes inhibit multidrug efflux pump activity in *Staphylococcus aureus* // *Antimicrob. Agents Chemotherapy*. — 2003. — 47. — P. 719–726.

9. *Malik Z., Ladan H., Nitzan Y.* Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions // *J. Photochem. Photobiology*. — 1992. — 14. — P. 262–266.

10. *Rovaldi C.R., Pievsky A., Sole N.A.* Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2000. — V. 44, № 12. — P. 3364–3367.

11. *Schirmer R.H., Coulibaly B., Stich A., Scheiwein M.* Methylene blue as an antimalarial agent // *Redox Rep.* — 2003. — 8. — P. 272–275.

12. *Soukos N.S., Ximenez-Fyvie L.A., Hamblin M.R.* Targeted antimicrobial photochemotherapy // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 1998. — 42, № 10. — P. 2595–2601.

13. *Wainwright M., Phoenix D.A., Laycock S.L.* Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* // *FEMS Microbiol. Letters*. — 1998. — 160. — P. 177–181.

14. *Wainwright M.* The use of dyes in modern biomedicine // *Biotech. Histochemistry* // 2003. — 78. — P. 147–155.



М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, С.Г. Соболева, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: rusamariya@yandex.ru

АНТИМИКРОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНОТИАЗИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Реферат

В работе было изучено влияние фенойтиазиновых соединений на *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Показано, что эффективность исследуемых соединений по отношению к *E. coli* после предварительной активации светом превышает активность метиленового синего. *S. aureus* оказался устойчивым к действию производных фенойтиазина как в темновых условиях, так и при фотоинактивации.

Ключевые слова: антимикробная активность, фенойтиазиновые соединения, фотоинактивация, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, S.G. Soboleva, T.O. Filipova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.:+38 (0482) 63 57 61, e-mail: rusamariya@yandex.ru

THE PHENOTHIAZINE COMPOUND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Summary

The influence of phenothiazine compounds on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was studied. The efficiency of these compounds after light pre-activation as to *E. coli* exceeded the methylene blue activity level. *S. aureus* was resistant to the action of phenothiazine derivatives both under the dark conditions and in photoinactivation presence.

Key words: antimicrobial activity, phenothiazine compounds, photoinactivation, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.



Т.М. Корня, С.О. Ігнатова

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна,
тел.: +38 (0482) 39 55 57, e-mail: odonata@mail.ru

СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ВПЛИВУ ФУЗАРІЄВОЇ КИСЛОТИ

Виявлено, що у форм пшениці із середньою стійкістю до Fusarium graminearum в культурі in vitro толерантність до фузарієвої кислоти на рівні зрілого пилку проявляється в його здатності до проростання, та на рівні мікроспор в культурі пиляків у збільшенні кількості морфогенного калусу та регенерації з нього рослин за впливу низьких концентрацій токсину. Встановлено, що за використання фузарієвої кислоти як селективного чинника в культурі пиляків пшениці можливо створювати форми подвоєних гаплоїдів із середньою стійкістю (6 балів) до захворювання пшениці, викликаного F. graminearum.

Ключові слова: Fusarium graminearum, селекція in vitro, андрогенез in vitro, озима м'яка пшениця.

В боротьбі із захворюванням фузаріозом колосу озимої м'якої пшениці створення методами селекції стійких сортів є найефективнішою, екологічно безпечною та економічно вигідною стратегією [1–4]. Одним з головних питань залишається скорочення строків селекції стійких форм пшениці, оскільки стійкість нівелюється через декілька поколінь по ряду причин, одна з яких — високий рівень мінливості та адаптації патогенів [5]. Тому, актуальним є залучення до традиційної селекції біотехнологічних методів гаплоїдії в поєднанні із селекцією *in vitro* [6, 7]. У цьому зв'язку метою даної роботи стало дослідження питання щодо морфогенезу гаметофіту пшениці на різних фазах його розвитку за впливу селективного фактору в умовах *in vitro*, а також визначення ефективності використання фузарієвого мікотоксину в селективній системі *in vitro* для добору форм із стійкістю до *F. graminearum*.

Матеріал та методи досліджень

За матеріал використовували набір гомозиготних ліній подвоєних гаплоїдів пшениці, отриманих шляхом андрогенезу *in vitro* від однієї гібридної комбінації озимої м'якої пшениці: Chinese Spring ph. 1b × [*Aegilops taushii* (1691) × Одеська напівкарликова]. Дані подвоєні гаплоїди пшениці попередньо були оцінені на стійкість до фузаріозу



колосу на штучному інфекційному фоні. Результати оцінки люб'язно надані відділом фітопатології та ентомології СГІ-НЦНС, к.с-г.н. Л. Т. Бабаянц та представлені в табл. 1.

Для дослідження морфогенезу гаметофіту на стадії сильновакуолізованої мікроспори за впливу фузарієвої кислоти застосовували метод культури пиляків [8, 9, 10], на стадії зрілого пилку – метод пророщування пилку в присутності токсину [11, 12]. Пиляки пшениці культивували на середовищі 190-2 [13], зрілий пилкок пророщували на середовищі за прописом В. А. Ляха та ін. [12].

В якості селективного фактору було обрано мікотоксин фузарієву кислоту, що додавали до складу поживних середовищ у концентраціях 50, 100 та 500 мкг/л для створення селективних фонів. Як контроль використовували поживні середовища без токсину.

Результати досліджень та їх обговорення

На пилкок ліній подвоєних гаплоїдів пшениці з відомою оцінкою польової стійкості до фузаріозу колосу подіяли різними концентраціями фузарієвої кислоти: 50, 100 та 500 мкг/л (табл. 1).

Таблиця 1

Проростання пилку ліній подвоєних гаплоїдів пшениці під впливом фузарієвої кислоти

Table 1

Germination of the pollen of wheat doubled haploid lines under the influence of fusaric acid

№ лінії	Оцінка польової стійкості за 10-бальною шкалою	Контроль	Фузарієва кислота, мкг/л		
			50	100	500
11	4	86,80 ± 3,81	75,39 ± 4,71*	14,64 ± 3,45*	2,99 ± 1,87*
12	3	94,94 ± 2,41	72,82 ± 4,96*	93,36 ± 2,96	59,50 ± 4,81*
14	4	78,68 ± 6,88	22,64 ± 4,09*	58,64 ± 5,62*	12,06 ± 3,60*
16	5	99,01 ± 1,11	61,24 ± 5,95*	75,39 ± 4,71*	76,43 ± 4,83*
18	6	85,21 ± 5,84	78,69 ± 10,27	84,72 ± 4,04	97,62 ± 4,61

Примітка: * – зменшення частки пророслого пилку в порівнянні з контролем при $p < 0,05$ за методом довірчих інтервалів для частки



В результаті за показником проростання пилку була виявлена найбільш толерантна *in vitro* гомозиготна лінія пшениці за номером № 18 із стійкістю до фузаріозу колосу — шість балів за десятибальною шкалою, що відповідає середній стійкості (або толерантності) до захворювання фузаріозом колосу. Пилок цієї лінії на досліджених концентраціях фузарієвої кислоти зберігав здатність до проростання. У цієї ж лінії в культурі пиляків під впливом тих самих концентрацій фузарієвої кислоти спостерігали достовірне збільшення відсотка морфогенного калусу в порівнянні з контролем ($p < 0,05$), і відповідно більшої кількості сформованих зелених рослин-регенерантів (табл. 2). Причому, максимальний відсоток сформованого толерантного морфогенного калусу спостерігали на варіантах середовищ з низьким вмістом токсину.

У сприйнятливих до *F. graminearum* форм пшениці, які мали 3–4 бали стійкості за десятибальною шкалою, за впливу фузарієвої кислоти спостерігали зменшення в порівнянні з контролем кількості морфогенних новоутворень та регенерації зелених рослин — це форми № 11 та № 12. У форм № 14 та № 16 (4–5 балів) — частка сформованого морфогенного калусу на селективних середовищах залишалась на рівні з контрольним варіантом.

Отже, у форм пшениці із стійкістю до *F. graminearum* від шести балів в культурі *in vitro* толерантність до токсину фузарієвої кислоти проявляється на рівні зрілого пилку в його здатності до проростання, та на рівні мікроспор в культурі пиляків у збільшенні кількості морфогенного калусу. Тому, оскільки показником стійкості до селективного фактору в культурі пиляків є формування із мікроспор саме морфогенного калусу, то селекцію необхідно проводити з вибракуванням неморфогенного калусу. На нашу думку, доцільним в отриманні толерантних ліній подвоєних гаплоїдів є використання низьких доз селективного фактору в поживному середовищі для сприяння формування морфогенних новоутворень та більшого виходу зелених рослин-регенерантів.

За літературними даними відомо, що за використання фузарієвої кислоти методом селекції *in vitro* можливо створювати генотипи огірка, стійкі до фузаріозного кореневого в'янення, викликаного грибом *F. oxysporum* [14]. Використання фузарієвої кислоти в гаплоїдній селекції стійких до фузаріозних гнилей пшениці, викликаних *F. oxysporum*, *F. moniliforme* та *F. solani* було продемонстровано в роботах Н. В. Лаврової [11], де показано, що культивуванням пиляків в присутності фузарієвої кислоти можливо створювати господарсько-цінні сорти пшениці стійкі до фузаріозного в'янення.

За нашими даними, за допомогою фузарієвої кислоти на рівні 50–500 мкг/л в поживному середовищі в культурі зрілого ізольованого пилку можливо оцінювати генотипи пшениці за їх сприйнятливістю або толерантністю до *F. graminearum*. В культурі пиляків з використанням фузарієвої кислоти можливо створювати умови для добору гомозиготних форм пшениці із середньою стійкістю до захворювання фузаріозом колосу.



Морфогенез в культурі пиляків ліній подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці від гібридної форми: Chinese Spring ph. 1b × [Ae. taushii (1691) × Одеська напівкарликова] за впливу фузарієвої кислоти

Morphogenesis in the anther culture of doubled haploid lines of wheat hybrid form: Chinese Spring ph. 1b × [Ae. taushii (1691) × Odessa napivkarlykova] under the influence of fusaric acid

Номер ЛПГ	Концентрація токсину, мкг/л		Кількість пиляків, шт.	Кількість новоутворень, %		Частота регенерації зелених рослин, %				
				Морфогенних	Достовірний інтервал Уїлсона Верхня межа	Нижня межа	шт.	% від висаджених пиляків	Достовірний інтервал Уїлсона Верхня межа	Нижня межа
11	Контроль		428	4,44	6,83	2,86	2	0,47	1,69	0,13
	Фузарієва кислота	50 100	303 324	3,30 0,93**	5,97 2,69	1,80 0,32	2	0,66	2,37	0,18
12	Контроль		730	5,75	7,69	4,28	5	0,68	1,59	0,29
	Фузарієва кислота	100 500	346 314	2,60** 8,28	4,87 11,86	1,37 5,71	1	0,29	1,62	0,05
14	Контроль		809	3,46	4,96	2,41	8	0,99	1,94	0,50
	Фузарієва кислота	50 100 500	320 354 306	1,25 5,08 3,59	3,17 7,89 6,32	0,49 3,24 2,02	1	0,31	1,75	0,06
16	Контроль		530	4,15	6,20	2,76	2	0,38	1,37	0,10
	Фузарієва кислота	50 500	307 1081	1,63 2,68	3,76 3,83	0,70 1,87	1	0,33	1,82	0,06
18	Контроль		280	0,36	1,99	0,06	0	0,00	0,67	0,05
	Фузарієва кислота	50 100 500	325 260 323	7,69* 2,31 4,95*	11,11 4,94 7,89	5,26 1,06 3,07	6	1,85*	3,97	0,85

Примітка: * — достовірний позитивний вплив фактору в порівнянні з контролем при $p < 0,05$

** — достовірний негативний вплив фактору в порівнянні з контролем при $p < 0,05$

Таким чином, толерантність експлантів пшениці до фузарієвої кислоти в культурі *in vitro* відповідає середній стійкості (6 балів) *in vivo*, але не високій стійкості до захворювання пшениці фузаріозом колосу. Можна зробити припущення, що токсин фузарієва кислота не є специфічним для захворювання, викликаного патогеном *F. graminearum*. На нашу думку, використання фузарієвої кислоти як селективного фактору в доборі на стійкість пшениці до фузаріозу колосу, викликаного *F. graminearum* дає можливість добирати лише середньостійкі/толерантні до *F. graminearum* генотипи.

В цілому, результати роботи показали, що шляхом поєднання методів гаплоїдії та селекції *in vitro* з використанням фузарієвої кислоти можливо створювати гомозиготні форми подвоєних гаплоїдів пшениці із толерантністю до захворювання, викликаного *F. graminearum*. Для проведення лабораторної експрес-оцінки сприйнятливості/толерантності до патогена створеного шляхом андрогенезу *in vitro* гомозиготного матеріалу пшениці оптимальним є використання методу пророщування зрілого пилку в присутності фузарієвої кислоти, що може бути використано на ранніх етапах розвитку регенерантів до зав'язування насіння.

ЛІТЕРАТУРА

1. Foroud N. *Fusarium graminearum*- and trichothecene-induced differential transcriptomics and proteomics in resistant and susceptible wheat genotypes / N. Foroud, A. Laroche, M. Jordan, B. Ellis, F. Eudes // 3 Int. FHB Symposium : Cereal Research Communications. — Szeged, Hungary, 2008. — Vol. 36, Suppl. B. — P. 239–243.

2. Zhuping Yang. Genetic diversity of resistance genes controlling fusarium head blight with simple sequence repeat markers in thirty-six wheat accessions from east asian origin / Zhuping Yang, Jeannie Gilbert and J. Douglas Procunier // Euphytica. — 2006. — V. 148, № 3. — P. 345–352.

3. Kawanishi Y. Development of highly resistant wheat lines to *Fusarium* head blight derived from Chinese source 'Fujian5114' / Yuki Kawanishi, Ichiro Tsutsui, Atsushi Torada, Haruka Ohta, Minako Ogasawara, Masaya Hayashi, Eriko Nishii // 8th International wheat conference, 1–4 June 2010 : abstracts. — St. Petersburg, Russia, 2010. — P. 271.

4. Бабаянц Л.Т. Исходный материал для селекции озимой мягкой пшеницы на групповую устойчивость к фитопатогенам / Л.Т. Бабаянц, О.В. Бабаянц, А.А. Васильев, В.А. Палясный // 36. наукових праць СГП-НЦНС. — Одеса, 2007. — вип. 9(49). — С. 224–237.

5. Билай В.И. Фузарии / В.И. Фузариини. — Киев: Наукова думка, 1977. — 441 с.

6. Bruins M.B.M. Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for fusarium head blight resistance /



М.В.М. Bruins, I. Karsan, J. Schepers and C.H.A. Snijders // Plant Science. — 1993. — V. 94, I. 1-2. — P. 195–206.

7. Eudes F. Trichothecene-mediated *in vitro* selection in wheat for reduced mycotoxin accumulation caused by *Fusarium graminearum* / Eudes F., Comeau A., Rioux S., Collin J. // Canadian Journal of Plant Science. — 2008. — V. 88, I. 6. — P. 1115–1125.

8. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза : автореф. дис. на соиск. учёной степ. докт. биол. наук : спец. 03.00.05 «Ботаника» / Н.Н. Круглова — Уфа, 2002. — 48 с.

9. Лобанова К.І. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці / Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. // Вісник Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4, № 1. — С. 52–57.

10. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений : учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. — М.: Агропромиздат, 1988. — 270 с.

11. Лаврова Н.В. Разработка и применение биотехнологий для получения устойчивых к фузариозу растений озимой пшеницы (гаплоидная) и огурца (меристемная, каллусная и микроспорогенная): автореферат дисс. на соискание науч. степени докт. биол. наук : спец. 03.00.23 «Биотехнология» / Н.В. Лаврова. — М., — 2006. — 46 с.

12. Методи отбора ценных генотипов на уровне пыльцы : [методические рекомендации] / В.А. Лях, А.И. Сорока, Л.Ю. Мищенко, М.Г. Калинова, Е. Н. Мирошниченко. — Запорожье, 2000. — 48 с.

13. Wang X. The effect of potato II medium for triticales anther culture / X. Wang, H. Hu // Plant Sci. Lett. — 1984. — Vol. 36. — P. 237–239.

14. Ткачева А.А. Получение растений огурца с повышенной устойчивостью к фузариозному увяданию методами *in vitro*: методические рекомендации / А.В. Поляков, А.А. Ткачева, И.И. Тарасенков, Н.К. Бирюкова. — М.: ГНУ ВНИИО, 2006. — 28 с.



Т.М. Корня, С.А. Игнатова

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, тел.: +38 (0482) 39 55 57,
e-mail: odonata@mail.ru

СЕЛЕКЦІЯ *IN VITRO* ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ПОД ВЛІЯННЯМ ФУЗАРІЄВОЇ КИСЛОТИ

Реферат

Выявлено, что у форм пшеницы со средней устойчивостью к *Fusarium graminearum* в культуре *in vitro* толерантность к фузариевой кислоте на уровне зрелой пыльцы проявляется в её способности прорасти, и на уровне микроспор в культуре пыльников в увеличении количества морфогенного каллуса и регенерации из него растений под влиянием низких концентраций токсина. Установлено, что с использованием фузариевой кислоты в качестве селективного фактора в культуре пыльников пшеницы возможно создавать формы удвоенных гаплоидов со средней устойчивостью (6 баллов) к *F. graminearum*.

Ключевые слова: *Fusarium graminearum*, селекция *in vitro*, андрогенез *in vitro*, озимая мягкая пшеница.

T.M. Kornya, S.O. Ignatova

South Plant Biotechnology Center,
3, Ovidiopolska Str., Odesa, 65036, Ukraine, e-mail: odonata@mail.ru

SELECTION *IN VITRO* OF THE WINTER COMMON WHEAT UNDER THE INFLUENCE OF FUSARIC ACID

Summary

There were revealed that the forms of wheat with an average resistance to *Fusarium graminearum* *in vitro* culture had the tolerance to fusarium acid at the level of mature pollen, that was displayed in its ability to germinate and at the level of microspores in anther culture – there were displayed the increasing of of morphogenic callus number and plants regeneration under the influence of low toxin concentrations. It was established that using of the fusarium acid as a selective factor in anther culture of wheat gave the possibility to create the forms of double haploids with average resistance (6 points) to *F. graminearum*.

Key words: *Fusarium graminearum*, selection *in vitro*, androgenesis *in vitro*, winter common wheat.



УДК: 577.11:631.8

**Н.С. Щеглова¹, О.В. Карпенко¹, Р.І. Вільданова¹, М.В. Пристай¹,
Н.Ю. Лісова², Т.М. Ногіна³**

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М.Литвиненка НАН України,
вул. Наукова, 3-а, Львів, 79053, Україна, тел.: +38 (032) 264 07 40,
e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

²Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН, с. Оброшино,
Пустомитівського р-ну Львівської обл.

³Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, Д03680, Україна

ВПЛИВ БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ *SYNORHIZOBIUM MELILOTI* З ЛЮЦЕРНОЮ

Встановлено, що біогенні поверхнево-активні речовини (трегалозоліпіди, рамноліпідний біокомплекс) у складі бактеріальних препаратів S. meliloti ЛН11 стимулюють формування симбіозу ризобій з люцерною. Досліджено різні способи отримання комплексних препаратів: внесення біогенних ПАР в поживне середовище росту ризобій та їх додавання безпосередньо до бактеріального препарату. При бактеризації насіння одержаними препаратами збільшується нодуляційна активність ризобій, надземна та коренева маса рослин. Визначено, що найбільш ефективними були препарати S. meliloti ЛН11, до складу яких входили трегалозоліпіди. Запропоновано оптимальний спосіб отримання комплексних препаратів – додавання трегалозоліпідів (0,01 г/л) при культивуванні ризобій.

Ключові слова: Synorhizobium meliloti, люцерна, біоПАР, рамноліпідний біокомплекс, трегалозоліпіди, нодуляційна активність.

Розробка ефективних екологічно безпечних препаратів для рослинництва є актуальною проблемою сучасної біотехнології. Значну перспективу для створення нових та удосконалення існуючих бактеріальних препаратів мають біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР). БіоПАР при своїй високій ефективності та унікальності їх властивостей є екологічно безпечними і нетоксичними, що визначає перспективу їх використання у різних галузях народного господарства. Відомо, що біоПАР впливають на проникність клітинних мембран, здатні регулювати ріст та метаболізм бактерій, підвищуючи активність ферментів [12]. Відомо, що рослинні ПАР сапоніни стимулюють нодуляційну активність і формування активного симбіозу ризобій з бобовими рослинами [9]. Особливу роль, на нашу думку, біоПАР можуть відігравати на початкових етапах розвитку кореневої системи рослини та її колонізації симбіотичними азот-

© Н.С. Щеглова, О.В. Карпенко, Р.І. Вільданова, М.В. Пристай, Н.Ю. Лісова, Т.М. Ногіна, 2011



фіксаторами (ініціацію кореневих бульбочок, конкурентоспроможність та нодуляційну активність ризобій), що впливає на формування ефективних взаємовідносин між мікро- і макросимбіонтами, сприяє підвищенню врожайності та отриманню якісної продукції рослинництва. В наших попередніх дослідженнях встановлено стимулювальний вплив біоПАР різної природи на проростання насіння бобових рослин [6]. Метою даної роботи є вивчення впливу біоПАР на формування симбіотичної системи бульбочкових бактерій *S. meliloti* ЛН 11 та рослин люцерни сорту Роксолана.

Матеріали і методи досліджень

Об'єкти досліджень: штам *Synorhizobium meliloti* ЛН11 (з колекції мікроорганізмів Інституту землеробства і тваринництва західного регіону УААН), люцерна сорту Роксолана; поверхнево-активні метаболіти: рамноліпідний біокомплекс (суміш рамноліпідів та полісахаридів) — продуцент штам *Pseudomonas* sp. PS-17 (з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України); ПАР, які містять трегалозоліпіди (ТЛ) — продуцент штам *Rhodococcus erythropolis* УКМ Ас-50 (з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України).

Штам *Pseudomonas* sp. PS-17 вирощували 5 діб на оптимізованому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 3,0; NaCl — 0,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; гліцерофосфат Са — 2,46; CaCO_3 — 0,01; MnSO_4 — 0,001; FeSO_4 — 0,001; цитрат Na — 2,0; гліцерин — 30,0; рН — 6,8–7,0. Рамноліпідний біокомплекс виділяли із супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 при додаванні 10%-го розчину соляної кислоти до рН 3,0. Отриманий осад витримували 12 год при 4 °С та відділяли центрифугуванням (8000 об/хв., 20 хв.). Він складається із 80% рамноліпідів та 20% полісахаридів [13]. Штам *R. erythropolis* УКМ Ас–50 культивували протягом 5 діб на середовищі Гудвіна в нашій модифікації (г/л): NH_4NO_3 — 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; KH_2PO_4 — 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; дріжджовий екстракт — 1,0; джерело вуглецевого живлення (гексадекан) — 20,0; рН 6,8–7,0. Трегалозоліпіди екстрагували з біомаси бактерій сумішшю Фолча (хлороформ/метанол, 2:1). Штам *S. meliloti* ЛН11 вирощували на манітно-дріжджовому середовищі (МД) впродовж 3 діб [10]. Для отримання модифікованих препаратів: 1 — штам *S. meliloti* ЛН11 культивували на поживному середовищі впродовж 3 діб з додаванням ПАР; 2 — ПАР додавали безпосередньо до суспензії клітин. Рамноліпідний біокомплекс або трегалозоліпіди вносили до біопрепаратів за концентрацій 0,05; 0,02; 0,01 г/л.

Вегетаційні досліді з люцерною проводили в умовах піщаної культури у поліетиленових посудинах ємністю 200 мл (напівстерильний дослід) на поживному середовищі Гельрігеля [3], що містило 0,2 норми азоту. До середовища додавали розчин мікроелементів (1 мл/кг піску): $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — 0,5 г/л; H_3BO_3 — 1,0 г/л, рН — 6,8–7,0. Повторність до-



слідів 6-ти кратна, загальна кількість рослин у варіанті — 30 шт. Насіння перед висівом стерилізували сумішшю пероксид водню (12%) — етанол (1:1). Бактеризацію насіння проводили суспензією клітин *S. meliloti* ЛН11 з титром $2 \cdot 10^9$ кл/мл.

Вплив біоПАР на ініціацію та формування кореневих бульбочок вивчали за їх загальною кількістю на корені та за розмірами: великі — 4–5 мм; середні — 2–3 мм; дрібні — ≤ 1 мм [2]. Підрахунок корневих бульбочок і облік зеленої маси проводили на 60-й день після сходів. Визначення надземної та кореневої маси проводили згідно із стандартною методикою.

Нітрогеназну (ацетиленвідновну) активність корневих бульбочок визначали ацетиленовим методом [11] на газовому хроматографі ЛХМ-80 з полум'яно-іонізаційним детектором, колонка з оксидом алюмінію LL 5/40 (0,4 x 130 см), температура 80 °С, газ-носії — гелій (30 мл/хв). Об'єм зразку газової суміші становив 0,2–1 см³. Вміст етилену визначали за калібрувальним графіком, як стандарт використовували етилен (ГОСТ 25070-87). Для кожного зразку брали по 5 корінців, експозиція в ацетилені 0,5 год.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що при внесенні рамноліпідних ПАР (біокомплексу) при культивуванні бактерій, а також при їх додаванні безпосередньо до бактеріальної суспензії *S. meliloti* ЛН11 підвищувалася ефективність бактеризації насіння люцерни. Залежно від концентрації рамноліпідних ПАР у препараті коренева маса люцерни збільшувалась на 19,2–23,1%, а надземна — на 14,5–17,1% порівняно з інокуляцією *S. meliloti* ЛН11; проте такий вплив був у межах середньостатистичної похибки (табл. 1). Нодуляційна активність ризобій за всіх концентрацій біокомплексу у препараті зросла на 20,4–29,6%.

Одним з пояснень такої стимулювальної дії біокомплексу може бути покращення контакту мікроорганізмів з поверхнею кореня, що обумовлено їх поверхнево-активними властивостями. Важливу роль, на нашу думку, відіграє і їх біологічна активність, зокрема вплив на активність пектиназ ризобій [5], оскільки ці ферменти спричиняють лізис клітинної стінки, що сприяє первинному інфікуванню корневих волосків [1]. Причиною зростання нодуляційної активності ризобій також може бути підвищення синтезу екзополісахаридів під впливом ПАР [7], оскільки відомо, що полісахариди ризобій відіграють важливу роль у формуванні ефективного симбіозу з бобовими рослинами [1, 2].

Рамноліпідні ПАР у складі бактеріальних препаратів практично не впливали на формування корневих бульбочок або незначно зменшували кількість великих і середніх бульбочок. Їх азотфіксувальна активність практично не відрізнялась від варіанту інокуляції *S. meliloti* ЛН11.



Таблиця 1

Вплив рамноліпідного біокомплексу (БК) на формування симбіозу *S. meliloti* ЛН11 — люцерна (сорт Роксолана)

Table 1

Influence of rhamnolipid biocomplex (BC) on the formation of symbiosis *S. meliloti* LN11 — alfalfa (var. Roksolana)

Варіант досліджу	БК (г/л)	Суша коренева маса, г/10 рослин	Суша надземна маса, г/10 рослин	Кількість корневих бульбочок, шт/10 рослин	Нітрогеназна активність, нмоль C ₂ H ₄ /год/рослину
Контроль (вода)	0	0,46±0,02	0,67±0,03	0	—
<i>S. meliloti</i> ЛН11	0	0,52±0,04	0,76±0,05	270	37,3±7,9
Внесення БК при культивуванні бактерій	0,05	0,66±0,09	0,88±0,05	408	46,3±10,7
	0,02	0,58±0,04	0,89±0,06	432	42,3±10,5
	0,01	0,62±0,04	0,91±0,07	440	42,3±7,0
Внесення БК до суспензії клітин	0,05	0,63±0,06	0,87±0,06	350	37,8±7,8
	0,02	0,62±0,06	0,87±0,05	325	33,8±9,1
	0,01	0,68±0,06	0,89±0,08	342	35,0±8,0

n= 27; p≤0,05

Визначено, що при культивуванні *S. meliloti* ЛН11 на поживному середовищі з рамноліпідами їх вміст у культуральній рідині після 72 год росту бактерій зменшувалася з 0,01 г/л до 0,002 г/л. Цей факт свідчить, що досліджені ПАР впливали на нодуляційну активність бактерій за низьких концентрацій.

Трегалозоліпіди, у складі бактеріальних препаратів, виявляли більший стимулювальний вплив на симбіотичні показники системи *S. meliloti* ЛН11 — люцерна сорту Роксолана, ніж рамноліпідні ПАР. Коренева маса рослин зросла на 39,4—42,4%, надземна маса — на 19,5—33,8%; нодуляційна активність ризобій підвищилася на 35—79% залежно від концентрації трегалозоліпідів та способу їх внесення у бактеріальну суспензію (табл. 2).



Таблиця 2
Вплив трегалозоліпідів (ТЛ) на формування симбіотичної системи
S. meliloti ЛН 11 – люцерна (сорт Роксолана)

Table 2
Influence of trehalose lipids on the formation of symbiotic system
S. meliloti LN11 – alfalfa (variety Roksolana)

Варіант досліджу	ТЛ, (г/л)	Суша коре- нева маса, г/10 рослин	Суша надземна маса, г/10 рослин	Кількість кореневих бульбочок, шт/10 рослин	Нітрогеназ- на активність, нмольС ₂ Н ₄ / год/рослину
Контроль (вода)	0	0,30±0,06	0,73±0,04	0	-
<i>S. meliloti</i> ЛН 11	0	0,33±0,04	0,77±0,04	204	54,3±5,0
Внесення ТЛ при культивуванні бактерій	0,05	0,46±0,03	0,96±0,06	275	65,1±5,3
	0,02	0,46±0,04	0,92±0,05	338	61,7±6,0
	0,01	0,47±0,05	1,03±0,10	365	59,4±5,5
Внесення ТЛ до суспензії бактерій	0,05	0,44±0,03	0,95±0,07	335	53,7±9,5
	0,02	0,45±0,05	0,92±0,05	346	59,2±9,1
	0,01	0,47±0,05	0,94±0,05	362	59,1±6,9

n=30; p<0,05

За бактеризації насіння препаратами, які модифіковані трегалозоліпідами, виявлено тенденцію до зростання кількості великих та достовірно збільшення кількості середніх кореневих бульбочок (рис. 1). Найбільшу ефективність виявили біопрепарати *S. meliloti* ЛН 11, отримані на поживних середовищах з трегалозоліпідами (0,01 г/л), при бактеризації якими одержано максимальний приріст кореневої та надземної маси люцерни.

Одним з механізмів впливу біоПАР на ріст рослин може бути підвищення активності фітогормонів, зокрема індолілоцтової кислоти (ІОК), яка синтезується ризобіями [4]. В модельному тесті на ризогенез живців квасолі було показано, що використання біогенних ПАР спільно з ІОК підсилювало її дію: збільшувалася кількість утворених корінців, їх довжина та маса [8].

Отже, встановлено стимулювальний вплив біогенних ПАР у складі бактеріальних препаратів на формування симбіозу *S. meliloti* ЛН11- люцерна сорту Роксолана. Показано ефективність бактеризації насіння комплексними препаратами, отриманими за різних способів: внесення біогенних ПАР до поживного середовища росту ризобій або безпосередньо до бактеріальної суспензії.



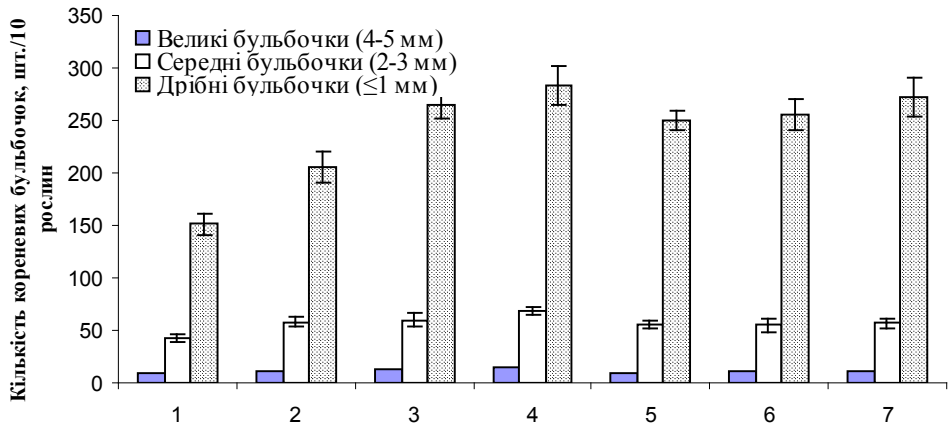


Рис. 1. Вплив трегалозоліпідів на формування кореневих бульбочок у системі *S. meliloti* ЛН11 – люцерна (сорт Роксолана):

1 – *S. meliloti* ЛН 11; 2, 3, 4 – ТЛ: 0,05 г/л; 0,02 г/л; 0,01 г/л, відповідно, вносили при культивуванні бактерій; 5, 6, 7 – ТЛ: 0,05 г/л; 0,02 г/л; 0,01 г/л, відповідно, додавали до бактеріальної суспензії.

Fig. 1. Influence of trehalose lipids on the formation of root nodules in system *S. meliloti* LN11 – alfalfa (var. Roksolana):

1 – *S. meliloti* LN11; 2, 3, 4 – TL was introduced when cultivating bacteria in concentrations 0,05 g/l; 0,02 g/l; 0,01 g/l; 5, 6, 7 – TL in concentrations 0,05 g/l; 0,02 g/l; 0,01 g/l respectively, were added to bacterial suspension.

Встановлено специфічність дії ПАР залежно від їх природи: використання рамноліпідних ПАР у складі бактеріальних препаратів меншою мірою впливало на формування симбіозу *S. meliloti* ЛН11 – люцерна сорту Роксолана ніж трегалозоліпіди.

Отримані результати дозволили запропонувати новий біотехнологічний підхід у виробництві комплексних бактеріальних препаратів для бобових рослин – додавання трегалозоліпідів (0,01 г/л) у поживне середовище при культивуванні ризобій.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции* // Под. ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. –С.-Пб.: Наука, 1998. – 194 с.
2. *Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс* // Под. ред. Е.Н. Мишустина. – М.: Наука, 1973. – 380 с.

3. *Сэги Й.* Методы почвенной микробиологии / Под ред. Г.С. Муромцева —М.: Колос. — 1983. — С. 107–109.

4. *Трепач А.О., Токмачева Л.М., Близнюк Н.М.* Фітогормональна активність *Rhizobium radiobacter* // Сільськогосп. мікробіол., — 2007. — вип. 5. — С. 82–89.

5. *Шульга А.Н., Карпенко О.В., Гуменюк В.В., Петрів М. Д.* Біогенні поверхнево-активні речовини для підвищення ефективності кормів сільськогосподарських тварин // Наук. Вісник Львівського нац. універ. ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького, серія «Сільськогосп. науки», — Т. 12, № 2 (44), ч. 3, — С. 270–274.

6. *Щеглова Н., Покиньюброда Т., Карпенко О.* Гліколіпідні ПАР — екологічно безпечні стимулятори росту сільськогосподарських рослин // Вісник НУ «Львівська політехніка». — Хімія та технологія хімічних речовин. — 2007. — № 590. — С. 133–138.

7. *Щеглова Н., Лісова Н., Карпенко О.* Стимуляція біосинтезу полісахаридів культури *E. nimipressuralis* ЛН 1 // Вісник Львів. ун-ту, серія «Біологія», — 2008. — Вип. 48. — С. 135–139.

8. *Щеглова Н., Вильданова Р., Лісова Н., Баранов В., Карпенко О.* Влияние биогенных поверхностно-активных веществ на рост бобовых растений // Радостим : зб. матеріалів конф., 23–25 октября 2010, Краснодар. —С. 113.

9. *Galan M., Lisova N., Oleszek W.* The role of saponins in nodulation of leguminous plants // International conference on saponins «Phytochemistry and Application of Plant Saponins», Poland , 14–17 September 2004, — 532 p.

10. *Zdor R.E.* Early infection and competition for nodulation of seybian by *B. japonicum* 123 and 138 / R.E. Zdor, S.G. Pueppke // Appl. and Environmental Microbiol. — 1988. — № 8. — P. 1996–2002.

11. *Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.* Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil. Biol. and Biochem. — 1973. — Vol. 5, № 1. — P. 47–81.

12. *Ron E., Rosenberg E.* Natural roles of biosurfactants // Env. Microbiology. — 2001. — Vol. 3, № 4. — P. 229–236.

13. *Пат. 71792 А* Україна 7 С12N1/02 С12R1:38. Поверхнево-активний біопрепарат / О.В. Карпенко, Н.Б. Мартинюк, О.Н. Шульга, Н.С. Щеглова. — заявл. 25.12.2003; опубл. 15.12.2004, Бюл № 12.



Н.С. Щеглова¹, О.В. Карпенко¹, Р.И. Вильданова¹, М.В. Пристай¹,
Н.Е. Лисова², Т.М. Ногина³

¹ Отделение физико-химии горючих ископаемых ИнФОУ им. Л.М. Литвиненко НАН Украины, ул. Научная, За, Львов, 79053, Украина, тел.:+38 (032) 264 07 40, e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

² Институт земледелия и животноводства западного региона УААН, с. Оброшино, Пустомитовского р-на Львовской обл.

³ Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОЗА *SYNORHIZOBIVM MELILOTI* С ЛЮЦЕРНОЙ

Реферат

Установлено, что биогенные поверхностно-активные вещества (трегалозолипиды, рамнолипидный биокомплекс) в составе бактериальных препаратов *S. meliloti* ЛН11 стимулируют формирование симбиоза ризобий с люцерной (сорт Роксолана). Исследованы разные способы получения комплексных препаратов: внесение биогенных ПАВ в питательную среду роста ризобий или непосредственно в бактериальную суспензию. При бактеризации семян полученными препаратами возрастает нодуляционная активность ризобий, надземная и корневая масса растений. Показано, что наиболее эффективными были препараты *S. meliloti* ЛН11, в состав которых входили трегалозолипиды. Предложен оптимальный способ получения комплексных препаратов – внесение трегалозолипидов (0,01 г/л) при культивировании ризобий.

Ключевые слова: *Synorhizobium meliloti*, люцерна, биоПАВ, рамнолипидный биокомплекс, трегалозолипиды, нодуляционная активность.



**N.S. Shcheglova¹, O.V. Karpenko¹, R.I. Vildanova¹, M.V. Prystay¹,
N.Yu. Lisova², T.M. Nogina³**

¹ Department of Physical Chemistry of Combustible minerals of Lytvynenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry NASU, 3а, Naukova str., Lviv, 79053, Ukraine, tel.:+38 (032) 264 07 40, e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

² Institute of agriculture and animal breeding of Western region of Ukraine, Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, 81115 Obroshyno, Pustomyivskiyi district, Lviv region, Ukraine

³ Zabolotny Institute of Microbiology And Virology NASU, 154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, GO3680, Ukraine

INFLUENCE OF BIOGENIC SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES ON FORMATION OF SYMBIOSIS *SYNORHIZOBIUM MELILOTI* WITH ALFALFA

Summary

The influence of biogenic surface-active substances (biosurfactants) – rhamnolipid biocomplex and trehalodolipid in the com position of bacterial preparations on the formation of symbiosis *S. meliloti* LN11 – alfalfa (variety Roksolana) was determined. It was shown that in spite of the way of biosurfactants application (introduction into the nutrient medium when culturing *S. meliloti* or introduction in inoculum when bacterizing seeds) the aboveground and root mass of alfalfa increased as well as nodulation activity of root nodules. The specificity of the biosurfactant effect depending on their chemical structure was ascertained: the greatest efficiency was performed by *S. meliloti* LN11 preparations, included trehalosolipids. It was shown that the best way of modification of biopreparations is addition of trehalosolipids into the nutrient medium when culturing rhizobia at concentration of 0.01 g/L.

Key words: *Synorhizobium meliloti*, alfalfa, biosurfactants, rhamnolipid biocomplex, trehalosolipids.



Л.С. Ястремська

Національний авіаційний університет, Інститут екологічної безпеки,
пр-кт космонавта Комарова, 1, Київ, 03058, Україна,
тел.: +38 (044) 406 78 87, e-mail: lorarem@gmail.com

ВПЛИВ ОКИСНО-ВІДНОВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ НА ФІЗІОЛОГІЧНИЙ СТАН МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *CLOSTRIDIUM*

Досліджено вплив окисно-відновного потенціалу (ОВП) середовища на продукцію біомаси і продуктів метаболізму анаеробними термофільними (60 °С) мікроорганізмами роду Clostridium: целюлозолітичного – Clostridium thermocellum 5СТ та сахаролітичного – C. thermosaccharolyticum 1S в анаеробних умовах. Показано, що ріст штамів відбувається у різних межах і оптимумах ОВП. Ріст C. thermocellum 5СТ спостерігається в межах ОВП –200...–380 мВ, з оптимумом –260 мВ, C. thermosaccharolyticum 1S в межах ОВП +100...–200 мВ, з оптимумом –135...–140 мВ (рН 7,0–7,3). За оптимальних значень ОВП у обох штамів приріст біомаси, утворення етанолу та ацетату на середовищі з відновником (сульфідом натрію) у 1,5–2 рази вищий, ніж на середовищі без відновника. Доведено, що ОВП є одним з основних факторів, що визначає фізіологічний стан клітин та інтенсивність процесів біосинтезу.

Ключові слова: окисно-відновний потенціал, рН, біомаса, Clostridium thermocellum, C. thermosaccharolyticum, продукція, етанол, ацетат, H₂.

Анаеробні бактерії роду *Clostridium* є однією з найважливіших груп мікроорганізмів, що беруть участь у трансформації органічної речовини, і тим самим здійснюють кругообіг вуглецю в біосфері. Ця група мікроорганізмів характеризується різноманітністю та складністю процесів їх обміну речовин, та вкрай широким спектром продуктів метаболізму що утворюються [2, 8, 10].

Одним із ключових параметрів анаеробного процесу при трансформації складних біополімерів поряд з рН і температурою є окисно-відновний потенціал середовища, який може впливати на хід метаболічних процесів мікроорганізмів [1, 4, 9, 11–15]. Окисно-відновний потенціал (ОВП, редокс-потенціал) дозволяє найбільш точно визначати ступінь анаеробних умов поживного середовища. ОВП є об'єктом досліджень у галузі переробки відходів з отриманням енергоносіїв (метану, водню, етанолу), органічних кислот (ацетату, пропіонату, бутирату), ферментів (целюлаз,



геміцелюлаз, пектиназ тощо) у сучасних біотехнологіях [1, 4, 8–10, 12, 13]. Проте, думки дослідників, що досліджують ОВП, суперечливі. Деякі – вважають, що ОВП безпосередньо діє на метаболічні процеси [1, 4, 9, 11, 13], інші – взагалі заперечують будь-який вплив редокс-потенціалу середовища на ріст і метаболізм мікроорганізмів [12]. Пошук літературних джерел виявив незначну кількість наукових робіт за даною проблемою [1, 4, 11–15].

Метою досліджень було визначення впливу редокс-потенціалу середовища на фізіологічний стан термофільних облигатних анаеробних мікроорганізмів – *Clostridium thermocellum* 5СТ та *C. thermosaccharolyticum* 1S.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктом дослідження були штами термофільних анаеробних бактерій, зокрема, целюлолітичний *Clostridium thermocellum* 5СТ, сахаролітичний *C. thermosaccharolyticum* 1S, ізольовані з активного мулу метантенка станції біологічного очищення стічних вод (м. Київ, Бортничі). Виділення й ідентифікація описані в роботі [6].

Для культивування штамів використовували мінеральне середовище «Р», такого складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; NH_4Cl – 1,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,02; NaHCO_3 – 1,0; розчин мікроелементів – 1 мл/л; розчин вітамінів – 1 мл/л; розчин 0,2% індикатора резазурину – 1 мл; вода дистильована – 1 л; рН середовища 7,0–7,5. Газова фаза аргон 100%. Автоклавували при 1,5 атм. Як вуглецевий субстрат застосовували целобіозу (0,5 об %).

Розчини вітамінів, вуглеводів стерилізували фільтруванням через фільтри «Синпор» № 8, 9, зберігали окремо в анаеробних умовах і вносили в середовище шприцем стерильно безпосередньо перед посівом [6]. Окремо готували і вносили розчини відновників для створення відновлювальних умов у середовищі: сульфід натрію (10% $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – 20 мл/л), цитрат титану (III) – 25 мл/л [15].

Розлив середовища в культиватор [3] об'ємом 500 мл, здійснювали в потоці інертного газу аргону (ДСТУ 10157–79), що містить O_2 у концентрації не вище 0,0007%, за модифікованою методикою Хангейта для культивування анаеробів [7]. Об'єм середовища – 250 мл, газової фази – 250 мл, посівного матеріалу – 20 мл.

В штуцера культиватора вставляли вимірювальні електроди для потенціометричного визначення значень ОВП і рН середовища на універсальному іономері ЕВ-74 [3]. Для визначення ОВП використовували платиновий електрод ЕВП-1 і хлорсрібний електрод порівняння ЕВЛ-ІМЗ. Значення рН встановлювали за допомогою електродної пари, що складається з вимірювального електроду ЕСЛ-63-07 і допоміжного – ЕВЛ-ІМЗ [3].



Вихідне значення ОВП поживного середовища з 0,5% целобіози після дегазування в потоці аргону становило +100 мВ, рН 7,0–7,3.

Ріст культур оцінювали за величиною оптичної густини клітинної суспензії, яку визначали на фотоелектрокалориметрі ФЭК-56П, при $\lambda=540$ нм у кюветі з довжиною світлового шляху 0,5 см, а також за виділенням газів — H_2 , CO_2 . Склад газів аналізували на газовому хроматографі ЛХМ-8МД, визначення кислот і спиртів — на хроматографі «Chrom-5». Об'єм проб — 5–10 мкл.

Морфологію клітин вивчали у фазовому контрасті на мікроскопі МБІ-6 (збільшення $\times 1570$).

Інкубування досліджуваних анаеробних культур здійснювали в термостаті при 60 °С.

Статистичне опрацювання даних проводили за загальноприйнятими методиками з урахуванням критерію Стьюдента [6].

Результати та їх обговорення

Целюлозолітичний штам *C. thermocellum* 5СТ гідролізує полісахариди (целюлозу, геміцелюлозу), дисахариди (целобіозу, сахарозу), моносахариди (глюкозу, галактозу, ксилозу) з продукуванням водню, вуглекислоти, етанолу, ацетату, лактату. Сахаролітичний штам *C. thermosaccharolyticum* 1S здатний ферментувати полісахариди (крохмаль, пектини, але не целюлозу), дисахариди (целобіозу, сахарозу, лактозу), моносахариди (пентози, гексози) з утворенням водню, вуглекислоти, етанолу, ацетату, лактату, бутирату [6].

Досліджувані штами є облігатними анаеробами. Для їх розвитку потрібні низькі значення окисно-відновного потенціалу середовища –100...–330 мВ [2]. Створення відновлювальних умов середовища є можливим за рахунок сполук, які мають електрондонорні властивості (відновників): тіогліколату натрію, цистеїну, сульфїду натрію, сірководню і ін. [1,4].

В роботі досліджувалися зміни ОВП, рН, продуктів метаболізму в процесі росту штамів залежно від наявності або відсутності в середовищі відновників при зброджуванні целобіози в строго анаеробних умовах в культиваторі.

Ріст *C. thermocellum* 5СТ без відновника [5]. Встановлено, що після інокулювання середовища 12-ти годинною культурою, значення ОВП за 10 годин знижувалося від +100 мВ до –100 мВ, трималося 4 години на тому ж рівні і до 24-ї години досягало максимальних значень –380 мВ (падіння на 480 мВ). Виділення метаболітів (водню, вуглекислого газу, етанолу, ацетату) починалося через 10–12 годин після інокуляції середовища. Оптична густина (ОГ) культуральної рідини досягала значень 0,2 одиниць екстинції (рис. 1А). Максимальна питома швидкість росту, яка дорівнювала 0,1 год⁻¹, відзначалася на 24 годину культивування (табл. 1).



Таблиця 1
Утворення метаболітів при культивуванні *C. thermocellum* 5СТ
на середовищі у відсутності відновника

Table 1
Formation of metabolites during cultivation *C. thermocellum* 5СТ on
medium in the absence of a reducer

Час	Продукти метаболізму, ммоль/л			Питома швидкість росту μ , год ⁻¹
	етанол	ацетат	лактат	
12	0,05± 0,01	0,07± 0,01	0	0,015±0,001
24	8,40± 0,02	26,7± 0,01	0,15± 0,01	0,10±0,001
48	8,09± 0,01	26,8± 0,03	0,16± 0,01	0,005±0,001
72	8,07± 0,02	25,0± 0,01	0,14± 0,01	0,005±0,001
96	8,10± 0,01	25,0± 0,01	0,15± 0,01	0,017±0,001

У момент максимального виділення водню ОВП стабілізувався на рівні -380 мВ і тільки через 72 години культивування підвищувався до -300 мВ. За значень ОВП -300 мВ накопичення біомаси зменшується вдвічі, рН знижується з 7,0 до 6,0, змінюється морфологічний стан клітин. Після 10–12 годин культивування помітного розвитку культури не відбувалося, і лише після того, як значення ОВП досягло -380 мВ, визначалися скупчення вегетативних клітин, після 50-ї години виявлялися – спорові клітини (рис. 2).

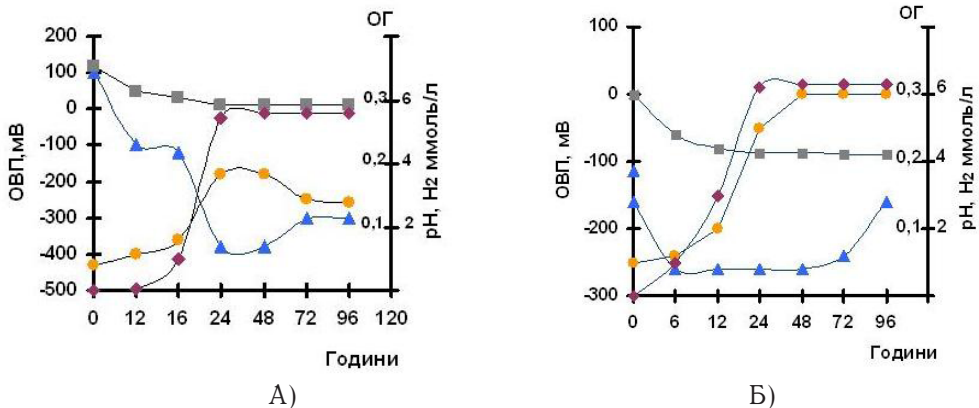


Рис.1. Динаміка росту *C. thermocellum* 5СТ на середовищі:

А) без відновника; Б) з відновником (Na₂S · 9H₂O);

▲ ОВП ■ рН ● оптична густина (ОГ) ◆ H₂

Fig. 1. The growth of *C. thermocellum* 5СТ on medium:

A) without the reducing agent; B) with the reducing agent (Na₂S · 9H₂O) ;

▲ redox potential ■ pH ● optical density ◆ H₂

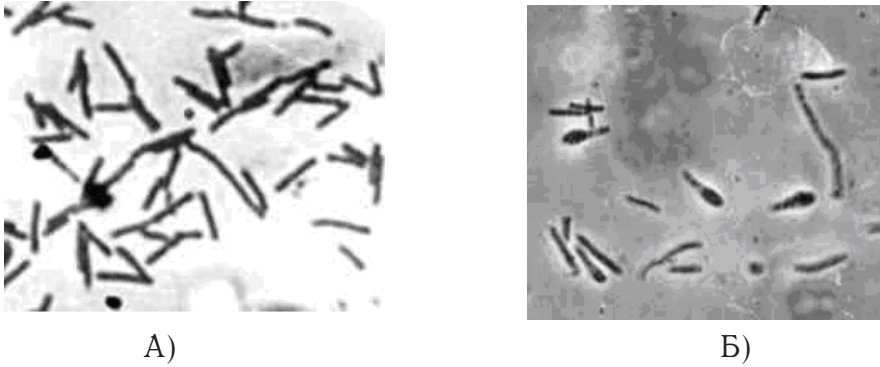


Рис. 2. Клітини *C. thermocellum* 5СТ (збільшення $\times 1570$, фазовий контраст)

- А) вегетативні клітини, 24–36 годин росту;
 Б) клітини на етапі спорування, 50–72 години

Fig. 2. Cells *C.thermocellum* 5СТ (increase $\times 1570$, phase contrast)

- A) vegetative cells 24–36 hours of growth;
 B) cells on the sporulation stage, 50–72 hours

Ріст *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з відновником – сульфідом натрію ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). При внесенні в дегазоване поживне середовище відновника значення ОВП встановлювалося на відмітці -100 мВ. Після інокулювання 12-ти годинною культурою ОВП швидко знижувався і за 30 хв досягав значень -160 мВ. За 10 год культивування значення потенціалу знижувалося до -260 мВ, стабілізувалося на цьому рівні протягом 60 год і лише після цього повільно підвищувалося до -160 мВ. У період експоненційного росту культури кількість метаболітів: водню, вуглекислого газу, етанолу, ацетату – досягало максимальних значень. Максимальна питома швидкість росту, яка дорівнювала $0,09 \text{ год}^{-1}$, відзначалася на 24-ій годині росту (табл. 2, рис. 1Б).

Таблиця 2

Утворення метаболітів при культивуванні *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з відновником ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)

Table 2

Formation of metabolites during cultivation *C. thermocellum* 5СТ on medium with the reducing agent ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)

Час	Продукти метаболізму, ммоль/л			Питома швидкість росту μ , год $^{-1}$
	етанол	ацетат	лактат	
12	$8,75 \pm 0,01$	$25,5 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,03$	$0,057 \pm 0,002$
24	$16,9 \pm 0,01$	$35,6 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,003$
48	$17,0 \pm 0,01$	$35,6 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,01$	$0,003 \pm 0,001$
72	$17,0 \pm 0,01$	$35,6 \pm 0,01$	$2,0 \pm 0,01$	$0,003 \pm 0,001$

В обох випадках (з відновником $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ та без нього) кількість водню, що утворився, становила близько 6 ммоль/л. Однак, приріст біомаси, утворення етанолу, ацетату у 1,5–2 рази вище на середовищі з відновником, ніж без нього.

Ріст культури у межах значень ОВП $-200 \dots -380$ мВ, з оптимумом -260 мВ, а не -100 мВ (значення ОВП стерильного середовища з відновником сульфідом натрію) можна інтерпретувати як результат взаємодії даного відновника з редокс-системами культуральної рідини.

Рис *C. thermosaccharolyticum* 1S без відновника. Після інокуляції культурою значення ОВП середовища за 7–8 годин знижувалося від $+100$ мВ до -200 мВ, (усього на 300 мВ), трималося 5 годин на тому ж рівні та до 24-ої години культивування підвищувалося та стабілізувалося на значенні -100 мВ. За максимального виділення водню ОВП стабілізувався на рівні -200 мВ і тільки через 18 годин культивування підвищувався до -100 мВ. Оптична густина досягала значень 0,24 одиниць екстинції, рН знизився з 7,0 до 5,0 (рис. 3А).

Виділення метаболітів починалося впродовж 5–6 годин після інокулювання середовища та досягало максимальних значень за 24 години. Максимальна питома швидкість росту, яка дорівнювала $0,1 \text{ год}^{-1}$, відзначалася на 6–12-тій годині росту (табл. 3).

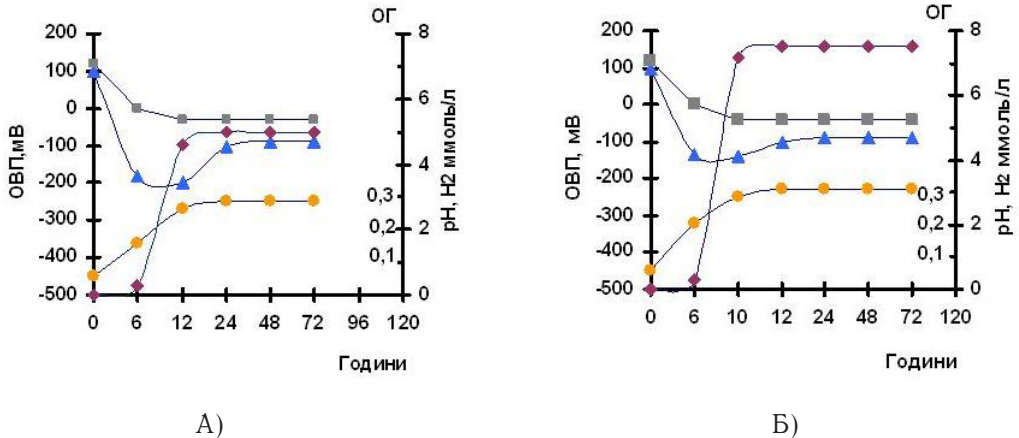


Рис. 3. Динаміка росту *C. thermosaccharolyticum* 1S на середовищі:

А) без відновника; Б) з відновником ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$);

▲ ОВП ■ рН ● оптична густина (ОГ) ◆ H_2

Fig. 3. The growth of *C. thermosaccharolyticum* 1S on medium:

A) without the reducing agent; B) with the reducing agent ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$);

▲ redox potential ■ pH ● optical density ◆ H_2

Таблиця 3

**Утворення метаболітів при культивуванні *C. thermosaccharolyticum* 1S
на середовищі у відсутності відновника**

Table 3

**Formation of metabolites during cultivation of *C. thermosaccharolyticum* 1S
in medium in the absence of the reducer**

Час	Продукти метаболізму, ммоль/л			Питома швидкість росту μ , год ⁻¹
	етанол	ацетат	лактат	
6	0,50± 0,01	0,07± 0,01	0	0,10±0,0001
12	5,40± 0,01	1,20± 0,02	0,30± 0,01	0,10±0,0001
24	5,60± 0,02	1,45± 0,01	0,31± 0,02	0,005±0,001
48	5,69± 0,01	1,50± 0,01	0,38± 0,02	0,005±0,001
72	5,69± 0,01	1,50± 0,01	0,38± 0,02	0,017±0,001

Ріст C. thermosaccharolyticum 1S на середовищі з відновником – сульфідом натрію ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). При внесенні в дегазоване середовище відновника значення ОВП швидко знижувалося та через 30 хв досягало значень -100 мВ. Після інокулювання 7-ми годинною культурою ОВП знижувався за 5 год культивування до $-135...-140$ мВ, встановлювався на цьому рівні та до 12-ої години підвищувався до -100 мВ і більше не змінювався; рН знизився з 7,5 до 5,0–4,8 (рис. 3Б).

У період експоненційного росту культури кількість біомаси та продуктів метаболізму: водню, вуглекислого газу, етанолу, ацетату, лактату досягало максимальних значень. Максимальна питома швидкість росту, яка дорівнювала $0,1$ год⁻¹, також відзначалася на 6–12-й годині росту (табл. 4).

Таблиця 4

**Утворення метаболітів при культивуванні *C. thermosaccharolyticum* 1S на
середовищі з відновником ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)**

Table 4

**Formation of metabolites during cultivation of *C. thermosaccharolyticum* 1S
on medium with the reducing agent ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)**

Час	Продукти метаболізму, ммоль/л			Питома швидкість росту μ , год ⁻¹
	етанол	ацетат	лактат, бутират	
6	0,50±0,01	0,07± 0,01	0	0,10± 0,001
12	6,40±0,01	2,50± 0,01	0,50± 0,01	0,10± 0,001
24	6,60±0,02	2,85± 0,01	0,51± 0,01	0,005±0,001
48	7,00±0,01	2,85± 0,01	0,58± 0,02	0,005±0,001
72	7,00±0,01	2,85± 0,01	0,58± 0,02	0,017±0,001



Отже, показано, що при культивуванні штаму *C. thermosaccharolyticum* 1S на середовищі з відновником ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) приріст біомаси та утворення метаболітів (водню, етанолу, ацетату, лактату, бутирату) у 1,5–2 рази вищий, ніж на середовищі без відновника. Розвиток культури відбувається у межах значень ОВП +100...–200 мВ, з оптимумом –135...–140 мВ (рН 7,0–7,3).

Ріст культур на середовищі з відновником цитратом титану (III). Для вивчення впливу дуже низьких (близьких до значення потенціалу водневого електроду –420 мВ, при рН 7,0) значень ОВП використовували цитрат тривалентного титану. За його допомоги у середовищі можуть бути отримані значення навіть нижчі, ніж у водневого електроду, причому цитрат титану (III) нетоксичний для більшості мікроорганізмів [15].

Вихідне значення ОВП середовища після дегазації становило +100 мВ (рН 7,0–7,3). Після внесення цитрату титану (III) ОВП швидко знижувався. Стаціонарне значення ОВП встановлювалося після 3 годин на рівні –420 мВ, при рН 7,0. Після цього в середовище вносили посівний матеріал штаму *C. thermocellum* 5СТ. Внесення інокуляту не викликало підвищення ОВП. Впродовж 24 годин культивування, при незмінному ОВП (–420 мВ), рН знизився з 7,0 до 6,5, оптична густина культуральної рідини збільшилася до 0,15 од. екстинції (рис. 4).

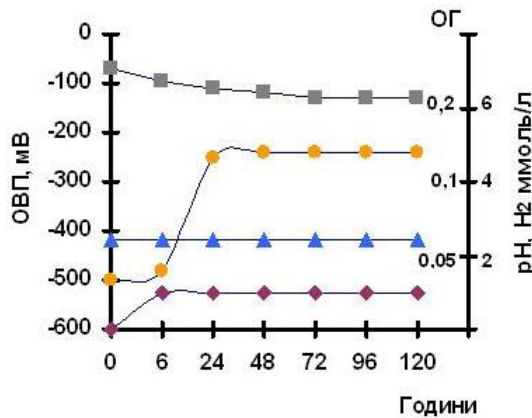
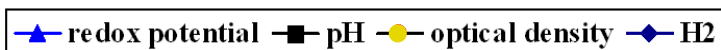


Рис. 4. Динаміка росту *C. thermocellum* 5СТ на середовищі з відновником цитратом титану (III):



Fig. 4. The growth of *C. thermocellum* 5ST on medium with reducing titanium citrate (III):



Проте, при вирощуванні культури за присутності цитрату титану (III) кількість водню, що утворився, у 6 разів менша у порівнянні з ростом культури на середовищі за відсутності відновника $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (рис. 1А). Аналогічні результати були отримані і при дослідженні росту сахаролітичного штаму *C. thermosaccharolyticum* 1S.

Динаміку зміни значень ОВП в процесі росту штамів залежно від наявності або відсутності в середовищі відновників при зброджуванні органічних речовин у строго анаеробних умовах можна пояснити тим, що представники роду *Clostridium* утворюють молекулярний водень за окиснення пірувату за участю піруват:фередоксин-оксидоредуктази. Фередоксин має дуже низький редокс-потенціал: при рН 7,0 він дорівнює стандартному ОВП водневого електроду [1]. Імовірно, що спостережувані нами зміни значень ОВП, які близькі до -380 мВ, пов'язані з функціонуванням таких переносників електронів як фередоксин. Поступове підвищення ОВП до -300 мВ *C. thermocellum* 5СТ, і -100 мВ *C. thermosaccharolyticum* 1S (рис.1А, 2А), можливо трактувати як результат зміни метаболічних процесів даних мікроорганізмів. Цитрат титану (III) пригнічує активність піруват:фередоксин-оксидоредуктази, що бере участь в утворенні водню.

В літературі зазначено, що ефект інгібування водню цитратом титану (III), також можливе за рахунок окиснення ключового ферменту. Так у факультативних анаеробів *E. coli* K-12 (утворює водень за рахунок окиснення форміату за участю ферменту форміат-гідрогенліази) цитрат титану (III) пригнічує активність форміат-гідрогенліази [1]. Отже, вплив цитрату титану (III) на мікроорганізми, що мають різні ферментні системи, які здійснюють відновлення протона до H_2 обумовлено зниженням ОВП середовища до рівнів, що роблять термодинамічно не вигідною реакцію окиснення форміату або пірувату.

В роботі [4] відзначається, що оптимальне значення ОВП розвитку метаногенного угруповання обумовлюється життєдіяльністю мікроорганізмів. Зниження метаногенезу за введення різних акцепторів електронів (феріціаніду калію, нітрату натрію, молекулярного кисню) зв'язано з підвищенням ОВП культурального середовища. Результати нашої роботи підтверджують думку, що ОВП впливає на фізіологічний стан клітин та інтенсивність процесів біосинтезу.

Таким чином, показано, що розвиток облигатних анаеробів роду *Clostridium* відбувається за різних меж значень ОВП з різними оптимумами. Ріст термофільного анаеробного целюлозолітичного штаму *C. thermocellum* 5СТ спостерігається в межах ОВП $-200 \dots -380$ мВ, з оптимумом -260 мВ, сахаролітичного *C. thermosaccharolyticum* 1S — в межах ОВП $+100 \dots -200$ мВ, з оптимумом $-135 \dots -140$ мВ (рН 7,0–7,3). При оптимальних значеннях ОВП у обох штамів приріст біомаси, утворення етанолу та ацетату на середовищі з відновником (сульфідом натрію) у 1,5–2 рази вищий ніж на середовищі без відновника. Оптимальні



значення ОВП обох штамів можна інтерпретувати як результат взаємодії даного відновника з редокс-системами культуральної рідини.

Проведені дослідження впливу окисно-відновного потенціалу середовища на метаболізм термофільних анаеробних мікроорганізмів підтверджують думку [1, 4, 14], що редокс потенціал є одним з основних факторів, що визначає фізіологічний стан клітин, і відповідно, інтенсивність процесів біосинтезу. ОВП може ширше застосовуватися при дослідженні різних фізіологічних груп мікроорганізмів наряду з такими показниками культурального середовища як рН та температура.

ЛІТЕРАТУРА

1. Данько Я.Н. Влияние различных экзогенных акцепторов и доноров электронов на образование метана метаногенными сообществами: Автореф. дис. канд.биол. наук: 03.00.07. Киев, — 1988. — 20 с.
2. Современная микробиология. Прокариоты: В 2т. /Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. — М.: Мир, — 2005. — Т. 1 — 656 с.
3. Чернышенко Д.В., Данько Я.Н., Таширеву А.Б. и др. Культиватор для изучения ростовых процессов анаеробных микроорганизмов // Микроб. журн. — 1990. — 52, № 6. — С. 90—91.
4. Чернышенко Д.В. Влияние некоторых акцепторов электронов на метаболизм метаногенного сообщества // Микроб. журнал. — 2002. — 64, № 5. — С. 35—46.
5. Ястремська Л.С., Карпенко В.І., Голодок Л.П. Вплив окисно-відновного потенціалу середовища на розвиток анаеробного термофільного целюлолітичного штаму *Clostridium thermocellum* 5СТ // Матер. міжн. конф. «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» — Запоріжжя: ЗНУ, 2007. — С. 497—498.
6. Ястремская Л.С. Идентификация термофильных анаеробных микроорганизмов, изолированных из метантенка // Микроб. журн. — 1993. — 55, № 6. — С. 3—12.
7. Ястремська Л.С. Анаеробний метод розливу рідких поживних середовищ // Наукові доповіді НУБіП. — 2011. — 2(24). — http://nd.nubip.edu.ua/2011_2/11yls.pdf
8. Demain A.L., Newcomb M., David J.H. Cellulase, Clostridia and Ethanol // Microbiol. and Molec. Biol. Rev. — 2005. — 69, N. 1. — P. 124—154.
9. Kim B.H., Bellows P., Rathin D., Zeikus J.G. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields // Appl. Environ. Microbiol. — 1984. — 48, P. 764—770.
10. Maki M., Leung K.T., Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. // Int. J. Biol. Sci. — 2009. — 5. — P. 500—516.



11. *Oblinger J.L., Kraft A.A.* Oxidation-reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens* // *J. of Food Science.*— 1973.— vol. 38. — 7.— P. 1108—1112.

12. *O'Brien R.W., Morris J.G.* Oxygen and growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum* // *J. Gen. Microb.*—1971.— 68.— P. 307—318.

13. *Soghomonyan D., Akopyan K., Trchounian A.* pH and oxidation-reduction potential change of environment during growth of lactic acid bacteria: Effects of oxidizers and reducers // *Appl. Biochem. Microb.*—2011. — vol. 47, № 1. — P. 27—31.

14. *Tabatabai L.B., Walker H.W.* Oxidation- reduction potential of growth of *Clostridium perfringens* and *Pseudomonas fluorescens* // *Appl. Microbiol.* — 1970. — vol. 1. — P. 441—446.

15. *Zehnder A.J.B., Wehrmann K.* Titanium (III) citrat as nontoxic oxidation-reducing buffering system for cultivation obligate anaerobes // *Science.* — 1976. — vol. 194, № 4270. — P. 1165—1166.

Л.С. Ястремская

Национальный авиационный университет, Институт экологической безопасности,
проспект космонавта Комарова, 1, Киев, 03058, Украина,
тел.: +38 (044) 406 78 87, e-mail: lorarem@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *CLOSTRIDIUM*

Реферат

Исследовано влияние окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) среды на образование биомассы и продуктов метаболизма анаэробными термофильными (60 °С) микроорганизмами рода *Clostridium*: целлюлозолитического — *C. thermocellum* 5СТ и сахаролитического — *C. thermosaccharolyticum* 1S в анаэробных условиях. Показано, что развитие штаммов происходит в разных границах и оптимумах ОВП. Рост *C. thermocellum* 5СТ наблюдается в пределах ОВП -200 ...- 380 мВ, с оптимумом -260 мВ, *C. thermosaccharolyticum* 1S в пределах ОВП +100..- 200 мВ, с оптимумом -135 ...-140 мВ (рН 7,0—7,3). При оптимальных значениях ОВП у обоих штаммов прирост биомассы, образование этанола и ацетата на среде с восстановителем (сульфидом натрия) в 1,5—2 раза выше, чем без восстановителя. Определено, что ОВП является одним из основных факторов, определяющих физиологическое состояние клеток и интенсивность процессов биосинтеза.



Ключевые слова: окислительно-восстановительный потенциал, рН, биомасса, *Clostridium thermocellum*, *C. thermosaccharolyticum*, продукция, этанол, ацетат, H₂.

L.S. Yastremska

National Aviation University, Institute for Environmental Security, 1,
cosmonaut Komarov
avenue, Kyiv, 03058, Ukraine, tel.: +38 (044) 406 78 87, e-mail: lorarem@gmail.com

EFFECT OF REDOX POTENTIALS ON PHYSIOLOGICAL STATE OF MICROORGANISMS OF GENUS *CLOSTRIDIUM*

Summary

The effect of redox potential (ORP) of the medium on formation of biomass and metabolic products by anaerobic thermophilic (60 °C) microorganisms of genus *Clostridium*: cellulolytic – *C. thermocellum* 5ST and saccharolytic *C. thermo-saccharolyticum* 1S under anaerobic conditions. There were shown, that strains development takes place in the various limits and within the optimum ORP. Growth of *C. thermocellum* 5CT is observed within ORP -200 ...- 380 mV, with an optimum -260 mV; *C. thermosaccharolyticum* 1S in the range redox potential +100 ..- 200 mV, with an optimum -135 ...- 140 mV (pH 7,0–7,3). For optimum values of redox potential in both strains, biomass growth, ethanol and acetate in formation medium with a reducing agent (sodium sulfide) in 1.5–2 times higher than that without a reducing agent. There were determined that the redox potential is one of the main factors determining the physiological state of the cells and biosynthesis intensity.

Key words: redox potential, cellulolytic thermophilic strain *Clostridium thermocellum*, saccharolytic strain of *C. thermosaccharolyticum*, H₂.



Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, М.А. Хархота

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

СВОЙСТВА ЦЕЛЛЮЛАЗ, ПРОДУЦИРУЕМЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS*

Изучали энзиматические свойства различных типов целлюлаз, продуцируемых бациллами при глубинном культивировании на среде с тяжелоразрушаемой целлюлозой. Обобщены результаты исследований свойств целлюлаз шести наиболее активных штаммов бацилл. Дан анализ влияния pH и температуры на их активность и стабильность. Установлено, что целлюлазы изучаемых штаммов бацилл проявляют наибольшую активность при pH от 6,0 до 7,0. Исключение составляет C_2 -фермент, имеющий pH-оптимум в более кислой зоне – от 5,0 до 8,0. Температурный оптимум действия C_x -, C_1 - и C_2 - ферментов – 50 °С, целлюбиазы – 40 °С. Целлюлазы бацилл отличались высокой термостабильностью, которую проявляли в широком интервале температур – от 40 °С до 70 °С.

Ключевые слова: целлюлазы, свойства, *Bacillus*.

Биоконверсия возобновляемого целлюлозосодержащего растительного сырья в различные полезные продукты продолжает оставаться одной из ключевых отраслей биотехнологии. Несмотря на то, что образование целлюлаз вообще, как и биосинтез любых ферментов-белков подчинено генетическому контролю, большинство факторов внешней среды оказывают решающее влияние на характер метаболизма клетки, в первую очередь, действуя на скорость различных ферментативных реакций. К числу основных факторов, определяющих эффективность гидролиза целлюлозосодержащего сырья, относятся прежде всего pH среды и температура. Их действие очень многообразно, они могут влиять на стабильность ферментов, разрушающих их, ускорять или замедлять денатурацию, влиять на сродство их к субстрату [9]. От этих свойств зависят новые возможности и области использования целлюлолитических ферментов [5].

С помощью оптимизации условий культивирования, состава среды и ее pH для исследуемых бактерий нам удалось усилить у бацилл активность ряда гидролитических ферментов. Исследуемые гидролазы проявляли индуцибельный тип секреции, поскольку их продуцирование наблюдалось лишь в присутствии в среде специфических субстратов [1, 2].

Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, М.А. Хархота



В рамках этих исследований актуален и продолжается поиск штаммов микроорганизмов, продуцирующих ферменты с новыми свойствами, среди которых особый интерес представляют кислото- и термостабильные целлюлазы. Недостаточная стабильность ферментов может привести к уменьшению скорости и глубины гидролиза разрушаемых ими субстратов. Перспективную группу организмов для таких исследований составляют бактерии рода *Bacillus*.

Цель настоящей работы заключалась в изучении энзиматических свойств различных типов целлюлаз, продуцируемых бактериями при глубинном культивировании на целлюлозе и обладающих наиболее высокой активностью и стабильностью при различных значениях рН среды и температуры.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы бесклеточные фильтраты культуральной жидкости шести штаммов *B. subtilis* ²³/₂, *B. subtilis* 5001, *B. subtilis* 13₂, *B. subtilis* 39, *B. subtilis* 51 и *B. licheniformis* ⁶/₂, отобранных в результате проведенного скрининга [7].

Культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде при условиях, описанных в работе [7].

Специфичность целлюлаз определяли, измеряя их активность, используя в качестве субстратов для синтеза исследуемых ферментов: натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) — 0,5; целлобиозу — 0,2; целлюлозу — 0,5; хлопковую вату — 0,5 и фильтровальную бумагу — 0,5%. Хлопковую вату переводили в гидроцеллюлозу путем обработки 10н HCl при комнатной температуре в течение 1 суток и тщательного отмывания до нейтрального рН промывными водами [4]. Фильтровальную бумагу тщательно измельчали.

Для определения активности целлюлаз группы C_x был применен метод определения эндоглюканазной активности по увеличению редуцирующей способности инкубационной смеси с 0,5% Na-КМЦ [11]. C₁- и C₂-активность измеряли по количеству растворимых сахаров, образовавшихся из хлопковой ваты и фильтровальной бумаги соответственно. Содержание сахара определяли колориметрическим методом по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой [11]. Целлобиазную активность определяли по возрастанию редуцирующей способности инкубационной смеси, которая состояла из 2,5 мл 0,2% раствора целлобиозы в 1/15 М фосфатном буфере (рН 5,5) и 1 мл фильтрата культуральной жидкости, содержащей фермент.

Для определения рН-оптимума действия C₁-, C₂- ферментов и целлобиазы проводили при 40 °С в 1/15 М цитратно-фосфатном буфере, C_x- фермента — при 50 °С в интервале значения рН от 3,0 до 9,0. Температурный оптимум действия целлюлаз устанавливали при рН 6,0 в интервале температур 30–60 °С.



Термостабільність определяли по остаточній активності ферментів в культуральній рідині після 60-хвилинного прогрівання при 30–90 °С з інтервалом 10 °С і 15–30 хвилин на киплячій водяній бані при 100 °С.

Для вивчення рН-стабільності супернатанти утримували в течение 1 і 24 годин при 12 °С (во избежание термоінактивации) в діапазоні рН 3,0–9,0 і потім доводили до оптимального для дії відповідних ферментів значення рН і определяли ферментативну активність.

Експерименти проводили в трьох повторностях, в качестве критерия достоверности использовали критерий Стьюдента на 5% уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

Біосинтез целлюлаз різними штамми бацилл найбільш інтенсивно протікає при величині рН середовища від 6,0 до 8,0 [1]. рН-оптимум дії ферментів звичайно також лежить в цих межах значень рН, однак за даними ряду дослідників цей показник може також знаходитися і між значеннями рН 4,5–6,5 і змінюватися в залежності від субстрату і інших умов [6, 10]. Відомі також целюлази з рН-оптимумом при нейтральних і лужних значеннях рН [12].

Слідовательно, для кожного фермента характерен свій рН-оптимум його активності. Іноді він виражений дуже різко, і тоді дія фермента виявляється лише в вузькій зоні значень рН.

Вивчення впливу кислотності середовища на активність целюлаз вивчаємих нами штамів бацилл виявило схожість оптимумів їх дії: C_x - і C_1 -ферменти і целлюбіаза мали однакові оптимуми дії в інтервалі рН 6,0–7,0, а C_2 -фермент виявився стійким в більшій кислотній середі і мав оптимум в широкій зоні рН від 5,0 до 8,0 (рис. 1).

В качестве примера на рис. 1 показаны рН-оптимумы C_x -, C_2 -ферментов у *B. licheniformis* 6/2 і *B. subtilis* 13₂, відповідно. Відхилення рН в ту або іншу сторону від оптимума вело до зниження ферментативної активності в 3–5 разів і більше.

Величина рН впливала і на стабільність продуцируємих целюлаз. Результати експериментів показали, що при зсуві рН середовища від оптимального до 8,0 уже після годинного утримання культуральної рідині при 12 °С, у вивчаємих штамів відзначалося 10–20% зниження C_x -, C_1 - і C_2 - активності і 14–33% — целлюбіази. Ще більш значительне зменшення активностей (до 25–30%) викликало збільшення кислотності. При збільшенні утримання культуральної рідині до 24 годин в тих же умовах втрати ферментної активності були ще більшими — до 40%.

В цілому ж комплекс ферментів представлявся більш стабільним в нейтральній і лужній зонах, ніж в кислотній, однак у деяких окремих целюлаз це властивість не завжди спостерігалося.



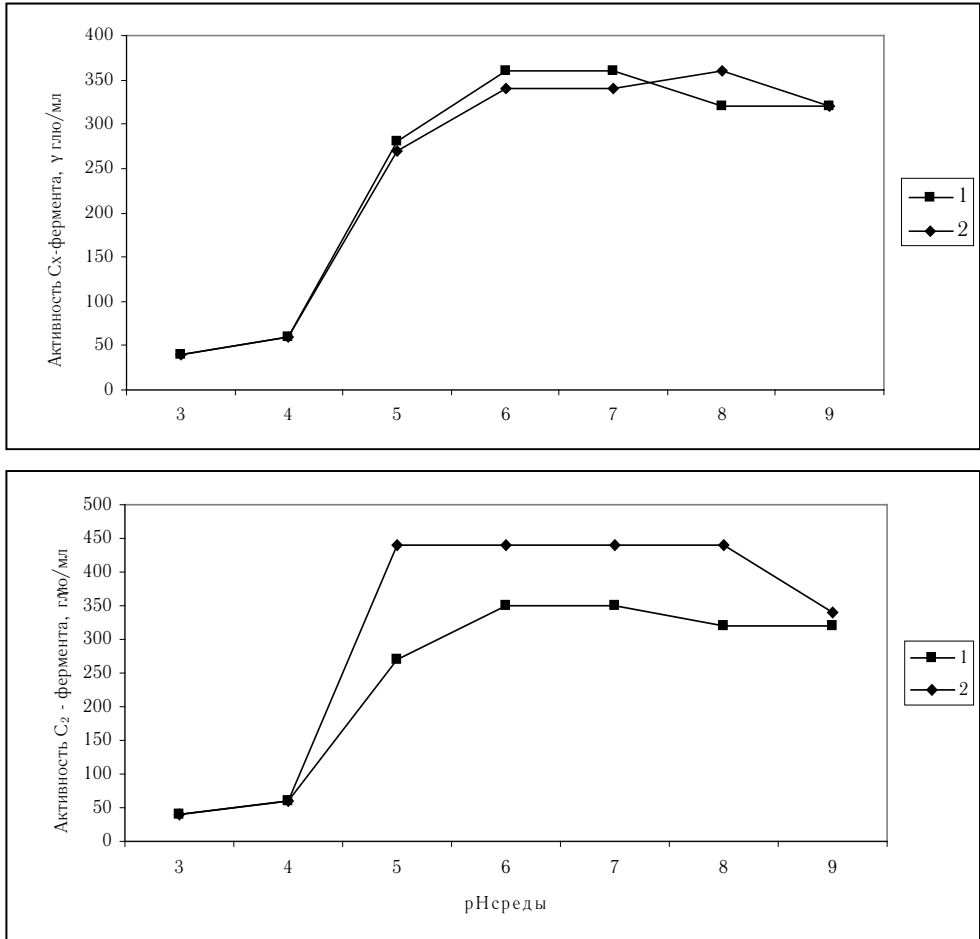


Рис. 1. Зависимость активности C_x - и C_2 - ферментов от pH реакционной среды на примере штаммов *B. licheniformis* 6/2 (1) и *B. subtilis* 13₂ (2), соответственно

Fig. 1. C_x - and C_2 - enzymes activity dependence from pH level reactionary medium on the example of strains *B. licheniformis* 6/2 (1) and *B. subtilis* 13₂ (2) pro tanto

Известно, что разные виды целлюлозоразрушающих микроорганизмов способны расти и продуцировать целлюлазы лишь в определенных температурных пределах, выше которых активность ферментов снижается. Оптимум действия ферментов обычно находится в пределах 40–60 °С [9]. Однако имеются сообщения об оптимуме действия при более высокой температуре – 90 °С [6].

Исследуемые штаммы бацилл обладают способностью синтезировать целлюлазы в пределах температуры от 30 до 60 °С. Наиболее активной при 40 °С выявилась целлобиаза, в то время как C_x -, C_1 - и C_2 -ферменты были наиболее активны при температуре, равной 50 °С (рис. 2). Эти значения температур были использованы нами в качестве контрольных при исследовании термостабильности у исследуемых ба-

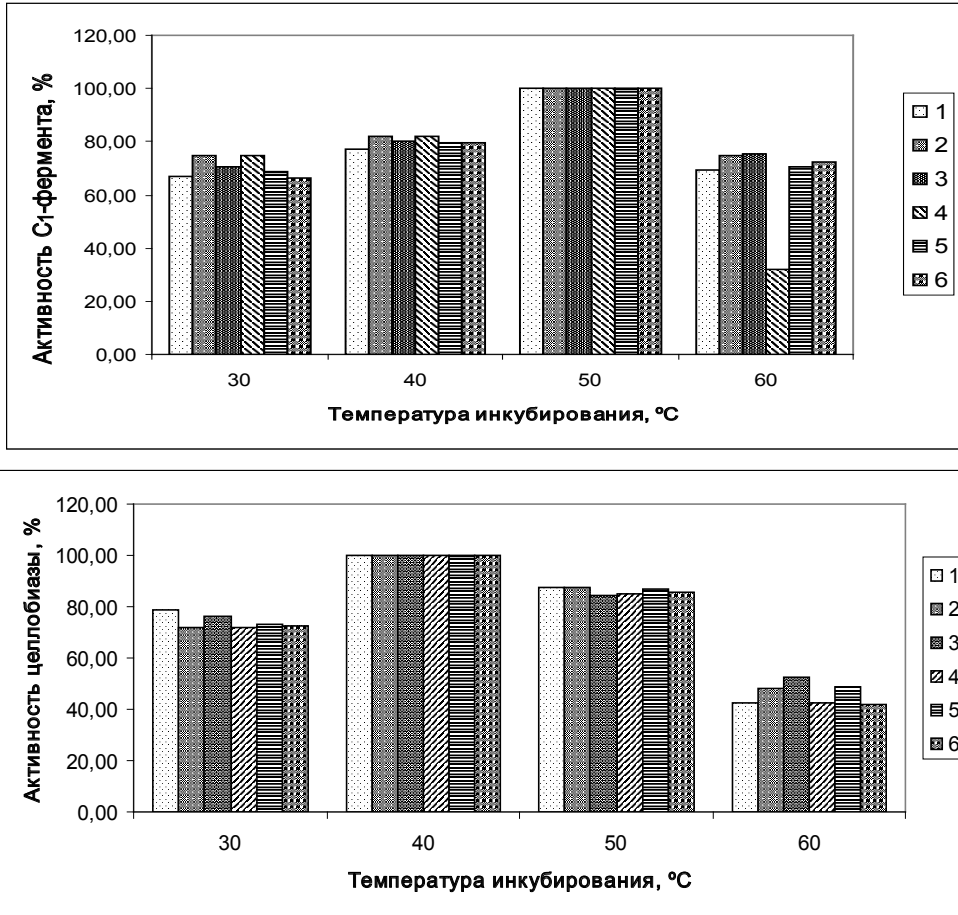


Рис. 2. Зависимость целлюлазной активности и активности C₁- фермента целлюлазного комплекса у бактерий рода *Bacillus* от температуры (при pH-оптимуме 6,0)

1–6 — штаммы *B. subtilis* 39, 51, 23/2, 5001, 13₂ и *B. licheniformis* 6/2, соответственно.

Fig. 2. Cellobiases activity dependence and activity of cellulases complex C₁-enzymes of bacteria of genus *Bacillus* from temperature (at pH-optimum 6,0)

1–6 — strains *B. subtilis* 39, 51 23/2, 5001, 13₂ and *B. licheniformis* 6/2 pro tanto.

цилл, а активности соответствующих ферментов при этих температурах были приняты за 100%.

Исходя из имеющихся источников, в которых показано, что внеклеточные гидролазы бацилл вообще характеризуются высокой термостабильностью [8], можно было бы ожидать, что гидролазы с целлюлолитическим действием также будут устойчивыми к повышенной температуре.

В узком интервале температур 40–50 °C у всех исследуемых штаммов проявлялась наибольшая термостабильность активности только для C_x-

фермента. Активность других типов целлюлаз была наиболее стабильной в более широком интервале — от 40 до 70 °С (рис. 3).

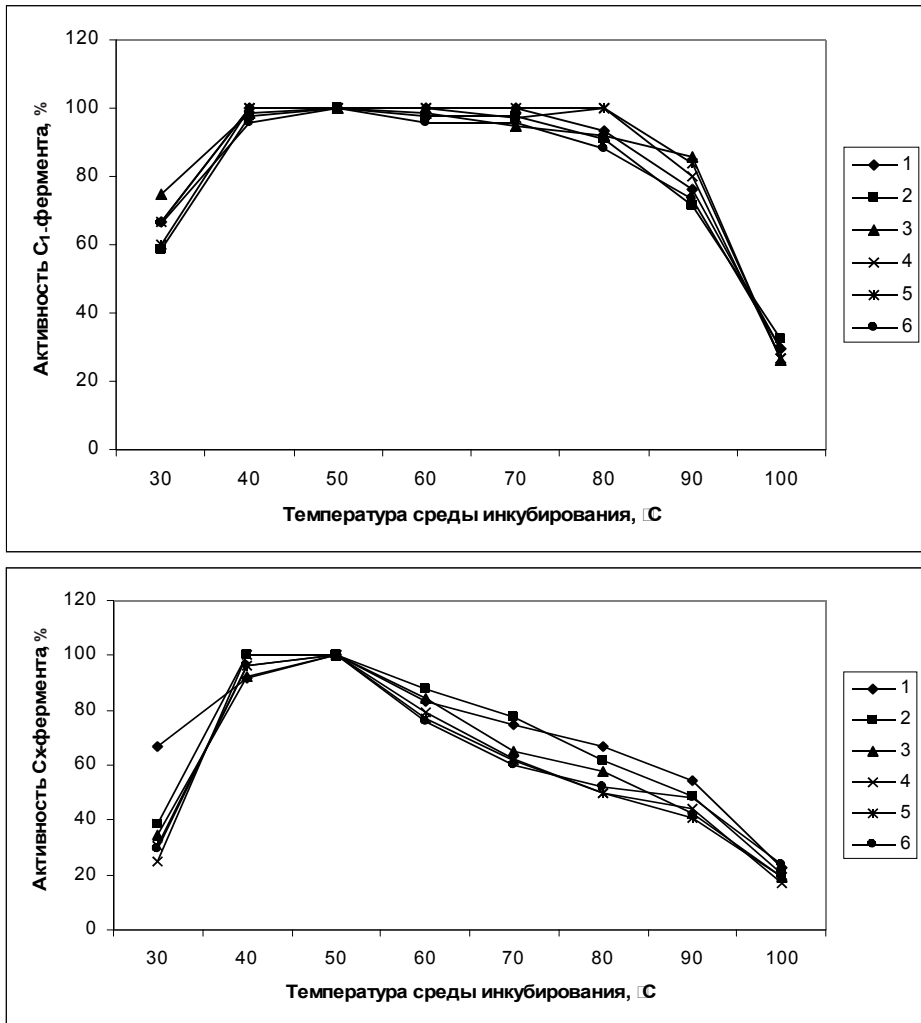


Рис. 3. Термостабильность активности C_x - и C_1 -ферментов целлюлозного комплекса бактерий рода *Bacillus* в зависимости от температуры (при pH-оптимуме 6,0)

Обозначения те же, что к рис. 2.

Fig. 3. Dependence of activity thermostability of cellulolytic complex C_x - and C_1 -enzymes of bacteria of genus *Bacillus* upon temperature (at pH-optimum 6,0)

The same notations that to fig. 2.

И несмотря на то, что с повышением температуры обычно наблюдается не только ускорение процесса гидролиза, но и повышается скорость инактивации ферментов, в проводимых опытах после прогревания культуральной жидкости в течение 1 часа даже при температуре 80 °С

происходила только частичная инактивация ферментов изучаемого комплекса, при этом сохранялось еще до 50,0–66,1% активности C_x -фермента, до 90–99% целлюбиазы, до 87,5–99,0% C_1 -фермента и до 78–88% активности C_2 -фермента. Заслуживает внимания и то, что даже после получасового кипячения культуральной жидкости при 100 °С на водяной бане сохранялось еще до 14–25% активности C_x - и C_2 -ферментов и до 26–32% — C_1 -фермента. Наиболее термостабильной оказалась целлюбиазная активность: ее в этих условиях сохранялось даже до 73,7–84,8% от исходной. В литературе также известны ферменты, которые при кратковременном нагреве до 100 °С в течение 10–15 мин не теряли своей активности [3, 7].

Высокая термостабильность целлюлолитических ферментов микроорганизмов считается уникальной и ее объясняют в первую очередь строением и подвижностью белковой молекулы. Эта способность микроорганизмов открывает новые перспективы биотехнологического применения целлюлаз.

Потребность в термо- и рН-стабильных ферментах в различных производствах высокая. Их использование позволит снизить стоимость ферментативного процесса за счет сокращения времени гидролиза растительных материалов и значительного уменьшения микробного инфицирования используемых субстратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Вплив рН поживного середовища на біосинтез гідролітичних ферментів у бацил // Мікробіологічний журнал. — 2010. — 72, № 5. — С. 3–7.
2. Авдеева Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Синтез гідролітичних ферментів у бацилл в залежності від складу поживного середовища // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 1. — С. 44–52.
3. Безбородов А.М. Ферментативные процессы в биотехнологии. — М.: Наука, 2008. — 335 с.
4. Клесов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович М.А., Синицын А.П. Роль адсорбционной способности эндоглюканазы в деградации кристаллической и аморфной целлюлозы // Биоорган. химия. — 1982. — Т. 8, № 5. — С. 643–651.
5. Маслова Н.Ф., Краморенко Е.А. Эффективность и актуальность создания новых ферментных препаратов на основе микробиологических субстанций для нормализации пищеварения // Фармаком. — 2008. — № 4. — С. 39–45.
6. Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Федорова Т.В., Тугай Т.И., Голубева Л.И., Королева О.В. Экстремальные микроорганизмы: биохимичес-



кая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2010. — 46, № 1. — С. 5–20.

7. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов с высокой целлюлазной активностью // Микробиологический журнал. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 41–48.

8. Павлова И.Н., Ротанова Т.В., Жолнер Я.Г. Аминопептидаза термофильного штамма *Bacillus licheniformis* // Микробиологический журнал. — 1989. — Т. 51, № 2. — С. 47–52.

9. Рабинович М.А., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространение, множественные формы и механизм действия. М.: ВИНТИ, 1988. — 11. — С. 4–189.

10. Рид Дж. Ферменты в пищевой промышленности. М.: Пищевая промышленность, 1971. — 44 с.

11. Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. — 288 с.

12. Соловьева И.В., Окунев О.Н., Крюкова Е.Г., Попова Н.Н., Синицын А.П., Черноглазов В.М. Нейтральные целлюлазы мицелиальных грибов: поиск продуцентов и изучение некоторых свойств // Прикладная биохимия и микробиология. — 1997. — Т. 33, № 4. — С. 388–392.

UDC 577.152.3

L.V. Avdeeva, A.I. Osadcha, M.A. Kharkhota

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, akad. Zabolotny Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

PROPERTIES OF THE CELLULASES PRODUCED BY BACTERIA OF GENUS *BACILLUS*

Summary

It was studied the enzymatic properties of various types of the cellulases produced by bacilli at cultivation on medium with cellulose. The results of cellulases properties researches of six the most activ bacilli strains are generalised. The analysis of pH influence and temperature on their activity and stability is given. It is determined that studied strains cellulases of bacilli display the most activity at pH from 6.0 to 7.0. The exception compound is C_2 -enzyme, having pH — optimum in more acid region — from 5.0 to 8.0. The temperature action optimum of C_x — C_1 - and C_2 — enzymes is 50 °C, cellobioses — 40 °C.

Bacilli cellulases differed in high thermostability which displayed in a wide interval of temperatures — from 40 °C to 70 °C.

Key words: the properties, cellulases, bacteria of genus *Bacillus*.



УДК 577.152.3

Л.В. Авдеєва, А.І. Осадча, М.А. Хархота

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: avdeeva@imv.kiev.ua

ВЛАСТИВОСТІ ЦЕЛЮЛАЗ, ПРОДУКОВАНИХ БАКТЕРІЯМИ РОДА *BACILLUS*

Реферат

Вивчено ензиматичні властивості різних типів целюлаз, що продукуються бацилами при глибинному культивуванні на середовищі з целюлозою. Узагальнено результати досліджень властивостей целюлаз шести найбільш активних штамів бацил. Дано аналіз впливу рН і температури на їх активність та стабільність. Встановлено, що целюлази досліджених штамів бацил проявляють найбільшу активність при рН від 6,0 до 7,0. Виключення складає C_2 -фермент, що має рН-оптимум в більш кислій зоні — від 5,0 до 8,0. Температурний оптимум дії C_x -, C_1 - і C_2 - ферментів — 50 °С, целобіаза — 40 °С.

Целюлази бацил відрізнялися високою термостабільністю, яка проявлялася в широкому інтервалі температур — від 40 °С до 70 °С.

Ключові слова: целюлази, властивості, *Bacillus*.



І.С. Замбріборщ

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,
Овідіопольська дорога, 3, м. Одеса, 65036, Україна,
тел.: (0482) 39 55 57, e-mail: IZambriborsh@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* РИСУ (*ORYZA SATIVA L.*)

За результатами цитологічного моніторингу стадій розвитку пиляків та морфологічного розвитку рослин оцінено режим попередньої обробки донорного матеріалу перед експлантацією пиляків на поживне середовище. Досліджено різні варіанти стерилізації та добрано поживне середовище для культивування пиляків рису. Отримано калюсну культуру пиляків рису.

*Ключові слова: рис посівний (*Oryza sativa L.*), пиляки, андрогенез, стерилізація, культивування *in vitro*.*

Рис посівний (*Oryza spp.*) є найважливішою сільськогосподарською культурою у світі. Отримання гаплоїдів через культуру ізольованих пиляків представляють альтернативу традиційним селекційним програмам з поліпшення цієї культури. Головною перевагою використання гаплоїдів в селекції є створення гомозиготних ліній в короткий термін [1]. Проте, здатність рису до андрогенезу може бути поліпшена до введення в культуру як інструмент для селекції рослин [2].

У Китаї, за допомоги культури пиляків отримано понад 100 нових сортів рису [3, 4]. Гаплоїди є цінними для виявлення та виправлення небажаних рецесивних ознак, утворених в результаті мутацій [5] або гібридизації [6]. Методи отримання подвійних гаплоїдів прискорюють цикл розмноження і дозволяють краще досягти розрізнення між генотипом у будь-якому поколінні [7].

Однак, як показали дослідження, індукція андрогенного калюсу та подальша регенерація у рису підвиду *Indica* виявилася надзвичайно низькою, тоді як сорти рису підвиду *Japanica* є чуйними до умов *in vitro*. У рису, як показано різними авторами, частота індукції коливатиметься від 10% до 100% залежності генотипу [8]. У дигаплоїдних ліній виявлено достовірні відхилення для різних ознак, у порівнянні з вихідними [9].

В Україні розробок за цим біотехнологічним напрямом не проводили, хоча необхідність у цих роботах є. Метою роботи було вивчення



особливостей андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. та розробка методів індукції ембріогенезу.

Матеріали та методи

Донорним матеріалом були рослини рису сортів Дебют (ранньостиглий), Преміум (середньостиглий), Агат (середньостиглий), Україна 96 (ранньостиглий), № 5 (пізньостиглий). Ці сорти рису відносяться до виду *O. sativa* L., *prol. Japonica*.

Попередньо волоті, які знаходилися у покривному листу, поміщали у воду з розчином солей за прописом Кнопа [10], обгортали фольгою та ставили у камеру при температурі + 7 та + 10 °С протягом 5 діб.

Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор у пиляках проводили шляхом приготування тимчасових мікропрепаратів пиляків, забарвлених оцетокарміном [11], під світловим мікроскопом.

Волоті звільняли від покривного листа та поміщали у чашки Петрі діаметром 150 мм.

Для стерилізації експлантів використовували такі варіанти: 1. волоті залити 5 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ і витримувати протягом 5 хв., потім злити розчин та 3 рази промити стерильною дистильованою водою; 2. волоті залити 50% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 10 хв., злити його, додати 0,05 н. розчин HCl (10 хв.) з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 3. волоті залити 70% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 4. волоті залити 50% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 5. волоті залити 50% розчином комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв., 0,05 н. розчином HCl — 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 6. волоті опускають у 70% спирт протягом 30 с, з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою; 7. протирання покривних листів 96% етиловим спиртом.

Для експлантації пиляків використовували поживне середовище №6 з додаванням 1 мг/л кінетину, 1 мг/л нафтилоцтової кислоти, 3 мг/л 2,4-Д, 8 г/л агару, рН 5,8 [12]. Середовище розливали в чашки Петрі діаметром 60 мм. У кожную чашку висаджували пиляки з однієї волоті. Кількість пиляків коливалась від 40 до 60 шт. залежно від сорту рису, який досліджували. Пиляки культивували при температурі $+27 \pm 1$ °С у темряві (термостат). Процес андрогенезу аналізували за ознакою — реакція пиляків на поживне середовище. Кількість новоутворень (індукцію) визначали у відсотках від загальної кількості пиляків. До новоутворень відносять зародкоподібні структури та калуси, які утворюються із молодих клітин пилку за умов *in vitro*.



Результати досліджень та їх обговорення

Цитологічні дослідження

Для введення в культуру *in vitro* використано пиляки донорних рослин *O. sativa* L., більша частина мікроспор у яких знаходилася переважно на вакуолізованій фазі розвитку (від ранньої до пізньої) [13, 14]. Більшість дослідників вважають цю фазу розвитку оптимальною для індукції розвитку мікроспор за спорофітною програмою при культивуванні пиляків в умовах *in vitro* і одержанні рослин-регенерантів.

Більша частина мікроспор, як у високочутливих, так і низькочутливих генотипів, у запропонованих умовах *in vitro* культивування пиляків до 3–4 доби культивування деградувала. У таких нежиттєздатних мікроспорах відзначали плазмоліз, деградацію, загибель клітин.

За подальшого культивування пиляків на 10–15 добу, від дати висадки пиляків на поживне середовище, відмічали формування морфогенних багатоядерних структур і пізніше, на 20–25 добу культивування, морфогенних багатоклітинних структур в середині пиляків.

Утворення калюсу спостерігали через 4–5 тижнів культивування. За зовнішнім видом виділено два типи калюсу — калюс, який нагадував грону винограду (неморфогенний), та компактний, біло-кремово кольору (морфо генний) (рис. 1). Після перенесення калюсу на поживне середовище для регенерації, часто спостерігали утворення нового калюсу у тій самій зоні, де він утворювався раніше. Калюси утворювалися на зовнішні некротичних пиляках (зовсім чорних), які виділяли в індукційне середовище феноли у достатньо великої кількості.

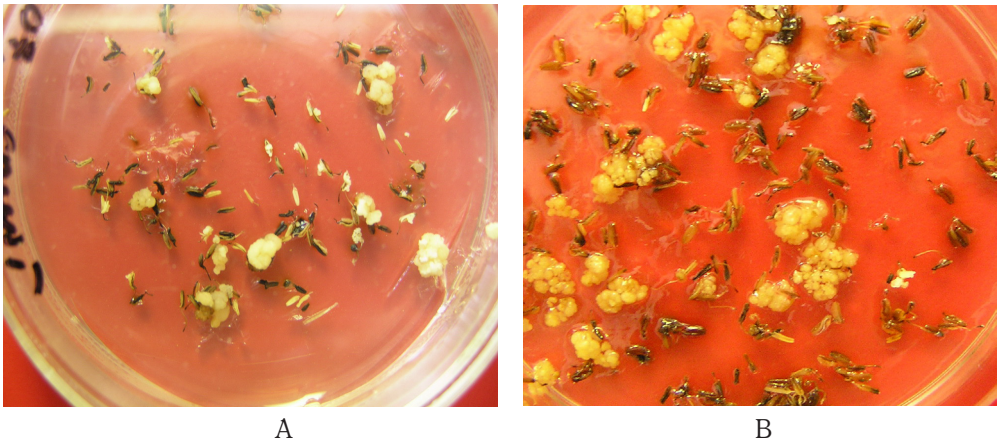


Рис. 1. Морфогенний (А) і неморфогенний (Б) калюс рису (збільшення x 20)

Fig. 1. Morphogenic (A) and nonmorphogenic (B) callus of rice (increased x 20)

Таким чином, для введення в культуру пиляків *in vitro* донорний матеріал відбирають, коли більша частина мікроспор знаходиться переважно на вакуолізованій фазі розвитку (від середньої до пізньої).

Стерилізація матеріалу

Донорний матеріал рису вирощували у чеках (м. Скадовськ). В процесі роботи виникла проблема контамінації дослідного матеріалу (бактеріальна і грибна інфекція), що було наслідком умов вирощування (у воді) та його доставки до лабораторії.

Всі зразки після обробки 1-м варіантом стерилізації (який використовують частіше) залишилися інфікованими. Ми застосували інші варіанти стерилізації експлантів. При варіантах 2, 3, 4, 5 (опис в матеріалах і методах) спостерігали, що пиляки виглядали життєздатними, але процент інфікування матеріалу також був високим.

При 6 варіанті стерилізації некроз був практично 100%, в той час як варіант 7 був самим нетравматичним для пиляків (вони зоставалися ніжно зеленим), хоча зараження матеріалу було високим.

Однак практично після всіх варіантів стерилізації спостерігалось утворення калюсу на експлантованих пиляках. На рис. 2 показано вплив стерилізації на індукцію новоутворень на пиляках на прикладі сорту Преміум. Найкращий для стерилізації виявився варіант 7 при цьому відсоток новоутворень склав 36,8% від висаджених пиляків, хоча рівень інфекції був досить великим. Варіант стерилізації 4 показав високий (35,6%) вихід новоутворень при цьому рівень зараження висадженого матеріалу був невеликим. Після обробок № 1 та № 6 увесь дослідний матеріал був інфікованим.

Таку картину спостерігали на всіх дослідних сортах рису Дебют, Преміум, Агат, Україна 96, № 5.

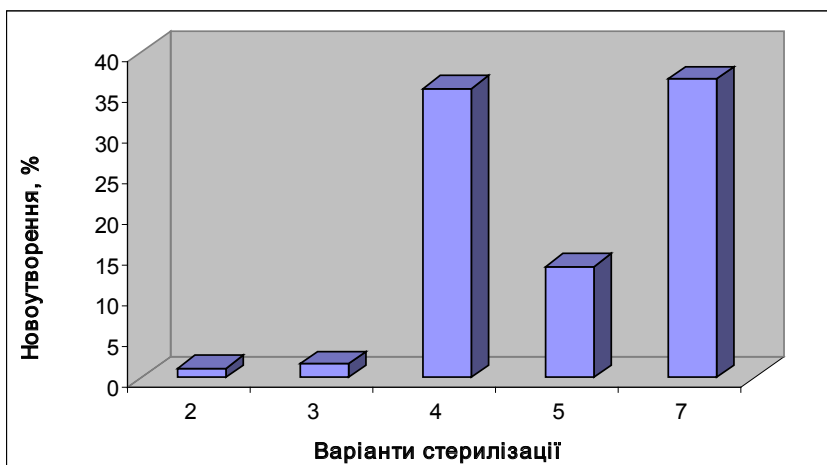


Рис. 2. Вплив варіантів стерилізації на індукцію пиляків на прикладі сорту Преміум (5 тижнів культивування)

Fig. 2. Effect of sterilization options upon induction of anther by example of the variety of Premium (5 weeks cultivation)

Таким чином, необхідним є подальший добір умов стерилізації матеріалу рису. З досліджених варіантів кращими виявилися варіант 4 (50% розчин комерційного препарату «Білизна» протягом 5 хв. з наступним п'ятикратним промиванням дистильованою стерильною водою) та варіант 7 (протирання покривних листів 96% етиловим спиртом).

Поживне середовище та індукція новоутворень

Знижений рівень амонійного азоту зіграв вирішальну роль у виборі оптимального поживного середовища в основному для сортів підвиду *Japonica*. Розроблено середовище N6 [15] зі зниженим вмістом сульфату амонію та високим вмістом азотнокислого калію (яке обрано для наших досліджень). Проте знижений рівень амонійного азоту виявився невідповідним для сортів підвиду *Indica*. Для них розроблено модифіковане поживне середовище N6 [16], у якому сульфат амонію і фосфорнокислий калій повністю замінено фосфорнокислим амонієм.

На рис. 3 представлено дані що до чутливості досліджених сортів рису до культури пиляків *in vitro* при варіанті стерилізації 4. Треба відмітити, що всі сорти більшою чи меншою мірою чутливі до умов культури. За дослідженим показником сорти поділилися на дві групи. До першої групи відносяться сорти середньостиглі Преміум та Агат, які показали більше 35 відсотків новоутворень. До другої групи — сорти ранньо- та пізньостиглі, для яких відсоток новоутворень склав від 14,9 до 28,5.

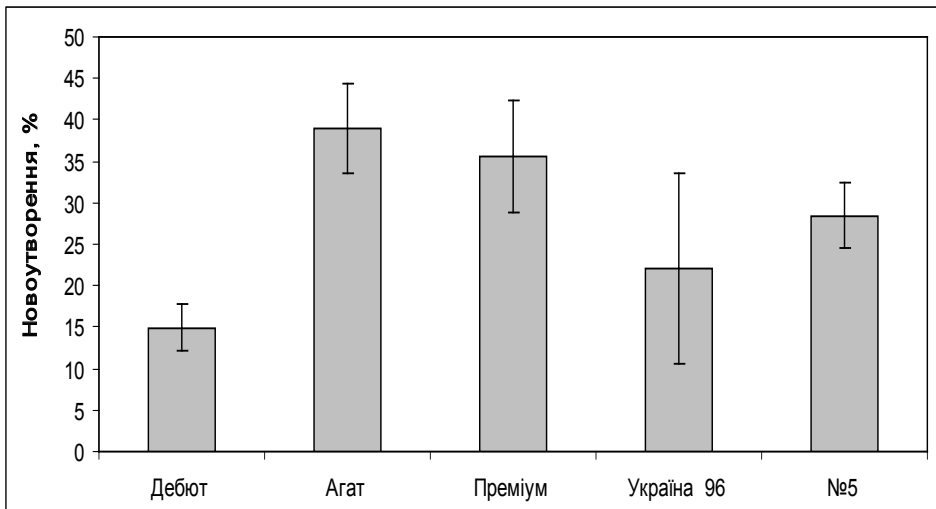


Рис. 3. Індукція новоутворень у сортів рису, що відрізняються за чутливістю до андрогенезу в культурі пиляків

Fig. 3. Induction of neoplasms in rice variety differ in sensitivity to androgenesis in anther culture

Таким чином, поживне середовище має велике значення у реакції експлантів на умови культури *in vitro*, але вирішальним є генетична схильність генотипу до запропонованих умов. Проте з удосконалення поживних середовищ та умов культивування є дуже важливими, для збільшення показників індукції новоутворень та подальшої з них регенерації зелених рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Khush G.S.* Origin, dispersal, cultivation and variation of rice // *Plant Mol. Biol.* — 1977. — V. 35. — P. 25–34.
2. *Zhu D.Y., Sun Z.X., Pan X.G., et al.* Use of anther culture in hybrid rice breeding / *Proceedings of the 3rd International Symposium of Hybrid Rice.* — 1998. — Philippines. — Cap.21. — P. 268–281.
3. *Meifang L.I.* Anther culture breeding of rice at the CAAS. / 1992 In: *K. Zheng and T. Murashige (eds.).* — 1992. — P. 75–85.
4. *Zhang Z.H., Chu Q.R.* Advance in rice anther culture for varietal improvement in China. // *J. Agric. China.* — 1986. — 2 Suppl. — P. 10–16.
5. *Chen Q.F., Wang C.L., Lu Y.M., Shen M., Afza R., Duren M.V., Brunner H.* Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement // *Euphytica.* — 2001. — 120. — P. 401–408.
6. *He T., Yang Y., Tu S.B., Yu M.Q., Li X.F.* Selection of Interspecific Hybrids for Anther Culture of Indica Rice // *Plan Cell, Tissue and Organ culture.* — 2006. — V. 86. — P. 271–277.
7. *Maria A.M., Adriana S., Ana M.G.* Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/deshydradation Technique // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* — 2006. — V. 42. — P. 31–36.
8. *Wang C.C., Sun C.S., Chu C.S., Wu S.C.* Studies on the albino pollen plantlets of rice // *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.* Science Press, Peking. — 1978. — P. 149–160.
9. *Змеева В. Н.* Тенденции изменчивости некоторых хозяйственно-полезных признаков в популяциях соматклонов и андрогенных дигаплоидов риса *Oryza sativa L.*: автореф. дисс... канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Биотехнология» / В. Н. Змеева. — Владивосток, 1995. — 27 с.
10. *Чесноков В.А. и др.* Выращивание растений без почвы. — Л. — 1960. — 360 с.
11. *Паушева З. П.* Практикум по цитологии растений : учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. — М.: Агропромиздат, 1988. — 270 с.
12. *Tala Gueye, Khadidiatou Ndoye Ndir.* *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa L.* and *Oryza glaberrima Steudt.*) for the rapid development of new breeding material // *Scientific Research and Essays.* — 2010. — Vol. 5(7). — P. 709–713.



13. Батыгина Т. Хлебное зерно: [атлас] / Татьяна Батыгина. — Л.: Наука, 1987. — 106 с.
14. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: автореф. дисс... д.б.н.: спец. 03.00.05 «Ботаника» / Н. Н. Круглова — Уфа, 2002. — 48 с.
15. Chu C.C. The N-6 medium and its application to anther culture of cereal crops // Proc. Symp. Plant Tissue Cult., Science Press., Peking.— 1978. — P. 45—50.
16. Jang X. R., Wang J. R., Li H. L., Li J. E. Studies on the general medium for anther culture of cereals and increasing of frequency of green pollen plantlets — induction of *Oryza sativa* snien // Acta Phytophysiol. Sin.— 1980. — Vol. 6. — P. 67—74.

І.С. Замбріборщ

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036, Украина, тел.: +38 (0482) 39 55 57,
e-mail: IZambriborsh@gmail.com

ИССЛЕДОВАНИЕ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* РИСА (*ORYZA SATIVA* L.)

Реферат

По результатам цитологического мониторинга стадий развития пыльников и морфологического развития растений, оценено режим предварительной обработки донорного материала перед эксплантацией пыльников на питательную среду. Исследованы различные варианты стерилизации и подобрана питательная среда для культивирования пыльников риса. Получена каллусная культура из пыльников риса.

Ключевые слова: рис посевной (*Oryza sativa* L.), пыльники, андрогенез, стерилизация, культивирование *in vitro*.



I.S. Zambriborchsh

South Plant Biotechnology Center,
3, Ovidiopolska Road, Odesa, 65036, Ukraine,
e-mail: IZambriborsh@gmail.com

RESEARCH OF ANDROGENESIS IN VITRO OF RICE (*ORYZA SATIVA L.*)

Summary

According to the results of cytological monitoring of the development stages of anther and morphological development of the plants, there were evaluated the regime of pretreatment of the donor material before anthers planting on nutrient medium. There were researched the various options for sterilization and chosen medium for anther cultivation of rice. There were derived callus from anther culture of rice.

Key words: rice (*Oryza sativa L.*), anther culture, androgenesis, sterilization, cultivation *in vitro*.



УДК: 579:737.23

В.Ю. Барштейн

Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», ул. Осиповского, 2а, Киев, 04123, Украина, тел.: +38 (044) 462 72 59, e-mail: ihtbar@ Rambler.ru

СТРАНИЦЫ ИСТОРИИ МИКРОБИОЛОГИИ В МЕДАЛЬНОМ ИСКУССТВЕ

Статья посвящена отражению ярких событий в истории микробиологии в медальном искусстве США, Франции, Португалии, Латвии, России, Украины.

Ключевые слова: история микробиологии, памятная медаль.

Рождение микробиологии связано с деятельностью голландского натуралиста-самоучки Антони ван Левенгука (нидерл. Antoni van Leeuwenhoek, 1632—1723) — основоположника научной микроскопии, члена Лондонского королевского общества (с 1680 г.).

Создавая примитивные микроскопы, добившись 300-кратного увеличения, Левенгук исследовал структуру различных форм живой материи. Левенгук зарисовывал наблюдаемые им объекты, описывал свои наблюдения и на протяжении более чем 50 лет отсылал их в Лондонское королевское общество, а также некоторым ученым. В 1673 г. его письмо впервые было опубликовано в журнале Лондонского королевского общества «Философские записки» (англ. Philosophical Transactions).

Левенгук впервые открыл эритроциты, описал бактерии, дрожжи, простейшие, волокна хрусталика, зарисовал сперматозоиды, строение глаз насекомых и мышечных волокон. Он открыл инфузории и описал многие их формы.

Антони ван Левенгуку посвящена американская медаль (45 мм, бронза, скульптор — А. Бельски, The Medallion Art Co., 1971), центральную часть аверса которой занимает его высокорельефный, погрудный, почти анфас портрет. Справа от портрета, в две строки — годы жизни: «1632 / 1723». По краю медального поля, по кругу — надпись, сверху: «ANTONJ VAN LEEUWENHOEK» (АНТОНИ ВАН ЛЕВЕНГУК), снизу: «THE MICROSCOPE» (МИКРОСКОП). Между надписями — «мелкие



зверьки» (лат. *animaculi*), обнаруженные Левенгуком при микроскопическом исследовании (рис. 1а).

Многофигурная композиция в центре реверса медали (рис. 1б) весьма символична. Фигура Левенгука в полный рост, прильнувшего к своему микроскопу, объединяет ученых древности (три фигуры слева), пользовавшихся логическими и методическими приемами нахождения истины, а не экспериментами и доказательствами, и современных исследователей, вооруженных микроскопом (две фигуры справа). Под фигурами, слева и справа от Левенгука, на круглых возвышениях медального поля — «мелкие зверьки». По краю медального поля, по кругу надписи, сверху — на голландском языке: «ONTLEDINGEN EN ONTDEKKINGEN» (АНАЛИЗ И ОТКРЫТИЯ), внизу — на английском: «LEEUVENHOEK & THE LITTLE ANIMALS» (ЛЕВЕНГУК И МЕЛКИЕ ЗВЕРЬКИ).



Рис. 1. Антони ван Левенгук. Медаль (США)

а) аверс, б) реверс.

Fig. 1. Antoni van Leeuwenhoek. Medal (USA)

a) obverse, b) reverse.

Творцом микробиологии как науки был Луи Пастер (фр. *Louis Pasteur*; 1822–1895) — французский микробиолог и химик, член Французской академии (с 1881 г.). Пастер выяснил роль микроорганизмов в процессах брожения (виноделие, пивоварение), в возникновении болезней животных и человека. Пастер окончательно установил специфичность возбудителей сибирской язвы, родильной горячки, холеры, бешенства и других болезней, развил представления об искусственном иммунитете, предложил метод предохранительных прививок, основанный на введении

в организм животного или человека ослабленных культур болезнетворных микроорганизмов, который имел исключительное значение для борьбы с инфекционными болезнями, в частности — сибирской язвы (1881 г.), бешенства (совместно с Эмилем Ру в 1885 г.). Таким образом, он стал одним из основоположников иммунологии. Пастер доказал, что в современных земных условиях невозможно самопроизвольное зарождение жизни. Работы Пастера послужили научной основой стерилизации хирургических инструментов и перевязочных материалов, приготовления консервов, пастеризации пищевых продуктов и т.д.

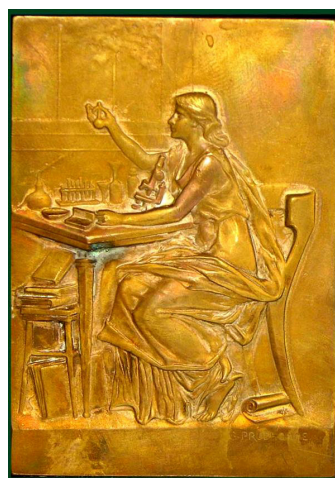
Прекрасную плакету (73x52 мм, бронза, Парижский монетный двор, 1910), посвященную Пастеру создал французский скульптор G. Prud'homme.

В центре аверса (рис. 2а) — полупогрудный, высокорельефный, профильный, повернутый влево портрет французского ученого. В верхней части плакеты, по бокам от портрета — годы жизни ученого: «1822», «1895». Под портретом — лавровая ветвь, под которой горизонтальная надпись в две строки: «LOUIS / PASTEUR» (ЛУИ ПАСТЕР).

В центре реверса — сидящая за столом женская фигура, символизирующая Науку, внимательно рассматривает содержимое колбы. На столе — микроскоп, лабораторная посуда и оборудование. На табурете под столом, на полу — книги. Под стулом, на котором сидит женская фигура — свернутый лист бумаги. На дальнем плане — окно и ветки дерева за ним (рис. 2б).



а)



б)

Рис. 2. Луи Пастер. Плакета (Франция).

а) аверс, б) реверс.

Fig. 2. Louis Pasteur. Plaquette (France).

а) obverse, b) reverse.

Сложные взаимоотношения связывали Луи Пастера с другим выдающимся ученым — немецким микробиологом Робертом Кохом (нем. Heinrich Hermann Robert Koch; 1843—1910), лауреатом Нобелевской премии по физиологии и медицине 1905 г. (за исследования и открытия в области туберкулеза). Кох разработал общие методы бактериологических исследований, в том числе метод культивирования микроорганизмов на биологических жидкостях и плотных питательных средах, метод мелких посевов, микрофотографирование бактерий. Кроме возбудителя туберкулеза — туберкулезной палочки, Кох открыл бациллу сибирской язвы, изучил цикл ее развития, впервые получил чистую культуру бациллы, доказал ее способность образовывать споры и установил их эпидемиологическое значение. Он открыл также возбудителей холеры (холерный вибрион), чумы рогатого скота, бубонной чумы и сонной болезни. Кох стал одним из основоположников современной бактериологии и эпидемиологии.

Одна из серии великолепных медалей медицинской тематики, созданной португальским скульптором Арминдо Висеу (Armando Viseu), посвящена Роберту Коху (70 мм, бронза, Государственный монетный двор Португалии, 70—е годы XX в.).

В центре медального поля аверса — погрудный, высокорельефный, профильный, повернутый на \neq вправо прекрасный портрет ученого. Фоном служит лаборатория и поясной портрет Луи Пастера справа от портрета Коха (рис. 3а).



Рис. 3. Роберт Кох. Медаль (Португалия).

а) аверс, б) реверс.

Fig. 3. Robert Koch. Medal (Portugal).

a) obverse, b) reverse.

Реверс медали типичен для этой серии (рис. 3б). Сверху, по краю медального поля, по кругу надпись на португальском языке: «ROBERT KOCH» (РОБЕРТ КОХ). Ниже — изящная виньетка. В центре реверса — надпись в пять строк на португальском языке: «CIENTISTA ALEMGO CATEDRÁTICO / DE HIGIENE DA UNIVERS. DE BERLIM. / INVESTIGOU A VIDA DOS MICRUBIOS: / REVELOU OS BACILOS DA TUBERCULOSE, / O TETRÉGENO E O VIBRIGO COLÍRICO.» (НЕМЕЦКИЙ УЧЕНЫЙ ПРОФЕССОР ГИГИЕНЫ БЕРЛИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА. ИССЛЕДОВАЛ ЖИЗНЬ МИКРОБОВ: ОТКРЫЛ БАЦИЛЛУ ТУБЕРКУЛЕЗА И ХОЛЕРНЫЙ ВИБРИОН). Справа и слева от надписи — изображения цветков. В нижней части реверса — великолепная эмблема, объединяющая все медали этой серии: на фоне раскрытой книги змея, обвивающая посох Асклепия и зажженный светильник. Слева и справа, горизонтально — даты жизни Коха: «1843 1910».

Повод рассказать об уроженце Киева, выдающемся микробиологе, основателе экологии микроорганизмов и почвенной микробиологии Сергее Николаевиче Виноградском (1856—1953) нам дает медаль (94 мм, бронза, литье, 1983) известного латышского скульптора Яниса Струпулиса, посвященная Всесоюзному микробиологическому обществу (организовано в 1957 при АН СССР, просуществовало до распада СССР в 1991 г.).

В центре аверса — высокорельефный, полупогрудный, почти анфас портрет С.Н. Виноградского. По краю медального поля, по кругу надпись, слева: «С.Н. ВИНОГРАДСКИЙ», справа — годы жизни ученого: «1856—1953» (рис. 4а).



Рис. 4. С.Н. Виноградский. Медаль (Латвия).
а) аверс, б) реверс.

Fig. 4. S.N. Winogradsky. Medal (Latvia).
a) obverse, b) reverse.

Реверс медали лаконичен. Слева — по краю медального поля, по кругу розположен лаврова ветвь, правее — надпись в четыре строки: «ВСЕСОЮЗНОЕ / МИКРО- / БИОЛОГИЧЕСКОЕ / ОБЩЕСТВО» (рис. 4б).

С.Н. Виноградский впервые показал, что существуют микроорганизмы (аноргоксиданты), которые получают энергию в результате окисления неорганических веществ, открыв таким образом процесс хемосинтеза у микроорганизмов. Его работы получили мировое признание, т.к. до этого единственными автотрофными организмами считались фотосинтезирующие растения. С.Н. Виноградский впервые выделил из почвы и описал анаэробную азотфиксирующую бактерию, усваивающую молекулярный азот. Развил современное представление о роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе.

Почвенной микробиологией занимался и Дмитрий Иосифович Ивановский (1864—1920) — выдающийся физиолог растений и микробиолог. Однако основной его заслугой перед наукой стало открытие возбудителей заболеваний небактериальной и непротозойной природы. В отличие от бактерий, невидимые в микроскоп при самом сильном увеличении, проходящие через фарфоровые фильтры и не растущие на обычных питательных средах, эти возбудители были впоследствии названы вирусами. Открытие Ивановский сделал во время изучения заболеваний табака на территории Бессарабии и Никитского ботанического сада, он доказал различие так называемых рябухи и мозаичной болезни табака, доказал заразность последней. Кроме того, Ивановский опубликовал работы об особенностях физиологических процессов в больных растениях, влиянии кислорода на спиртовое брожение у дрожжей, состоянии хлорофилла в растениях, его устойчивости к свету, значении каротина и ксантофилла.

100-летию со дня рождения основоположника вирусологии Д.И. Ивановского посвященная медаль (60 мм, томпак, Ленинградский монетный двор, 1964) скульптора В.В. Воронцова.

В центре медального поля аверса (рис. 5а) прекрасный высокорельефный, головной, профильный, повернутый на \neq вправо портрет ученого. Справа от портрета горизонтальная надпись в две строки — годы рождения и смерти ученого: «1864— / 1920». Слева от портрета, по краю медального поля, по кругу надпись: «ДМИТРИЙ ИВАНОВСКИЙ».

Реверс медали — текстовой, рельефная надпись в восемь строк: «ОСНОВОПОЛОЖНИК / УЧЕНИЯ / О / ВИРУСАХ / 100 / ЛЕТ / СО ДНЯ / РОЖДЕНИЯ» (рис. 5б).



Рис. 5. Д.И. Ивановский. Медаль (Россия).

а) аверс, б) реверс.

Fig. 5. D.I. Ivanovsky. Medal (Russia).

a) obverse, b) reverse.

100—летний юбилей Даниила Кирилловича Заболотного, выдающегося украинского микробиолога и эпидемиолога, Президента Всеукраинской академии наук (1928—1929), одного из основателей Международного общества микробиологов (Париж, 1927) также отмечен медалью (62 мм, бронза, О. Кошевой по эскизу художника Д. Серова, Украина, 1966).

Д.К. Заболотный родился в с. Чеботарка Подольской губернии. Он закончил естественное отделение физико-математического факультета Новороссийского университета в Одессе и медицинский факультет Киевского университета. С 1889 г. Заболотный был сотрудником основанной И.И. Мечниковым Одесской бактериологической станции. В 1898 г. Заболотный основал первую в России кафедру медицинской микробиологии в Петербургском женском медицинском институте, которую возглавлял много лет. В 1919—1923 гг. он был ректором Одесского медицинского института, где создал первую в мире кафедру эпидемиологии. С 1928 г. Заболотный возглавил созданный им Институт микробиологии и эпидемиологии АН Украины, который ныне носит его имя. Необычайно трудно в нескольких строках описать все многочисленные научные заслуги Д.К. Заболотного. Упомянем некоторые из его основных работ. Они посвящены изучению инфекционных болезней, главным образом чумы, холеры, сифилиса, разработке методов борьбы с ними. Он доказал существование эпидемических очагов чумы, роль диких грызунов в ее распространении среди людей, установил пути передачи бубонной и легочной чумы, работал над приготовлением противочумных вакцин

и сывороток. Заболотный — автор учебника «Основы эпидемиологии» (т. 1–2, 1927).

На медали изображен высокорельефный, погрудный, почти анфас портрет ученого, расположенный в центре аверса. С левой стороны, по краю медального поля, по кругу надпись: «АКАДЕМІК ДАНИЛО ЗАБОЛОТНИЙ». Справа от портрета горизонтально в две строки годы рождения и смерти ученого: «1866 / 1929» (рис. 6а).

Реверс медали — текстовый, рельефная надпись в шесть строк: «ВИДАТНИЙ / МІКРОБІОЛОГ / ТА ЕПІДЕМІОЛОГ / 100 / РОКІВ З ДНЯ / НАРОДЖЕННЯ» (рис. 6б).



Рис. 6. Д.К. Заболотный. Медаль (Украина).

а) аверс, б) реверс.

Fig. 6. D.K. Zabolotny. Medal (Ukraine).

a) obverse, b) reverse.

Памятники материальной культуры (в том числе — памятные медали) составляют важный раздел источниковедческой базы истории биологической науки, в данном случае — микробиологии, позволяет воссоздать целостную картину развития этого раздела биологии, расширить кругозор студентов.

УДК: 579:737.23

В.Ю. Барштейн

Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна,
тел.: +38 (044) 462 72 59, e-mail: ihtbar@rambler.ru

СТОРІНКИ ІСТОРІЇ МІКРОБІОЛОГІЇ В МЕДАЛЬЕРНОМУ МИСТЕЦТВІ

Реферат

Стаття присвячена відображенню яскравих подій в історії мікробіології в медальєрному мистецтві США, Франції, Португалії, Латвії, Росії, України.

Ключові слова: історія мікробіології, пам'ятна медаль.

V.Yu. Barshteyn

Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine, 2a, Osipovskogo str., Kyiv, 04123, Ukraine, tel.: +38 (044) 462 72 59, e-mail: ihtbar@rambler.ru

PAGES OF HISTORY OF MICROBIOLOGY IN MEDALIC ART

Summary

The article is devoted to the reflection of bright events in history of microbiology in the medalic art of the USA, France, Portugal, Latvia, Russia, Ukraine.

Key words: history of microbiology, art medal.



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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 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 на дискеті або дисконі (Word, шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).



При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);
 - назва статті великими літерами;
 - анотація із зазначенням новизни 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). Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, адреси, повну назву статті відповідною мовою. Після тексту реферату з абзацу розміщуються ключові слова.

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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

Підписи, а також пояснення, примітки до 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 // *Микробиол. журн.* — 1998. — 60, № 5. — С. 27 - 42.

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

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

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

На тези доповідей



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

На депоновані наукові роботи

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, діагностикумів, реактивів для наукових досліджень тощо.



INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

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

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

Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



Наукове видання

«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

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.

Підп. до друку 23.03.2011. Формат 70x108/16.
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

Редакційно-видавничий Центр
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова,
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38 (048) 723 28 39