

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

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

№ 3(19)
2012

Одеса
2012

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

Свідоцтво: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

Затверджено до друку Вченою радою

Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

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

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс

Редактори: Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

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

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2012

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov
University, 2012

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

- Р.В. Грицай, Л.Д. Варбанець**
RALSTONIA SOLANACEARUM:
ОСОБЛИВОСТІ БІОЛОГІЇ І ІДЕНТИФІКАЦІЇ..... 6
- А.Ф. Ткаченко, О.О. Тігунова, С.М. Шульга**
МІКРОБНІ ЛІПІДИ – АЛЬТЕРНАТИВНЕ ДЖЕРЕЛО СИРОВИНИ
ДЛЯ БІОПАЛИВА 17

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

- М.Б. Галкін, Н.В. Ліманська, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця**
ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ БАКТЕРІЯМИ *LACTOBACILLUS*
PLANTARUM НА КОРЕНЯХ РОСЛИН *LEPIDIUM SATIVUM L.*..... 34
- О.В. Федотов, А.К. Велигодська**
ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН У ДЕЯКИХ
ВИДІВ БАЗИДІОМЦЕТІВ..... 44
- Є.Ю. Пахомова, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова**
ВПЛИВ ВІСМУТОВИХ КОМПЛЕКСІВ ПОРФІРИНІВ І
БАКТЕРІОФАГА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ТА СИНТЕЗ
ПІОЦІАНІНУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*..... 55
- М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш**
ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ОРГАНІЧНОГО ЖИВЛЕННЯ НА
КІЛЬКІСНІ ЗМІНИ ФОТОРЕАКЦІЙНИХ МОЛЕКУЛ У КЛТИНАХ
CHLOROBIVUM LIMICOLA ІМВ К-8 65
- В.О. Іваниця, С.О. Білоіваненко**
ЧИСЕЛЬНІСТЬ ТА ТАКСОНОМІЧНИЙ СКЛАД ДРІЖДЖІВ
ПРИБЕРЕЖНОЇ АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЇНИЙ 74
- В.М. Гришко, О.М. Коріновська**
СТІЙКІСТЬ МІКРОМІЦЕТІВ ДО СУМІСНОЇ ДІЇ СПЛУК
ВАЖКИХ МЕТАЛІВ 82
- І.А. Блайда, Т.В. Васильєва, Л.І. Слюсаренко, В.Ф. Хитрич,
В.О. Іваниця**
ВИЛУЧЕННЯ РІДКІСНИХ ТА КОЛЬОРОВИХ МЕТАЛІВ
УГРУПОВАННЯМИ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗОЛИ
ВІД СПАЛЮВАННЯ ПАВЛОГРАДСЬКОГО ВУГІЛЛЯ 91

Х Р О Н І К А Н А У К О В О Г О Ж И Т Т Я

- ІІ МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ
«СУЧАСНІ РЕСУРСОЗБЕРІГАЮЧІ ТЕХНОЛОГІЇ. ПРОБЛЕМИ ТА
ПЕРСПЕКТИВИ» 102
- ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 104

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

R.V. Gritsay, L.D. Varbanets

RALSTONIA SOLANACEARUM: FEATURES OF BIOLOGY AND IDENTIFICATION 6

A. Tkachenko, O. Tigunova, S. Shulga

MICROBIAL LIPIDS ARE AN ALTERNATIVE RAW MATERIAL FOR BIOFUEL..... 17

EXPERIMENTAL WORKS

M.B. Galkin, N.V. Limanska, T.O. Philipova, V.O. Ivanytsia

BIOFILM FORMATION BY *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BACTERIA ON *LEPIDIUM SATIVUM* L. ROOTS 34

O.V. Fedotov, A.K. Veligodska

TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN SOME SPECIES OF BASIDIOMYCETES 44

E.Yu. Pachomova, M.B. Galkin, B.M. Galkin, T.O. Filipova

ACTION OF PORPHYRINES BISMUTH COMPLEXES AND BACTERIOPHAGE ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION AND PICOYANIN BIOSYNTHESIS 55

M.B. Gorishniy, S.P. Gudz, S.O. Hnathush

EFFECT OF MINERAL AND ORGANIC NUTRITION ON QUALITATIVE CHANGES PHOTOSYNTHETIC MOLECULES IN THE CELLS OF *CHLOROBIUM LIMICOLA* IMB K-8 65

V.O. Ivanytsia, S.O. Biloivanenko

ABUNDANCE AND TAXONOMIC COMPOSITION OF THE COASTAL AREA OF YEASTS OF ZMIINIY ISLAND 74

V.M. Gryshko, O.N. Korinovska

MICROMYCETES STABILITY TO THE HEAVY METALS COMPOUNDS JOINT ACTION 82

I.A. Blayda, T.V. Vasyleva, L.I. Slysarenko, V.F. Khitrich,

V.O. Ivanytsia

EXTRACTION OF RARE AND NONFERROUS METALS BY MICROBIAL COMMUNITIES OF THE ASH FROM BURNING PAVLOGRAD'S COAL 91

THE CHRONICLE OF A SCIENTIFIC LIFE

VII SUMMER SCHOOL «MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY» 102

INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 108

УДК 544.537+579.84

Р.В. Грицай, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

***RALSTONIA SOLANACEARUM*: ОСОБЛИВОСТІ БІОЛОГІЇ І ІДЕНТИФІКАЦІЇ**

Ralstonia solanacearum — збудник бактеріального в'янення для широкого кола рослин, із значним географічним ареалом поширення. Маючи Південноамериканське походження, збудник продемонстрував феноменальні адаптивні властивості, протягом другої половини 20-го століття поширившись та адаптувавшись до умов всіх континентів за виключенням полярних широт. Даний патоген має найбільше економічне значення серед бактеріальних агентів картоплі, будучи карантинним об'єктом для країн Європи та України. В огляді висвітлені проблемні питання, щодо особливостей біології, таксономії, патогенних властивостей *Ralstonia solanacearum*, а також сучасних методів діагностики та боротьби з хворобою.

Ключові слова: *Ralstonia solanacearum*, бура бактеріальна гниль картоплі.

Ralstonia solanacearum — один із найдеструктивніших бактеріальних патогенів, що набув глобального поширення і здатний вражати понад 450 видів, 44 родів рослин [4, 22]. В 2002 році США віднесли даний збудник до десяти біотерористичних об'єктів у сільському господарстві, які підлягають найсуворішим заходам контролю та боротьби [21].

Ralstonia solanacearum — це грамнегативна, паличкоподібної форми бактерія, що не утворює спор. Розміри клітин 0,5–1,5 мкм. При вирощуванні на агаризованих середовищах утворює гладкі, світлі, опалесцентні колонії, що з часом набувають коричневого забарвлення внаслідок накопичення меланіну [2].

Для штамів *R. solanacearum* характерною ознакою є наявність двох-компонентного геному — одночасна присутність хромосоми і мегаплазміди. Хромосома містить основні вітальні гени, окремі з яких можуть дублю-



ватися в меншому репліконі. Тим не менше, мегаплазміда є обов'язковою для існування клітини, що, як вважають, стало результатом тривалої коеволюції обох репліконів. Малі плазміди (менше 100 т.п.н.) виявлені тільки в окремих штаммах, і вважаються нетиповими для *R. solanacearum*. Бактерії здатні до трансформації, містять значну частину мобільних генетичних елементів, що чинять помітний вплив на адаптаційні властивості виду [17]. Рання класифікація штамів *R. solanacearum* здійснювалася на основі фенотипових властивостей. Це стало підґрунтям для створення так званої бінарної системи, що відображає два підходи в диференціації: а) за колом можливих рослин-живителів і б) за фізіолого-біохімічними властивостями культури бактерії. Відповідно виділяють п'ять рас (з яких найпоширенішими і краще вивченими є раси 1–3) і п'ять біотипів [6, 9]. Біотиби 3 і 4 метаболічно гнучкіші ніж біотиби 1 і 2, крім того перші чітко відокремлюються від інших в окрему групу на основі електрофоретичних профілів мембранних білків і PCR-RFLP (PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism) аналізу. Існує також істотна різниця в географічному поширенні зазначених двох груп біоварів, що може свідчити про їх незалежне еволюційне походження чи розвиток. В цілому, біотип 1 переважає в Америці; біотип 3 – в Азії. Біотиби 2, 3, 4 зустрічаються в Австралії, Китаї (разом з біотипом 5), Індії, Індонезії, Шрі-Ланці [22, 25].

Дана система класифікації, що склалася історично першою, несе прикладні переваги і залишається основною в практиці фітопатологічних досліджень, однак не відображає реальної спорідненості між штамми.

Можливості для більш детального встановлення внутрішньовидової структури стали доступнішими з впровадження в практику методу полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Перші спроби вивчення генетичних взаємозв'язків між штамми *R. solanacearum* базувалися на ампліфікації довільних ділянок геному і аналізі отриманих фінгерпринтів.

На дендрограмі, побудованій за результатами PCR-RFLP аналізу 120 штамів *R. solanacearum* – ізолятів із різних географічних регіонів, спостерігалася різка дивергенція між групами штамів біотипів I і II і біотипів III і IV. В свою чергу біотиби I і II відділялися в дві окремі підгрупи, тоді як провести чітку лінію розподілу між біотипами III і IV за генетичними дистанціями неможливо [27]. Цей результат був продубльований також з використанням REP (Repetitive Extragenic Palindromic) – та RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) - PCR фінгерпринтів [35].

За допомогою гер-PCR було проведено вивчення спорідненості між 107 штамми *R. solanacearum*, виділених із імпортованого в США протягом десяти років зараженого матеріалу. Отримані результати дали змогу диференціювати їх за біотипом, регіоном походження та деякими особливостями патогенезу [31]. Таким чином, у фітопатологічних дослідженнях використання методу ПЛР для виду з такою неоднорідною структурою,

дозволяє отримувати інформацію про властивості конкретного ізоляту і, відповідно, допомагає в підборі умов роботи з ним.

Результати рестрикційного аналізу геному штамів, що базуються на аналізі окремих ділянок ДНК — 16S-23S спейсерної ділянки, генів *mutS*, *hrpB*, *egl*, є основою філогенетичної класифікаційної системи. З цих позицій в межах виду *R. solanacearum* виділяють чотири філотипи (генетичні групи), кожна з яких, поділяється на менші групи — секвевари. Представники кожного філотипу мають спільне географічне походження: філотипи 1 і 2 складаються із азіатських і південноамериканських ізолятів відповідно, філотип 3 представлений штамми із Африки, філотип 4 — Індонезії, Японії і Австралії [34, 40]. Виходячи з того, що ДНК-ДНК гомологія між штамми *R. solanacearum* може бути нижчою прийнятого для мікроорганізмів внутрішньовидового бар'єру у 70%, було запропоновано використовувати для означення цієї групи бактерій поняття “комплексний вид” [21].

R. solanacearum, що викликають захворювання бурої гнилі картоплі (ББГК), представлений штамми раси 3, біотипу 2 (R3bv2), та фенотипово і філогенетично являють собою гомогенний кластер (філотип 2, секвевар 1), характеризуються адаптацією до відносно низьких температур [12]. Найбільшою шкодочинністю *R. solanacearum* характеризується на насадженнях в Африці, Азії, Південній та Центральній Америці. На відносно холодних тропічних високіг'ях *R. solanacearum* перебуває в основному у вигляді латентної інфекції, однак коли заражені бульби висаджуються на тепліших низинних територіях, рослини швидко в'януть і гинуть [26].

Збудник проникає, звичайно, в рослину з ґрунту, через пошкоджені корені, після чого швидко поширюється і розмножується у ксилемній тканині. Незважаючи на відносно бідне поживними речовинами мікроаеробне середовище, популяція бактерій може сягати 10^9 клітин на грам сирої маси рослини [15].

R. solanacearum володіє різноманітними факторами вірулентності, що в сукупності і обумовлюють протікання хвороби. Серед них: екстрацелюлярні глікополімери, які утворюються у великій кількості і спричиняють закупорювання провідних судин рослинного організму, викликаючи основний симптом — в'янення [1]. Ініціації патологічного процесу сприяє утворення целюлітичних ферментів, наявність джгутикового руху, хемотаксису і системи третього типу секреції [6, 11].

Беручи свій початок із гірських районів Південної Америки, представники *R. solanacearum* пізніше були завезені на інші континенти. Перші повідомлення про виявлення вогнищ захворювання на південному узбережжі Європейського регіону з'явилися на початку 20-го століття. Більш пізня поява бурої гнилі відмічена в Швеції (1972), в 90-х роках — в Австрії, Бельгії, Франції, Англії. В 1995 році, в Нідерландах — основного виробника насінневої картоплі, стався спалах хвороби, який завдав значних збитків народному господарству країни. Це зобов'язало уряд



впровадити цілу низку карантинних заходів, зокрема, в 1997 році була прийнята Директива, що визначає обов'язкову необхідність проведення моніторингу продукції картоплярства на наявність бурої гнилі і заходи щодо ліквідації виявлених вогнищ, які поширюються на всі країни Європейського союзу [26].

Незважаючи на проведені заходи щодо викорінення збудника, бактерії *R. solanacearum* залишаються присутніми на обмежених територіях і деяких водних артеріях Європи, час від часу спричинюють локальні вогнища хвороби в агроценозах [8]. Проведені екологічні дослідження виявили здатність R3bv2 виживати як мінімум 100 днів у ґрунті та водоймах за середньої температури 12 °С [12]. При температурі 24 °С в стерильній воді бактерії зберігали здатність до росту на агаризованих середовищах протягом року, вірулентність — протягом чотирьох років [7].

В разі тривалого перебування в бідному енергетичними субстратами середовищі, за дії інших несприятливих умов бактерії *R. solanacearum* можуть переходити в так званий «життєздатний, але не культивований стан». При цьому відбувається загальне сповільнення метаболізму, припинення поділу та уповільнення росту клітин, зниження проникливості клітинної стінки. Повернення до нормального стану вимагає тривалого перебування в сприятливих умовах і наявності додаткових факторів [23]. При культивуванні *R. solanacearum* в стерильній воді за 4 °С вже після 30 днів більше 2/3 клітин перейшли в некультивований стан. На 56-ий день кількість бактеріальних клітин, що необхідна для 100% ураження сприйнятливих рослин, зросла на чотири порядки порівняно із вихідною культурою [32]. Відновлення патогенних властивостей збудника бурої гнилі, що перебуває у некультивованому стані, можливе при потраплянні до ризосфери сприйнятливих рослин, або на штучних середовищах спеціального складу [18].

Виживанню збудника бурої гнилі картоплі у природних умовах сприяє можливість локалізації бактерій на бур'янах родини пасльонових. Важлива роль тут належить пасльону солодко-гіркому, що проростає на берегах річок і може накопичувати інфекцію своїми зануреними у воду коренями [4]. Основним способом розповсюдження R3bv2 є заражений насінневий матеріал картоплі. Поширення його можливе також за допомогою нетипових для *R. solanacearum* рослин-живителів, на яких патоген може перебувати у вигляді латентної інфекції. Типовим прикладом такого переносника є герань, на імпортованих в США саджанцях якої вперше було виявлено збудник в 1981 році. Враховуючи те, що імпорт цих рослин в США з того часу виріс більш ніж в десять разів, досягнувши 100 млн екземплярів за 2003 рік, ця проблема зайняла помітний сектор серед існуючих каналів поширення інфекції [38].

Одним із першочергових завдань в боротьбі із збудником є використання точних і швидких методів діагностики. В недалекому минулому найпоширенішим методом детекції *R. solanacearum* був посів суспензії

бактерій із природних субстратів у напівселективні середовища з подальшою ідентифікацією отриманих на них колоній. Цей традиційний метод є довготривалим і не дозволяє враховувати клітини, що перебувають в життєздатному, але не культивованому стані, чим призводить до недооцінки чисельності популяції бактерій.

Створені тест-системи на основі імуно-ферментного аналізу до R3bv2 знайшли практичне використання, але при цьому можуть мати місце перехресні реакції із сапрофітними бактеріями ґрунту, і отримання хибнопозитивних результатів [36]. Ця проблема частково вирішується методом імунофлюоресцентної мікроскопії [25].

За останнє десятиліття було розроблено також чимало методів діагностики збудника бурої гнилі, що базуються на ПЛР, без стадії культивування на штучних середовищах. При розробці праймерів першопочатково використовували нуклеотидні послідовності рибосомальних генів (16S та 23S ділянки) [41]. Однак їхня ампліфікація може бути причиною утворення хибно-позитивного паттерну зі спорідненими видами, такими як *Ralstonia picketti*, у зв'язку із високим рівнем консерватизму генів рибосом всередині роду *Ralstonia*. Найбільшого масового використання набули тест-системи, що базуються на ампліфікації специфічної для збудника ББГК ділянки ДНК, вперше запропонованої Феганом та співавторами [13]. Однак, пізніше було встановлено, що дана ампліфікована послідовність є частиною Ми-бактеріофага, а отже може бути втрачена або передана іншим видам бактерій [19]. В зв'язку з цим було розроблено альтернативні праймери до інших ділянок ДНК патогену, наприклад генів ендонуклеази, цитохрому *c1*, *hgrB*, *hrcu*, *flic*, тощо [10].

Враховуючи високу пластичність геному *R. solanacearum*, зокрема здатність до трансформації та обміну генетичним матеріалом, використання тільки одного генетичного маркера (як у випадку ПЛР), може бути недостатнім для достовірної ідентифікації на видовому і особливо субвидовому рівні.

Сучасним, але поки що тільки перспективним методом діагностики, що позбавлений вказаного недоліку, є метод мікроаррей-аналізу. Ця технологія використовує тисячі маркерів одночасно, що забезпечує високу інформативність та достовірність результату. Впровадження в практику методу лімітується його відносною дорожнечою та складністю, а підготовка відповідних тест-систем на його основі можлива тільки до біологічних об'єктів із секвенованим геномом [3]. Метод був використаний для ідентифікації ряду фітопатогенних мікроорганізмів [39], у тому числі патогенів картоплі [14]. Здійснено підбір мікроареїв до *R. solanacearum*, що відповідають специфічним для R3bv2 ділянкам ДНК, і не є частиною мобільних генетичних елементів [20].

Основними в боротьбі з ББГК є превентивні заходи, які включають контроль зараженості насінневого матеріалу, моніторинг територій, карантин виявлених вогнищ хвороби. Негативні наслідки інфікування



можуть бути зменшені поєднанням різноманітних заходів контролю. Серед них дотримання встановлених фітосанітарних правил, вирощування толерантних сортів, сівозміна, агротехнічні заходи [5].

Вирішальна роль у забезпеченні стійкості картоплі до збудника ББГК, як і до інших бактеріальних патогенів, належить індукованим молекулярним механізмам, які об'єднують під загальною назвою — реакція гіперчутливості. Вони включають накопичення антимікробних речовин, таких як фітоалексини (флавоноли, флавонони, флаван-3-оли), підвищення активності поліфенолоксидази, пероксидази. Це супроводжується утворенням вільних радикалів, які спричиняють загибель оточуючих клітин рослини, а разом і бактеріальних клітин. Однак серед природного генофонду картоплі існує обмежене число форм, що могли б слугувати донорами генів стійкості до ББГК в селекції господарсько-цінних сортів. Певна резистентність виявлена у дикої форми *Solanum phureja*, однак, сама генетична основа механізмів природної стійкості картоплі вивчена ще дуже фрагментарно [33]. Експресія генів стійкості обмежується незначним географічним регіоном, що пов'язано із високою варіабельністю штамів *R. solanacearum* та модифікуючою дією факторів зовнішнього середовища [37].

Провідна роль у пошуку та вивченні молекулярних основ резистентності до бурої гнилі, а також створенні трансформованих організмів, що несуть відповідну ознаку, належить генетичній інженерії та біотехнології. Одним із перспективних напрямків роботи є створення генетично модифікованих сортів із посиленою транскрипцією генів деяких антимікробних пептидів тварин (цекропінів, магаїнів, саркотоксину, тощо) [24]. На основі цекропіну створено модифіковані пептиди shiva-1 і SB37 посиленої антимікробної дії, штучно синтезовані послідовності ДНК яких було введено в геном томатів. Отримані химерні лінії рослин характеризувалися меншою сприйнятливістю до *R. solanacearum* та *Erwinia carotovora*, ніж вихідні форми [28]. Трансформовані рослини тютюну із геном лактоферину людини, що є бактерицидним глікопротеїдом, теж продемонстрували підвищену стійкість до R3bv2 [42].

Подоланню наслідків інфікування *R. solanacearum* насаджень картоплі можуть сприяти агротехнічні заходи. В умовах *in vitro* було показано зменшення популяції *R. solanacearum* в ґрунті за підвищеного вмісту нітритів та кислого рН, дія яких синергічно посилюється. Нітрати за цих умов не мали рістпригнічувального ефекту. Внесення вищевказаних солей, фосфатів, СаО, сечовини у ґрунт відкритих агроценозів характеризувалося неоднозначним впливом на чисельність збудника бурої гнилі, що обумовлене типом ґрунту, кліматичними факторами, тощо [30].

Антагоністичні до R3bv2 бактерії було підібрано і показана їхня ефективність в польових умовах. Серед них авірулентні та генетично модифіковані штами *R. solanacearum* [16], деякі природні бактерії-антагоністи

ризосфери із родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*. Біологічний метод контролю не набув широкого впровадження в практику [29].

На даний час бура бактеріальна гниль є карантинною хворобою для території України. Відсутність офіційних даних про наявність вогнищ ураження ББГК на нашій території протягом останніх 15 років, враховуючи широкий спектр кліматичних умов нашої країни, інтенсивний імпорт насінневого матеріалу, наявність хвороби в деяких сусідніх державах, створює високу імовірність занесення і потребує зосередження уваги на вивченні цього питання [4].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Варбанець Л.Д., Гвоздяк Р.И., Мураєв В.А., Броварская О.С., Житкевич Н.В. Химический состав и биологическая активность гликополимеров *Ralstonia solanacearum* (Yabuchi et al., 1995) // Мікробіол. журн. — 1997. — Т. 59. — С. 13–21.
2. Житкевич Н.В., Українець Л.М., Гвоздяк Р.И. Біологічні властивості *Ralstonia solanacearum* // Мікробіол. журн. — 2009. — Т. 71. — С. 49–56.
3. Івахно С.С., Корнелюх О.І. Мікроареї: огляд технологій та аналіз даних // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 2. — С. 5–19.
4. Левченко В.И., Квашина Н.А. Бурая гниль картофеля // Защита и карантин растений. — 2006. — № 2. — С. 40–41.
5. Сикало О.О., Мовчан О.М., Устїнов І.Д. Карантинні шкідливі організми. Частина 2. Карантинні хвороби: Підручник (за ред. О.О. Сикало). — К.: Колообіг, 2005. — 412 с.
6. Akiyama Y., Nishikawaji S., Eda S., Tanaka H., Ohnishi A., Kato K. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* // Agr. Biol. Chem. — 1985. — № 49. — P. 1193–1194.
7. Alvarez B., Lypez M.M., Biosca E.G. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms // Microbiology. — 2008. — V. 154. — P. 3590–3598.
8. Caruso P., Palomo J.L., Bertolini E., Alvarez B., Lypez M.M., Biosca E.G. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures // Appl. Environ. Microbiol. — 2005. — V. 71. — P. 140–148.
9. Castillo J.A., Greenberg J.T. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum* // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — V. 73. — P. 1225–1238.
10. Chen Y., Zhang W.Z., Liu X., Ma Z.H., Li B., Allen C., Guo J.H. A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in the horticultural soil and plant tissues // J. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 20. — P. 193–201.



11. *Elphinstone M.S., Baverstock P.R.* Resistance to bacterial wilt in potato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the stem tissues // *Plant Pathol.* — 1996. — V. 45. — P. 720–726.

12. *Elphinstone J.G.* Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in cool climates // *Potato Res.* — 1996. — V. 39. — P. 403–410.

13. *Fegan M., Holoway G., Hayward A.C., Timmis J.* Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype / *Bacterial wilt disease. Molecular and ecological aspects.* ed. by Prior P., Allen C., Elphinstone J. — Berlin: Springer-Verlag, 1998. — P. 34–43.

14. *Fessehaie A., De Boer S.H., and Lüvesque C.A.* An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato // *Phytopathol.* — 2003. — V. 93. — P. 262–269.

15. *Flores-Cruz Z., Allen C.* *Ralstonia solanacearum* encounters an oxidative environment during tomato infection // *Mol. Plant Microbe Interact.* — 2009. — V. 22. — P. 773–782.

16. *Frey P., Prior P., Marie C., Kotoujansky A., Trigalet-Demery D., Trigalet A.* Hrp mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential bio-control agents of tomato bacterial wilt // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1994. — V. 60. — P. 3175–3181.

17. *Genin S., Boucher C.* Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum* // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 2004. — Vol. 42. — P. 107–134.

18. *Grey, E.B., Steck T.R.* The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 3866–3872.

19. *Guidot A., Carrure S., Siri M.I., Pianzola M.J., Prior P., Boucher C.* Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection // *Phytopathol.* — 2009. — V. 99. — P. 1105–1112.

20. *Guidot A., Coupat B., Fall S., Prior P., Bertolla F.* Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays // *ISME J.* — 2009. — V. 3. — P. 549–562.

21. *Hayward A.C., Prior P., Allen C.* Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. — St. Paul: APS PRESS, 2005. — 528 p.

22. *Hayward A.C.* Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* // *Annu. Rev. Phytopathol.* — 1991. — Vol. 29. — P. 65–87.

23. *James D.O.* The viable but nonculturable state in bacteria // *J. Microbiol.* — 2005. — V. 43. — P. 93–100.

24. Jan P.S., Huang H.Y., Chen H.M. Expression of a synthesized gene encoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2010. — V. 76. — P. 769–775.
25. Janse J.D. *Phytobacteriology: principles and practice.* — Wallingford: CABI/Oxford Presss. — 2006. — 368 p.
26. Janse J.D. Potato brown rot in western Europe-history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies // *Bull. OEPP.* — 1996. — V. 26. — P. 679–695.
27. Jaunet T.X., Wang J.-F. Variation in genotype and aggressiveness diversity of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan // *Phytopathol.* — 1999. — V. 89. — P. 320–327.
28. Jaynes J.M., Nagpala P., Destefano-Beltran L., Huang J.H., Kim J.H., Denny T., and Cetiner S. Expression of a cecropin B lytic peptide analog in transgenic tobacco confers enhanced resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* // *Plant Sci.* — 1993. — V. 89. — P. 43–53.
29. Lemessa F., Zellera W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia // *Biological Control.* — 2007. — V. 42. — P. 336–344.
30. Michel V.V., Mew T.W. Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils // *Phytopathol.* — 1998. — Vol. 88. — P. 300–305.
31. Norman D.J., Zapata M., Gabriel D.W., Duan Y.P., Yuen J.M., Mangravita-Novo A., Donahoo R.S. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America // *Phytopathol.* — 2009. — V. 99. — P. 1070–1077.
32. Overbeek L.S., Bergervoet H.W. The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 // *Phytopathol.* — 2004 —V. 94. — P. 463–469.
33. Poiatti V.A., Dalmas F.R., Astarita L.V. Defense mechanisms of *Solanum tuberosum* in response to attack by plant-pathogenic bacteria // *Biol Res.* — 2009. — V. 42. — P. 205–215.
34. Poussier S., Vandewalle P., Luisetti J. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hrp* gene region // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1999. — V. 65. — P. 2184–2194.
35. Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* assessed by PCR-RFLP of the *hrp* region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision // *Microbiology-UK.* — 2000. — V. 146. — P. 1679–1692.
36. Priou S., Gutarra L. Highly sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in latently infected potato tubers by post-enrichment enzyme-



linked immunosorbent assay on nitrocellulose membrane // Bull. OEPP. — 1999. — V. 29. — P. 117–125.

37. Schell M.A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network // Annu. Rev. Phytopathol. — 2000. — V. 38. — P. 263–292.

38. Swanson J.K., Yao J., Tans-Kersten J., Allen C. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium // Phytopathol. — 2005. — V. 95. — P. 136–143.

39. Tambong J.T., de Cock, A.W., Tinker N.A., Lúvesque C.A. Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — V. 72. — P. 2691–2706.

40. Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu D. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique exhibiting a new pathogenic potential // Applied and environmental microbiology. — 2007. — Vol. 73. — P. 6790–6801.

41. Wullings B.A., Van Beuningen A.R., Janse J.D., Akkermans A.D. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes // Appl Environ Microbiol. — 1998. — V. 64. — P. 4546–4554.

42. Zhang Z., Coyne D.P., Vidaver A.K., Mitra A. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants // Phytopathol. — 1998. — V. 88. — P. 730–734.

Стаття надійшла до редакції 16.01.2012 р.

Р.В. Грицай, Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

RALSTONIA SOLANACEARUM: ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ

Реферат

Ralstonia solanacearum — возбудитель бактериального увядания для широкого круга растений, со значительным географическим ареалом распространения. Имея южноамериканское происхождение, возбудитель продемонстрировал феноменальные адаптивные свойства, в течение второй половины 20-го века распространившись и адаптировавшись к условиям всех континентов за исключением полярных широт. Данный патоген имеет наибольшее экономическое значение среди бактериальных агентов картофеля, будучи карантинным объектом для стран Европы и Украины.



В обзоре освещены проблемные вопросы, относительно особенностей биологии, таксономии, патогенных свойств *Ralstonia solanacearum*, а также современных методов диагностики и борьбы с болезнью.

Ключевые слова: *Ralstonia solanacearum*, бурая бактериальная гниль картофеля.

R.V. Gritsay, L.D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, Kyiv,
tel.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

***RALSTONIA SOLANACEARUM:* FEATURES OF BIOLOGY AND IDENTIFICATION**

Summary

Ralstonia solanacearum — a causative agent of bacterial wilt for a wide range of plants, with a significant area of geographic distribution. Having South American origin, the agent has demonstrated the phenomenal adaptive properties during the second half of the 20th century, spreading and adapted to the conditions of all continents except the polar latitudes. This pathogen has the greatest economic importance among potato bacterial agents, being a subject to quarantine for Europe and Ukraine. The review highlighted the issues regarding the features of biology, taxonomy, pathogenic properties of *Ralstonia solanacearum* and modern methods of diagnosis and combating with the disease as well.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, potato brown rot.



А.Ф. Ткаченко, Е.А. Тигунова, С.М. Шульга

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

МИКРОБНЫЕ ЛИПИДЫ – АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СЫРЬЯ ДЛЯ БИОТОПЛИВА

В обзоре представлены основные направления отечественных и зарубежных исследований, экспериментальные данные поиска активных продуцентов липидов среди различных видов дрожжей и пути оптимизации процесса липидообразования у наиболее перспективных штаммов. Показано, что поддерживая необходимые условия культивирования, можно управлять ходом ферментативных процессов. Рассмотрено влияние на рост, развитие и биохимическую активность микроорганизмов состава среды, температуры, аэрации и окислительно-восстановительных условий. Изменение этих факторов влияет на биосинтетическую деятельность микроорганизмов, липогенную активность дрожжей и на состав синтезируемых ими липидов. Показано, что способность дрожжей к липидообразованию и сравнительно быстрая возможность изменения количества и состава липидов путем направленного культивирования, позволяет сделать вывод о том, что полученные микробиологическим синтезом липиды, могут служить источником сырья для получения биотоплива в промышленных масштабах.

Ключевые слова: дрожжи, *Rhodotorula gracilis*, *Pichia anomala*, микробные липиды, биотопливо.

Интенсивное развитие биоэнергетики становится актуальной задачей практически для всех регионов мира. Преимуществом биотоплива в сравнении с другими видами топлива является уменьшение вредных выбросов в атмосферу, уменьшение зависимости от импортных поставок энергоносителей, стоимость которых постоянно растет. Разрабатываемые новые технологии получения биотоплива в основном направлены на использование в качестве сырья бытовых и промышленных отходов и переработки их на экологически чистое топливо.

Одним из видов биотоплива является биодизель, для получения которого используют растительные или животные жиры. Производство биодизельного топлива из растительных масел осуществляется с использованием реакции трансэтерификации молекул в присутствии катализатора [1–5].

Липиды микробного происхождения (дрожжевые липиды) практически подобны по составу с растительными и животными жирами. Дрожжи имеют ряд свойств (скорость роста, неприхотливость к составу сред, высокий выход липидов, приемлемый жирнокислотный состав), которые позволяют рассматривать их как перспективный источник промышленного получения липидов — сырья для биодизеля.

С составом липидов (наличием длинных или коротких «хвостов» насыщенных и/или ненасыщенных жирных кислот, количеством углеродных атомов в цепи, положением, конфигурацией и количеством двойных связей) во многом связаны такие свойства микроорганизмов как термотолерантность, термофильность, кислотоустойчивость, вирулентность и другие признаки. Кроме того, в микроорганизмах липиды могут выполнять функцию запасных продуктов. К таковым относится поли-*b*-гидроксимасляная кислота, образуемая многими бактериями, и триацилглицериды, накапливаемые в больших количествах некоторыми дрожжами и другими представителями грибов. Фракционный состав внутриклеточных липидов некоторых видов дрожжей приведен в таблице 1.

Таблица 1

Состав дрожжевых липидов, % [6]

Table 1

The composition of yeast lipids,% [6]

Фракция	<i>Lipomyces starkeyi</i>	<i>Lipomyces lipoferus</i>	<i>Sporobolomyces roseus</i>
Фосфолипиды	2,2	4,3	3,3
Стерины	2,5	5,3	3,7
Моно- и диацилглицериды	4,6	5,7	4,8
Свободные жирные кислоты	16,4	2,6	10,1
Триглицериды	71,4	78,1	72,2
Стериновые эфиры и воска	1,2	1,7	2,1

Как видно из таблицы 1, среди отдельных фракций дрожжевых липидов наибольшую часть (71,4–78,1%) занимают триглицериды. Аналогичный фракционный состав имеют липиды мицелиальных грибов и водорослей.

Общее количество липидов у микроорганизмов колеблется в пределах 0,2–10% от количества сухих веществ клеток (СВК). У дрожжей при благоприятных условиях содержание липидов может достигать 60–70% от СВК. Наиболее активные по признаку липидообразования микроорганизмы представлены в табл. 2.



Таблица 2

Общее содержание липидов у некоторых видов микроорганизмов [6]

Table 2

Total lipid content of some microorganisms [6]

Микроорганизм	Липиды / (% от СВК)
<i>Actinomyces albaduncus</i>	42-57
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	40-60
<i>Blakeslea trispora</i>	54-56
<i>Cryptococcus terricolus</i>	65-70
<i>Lipomyces lipoferus</i>	50-63
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	35-36

Состав липидов различных микроорганизмов неодинаков. У бактерий, как правило, много фосфолипидов. Микобактерии содержат значительное количество восков. Молекулы кислот у эубактерий обычно содержат от 10 до 20 атомов углерода (преимущественно 15–19). Микобактерии, кориниебактерии и нокардии содержат в составе липидов кроме обычных кислот, своеобразные, характерные только для этих микроорганизмов миколовые кислоты, представляющие собой высокомолекулярные β -гидроксикислоты с длинной алифатической цепью в α -положении.

Среди различных групп микроорганизмов, имеющих практическое значение, дрожжам отводится ведущая роль. Жирнокислотный состав дрожжевых липидов практически идентичен составу растительных масел [6].

Дрожжи имеют ряд свойств (скорость роста, неприхотливость к составу сред, высокий выход липидов, приемлемый жирнокислотный состав), которые позволяют рассматривать их как наиболее перспективный источник промышленного получения липидов — сырья для биодизеля.

Процесс образования липидов у большинства дрожжей состоит из двух четко разграниченных стадий. Первая стадия характеризуется быстрым образованием белка в условиях усиленного снабжения культуры азотом и сопровождается медленным накоплением липидов (в основном глицерофосфатов и нейтральных жиров); вторая — прекращением роста дрожжей и усиленным накоплением липидов (в основном нейтральных). Типичными липидообразователями являются дрожжи *Cryptococcus terricolus*, которые синтезируют большое количество липидов (до 60% от СВК) в условиях, даже неблагоприятных для синтеза белка [7].

Из других липидообразующих дрожжей промышленный интерес представляют дрожжи *S. guilliermondii*, утилизирующие алканы. Они синтезируют в основном фосфолипиды, накапливают большие количества липидов, активно развиваются на углеводных субстратах (мелассе, ги-

дрозизатах торфа и дресины). Такии свойстваи оладают и дрощи видов *Lipomyces lipoferus* и *Rhodotorula gracilis*. Их липогинез сушественно азисит от условий культивирования, при этом накаливаются азначительные количества (до 70%) триацилглицеридов [8].

Из отдельных групп липидообразующих дрощей наиболее широко распространены в природе дрощи *Rhodotorula* и *Pichia*, продуцирующие липиды в пределах 30–40% СВК.

В результате скрининга [9] дрощевых культур — липидообразователей (табл. 3) отобраны штаммы с повышенным синтезом липидов. Эффективность синтеза липидов определяли по жировому коэффициенту. Дрощи *P. anomala* L1 и *R. gracilis* SK-4 синтезировали наибольшее количество липидов (220 и 240 мг/100 см³, соответственно), при этом показатель жирового коэффициента был 7,8 и 8,0, соответственно.

Таблица 3

Штаммы дрощей с повышенным синтезом липидов [9]

Table 3

Yeast strains with increased synthesis of lipids [9]

Дрощи	Усвоенный сахар (%)	Сухая биомасса (мг/100 мл)	Липиды		Жировой коэффициент
			мг/100 мл	% сухой биомассы	
<i>C. valida y-691</i>	61,0	1000	42	4,2	2,1
<i>C. utilis L-35</i>	47,0	750	105	14,0	6,7
<i>P. anomala M-1</i>	17,5	215	39	18,1	6,7
<i>P. polymorpha v-1</i>	41,5	650	92	14,1	6,6
<i>P. anomala L1</i>	85,0	1500	220	14,0	7,8
<i>R. glutinis K-1</i>	85,0	1450	200	13,8	7,0
<i>R. gracilis SK-4</i>	90,0	1600	240	15,0	8,0
<i>S. cerevisiae M-5</i>	45,0	695	60	8,6	4,3
<i>S. uvarum H-7</i>	52,0	870	58	6,7	3,5

Одним из критериев выбора этих культур было предварительное изучение их естественной изменчивости по признаку липидообразования [9].

Естественная изменчивость (диссоциация) присуща любому виду микроорганизмов и возникает как в обычных условиях культивирования, так и под влиянием самых разнообразных факторов. По этой причине актуален вопрос о сохранении штаммов от вырождения. Невозможно использовать в промышленном производстве культуры, которые в процессе длительного культивирования теряют свои первоначальные свойства и требуют немало усилий для их восстановления [10, 11].



По мнению авторов [12] диссоциация является специфической формой внутривидовой изменчивости микроорганизмов, возникающей только под действием неблагоприятных условий существования. У дрожжей *S. roseus*, *R. gracilis* и *P. anomala* естественная диссоциация по признаку липидообразования выражена слабо. Для этих дрожжей характерны сравнительно небольшие по липидообразованию отклонения от исходной культуры, и довольно устойчив признак активного липидообразования [13].

С культурами дрожжей *P. anomala* L1, *R. gracilis* SK 4 проведены исследования, направленные на повышение выхода липидной фракции при минимальных затратах питательных веществ [9]. Показана возможность увеличения липидообразования путем оптимизации состава питательной среды и условий культивирования.

Проявление жизненного цикла микроорганизмов во многом зависит от условий среды. Поддерживая необходимые условия культивирования, можно в известной мере управлять ходом ферментативных процессов. Особенно большое влияние на рост, развитие и биохимическую активность микроорганизмов оказывают такие факторы как состав среды, температура, аэрация и окислительно-восстановительные условия. Эти факторы влияют на рост и интенсивность обменных процессов, что сказывается на биосинтетической деятельности микроорганизмов, липогенной активности дрожжей и на составе синтезируемых ими липидов [14].

Источником энергии, необходимой для жизнедеятельности дрожжей-продуцентов, могут быть различные углеродсодержащие соединения. Исследования липогенной активности дрожжей на различных углеводах показало [13], что наибольшая активность липидообразования наблюдается на средах с сахарозой (накопление липидов – 8,2 г/л), с глюкозой и фруктозой – 7,8 и 6,5 г/л, соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Синтез липидов и дыхательная активность *Rhodotorula gracilis* SK-4 на средах с разными моносахаридами [13]

Table 4

Lipids synthesis and respiratory activity of *Rhodotorula gracilis* SK-4 in medium with different monosaccharides [13]

Сахара	Липиды, г/л	Дыхательная активность, %
Глюкоза	7,8	100
Фруктоза	6,5	104
Сахароза	8,2	110
Галактоза	6,8	66
Ксилоза	6,7	29



В качестве оптимального источника углерода для дальнейших исследований была выбрана сахароза. Наибольшая дыхательная активность на сахарозе установлена у *R. gracilis SK-4* (110%).

Определенное влияние на липогенную активность дрожжей оказывали не только источники углерода, но и их концентрации (рис. 1).

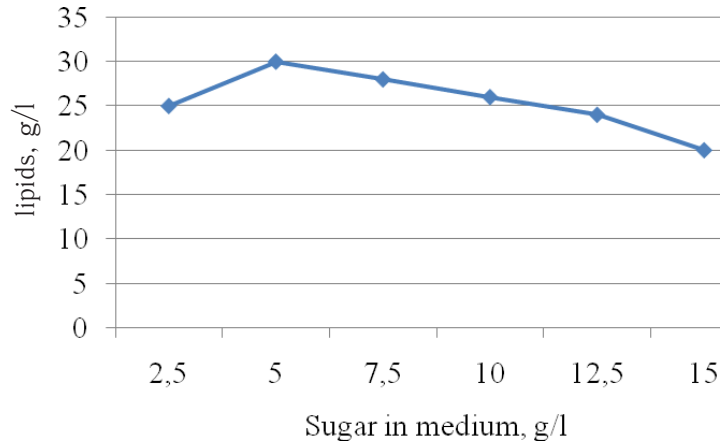


Рис. 1 Влияние содержания сахарозы в среде на синтез липидов дрожжами *R. gracilis SK-4*

Fig. 1. Effect of sugar in the medium for lipids synthesis by yeasts *R. gracilis SK-4*

Исследованиями липидообразования у *R. gracilis SK-4* установлено, что максимальное образование липидов происходит при 5%-ной концентрации сахарозы в среде. Увеличение концентрации сахарозы до 6% приводило к уменьшению содержания липидов. При дальнейшем повышении концентрации сахарозы процесс липидообразования ингибировался [13].

Лучшими источниками азота являлись мочеви́на и аммоний азотнокислый, которые обеспечивали повышенный синтез липидов [13]. Определено, что не только источники азота и углерода влияют на процесс липидообразования, но и их соотношение (табл. 5).

В процессе образования липидов у дрожжей значительную роль играет кислород воздуха. Суспендирование дрожжей, содержащих запасные углеводы, в среде богатой кислородом приводило к трансформации углеводов в липиды [15]. В условиях аэробного развития дрожжей кислород необходим для окисления различных источников углерода. Обильное снабжение растущей культуры кислородом воздуха требовалось, прежде всего для создания нормальных условий окисления источников углерода и высвобождения необходимой энергии для роста и образования различных компонентов клетки. Ряд авторов [15–17] предположили, что кислород, задерживая липолитическое действие липазы, способствовал процессам

обратного действия, а именно биосинтезу липидов и связыванию водорода, высвобождающегося при образовании промежуточных продуктов распада углеводов.

Таблица 5

Влияние источников азота на рост и образование липидов
P. anomala и *R. gracilis* [13]

Table 5

Effect of nitrogen sources on the growth and lipids formation
of *P. anomala* and *R. gracilis* [13]

Источник азота	<i>R. gracilis</i>			<i>P. anomala</i>		
	СВК г/л	Липиды		СВК г/л	Липиды	
		г/л	%		г/л	%
NH ₄ H ₂ PO ₄	12,2	4,31	32,9	9,6	3,73	38,9
NH ₄ NO ₃	10,9	5,65	46,3	12,1	6,41	53,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	12,7	3,25	29,8	13,9	5,66	40,7
Мочевина	13,9	7,80	56,1	13,5	6,95	51,5
Аспарагин	13,1	5,56	43,8	9,6	3,73	38,9

В результате исследований установлено [9], что для максимального накопления биомассы и липидов скорость аэрации различна. Если максимальная скорость растворения кислорода в среде для синтеза биомассы составляла 6 г O₂/л/час, то для получения максимального количества липидов – 12 г O₂/л/час. Последующее увеличение скорости аэрации среды приводило к угнетению роста дрожжей и образования липидов (рис. 2).

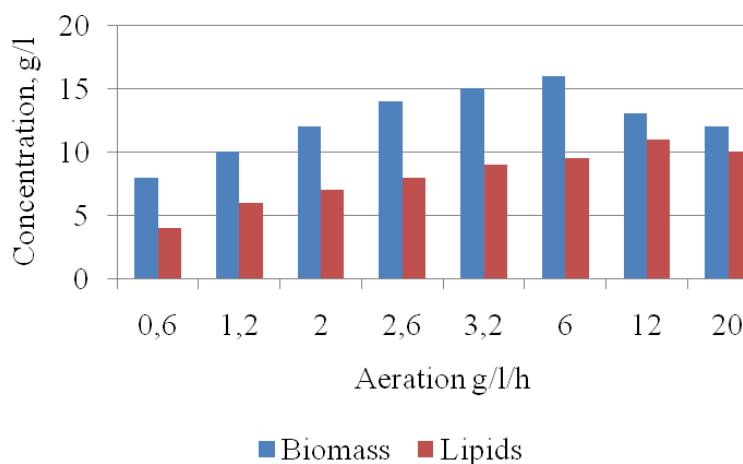


Рис.2. Влияние скорости аэрации среды на накопление биомассы и синтез липидов у *R. gracilis* SK-4

Fig. 2. Medium aeration levels for biomass and lipids accumulation by *R. gracilis* SK-4

Одним из факторов, определяющих рост микроорганизмов и их физиологическую активность, является величина рН. У дрожжей чувствительность к различным значениям рН в среде менее выражена. В результате исследований установлено [9], что максимальное накопление биомассы дрожжей происходило при рН 5,5 (при этом значении отмечен наибольший жировой коэффициент 18,1), однако максимальное содержание липидов (в процентах к сухому веществу) наблюдалось при рН 6,0. Результаты влияния рН среды на накопление биомассы и синтез липидов дрожжами *R. gracilis SK-4* представлены в таблице 6.

Таблица 6

Влияние рН среды на синтез биомассы и липидов дрожжами *R. gracilis SK-4* [9]
Table 6

Effect of pH on the synthesis of biomass and lipids by yeasts *R. gracilis SK-4* [9]

рН	Биомасса		Липиды		
	г/л	% от сахара	г/л	% от сахара	% от сухих веществ
4,0	9,8	24,5	3,2	8,1	31,2
4,5	12,5	30,7	4,8	9,6	32,9
5,0	13,9	34,7	6,7	15,3	44,9
5,5	15,9	39,7	7,2	18,1	45,6
6,0	14,8	37,0	7,0	17,5	47,0
6,5	4,8	12,0	2,0	5,0	41,5
7,0	3,9	9,7	1,3	3,1	29,8

Исследование влияния температуры на накопление биомассы и синтез липидов показало [9], что повышение температуры с 34 до 37 °С приводило к увеличению накопления биомассы и синтеза липидов. Дальнейшее повышение температуры (до 38 °С и выше) уменьшало содержание биомассы, а синтез липидов незначительно возрастал (рис. 3).

Изменение температуры культивирования дрожжей в пределах, обеспечивающих нормальный рост, влияет на их состав и незначительно сказывается на процентном содержании липидов. При этом температурный режим выращивания зависел от используемого вида и штамма дрожжей, состава среды и условий культивирования организма.

При выращивании дрожжей *Rhodotorula* обнаружено, что изменение состава липидов в значительной степени зависит от характера используемой среды. Дрожжи на органической среде (экстракт пивных дрожжей) при 20 °С синтезировали липиды с небольшим содержанием пальмитиновой кислоты и высоким содержанием олеиновой, а при 35 °С соотношение этих кислот было обратным [18–20].



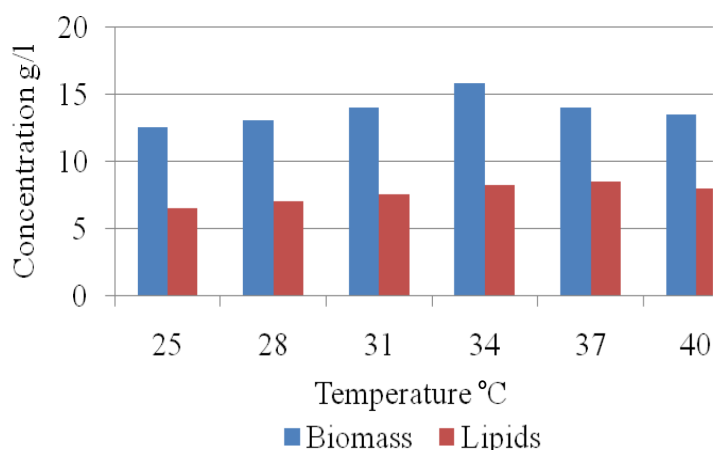


Рис. 3. Влияние температуры на накопление биомассы и синтез липидов дрожжами *R. gracilis SK-4*

Fig. 3. Temperature effect upon biomass and lipids accumulation by yeasts *R. gracilis SK-4*

Использование жирных кислот в качестве дополнительного источника углерода способствовало увеличению содержания в липидах дрожжей именно вносимых кислот. Введение в среду олеиновой кислоты привело к увеличению содержания ее в липидной фракции на 45% по сравнению с содержанием в липидной фракции дрожжей, выращенных только на глюкозе. Аналогичные результаты получены и в случае использования линолевой (увеличение в 12,5 раза) и пальмитиновой (увеличение на 49%) кислот [9]. Это объяснялось снижением энергетических затрат на биосинтез липидов, а использование дрожжами жирных кислот в качестве продуктов синтеза липидов происходило без предварительного их декарбоксилирования [13]. Результаты влияния жирных кислот, как источника углерода среды, на жирнокислотный состав липидов *R. gracilis SK-4* представлены в таблице 7.

Кроме источников углеродного и азотного питания, а также условий культивирования, на рост дрожжевой популяции, а следовательно, и на скорость синтеза липидов определенное влияние оказывают различные источники минерального питания, а также биологические факторы, среди которых, в основном, витамины, провитамины и их производные.

Многие виды дрожжей богаты витаминами комплекса В и могут развиваться на обедненных средах. Дополнение среды некоторыми витаминами стимулировало синтез липидов дрожжами *R. gracilis* и *P. anomala*. Для нормального роста и липидообразования этих культур на синтетической среде необходимо присутствие пантотеновой кислоты, тиамина и биотина. Отсутствие пантотеновой кислоты отрицательно влияет на синтез липидов. Связывают это с пантотеином (производное

Таблица 7

Влияние жирных кислот на состав липидов *R. gracilis* SK-4 [13]

Table 7

The influence of fatty acids on lipids composition of *R. gracilis* SK-4 [13]

Жирная кислота	Источник углерода среды, % от общего количества			
	Глюкоза	Олеиновая кислота	Линолевая кислота	Пальмитиновая кислота
Гексадекановая C16	34,5	13,5	21,0	49,2
Октадекановая C18	61,3	79,5	78,5	43,8
Пальмитиновая	29,0	12,0	21,0	43,2
Стеариновая	3,4	2,5	3,5	2,0
Пальмитолеиновая	5,5	1,5	-	6,0
Олеиновая	54,5	79,5	32,5	39,0
Линолевая	3,4	-	42,5	1,5
Линоленовая	-	-	-	1,3

пантотеновой кислоты и цистеина), который участвует в синтезе высших жирных кислот и стероидов (табл. 8).

Таблица 8

Накопление биомассы (г/л) *P. anomala* L1 и *R. gracilis* SK-4 на среде с ростовыми добавками [6]

Table 8

Accumulation of biomass (g / l) *P. anomala* L1 and *R. gracilis* SK-4 on additives growth substances [6]

Штамм	Без витаминов	С дрожжевым автолизатом	С витаминами					
			В1 s	В2	В6	В7	В8	ПАБК
<i>P. anomala</i> L1	10,3	30,4	8,2	9,6	8,6	28,4	11,2	9,4
<i>R. gracilis</i> SK-4	16,8	26,5	16,4	18,5	16,4	30,5	16,0	10,2

В среде с тиаминном, но при недостатке парааминобензойной кислоты (ПАБК) в дрожжах *R. gracilis* SK-4 наблюдается нарушение липидного обмена, что выражается в усиленном накоплении липидов [13].

Особое место в липогенезе дрожжей занимает инозит. При условии его дефицита в среде повышается содержание липидов в клетках, но уменьшается количество фосфолипидов. Действие инозита проявляется прежде всего у видов дрожжей, которые не способны к его биосинтезу.



У дрожжей *R. gracilis* SK-4 не наблюдается увеличения общего содержания липидов при недостатке инозита [6].

При выращивании дрожжей *P. anomala* L1 на среде с пиридоксином наблюдается увеличение содержания общих липидов по сравнению с культивированием на среде без пиридоксина [6]. Отмечено падение содержания мононенасыщенных жирных кислот (в основном пальмитолеиновой) при постоянном количестве насыщенных жирных кислот.

Показано, что никотиновая кислота не оказывает влияния на рост дрожжей *R. gracilis* SK-4, так как данная культура обладала способностью к ее биосинтезу, как и к биосинтезу пиридоксина и рибофлавина [9].

Установлено, что на рост и образование липидов дрожжами *R. gracilis* определенное влияние оказывает оротовая кислота (2,6-диоксипиримидин-4-карбоновая). В концентрации 0,1% оротовая кислота вызывает ускорение роста дрожжей и стимулирует скорость синтеза липидов [6].

На рост и накопление липидов дрожжами наиболее сильное влияние оказывают фосфаты. Нормальный процесс накопления липидов возможен только при наличии в среде определенной концентрации фосфора. Однако в зависимости от свойств дрожжей-липидообразователей оптимальная концентрация фосфора в среде может быть различной. Недостаток фосфора в среде приводил к неполному использованию сахара среды, избыток же фосфора меняет направление процесса в сторону накопления биомассы, а не синтеза липидов. Повышение концентрации в среде фосфора подавляет включение ацетат-С¹⁴ в жирные кислоты и неомыляемые липиды *R. gracilis* SK-4 [21]. Действие фосфорных солей можно объяснить их ролью в метаболических процессах дрожжевой клетки. Недостаток фосфора в среде влияет на процессы синтеза белка. Обильное снабжение фосфором способствовало повышенному синтезу белка, а недостаток — усилению липидообразования.

Действие фосфатов на липогенез дрожжей, в известной степени, аналогично действию солей азота. Избыток угнетает, а недостаток стимулирует процессы биосинтеза липидов. Однако повышение количества липидов в дрожжах при недостатке фосфора гораздо меньше, чем при недостатке азота.

Накопление дрожжами липидов было максимальным (рис. 4) при добавлении в среду 0,03 г/л фосфора, причем эта норма оказалась оптимальной для *R. gracilis* и для *P. anomala* [13].

Исследования влияния фосфорного питания на фракционный состав липидов *P. anomala* показали, что внесение в среду 1,39 г/л фосфора ведет к некоторому увеличению относительной доли фосфолипидов и снижению стероидов, моно- и диглицеридов (табл. 9). В целом же влияние фосфорного питания на фракционный состав липидов невелико [13].

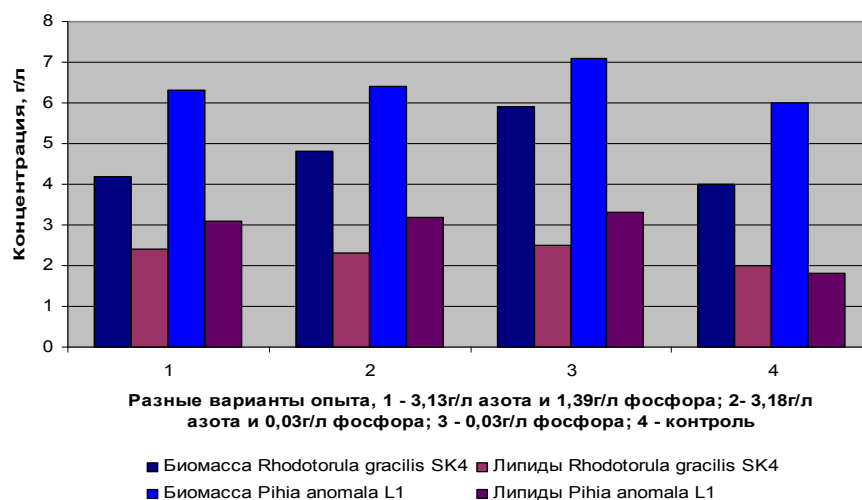


Рис. 4. Влияние разных концентраций фосфора на рост и липидообразование *R. gracilis* SK-4 и *Pichia anomala* L1

1 – излишек азота и фосфора; 2 – излишек азота и норма фосфора;
3 – норма фосфора без азота и 4 – без азота и фосфора

Fig. 4. The effect of different concentrations of phosphorus upon biomass and lipids accumulation by yeasts *R. gracilis* SK-4 and *Pichia anomala* L1
1 – nitrogen and phosphorus surplus; 2 – nitrogen surplus and rate of phosphorus;
3 – rate of phosphorus without nitrogen; 4 – without nitrogen and phosphorus.

Влияние на липогенез дрожжей магния, калия, натрия и других компонентов противоречивы. Ионы магния тормозят процесс липидообразования в покоящихся клетках дрожжей [22–23], в то же время отмечается положительное влияние ионов магния на синтез биомассы в логарифмической фазе роста.

Таблица 9
Влияние фосфорного питания на фракционный состав липидов *P. anomala* L1* [13]
Table 9
The effect of phosphorus supply upon fractional composition of *P. anomala* L1 lipids [13]

Фракция	Без фосфора, (г/л)	Добавлено в среду 1,9 фосфора, (г/л)
Фосфолипиды	1,5±0,01	2,1±0,01
Неидентифицированная	2,3±0,03	2,9±0,03
Стерины	3,9±0,05	3,2±0,05
Моно- и диглицериды	3,9±0,06	3,0±0,06
Свободные жирные кислоты	6,1±0,04	6,7±0,04
Триглицериды	76,5±0,08	78,9±0,08
Стериновые эфиры и воска	1,6±0,02	1,8±0,02

*/источник азота – мочевины, 1,39 г/л



Добавление в среду сернокислого магния оказывает положительное влияние на уровень использования редуцирующих веществ (РВ) среды и накопления биомассы дрожжей (табл. 10). Наибольшее количество липидов дрожжи синтезируют при добавлении 2,5 г/л сернокислого магния. Внесение больших количеств сернокислого магния (10 и 20 г/л) приводит к заметному торможению синтеза липидов дрожжами.

Таблица 10

Влияние ионов магния на рост и липидообразование дрожжей
R. gracilis SK-4 и *P. anomala* L1 [16]

Table 10

The effect of magnesium ions upon the growth and formation of lipid yeasts
R. gracilis SK-4 and *P. anomala* L1 [16]

Дрожжи	MgSO ₄ , г/л	Используй- вано РВ, %	Биомасса		Липиды		
			г/л	в % от использо- ванных РВ	г/л	в % от использо- ванных РВ	в % от сухих веществ клеток
<i>R. gracilis</i> SK-4	20	82,7	4,7	37,8	1,5	11,9	31,6
	10	90,7	5,2	38,1	1,6	13,3	31,5
	5	80,0	4,0	32,0	1,6	12,8	40,2
	2,5	85,3	3,8	29,4	1,6	12,2	43,6
	0,1	77,3	3,3	28,3	1,4	12,0	43,0
<i>P. anomala</i> L1	20	93,7	6,0	40,8	2,4	16,6	40,8
	10	87,3	6,0	45,4	2,2	16,9	37,2
	5	74,7	3,7	33,4	1,8	16,2	48,4
	2,5	81,3	4,2	34,1	2,2	17,9	52,6
	0,1	74,7	3,9	34,9	2,0	17,8	50,9

Добавление хлористого калия приводит к некоторому улучшению степени использования РВ среды и повышению общего выхода биомассы дрожжей (табл. 11). Ионы калия оказывают положительное влияние на биосинтез липидов. По своему действию введение в среду калия аналогично введению магния. Не оказывая непосредственного влияния на липогенез дрожжей, ионы калия и магния в известной мере влияют на степень использования углерода и азота среды и на скорость накопления дрожжевой биомассы. В свою очередь это способствует некоторому увеличению общего выхода липидной фракции дрожжей.

При культивировании дрожжей *P. anomala* L1 на среде с хлористым натрием отмечена гибель дрожжей и уменьшение веса клеток, однако содержание липидов в них увеличивается. Жирнокислотный состав липидов на среде с хлористым натрием также подвергается некоторому

изменению. При увеличении концентрации соли до 10% в клетках накапливаются в значительном количестве кислоты $C_{12:0}$ и резко уменьшается концентрация кислот $C_{18:1}$. В зависимости от концентрации соли меняется соотношение между насыщенными и ненасыщенными кислотами [15].

Таблица 11

Влияние ионов калия на рост и липидообразование дрожжей [16]

Table 11

The effect of potassium ions upon the growth and lipid formation of yeasts [16]

Концентрация КСl, г/л	<i>R. gracilis</i> SK-4				<i>P. anomala</i> L1			
	Использовано РВ, %	Биомасса, г/л	Липиды		Использовано РВ, %	Биомасса, г/л	Липиды	
			г/л	%			г/л	%
2,0	87,5	5,2	1,5	28,7	88,1	5,8	2,5	42,9
1,0	86,9	5,1	1,5	28,9	85,6	5,0	2,1	41,0
0,5	84,4	4,7	1,3	27,9	83,8	4,9	2,1	42,7
0,25	84,4	4,7	1,3	26,9	83,8	4,9	2,1	41,8

Микроскопические грибы пока не получили большого распространения как продуценты липидов, хотя жир грибов по своему составу также близок к растительному. Выход жиров у *Aspergillus terreus*, например, на углеводных средах достигает 51% от СВК. Липидный состав представлен в основном нейтральными жирами и фосфолипидами [8].

Способность дрожжей к липидообразованию и сравнительно быстрая возможность изменения количества и состава липидов путем направленного культивирования, позволяет сделать вывод о том, что полученные микробиологическим синтезом липиды, могут служить источником сырья для получения биотоплива в промышленных масштабах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carioca J.O.B.* Biofuels: Problems, challenges and perspectives // *Bio-technol. J.* — 2010. — № 5. — P. 260–273.
2. *Hirsch R.L., Bezdek R., Wendling R.* Peaking of World Oil Production and Its Mitigation // *AIChE J.* — 2006. — № 52. — P. 2–8.
3. *Kerr R.A.* CLIMATE CHANGE: Global warming is changing the world // *Science* — 2007. — № 316. — P. 188–190.
4. *Олійничук С., Кизюн Г., Шиян П., Сосницький В.* Сучасні й перспективні технології виробництва біопалив на світовому ринку // *Харчова і переробна промисловість.* — 2009. — № 6(358). — С. 11–13.
5. *Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наукова думка, 2010. — 328 с.



6. Залашко М.В. Биосинтез липидов дрожжами. — Мн., «Наука и техника», 1971. — 216 с.
7. Asselinean J., Lederer E. **Chemistry and metabolism of bacterial lipids**. “Lipide metabolism”. — John Wiley a. Sons. New York, 1960 — 200 p.
8. Губарев Е.М. Основные процессы обмена веществ у микробов. — М. Мир, 1961 — 165 с.
9. Шульга С.М., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Е., Хоменко А.И., Андрияш А.С. Биосинтез липидов дрожжами *Rhodotorula gracilis*. // Ж. Биотехнология — 2010. — т. 3, № 3. — С. 58–65
10. Ганбаров Х.Г., Абдулгамидова С.М. Изучение внутривидовых морфо-культуральных изменений дрожжевых грибов, хранившихся в коллекции культур. Вестник Бакинского Государственного Университета // Журнал серия биологических наук. — 2007. — № 1. — С. 42–46.
11. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Демушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. — 2009. — № 4. — С. 99–121.
12. Лукин А.А. Экспериментальное исследование диссоциации у *Bacillus brevis* var. G.-B.: Автореф. канд. дисс. М., 1965. — 20 с.
13. Shulga S.M., Tkachenko A.F., Beyko N. E. Biosynthesis of lipids by the yeast *Rhodotorula gracilis* // III International conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology «BioMicroWord 2009» (Lisbon, Portugal, 2–4 December, 2009): abstr. — P. «World Scientific», 2009. — p. 385.
14. Шульга С.М., Тигунова О.О., Ткаченко А.Ф., Бейко Н.Е., Хоменко А.И. Вплив ліофільного висушування на життєздатність дріжджів *Pichia anomala*. // Ж. Біотехнологія. — 2011. — том 4, № 4. — С. 83–86
15. Rattray J.B., Schibeci A., Kidby D.K. Lipids of yeasts // Bacteriol. Rev. — 1975. — V. 39, № 3. — P. 197–231.
16. Hall M.J., Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose under various conditions in a one- and two-stage continuous culture // Appl. Environ. Microbiol. — 1977. — V. 33, № 3. — P. 577–584.
17. Коронелли Т.В. Липиды микобактерий и родственных микроорганизмов. — М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1984. — 160 с.
18. Ratledge C., Wynn J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms // Adv. Appl. Microbiol. — 2002. — № 51. — P. 1–44.
19. Alvarez H., Steinbuechel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2002. — № 60. — P. 367–376.

20. Meng X., Yang J., Xu X. Zhang L. et. al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. // *Renew. Energ.* — 2009. — № 34. — P. 1–5
21. Van Hamme J.D., Ward O.P. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas sp.* strain JA5-B45 and *Rhodococcus sp.* stain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them// *Ibid.* — 2001. — V. 67, N 10. — P. 4874–4879.
22. Steen E., Kang Y., Bokinsky G., Hu Z., et. al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass // *Nature.* — 2010. — № 463. — P. 559–562.
23. Li Q., Du W., Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2008. — № 80. — P. 749–756.

Стаття надійшла до редакції 05.06. 2012 р.

А.Ф. Ткаченко, О.О. Тигунова, С.М. Шульга

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

МІКРОБНІ ЛІПІДИ — АЛЬТЕРНАТИВНЕ ДЖЕРЕЛО СИРОВИНИ ДЛЯ БІОПАЛИВА

Реферат

В огляді представлені основні напрямки досліджень вітчизняних та закордонних авторів, а також експериментальні дані направлені на пошук активних продуцентів ліпідів серед різних видів дріжджів та шляхів оптимізації процесу ліпідотворення у найбільш перспективних штамів. Показано, що підтримуючи необхідні умови культивування можна керувати ходом ензиматичних процесів. Розглянуто вплив на ріст, розвиток та біохімічну активність мікроорганізмів складу середовища, температури, аерації та окиснювально-відновлювальних умов. Зміна цих факторів впливала на біосинтетичну діяльність мікроорганізмів, ліпогенну активність дріжджів та на склад синтезованих ними ліпідів. Показано, що властивість дріжджів до ліпідотворення та відносно швидка можливість змінення кількості та складу ліпідів шляхом направленою культивування, дає змогу зробити висновок про те, що отримані мікробіологічним синтезом ліпіди, можуть слугувати джерелом сировини для отримання біопалива в промислових масштабах.

Ключові слова: дріжджі, *Rhodotorula gracilis*, *Pichia anomala*, мікробні ліпіди, біопаливо.



A. Tkachenko, O. Tignova, S. Shulga

State organization “Institute of Food Biotechnology and Genomics”, NASU,
2a, Osipovskogo str., Kyiv-123, 04123, Ukraine,
tel.: +38 (044) 434 45 77, e-mail: Shulga5@i.ua

MICROBIAL LIPIDS ARE AN ALTERNATIVE RAW MATERIAL FOR BIOFUEL

Summary

This review presents the main directions of domestic and foreign research, also experimental data to search among the different species of yeasts – active producers of lipids and the ways to lipidogenesis process optimization in the most promising strains. It was shown that maintaining the necessary conditions of cultivation can direct enzymatic processes course. The influence of microbial medium composition, temperature, aeration and oxidation-reduction conditions on the growth, development and biochemical activity was investigated. These factors changing has affected the microorganisms biosynthetic activity, lipidogenic yeasts activity and has synthesized lipids composition. It is proved that lipidogenic yeasts ability and relatively rapid ability of changing the amount and composition of lipids by the direct cultivation leads to the conclusion that lipids obtained by microbial synthesis can be commercially a source of raw materials for biofuel.

Key words: *Rhodotorula gracilis*, *Pichia anomala*, yeast, microbial lipids, biofuel.



УДК 579.2

М.Б. Галкін, Н.В. Ліманська, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця

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

ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ БАКТЕРІЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА КОРЕНЯХ РОСЛИН *LEPIDIUM SATIVUM L.*

*Проведено дослідження формування біоплівки молочнокислими бактеріями на поверхні коренів тест-рослин крес-салату *Lepidium sativum L.* Встановлено, що за змодельованих умов клітини бактеріоциногенних штамів *Lactobacillus plantarum* мають здатність до адгезії та формування біоплівки на коренях тест-рослин, на відміну від бактерій *Lactococcus lactis*. Вивчення механізмів формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* ONU 87 на коренях рослин показало, що вибіркова інактивація основних груп адгезинів по різному впливає на цей процес. Інактивація S-шару призводить до припинення адгезії бактерій, інактивація поверхневих поліцукридів – до припинення формування мікроколоній, а видалення тейхоевих кислот – до інгібування процесу дозрівання біоплівки.*

*Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, біоплівка, адгезини, *Lepidium sativum L.**

Використання синтетичних речовин таких як гербіциди, пестициди, стимулятори росту часто призводить до порушення балансу взаємовідносин між рослинами та мікроорганізмами ризосфери, що в свою чергу надає перевагу фітопатогенним мікроорганізмам і призводить до значних втрат рослинної продукції від інфекційних хвороб. В зв'язку з цим актуальним є пошук підходів до біологічного контролю за формуванням нормальної мікробіоти ризосфери та захисту від фітопатогенних мікроорганізмів, особливо в умовах гідропоніки та інших умовах штучного вирощування рослин [2, 11].

Відомо, що на коренях рослин в ґрунті формується біоплівка, яка складається з представників різних видів мікроорганізмів [3, 4]. Біоплівка виконує багато життєво важливих для рослин функцій, зокрема забезпе-

© М.Б. Галкін, Н.В. Ліманська, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця, 2012



чує захист рослин від фітопатогенних мікроорганізмів. Цей захист може бути обумовлений як продукуванням широкого спектру біосурфактантів, антибіотиків та бактеріоцинів, так і блокуванням сайтів адгезії на коренях [1,7]. Порушення у формуванні структури біоплівки відкриває можливість фітопатогенним мікроорганізмам взаємодіяти з тканинами рослини та викликати її захворювання.

Пошук інструментів біологічного контролю фітопатогенних бактерій доцільно проводити серед мікроорганізмів, які з одного боку здатні продукувати антимікробні метаболіти, а з іншого формувати біоплівку на коренях та інтегруватися у природні біоплівки, підсилюючи їх захисні властивості. Однією з перспективних груп таких мікроорганізмів є бактерії роду *Lactobacillus*, більшість з яких здатні продукувати бактеріоцини [9, 10]. Незважаючи на те, що у природних умовах представників роду *Lactobacillus* знаходять на рослинах, механізми взаємодії цих бактерій з рослинами, особливо з їх кореневою системою, вивчені недостатньо.

Метою даної роботи було вивчення особливостей та механізмів формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* на коренях рослин крес-салату.

Матеріали та методи

В роботі були використані штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 87, *Lactobacillus plantarum* ONU 12, для яких встановлено здатність продукувати бактеріоцини, штам лактококів *Lactococcus lactis* ONU 505, які не притаманні для мікробіоти рослин, та штам ґрунтової бактерії *Pseudomonas fluorescens* ONU303. *Lactobacillus plantarum* ONU 87, *Lactobacillus plantarum* ONU 12 та *Lactococcus lactis* ONU 505 вирощували на середовищі MRS за температури 37 °С, штам *Pseudomonas fluorescens* ONU 303 — на середовищі Гіса за 25 °С.

Для вивчення формування біоплівки бактеріями на коренях рослин використовували крес-салат *Lepidium sativum* L. сорту «Ажур». Насіння крес-салату стерилізували шляхом занурення на 3 хв у 70% етанол та переносили на диски стерильного фільтрувального паперу у чашки Петрі. Диски заливали стерильною водогінною водою та витримували за кімнатної температури впродовж 3 діб. Після проростання відбирали проростки з довжиною кореня 2–3 см. Контроль стерильності насіння та проростків здійснювали шляхом викладання на чашки Петрі з МПА та інкубування при 37 °С впродовж 24 год.

Отримані проростки переносили до 48-лункового планшета по одному до кожної лунки, що містили по 1 мл суспензії клітин бактерій в концентрації 10^8 КУО/мл в середовищі MRS. Проростки з бактеріями в планшетах інкубували 24 год при 37 °С.

Після інкубації проростки промивали від не прикріплених до кореня клітин шляхом занурення у фізіологічний розчин. Сформовану біоплівку

фіксували 96% етанолом впродовж 15 хв та забарвлювали 1% розчином акридинового помаранчевого впродовж 5 хв. Забарвлені проростки ретельно висушували на предметному склі, мікроскопували з використанням мікроскопу Primo Star PC, Carl Zeiss при збільшені $\times 900$ та фотографували з використанням камери Olympus DCM (3,0 M pixels). Сформованість біоплівки оцінювали за системою чотирьох плюсів (табл. 1).

Таблиця 1

Критерії оцінки сформованості біоплівки

Table 1

The criteria of biofilm quality assessing

Значення	Критерії
—	Адгезія бактерій не спостерігається, біоплівка не формується.
+	Біоплівка представлена адгезованими клітинами практично без мікроколоній.
++	Біоплівка представлена поодинокими повністю сформованими мікроколоніями.
+++	Біоплівка середньої товщини з розривами у структурі.
++++	Біоплівка середньої або більше товщини без розривів у структурі, добре сформований матрикс.

Вивчення механізмів адгезії бактерій *L. plantarum* до поверхні коренів здійснювали шляхом вибіркової інактивації основних груп адгезинів. Поверхневі поліцукриди інактивували шляхом їх окиснення метаперіодатом натрію [6]. Для цього суспензію бактеріальних клітин (10^8 КУО/мл) інкубували 18 год при 4 °С у 100 мМ розчині метаперіодату натрію в 0,1 М CH_3COONa з рН 5,5. Після інкубації суспензію клітин тричі відмивали фізіологічним розчином та інкубували 1 год з 100 мМ NaBH_4 при 4 °С. Після інкубації та відмивання клітини ресуспендували у середовищі MRS. Тейхоеві кислоти вилучали з клітинної стінки шляхом обробки суспензії клітин *L. plantarum* 30% трихлороцтовою кислотою (ТХО) при 37 °С впродовж години [12]. Білки S-шару клітинної стінки вилучали за інкубації бактерій впродовж 15 хв 5 М LiCl у середовищі MRS на льоду [5]. Після цього бактерії тричі відмивали фізіологічним розчином та ресуспендували у середовищі MRS.

Життєздатність клітин *L. plantarum* після інактивації адгезинів підтверджували шляхом висівів оброблених клітин на чашки Петрі з твердим середовищем MRS.

Результати та їх обговорення

Вивчення особливостей формування біоплівки бактеріоциногенними штамами *Lactobacillus plantarum* показало, що обидва досліджувані штами лактобацил виявляють здатність взаємодіяти з коренями тест-рослин.



Для порівняння формування біоплівки бактеріями штамів *L. plantarum* порівнювали з біоплівками ґрунтової бактерії *Pseudomonas fluorescens* ONU 303 та *Lactococcus lactis* ONU 505, що не зустрічається на рослинах за природних умов.

Отримані результати (рис. 1) показали, що *P. fluorescens* ONU 303 вже за 24 год інкубації формує розвинену біоплівку середньої товщини, яка займає практично усю поверхню кореня та складається з добре сформованих мікроколоній та матриксу. Загалом сформованість біоплівки *P. fluorescens* ONU 303 оцінено як «++++» (табл. 2).

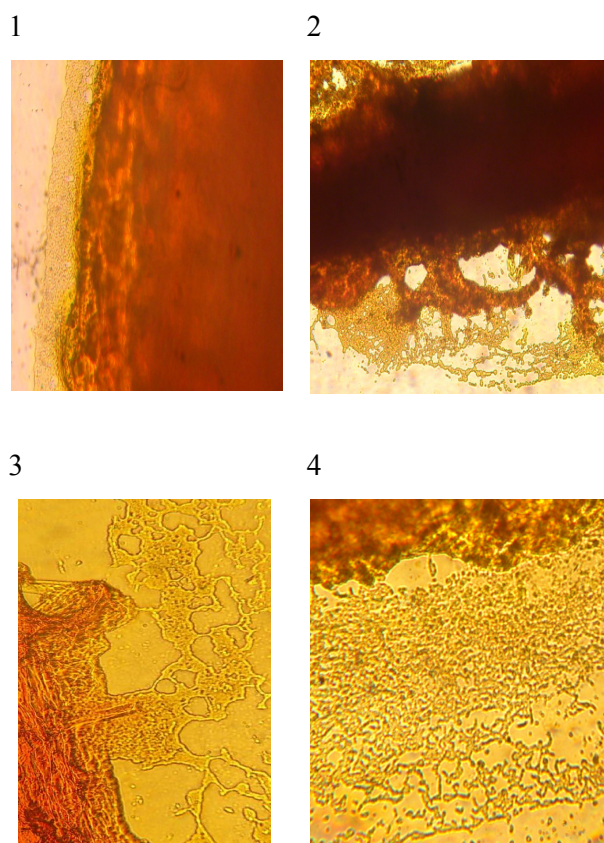


Рис. 1. Біоплівка досліджуваних бактерій на поверхні коренів крес-салату
1 – *Pseudomonas fluorescens* ONU 303; 2* – *Lactococcus lactis* ONU 505;
3 – *Lactobacillus plantarum* ONU 12; 4 – *Lactobacillus plantarum* ONU 87.
Примітка: * – інкубація 48 год

Fig.1. Biofilm formation of bacteria test-strains on the roots of watercress lettuce
1 – *Pseudomonas fluorescens* ONU 303; 2* – *Lactococcus lactis* ONU 505;
3 – *Lactobacillus plantarum* ONU 12; 4 – *Lactobacillus plantarum* ONU 87.
Note: * – 48 hours incubation

У порівнянні з *P. fluorescens* ONU 303, бактерії *L. lactis* ONU 505 виявили набагато меншу здатність до формування біоплівки на коренях

тест-рослин (рис. 1). Так, після першої доби інкубації біоплівку цих бактерій на поверхні коренів не виявили, або спостерігали поодинокі адгезовані клітини. Таким чином, ступінь сформованості біоплівки бактеріями *L. lactis* ONU 505 за 24 год оцінювали як «-» та «+». Через 48 годин інкубації біоплівка *L. lactis* ONU 505 складалася з поодиноких, але повністю розвинутих мікроколоній, з численними зонами розриву. Ці структури нерівномірно покривали поверхню кореня та концентрувалися переважно у зоні кореневих волосків. На більшості досліджених ділянок контакт між мікроколоніями був відсутнім і лише місцями виявлено структури, які були наближені до сформованої біоплівки. Загалом на 48 год інкубації сформованість біоплівки *L. lactis* ONU 505 на коренях крес-салату оцінено «++».

Таблиця 2

Оцінка сформованості біоплівки досліджуваних штамів мікроорганізмів

Table 2

Quality assessment of biofilm formation by used test-strains

Штам	Час інкубації, год	Оцінка сформованості біоплівки
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ONU 303	24	++++
	48	++++
<i>Lactococcus lactis</i> ONU 505	24	-/+
	48	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> ONU 12	24	+++
	48	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> ONU 87	24	++++
	48	++++

Очевидно, отримані результати свідчать про те, що *L. lactis* в природних умовах не взаємодіє з рослинами і не входить до мікробіоти філо- та ризосфери рослин.

Дослідження бактеріоциногенних штамів *L. plantarum* щодо формування біоплівки на коренях крес-салату (рис. 1.) показало здатність обох штамів утворювати біоплівку за 24 год інкубації. Оцінювання сформованості біоплівок виявило деякі специфічні штамові особливості. Біоплівка *L. plantarum* ONU12 була добре сформованої структури середньої товщини з розвинутим матриксом. Вона не була прикріпленою до кореня по всій своїй площі. Ділянки біоплівки, які були прикріплені до кореня мали вигляд тяжів.

Біоплівка *L. plantarum* ONU 87 мала значну товщину та рівномірність по поверхні. В біоплівці бактерій цього штаму виявлено зони з різним рівнем розвитку матриксу. З віддаленням від кореня біоплівка ставала менш щільною. В цілому сформованість біоплівки штамів *L. plantarum* можна якісно оцінити як «+++» для *L. plantarum* ONU 12 та «++++» для *L. plantarum* ONU 87.



Для подальшого вивчення механізмів адгезії лактобацил до поверхні коріння проростків крес-салату використано штам *L. plantarum* ONU 87, який більш здатний до формування біоплівки. У зв'язку з тим, що механізми адгезії бактерій роду *Lactobacillus* є добре вивченими [5], з'ясування механізмів адгезії та формування біоплівки здійснювали шляхом інактивації поверхневих поліцукридів, тейхоєвих кислот та S-шару.

Отримані результати (рис. 2) свідчать про те, що всі три основні групи адгезинів тою чи іншою мірою обумовлюють адгезію та формування біоплівки штаму *L. plantarum* ONU 87 на поверхні коренів тест-рослин. Так, обробка клітин штаму *L. plantarum* ONU 87 метаперіодатом натрію, що призводить до інактивації поверхневих поліцукридів (рис. 2.), не впливала на здатність клітин бактерій штаму до адгезії, але порушувала формування мікроколоній. Оцінка сформованості біоплівки змінювалася з «++++» у контролі до «+» (табл. 3). Отримані результати уможливають припущення, що поверхневі поліцукриди не впливають на адгезію клітин до поверхні кореня тест-рослин, але обумовлюють агрегацію клітин, тобто формування мікроколоній.

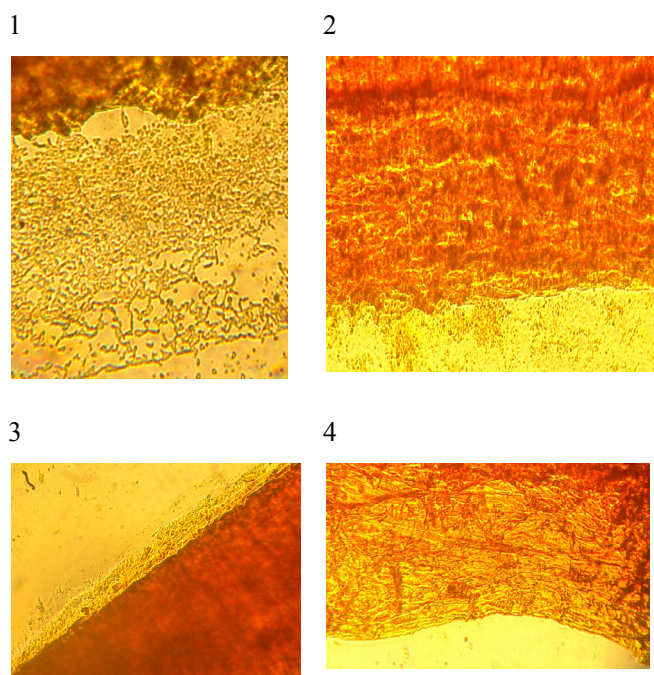


Рис. 2. Біоплівка бактерій *L. plantarum* ONU 87 на поверхні коренів крес-салату за інактивації окремих груп адгезинів

1 — контроль; 2 — інактивація поверхневих поліцукридів;
3 — інактивація тейхоєвих кислот; 4 — інактивація S-шару

Fig.2. *L. plantarum* ONU 87 biofilm formation on the surface of the roots of tested plants after different adhesions groups inactivation

1— control; 2 — surface polysaccharide inactivation;
3 — teichoic acid inactivation; 4 — S-layer inactivation

Вилучення тейхоевих кислот (рис. 2) також призводить до порушення структури біоплівки бактерій *L. plantarum* ONU 87. Обробка бактерій 30% ТХО не порушувала адгезію та формування мікроколоній, проте оброблені таким чином клітини формували біоплівку зі значно порушеною архітектурою. Біоплівка мала вигляд окремих мікроколоній практично не зв'язаних між собою. Можна припустити, що у системі взаємодії бактерій *L. plantarum* ONU 87 з коренями крес-салату, тейхоеві кислоти відіграють провідну роль у дозріванні біоплівки. Якісна оцінка формування біоплівки змінювалася з «++++» до «++» у порівнянні з контролем (табл. 3).

Таблиця 3

Оцінка сформованості біоплівки бактерій *L. plantarum* ONU 87 за вибіркової інактивації основних груп адгезинів

Table 3

Changes in quality of *L. plantarum* ONU 87 biofilm after selective inactivation of the major adhesions groups

Інактивовані адгезини	Оцінка сформованості біоплівки
Контроль	++++
Поліцукриди	+
Тейхоеві кислоти	++
Білки S-шару	-

Інактивація білків S-шару клітин *L. plantarum* ONU 87 5M розчином LiCl призводила до повної втрати клітинами здатності до адгезії на коренях крес-салату (рис. 2). S-шар є складним комплексом поверхневих білків, які знаходяться у кристалічній формі [8]. Ця структура розташована на поверхні клітин бактерій і виконує декілька важливих функцій, у тому числі відповідає за адгезію. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що у змодельованій системі взаємодії між *L. plantarum* ONU 87 та кореневою системою тест-рослини, ключовим компонентом, який відповідає за адгезію, є саме білки S-шару.

Таким чином, підсумовуючи отримані результати можна зробити висновок, що досліджені бактеріоциногенні штами *L. plantarum* проявили досить добру здатність до формування біоплівки на коренях тест-рослин. Механізм адгезії бактерій *L. plantarum* ONU 87 до коренів крес-салату переважно залежить від білків S-шару. Поліцукриди, що розташовані на поверхні клітинної стінки відповідають, очевидно, за формування мікроколоній, а тейхоеві кислоти — за процес дозрівання біоплівки.

Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що *L. plantarum* ONU 87 у зв'язку зі здатністю до формування біоплівки та



синтезу бактериоцинів може бути перспективним для подальшого дослідження як потенційний компонент пробіотичного препарату для захисту рослин від інфікування фітопатогенними бактеріями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Amellal N., Burtin G., Bartoli F., Heulin T. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 3740–3747.
2. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. // Plant Physiology. – 2004. – V. 134. – P. 307–319.
3. Costerton J.W. Overview of microbial biofilms. // J. Ind. Microbiol. – 1995. – V. 15. – P. 137–140.
4. Davey Marry Ellen, O'Toole George A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiology and molecular biology reviews. – 2000. – V. 64. – № 4. – P. 847–867.
5. Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J., Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 94. – P. 981–987.
6. Lorca G., Torino M.I., de Valdez G.F., Ljungh A. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 206. – P. 31–37
7. Lugtenberg B.J.J., Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – V. 81. – P. 373–383.
8. Mobili P., Gerbino E., Tymczynszyn E.E., Gómez-Zavaglia A. S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. // Curr. Res. Tech. Ed. Top. in Appl. Microbiol. and Biotech. (Ed) A. Mendez-Vilas. – 2010. – P. 1224–1234.
9. Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Onilude A.A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. // African J. Biotech. – 2003. – V. 2. – P. 219–227.
10. Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Warner P.J., Jiménez-Díaz R. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a Bacteriocin Producer, as a Starter Culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60. – P. 2059–2064.
11. Stanghellini M.E., Miller R.M. Biosurfactants. Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. // Plant Disease. – 1997. – V. 81. – P. 4–12.
12. Zárata G., Morata De Ambrosini V., Chaia A.P., González S. Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium*

acidipropionici CRL 1198 to intestinal epithelial cells. // Can. J. Microbiol. – 2002. – V. 48. – P. 449–457.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2012 р.

Н.Б. Галкин, Н.В. Лиманская, Т.О. Филиппова, В.А. Иваница

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

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ БАКТЕРИЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА КОРНЯХ *LEPIDIUM SATIVUM* L.

Реферат

Проведено изучение формирования биоплёнки клетками бактериоциногенных штаммов *Lactobacillus plantarum* на поверхности корней тест-растений крес-салата *Lepidium sativum*. Показано, что оба исследованных штамма обладают способностью к адгезии и формированию биоплёнки в отличие от молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*. Исследование механизмов образования биоплёнки бактериями штамма *Lactobacillus plantarum* ONU 87 на корневой системе растений показало, что избирательная инактивация основных групп адгезинов по-разному влияет на этот процесс. Инактивация S-слоя приводила к прекращению адгезии, инактивация поверхностных полисахаридов — к прекращению формирования микроколоний, а инактивация тейхоевых кислот — к ингибированию процесса созревания биоплёнки.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, биоплёнка, адгезины, *Lepidium sativum* L.

M.B. Galkin, N.V. Limanska, T.O. Philipova, V.O. Ivanytsia

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

BIOFILM FORMATION BY *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BACTERIA ON *LEPIDIUM SATIVUM* L. ROOTS

Summary

Investigation of a biofilm formation ability of *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogenic strains on the plant roots shows that each used strain



has a good ability to adhesion and biofilm formation on the test-plant roots surface in contrast to *Lactococcus lactis*. Study of the mechanisms of biofilm formation by test strains on the root system of plants has shown that selective inactivation of the major groups of adhesions different by influences on this process. Since inactivation of S-layer led to the cessation of adhesion, inactivation of surface polysaccharides to the cessation of microcolonies formation and inactivation of teichoic acids to the inhibition of the biofilm maturation process.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, biofilm, adhesions, *Lepidium sativum* L.



УДК 579.222: 547.562.4: 582.284

О.В. Федотов, А.К. Велигодська

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

ЗАГАЛЬНИЙ ВМІСТ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН У ДЕЯКИХ ВИДІВ БАЗИДИОМІЦЕТІВ

*Досліджено загальний вміст поліфенольних речовин у карпофорах 50 видів базидіоміцетів з яких 27 належать до порядку Polyporales та 23 – порядку Agaricales. Інтродуковано 23 штами 8 видів базидіальних грибів, для яких визначена динаміка росту та накопичення поліфенольних речовин в міцелії та культуральному фільтраті при ферментації на глюкозо-пептонному середовищі. Відібрано штами видів *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *Fistulina hepatica* та *Laetiporus sulphureus* – перспективні для подальших досліджень з метою отримання поліфенолів міцеліального та позаклітинного походження.*

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

В останні десятиріччя актуальною проблемою є пошук нових біологічно активних речовин (БАР) та їх продуцентів з метою розробки та впровадження у виробництво сучасних груп лікарських та лікувально-профілактичних засобів [1, 2].

Зокрема, затребуваними речовинами у різних галузях промисловості та медицині є поліфенольні сполуки, які є природними антиоксидантами, що протидіють розвитку різноманітних патогенних явищ у клітині та, як наслідок, численних захворювань [1, 5, 10]. До них відносять фенольні кислоти та альдегідні похідні, речовини поліфенолоксикарбонowego комплексу, каротиноїди, флавоноїди, меланіни, таніни тощо [6, 14].

Встановлено, що ці речовини синтезуються практично всіма рослинними та грибними організмами [2, 8]. Традиційними джерелами отримання поліфенолів є рослинна сировина – *Camellia sinensis* і *Humulus lupulus*, а також плоди *Vitis vinifera* [8, 12]. Низка наукових робіт присвячена дослідженню вмісту поліфенолів в грибах, зокрема вивчено загальних вміст поліфенольних речовин у плодкових тілах 49 видів їстівних грибів, що відносяться до родів *Boletus*, *Suillus*, *Volvariella*, *Pleurotus* і ін. [9, 15]. Однак, ці роботи дають недостатньо сформоване уявлення про якісний та кількісний вміст поліфенольних речовин в вищих базидіальних грибах та



мікологічному матеріалі при їх культивуванні, що обумовлює необхідність подальших скринінгових робіт у цьому напрямку.

Інтерес до базидіомицетів, в т.ч. і дереворуйнівних, по-перше обумовлений їх здатністю до синтезу численних БАР. Зокрема, здійснюючи деструкцію лігніноцелюлозного комплексу вони утворюють антиокисні речовини — оксидоредуктази, вітаміни, поліфеноли, блокатори утворення вільних радикалів і ін., що забезпечують адаптивні механізми антиоксидантного захисту ксилотрофів [11, 13, 14]. По-друге, міцеліальні культури цих організмів невибагливі до складу живильних середовищ, переважна їх більшість є їстівними та неотруйними і можуть бути використані в мікробіологічному виробництві БАР.

Метою роботи було вивчення загального вмісту поліфенольних речовин у карпофорах та в міцелії і культуральному фільтраті деяких видів базидіомицетів.

Матеріали і методи

Матеріалами дослідження були карпофори, міцелії та культуральний фільтрат 50 видів макроміцетів, з яких 27 належать до порядку *Polyporales* та 23 — порядку *Agaricales* відділу *Basidiomycetes*. Загальні відомості щодо досліджених видів базидіальних грибів представлено в публікації [5] та в відповідних розділах статті. Також матеріалом дослідження були 23 штами з колекції культур шапинкових грибів кафедри фізіології рослин Донецького національного університету: *Fomes fomentarius* (L. ex Fr.) Gill. — T-10, Ff-09, Ff-1201; *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. — Ls-08, Ls-09; *Fistulina hepatica* Schff. ex Fr. — Fh-08, Fh-18; *Flammulina velutipes* (Curt.: Fr.) Sing. — F-03, F-06, F-1, F-202; *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. — Hk-35, P-004, P-01, P-039, P-107, P-192, P-208; *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. — Sc-10, Sc-1101, Sc-1102; *Trametes hirsuta* (Wulf.:Fr.) Pil. — Th-11 та *Trichaptum bifforme* (Fr.) Ryv. — Tb-11. Переважна більшість інтродукованих штамів виділена в чисту культуру з дикоростучих плодових тіл (ПТ) базидіомицетів, зібраних в різних місцевостях Донецької області, систематичне положення яких встановлено згідно сучасних літературних джерел [7].

З метою вивчення загального вмісту поліфенолів, зібрані ПТ висушували та подрібнювали до розміру часток $0,1 \pm 0,01$ мм, а дослідні штами культивували поверхнево в колбах Ерленмейера вмістом 250 мл на глюкозо-пептонному живильному середовищі (ГПС, рН₀ $6,5 \pm 0,2$) об'ємом 50 мл наступного складу, г/ л: глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; KH_2PO_4 — 0,6; K_2HPO_4 — 0,4; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; CaCl_2 — 0,05; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів на сусло-агарі. Температура культивування $27,5$ °С. Термін культивування — 6, 9 та 12-ть діб. Після закінчення терміну культивування, міцелії при 5 ± 1 °С відділяли від культуральної рідини

шляхом фільтрування. Отриманий міцелій додатково підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до $1 \pm 0,5$ °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання в охолодженій ступці. В подальших дослідженнях використовували подрібнені карпофори (ПК), гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ).

Абсолютно суху біомасу (АСБ) ПК та міцелію визначали ваговим методом [17].

Визначення загального вмісту (W) поліфенольних (ПФ) речовин проводили у спиртових витяжках мікологічного матеріалу за модифікованою методикою Фоліна-Чокальтеу [16] та розраховували за формулою:

$$W = \frac{(D - D_{inter}) \times V_s}{S_{std} \times M_s \times W_{dm} \times S}$$

де: M_s — маса проби; D — оптична густина розчину; D_{inter} — точка перетину калібрувальної прямої з віссю y ; S_{std} — коефіцієнт нахилу калібрувальної прямої; V_s — об'єм екстракту (5 мл); $W_{dm} \times S$ — вміст сухої речовини в пробі.

Дослідження проводили у трикратній повторності. Статистичне опрацювання проводили з використанням програм для проведення статистичного опрацювання результатів біологічних експериментів. З метою визначення рівня кореляції між вмістом ПФ у міцелії та КФ одноковікових культур проводили кореляційний аналіз. Достовірною вважалася різниця за рівня вірогідності $P > 0,95$ [3].

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження було проведено оцінку загального вмісту поліфенолів у 225 карпофорах 27 видів поліпоральних та у 220 — 23 видів агарикальних грибів (табл.).

Таблиця

Загальний вміст поліфенолів у плодових тілах деяких видів базидіоміцетів

Table

Total content of polyphenols in fruit bodies of some species of Basidiomycetes

Вид	Кількість досліджених зразків ПТ	Вміст поліфенольних речовин, мг/г
1	2	3
Порядок <i>Polyporales</i>		
<i>Auricularia auricula-judae</i> *	12	$32,53 \pm 3,52$
<i>Laeticorticium roseum</i> *	3	$20,02 \pm 0,58$
<i>Chaetoporus ambiguus</i> *	6	$20,66 \pm 0,95$
<i>Sparassis crispa</i> *	9	$10,54 \pm 0,19$



Продовження таблиці

1	2	3
<i>Fibuloporia mollusca</i> *	6	10,54 ± 0,35
<i>Tyromyces lacteus</i> *	9	16,07 ± 0,76
<i>Tyromyces revolutus</i> *	3	12,09 ± 0,16
<i>Tyromyces undosus</i> *	6	10,33 ± 0,13
<i>Irpex lacteus</i> *	9	26,75 ± 0,43
<i>Amyloporia lenis</i> *	3	15,05 ± 0,21
<i>Hydnum ochraceum</i> *	3	10,02 ± 0,24
<i>Trametes squalens</i> *	6	15,07 ± 0,28
<i>Trametes campestris</i> *	6	20,14 ± 0,41
<i>Trametes versicolor</i> *	15	14,13 ± 0,71
<i>Trametes zonatus</i> *	9	15,06 ± 0,52
<i>Fomes fomentarius</i> *	12	248,29 ± 5,84
<i>Heterobasidion annosum</i> *	12	13,33 ± 0,64
<i>Fomitopsis pinicola</i> *	6	39,19 ± 0,58
<i>Daedalea quercina</i> *	6	9,02 ± 0,13
<i>Piptoporus betulinus</i> *	12	15,10 ± 0,10
<i>Polyporus squamosus</i> *	9	23,20 ± 0,37
<i>Laetiporus sulphureus</i> *	9	117,04 ± 0,56
<i>Ganoderma applanatum</i> *	9	161,08 ± 0,19
<i>Ganoderma lucidum</i> *	15	89,06 ± 1,5
<i>Inonotus obliquus</i> *	12	20,55 ± 0,31
<i>Phellinus igniarius</i> *	9	34,53 ± 0,55
<i>Phellinus pomaceus</i> *	9	19,04 ± 0,59
Порядок <i>Agaricales</i>		
<i>Agaricus arvensis</i> *	5	24,57 ± 4,07
<i>Agaricus bisporus</i> **	9	35,44 ± 0,63
<i>Agaricus campestris</i> *	5	23,46 ± 0,10
<i>Agrocybe cylindracea</i> **	9	75,85 ± 1,22
<i>Coprinus comatus</i> *	15	25,04 ± 0,58
<i>Coprinus micaceus</i> *	15	25,03 ± 0,15
<i>Fistulina hepatica</i> *	9	172,25 ± 0,20
<i>Flammulina velutipes</i> *	27	81,25 ± 7,75
<i>Flammulina velutipes</i> **	3	65,06 ± 0,92
<i>Lentinus edodes</i> **	9	35,47 ± 0,42



Закінчення таблиці

1	2	3
<i>Marasmius oreades</i> *	3	37,08 ± 0,65
<i>Pleurotus citrinopileatus</i> **	3	37,55 ± 0,11
<i>Pleurotus eryngii</i> **	6	15,03 ± 0,42
<i>Pleurotus ostreatus</i> *	34	100,56 ± 3,15
<i>Pleurotus ostreatus var. Florida</i> **	3	53,07 ± 2,01
<i>Kuehneromyces mutabilis</i> *	9	32,28 ± 0,83
<i>Pholiota aurivella</i> *	3	18,02 ± 0,35
<i>Pholiota squarrosa</i> *	3	12,04 ± 0,65
<i>Schizophyllum commune</i> *	21	19,29 ± 0,27
<i>Stropharia aeruginosa</i> *	3	32,53 ± 0,54
<i>Stropharia rugosoannulata</i> **	6	59,56 ± 1,85
<i>Lyophyllum loricatum</i> *	5	21,37 ± 0,63
<i>Lyophyllum connatum</i> *	5	20,42 ± 0,12
<i>Tricholoma flavovirens</i> *	5	79,08 ± 0,20
<i>Tricholoma sejunctum</i> *	5	31,48 ± 0,52

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

Аналіз вмісту поліфенольних речовин в карпофорах поліпорових грибів показав наступне. Переважна частина (85%) їх ПТ має незначний вміст поліфенольних речовин, який знаходиться в межах від 9 мг/г (*D. quercina*) до 39 мг/г (*F. pinicola*). У другу групу входять 3 види поліпорових грибів (*G. lucidum*, *L. sulphureus* та *G. applanatum*) з вмістом поліфенолів у ПТ від 89 мг/г до 161 мг/г АСБ. Найбільший вміст поліфенолів — понад 248 мг/г АСБ мають плодові тіла трутового гриба *F. fomentarius*. Для порівняння отриманих результатів, зазначимо, що запатентовано метод екстракції діючих речовин з карпофорів чаги *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pil. з максимальним вмістом ПФ 140 мг/г АСБ при водній екстракції [4, 18].

Дослідження вмісту поліфенольних речовин в карпофорах агарикальних грибів виявило, що серед цих грибів переважна, але менша ніж у поліпорових, частина (74%) має незначний вміст поліфенолів у ПТ. Тут він знаходиться в межах від 12 (*P. squarrosa*) до 37 мг/г (*P. citrinopileatus*). У групу з помірним вмістом від 53 до 101 мг/г поліфенолів у плодкових тілах, можна віднести 5 видів агарикальних грибів: *P. ostreatus*, *S. rugosoannulata*, *T. flavovirens*, *F. velutipes* та *A. cylindracea*. Найвищий вміст, близько 172 мг/г поліфенолів зареєстровано в дикоростучих плодкових тілах *F. hepatica*. Однак, цей показник більш як в 1,5 рази



нижче вмісту фенольних речовин в плодових тілах трутового гриба *F. fomentarius*. Для порівняння зазначимо, що середній вміст поліфенолів в рослинній сировині *Camellia sinensis* складає 450 мг/г, а у мікологічному матеріалі – плодових тілах *P. ostreatus* – 70 мг/г АСБ [8, 12].

Вивчення вмісту поліфенолів в спиртових екстрактах з плодових тіл 50 видів базидіомицетів дозволило виділити види трутових грибів – *G. lucidum*, *L. sulphureus*, *G. applanatum* та *F. fomentarius* і види агарикових грибів – *S. rugosoannulata*, *A. cylindracea*, *T. flavovirens*, *F. velutipes*, *P. ostreatus* та *F. hepatica* з високим вмістом цих речовин понад 60 мг/г АСБ.

Наступним етапом дослідження було отримання чистих культур з карпофорів, а також вивчення динаміки росту та інтенсивності синтезу поліфенольних речовин деяких з них при культивуванні на ГПС.

Результати накопичення штамми АСБ в динаміці росту (на 6-ту, 9-ту та 12-ту добу культивування) представлені на рис. 1. Як бачимо, всі культури досягають максимуму цього показника на 12-ту добу росту. Найпродуктивнішими тут є штами *S. commune* Sc-1101 і Sc-10 та штами *F. velutipes* F-202. Найнижчі значення накопичення АСБ зафіксовані для штаму *P. ostreatus* P-192 та штаму *F. fomentarius* Ff-09. Отже, досліджені культури мають індивідуальні значення росту – накопичення біомаси в застосованих умовах культивування, що, ймовірно, відображає придатність цих умов для їх росту.

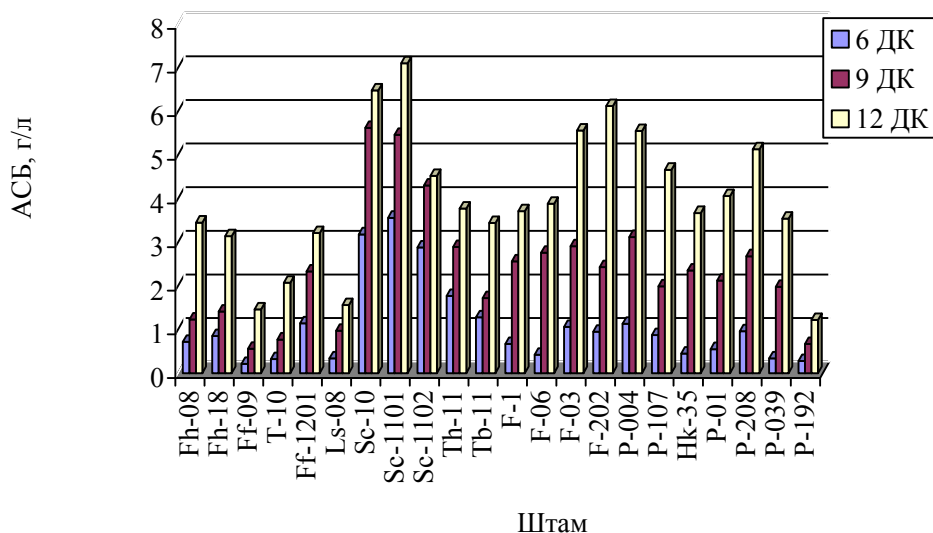


Рис. 1. Динаміка накопичення АСБ штамми базидіомицетів (ДК – доба культивування)

Fig. 1. Dynamics of accumulation of absolute dry biomass by the strains of Basidiomycetes (DC – day of cultivation)

Результати вивчення загального вмісту поліфенольних речовин у міцелії та культуральному фільтраті в динаміці росту деяких штамів базидіоміцетів представлені на рис. 2 і 3.

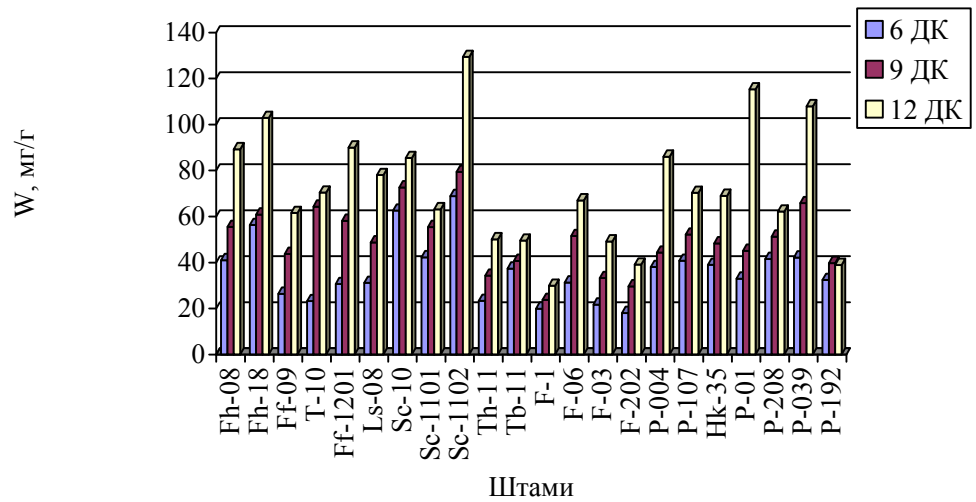


Рис. 2. Динаміка накопичення поліфенолів у міцелії штамів базидіоміцетів (ДК – доба культивування)

Fig. 2. Dynamics of accumulation of polyphenols at mycelium of the strains of Basidiomycetes (DC – day of cultivation)

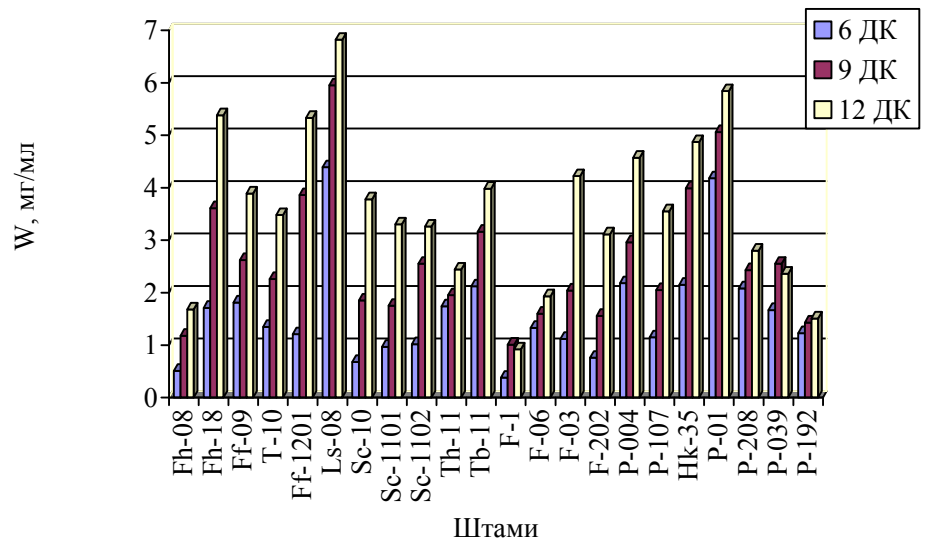


Рис. 3. Динаміка накопичення поліфенолів у КФ штамів базидіоміцетів (ДК – доба культивування)

Fig. 3. Dynamics of accumulation of polyphenols at culture filtrate of the strains of Basidiomycetes (DC – day of cultivation)



Встановлено, що переважна більшість штамів здатна до накопичення поліфенольних речовин як в міцелії так і в КФ протягом всього терміну культивування. Максимум вмісту ПФ у міцелії для 96 %, та у КФ — для 91% від загальної кількості штамів співпадав із закінченням терміну їх культивування.

Динаміка вмісту поліфенольних речовин в міцелії досліджених штамів має наступні характеристики. Найвищий вміст цих речовин в межах від 107,9 до 129,4 мг/г зареєстровано для штамів *P. ostreatus* P-039 і P-208 та штаму *S. commune* Sc-1102 на 12 добу їх росту. Найнижчі ж показники вмісту ПФ від 29,9 до 50,1 мг/ г зафіксовано для штамів *F. velutipes* F-1, F-202 і F-03 та штаму *P. ostreatus* P-192 наприкінці терміну культивування.

Вивчення динаміки вмісту поліфенольних речовин в культуральному фільтраті досліджених штамів показало, що на 12-ту добу росту зареєстровано найвищий вміст ПФ в межах від 5,4 до 6,8 мг/мл для штамів *F. hepatica* Fh-18, *L. sulphureus* Ls-08 та *P. ostreatus* P-01, а найнижчий — від 0,9 до 1,7 мг/мл для штамів *F. hepatica* Fh-08, *P. ostreatus* P-192 та *F. velutipes* F-1.

В усіх випадках вміст поліфенолів в міцелії був значно вищим за вміст цих речовин у культуральному фільтраті та коливався на 12-ту добу культивування від 11,4 разів для штаму *L. sulphureus* Ls-08 до 52,9 разів для штаму *F. hepatica* Fh-08. Значна різниця між здібністю штамів до синтезу та накопичення ПФ у міцелії та КФ, скоріше за все, пояснюється реалізацією їх генотипу в умовах досліду.

Обчислення коефіцієнту кореляції між вмістом ПФ у міцелії та КФ однодієвих культур показало наступне. Спостерігається дуже висока позитивна кореляція у 73,2%, висока позитивна — у 17,4% та середня — у 4,5% дослідів.

Таким чином, результати визначення загального вмісту поліфенольних речовин у деяких видів базидіомицетів дозволяють зробити наступні висновки. Види трутових грибів — *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Laetiporus sulphureus* та *Fomes fomentarius* і види агарикових грибів — *Stropharia rugosoannulata*, *Agrocybe cylindracea*, *Tricholoma flavovirens*, *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus* та *Fistulina hepatica* характеризуються найвищим вмістом поліфенольних речовин в карпофорах. Інтродуковані штами в переважній більшості здатні до накопичення поліфенольних речовин як в міцелії, так і в КФ протягом всього терміну культивування. Штами *P. ostreatus* P-01 та *F. hepatica* Fh-18 і *L. sulphureus* Ls-08 — перспективними для подальших досліджень з метою отримання поліфенолів позаклітинного, а штами *S. commune* Sc-1102 та *P. ostreatus* P-039 і P-208 — міцеліального походження.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения / М.Н. Запрометов. — М.: Наука, 1993. — 271 с.
2. *Никитина В.С.* Антибактериальная активность полифенольных соединений, выделенных из растений семейств *Geraniaceae* и *Rosaceae* / В.С. Никитина; Л.Ю. Кузьмина, А.И. Мелентьев, Г.В. Шендель // Прикладная биохимия и микробиология. — 2007. — Т. 43, № 6. — С. 705–712.
3. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.
4. *Сысоева М.А.* Структурная организация и свойства полифенолов чаги / М.А. Сысоева, О.Ю. Кузнецова, В.С. Гамаюрова // Вестник Казанского технологического университета (КГТУ). 2005. — № 1. — С. 244–250.
5. *Федотов О.В.* Колекція культур шапинкових грибів — основа мікологічних досліджень та стратегії збереження біорізноманіття базидіоміцетів / О.В. Федотов, О.В. Чайка, Т.Є. Волошко, А.К. Велигодська // Вісник Донецького університету, Сер. А: Природничі науки, вип. 1. — Донецьк: ДонНУ, 2012. — С. 209–213.
6. *Asatiani M.D.* Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants / M.D. Asatiani, G. Elisashvili, A.Z. Songulashvili, V. Reznick, S.P. Wasser // Progress in Mycology. — 2010. — P. 311–327.
7. *Kirk P.M.* Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers — Wallingford, CAB International, 2001. — 655 p.
8. *Li Fu* Total phenolic contents and antioxidant capacities of herbal and tea infusions / Li Fu, Bo-Tao Xu, Ren-You Gan, Yuan Zhang, Xiang-Rong Xu, En-Qin Xia, Hua-Bin Li // International Journal of Molecular Sciences. — 2011. — Vol. 12 (4). — P. 773–779.
9. *Guthalu* Puttaraju Nethravathi Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms / Nethravathi Guthalu Puttaraju, Sathisha Upparahalli Venkateshaiah, Shylaja Mallaiiah Dharmesh, Shashirekha Mysore Nanjaraj Urs and Rajarathnam Somasundaram // J. Agric. Food Chem. — 2006. — 54 (26). — P. 9764–9772.
10. *Shivashankara K.S.* Bioavailability of Dietary Polyphenols and the Cardiovascular Diseases / K.S. Shivashankara, S.N. Acharya // The Open Nutraceuticals Journal. — 2010. — Vol. 3. — P. 227–241.
11. *Peyrat-Maillard M.N.* Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection / M.N. Peyrat-Maillard, S. Bonnely, C. Berset // Talanta. — 2000. — V. 51. — P. 709–716.
12. *Halvorsen B.L.* A systematic screening of Total Antioxidants in dietary plants / B.L. Halvorsen., K. Holte M.C.W. Myhrstad // J. Nutr. — 2002. — V. 132. — P. 461–471.
13. *Fedotov O.V.* Wood-destroying fungi as bio-sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov — Plant and Microbial



Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications — Tbilisi: Myza, — 2007. — P. 125–126.

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

15. *Guo Ya–Jun* Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro–fungi / Ya–Jun Guo, Gui–Fang Deng, Xiang–Rong Xu, Shan Wu, Sha Li, En–Qin Xia, Fang Li, Feng Chen, Wen–Hua Ling and Hua–Bin Li // *Food & Function.* — 2012. — Vol. 8. — P. 709–716.

16. *Мусиенко М.М.* Спектрофотометрические методы в практике физиологии, биохимии и экологии растений / М.М. Мусиенко, Т.В. Паршикова, П.С. Славный. — К.: Фитосоцицентр, 2001. — 200 с.

17. *Государственная Фармакопея СССР.* — XI изд. — Вып. 1. — М.: Медицина, 1987. — 336 с.

18. *Патент 2448721* России. Способ получения экстракта чаги / Кузнецова О.Ю., Сысоева М.А. Заявка № 2010124076/15 від 11.06.2010, МПК А61К36/06, В01D11/02 (2006.01), Бюл. № 12 від 27.04.2012.

Стаття надійшла до редакції 17.09.2012 р.

О.В. Федотов, А.К. Велигодская

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

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

Исследовано общее содержание полифенольных веществ в карпорфах 50 видов базидиомицетов из которых 27 относятся к порядку *Polyporales* и 23 — порядку *Agaricales*. Интродуцировано 23 штамма 8 видов базидиальных грибов, для которых определена динамика роста и накопления полифенольных веществ в мицелии и культуральном фильтрате при ферментации на глюкозо-пептонной среде. Отобраны штаммы видов *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *Fistulina hepatica* и *Laetiporus sulphureus* перспективные для дальнейших исследований с целью получения полифенолов мицелиального и внеклеточного происхождения.



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

O.V. Fedotov, A.K. Veligodska

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

TOTAL POLYPHENOL CONTENT IN SOME SPECIES OF BASIDIOMYCETES

Summary

Total polyphenol content in fruiting bodies of 50 species of basidiomycetes, 27 of which are belong to order *Polyporales* and 23 to order *Agaricales* was investigated. Dynamics of growth and accumulation of polyphenolic compounds in the mycelium and cultural filtrate of 23 strains of 8 species of basidiomycetes were studied. There were selected the strains of species *Sshizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *Fistulina hepatica* and *Laetiporus sulphureus* promising for the further research to develop the methods for polyphenols mycelial and extracellular origin.

Key words: polyphenols, basidiomycetes, carpophores, mycelium, cultural filtrate.



Є.Ю. Пахомова, М.Б. Галкін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

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

ВПЛИВ ВІСМУТОВИХ КОМПЛЕКСІВ ПОРФІРИНІВ І БАКТЕРІОФАГА НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ ТА СИНТЕЗ ПІОЦИАНІНУ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Встановлено, що за сумісного використання з порфіринами бактеріофаг P. aeruginosa потенціює інгібуючу дію вісмутових комплексів на процеси, контрольовані системою quorum sensing. Показано, що самі по собі вісмутові комплекси порфіринів знижують синтез піоціаніну та утворення біоплівки P. aeruginosa пропорційно їх концентрації у середовищі. Найбільшу інгібуючу активність виявляє Vi(III)-ТПП, найменшу – Vi(III)-ПП ІХ. За присутності 0,4 мкМ Vi(III)-ТПП кількість піоціаніну у добовій культурі зменшується у 1,8 разу від контролю. При 40 мкМ Vi³⁺-ТПП кількість пігменту була нижчою у 2,3 разу, а при 80 мкМ – у 3,1 разу. За присутності бактеріофага (2×10⁵ БУО/мл) вміст пігменту був нижчим у 2,5; 4,7 та 10 разів від контролю при концентраціях вісмутового комплексу ТПП 0,4; 4 і 80 мкМ, відповідно. Маса біоплівки за сумісного впливу бактеріофага і Vi(III)-ТПП утримувалася менша ніж при дії тільки одного порфірину. Вісмутові комплекси інших порфіринів чинять такий самий за спрямованістю ефект, але за кількісними показниками поступаються Vi(III)-ТПП. Встановлено, що за дії тільки бактеріофага формування біоплівки не порушується, але синтез піоціаніну суттєво зменшується.

Ключові слова: біоплівка, піоціанін, P. aeruginosa, бактеріофаг вісмутові комплекси порфіринів.

У зв'язку з широким розповсюдженням бактерій з множинною стійкістю до антибіотиків в останній час виникла концепція відродження фаготерапії – використання бактеріофагів в лікуванні інфекційних захворювань [15]. В більш широкому сенсі фаготерапія передбачає застосування не тільки живих фагів, але і їх білкових продуктів, які можуть вбивати бактерії або підвищувати їх чутливість до інших антимікробних засобів. До таких білків, перш за все, відносяться ферменти бактеріофагів, які розщеплюють пептидоглікани клітинних стінок бактерій, полісахаридні капсули та позаклітинні полімери [10,14]. Наявність деполімераз свідчить про можливість використання бактеріофагів або їх ферментів для руй-



нування бактеріальних біоплівки. Стійкість бактерій у складі біоплівки до антимікробних засобів значною мірою забезпечується матриксом, до складу якого входять різні біополімери [6,7,11]. Розщеплення полімерів зменшує в'язкість біоплівки, що сприяє підвищенню чутливості бактеріальних клітин до антибіотиків [5,13].

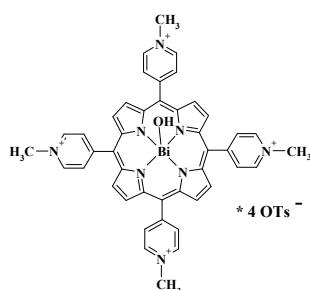
Раніше нами було показано, що комерційний препарат синьогнійного бактеріофага утворює негативні колонії на газоні *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692, але не впливає на формування цим штамом біоплівки та кількість планктонних клітин [3]. Тому було доцільним дослідити здатність цього бактеріофага потенціювати дію сполук, які попереджають утворення біоплівки *P. aeruginosa*.

Метою роботи було дослідження сумісного впливу синьогнійного бактеріофага і вісмутових комплексів синтетичних порфіринів — ефективних інгібіторів системи міжклітинної комунікації і формування біоплівки [1,4], на деякі показники функціонування системи quorum sensing *P. aeruginosa* ATCC 15692.

Матеріали і методи

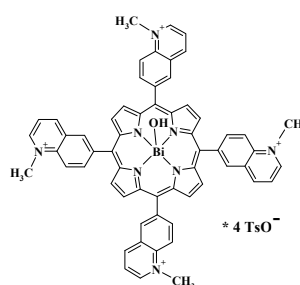
У роботі як тест-мікроорганізм використовували колекційний штам *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692.

Досліджені у роботі порфірини синтезовані у ПНДЛ-5 ОНУ імені І.І. Мечникова. Нижче наведені структурні формули, повні та скорочені назви цих речовин:



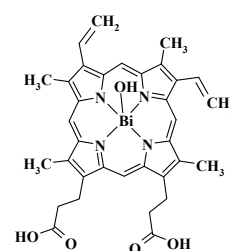
Ві(III)-мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірин

Ві(III)-ТПП



Ві(III)-мезо-тетра(6-N-метил-хінолінил)порфірин

Ві(III)-ТХП



Ві(III)-протопорфірин IX

Ві(III)-ПП IX

Джерелом бактеріофага слугував комерційний препарат «Бактеріофаг Псевдомонас аеругіноза (синьогнійний)» виробництва МікроГен з титром 10^7 бляшкоутворюючих одиниць в 1 мл.

Вивчення сумісного впливу синьогнійного бактеріофага і вісмутових комплексів синтетичних порфіринів на функціонування системи quorum sensing *P. aeruginosa* проводили у стаціонарній системі «планктон—біоплівка» за показниками: утворення біоплівки, синтез піюціаніну, кількість планктонних клітин.



Культивування здійснювали у 48-лункових планшетах «Nuclon». У кожну лунку поміщали 1 мл середовища Гіса з глюкозою без індикатора Андреде і вносили добову культуру *P. aeruginosa* до кінцевої концентрації 10^3 кл/мл. В експериментах з бактеріофагом у лунки вносили по 20 мкл комерційного препарату. Вісмутові комплекси порфіринів додавали до кінцевих концентрацій 0,4; 40 та 80 мкМ.

Планшети інкубували в термостаті при температурі 37 °С впродовж 24 годин. Після цього вимірювали оптичну густину планктонної культури на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 540 нм.

Біоплівки у планшетах відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом на протязі 10 хв. Після фіксації зразки забарвлювали водними розчином кристалічного фіолетового впродовж 5 хв. Біоплівку у планшетах після висушування при кімнатній температурі руйнували за допомогою лізуючого розчину 0,1 М NaOH + 1% SDS та інкубували при кімнатній температурі 1,5 год. Облік результатів проводили на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 592 нм [9].

Для визначення вмісту піоціаніну 5 мл супернатанту переносили у чисті пробірки, екстрагували 3 мл хлороформу і реекстрагували 1 мл 0,2 Н HCl до виникнення червоного забарвлення. Заміряли оптичну густину розчину піоціаніну у 0,2 Н HCl на спектрофотометрі “μQuant” (Угорщина) при довжині хвилі 510 нм [8].

Всі експерименти проводили тричі з 5 повторами в кожному.

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

Результати та їх обговорення

Одержані результати (рис. 1–3) свідчать про те, що досліджувані вісмутові комплекси порфіринів інгібують утворення біоплівки, синтез піоціаніну та зменшують вміст клітин *P. aeruginosa* у планктоні. Вираженість цих ефектів залежить від концентрації сполук у середовищі. Показано, що найбільшу пригнічуючу активність виявляє Ві(III)-ТПП. Вже за концентрації 0,4 мкМ цей комплекс знижує утворення біоплівки і синтез піоціаніну на 35% і 44%, відповідно.

Два інші комплекси у даній концентрації зменшують ці показники на 20–30%. За впливу більш високих концентрацій досліджуваних сполук спостерігаються більш суттєві відмінності між їх ефектами.

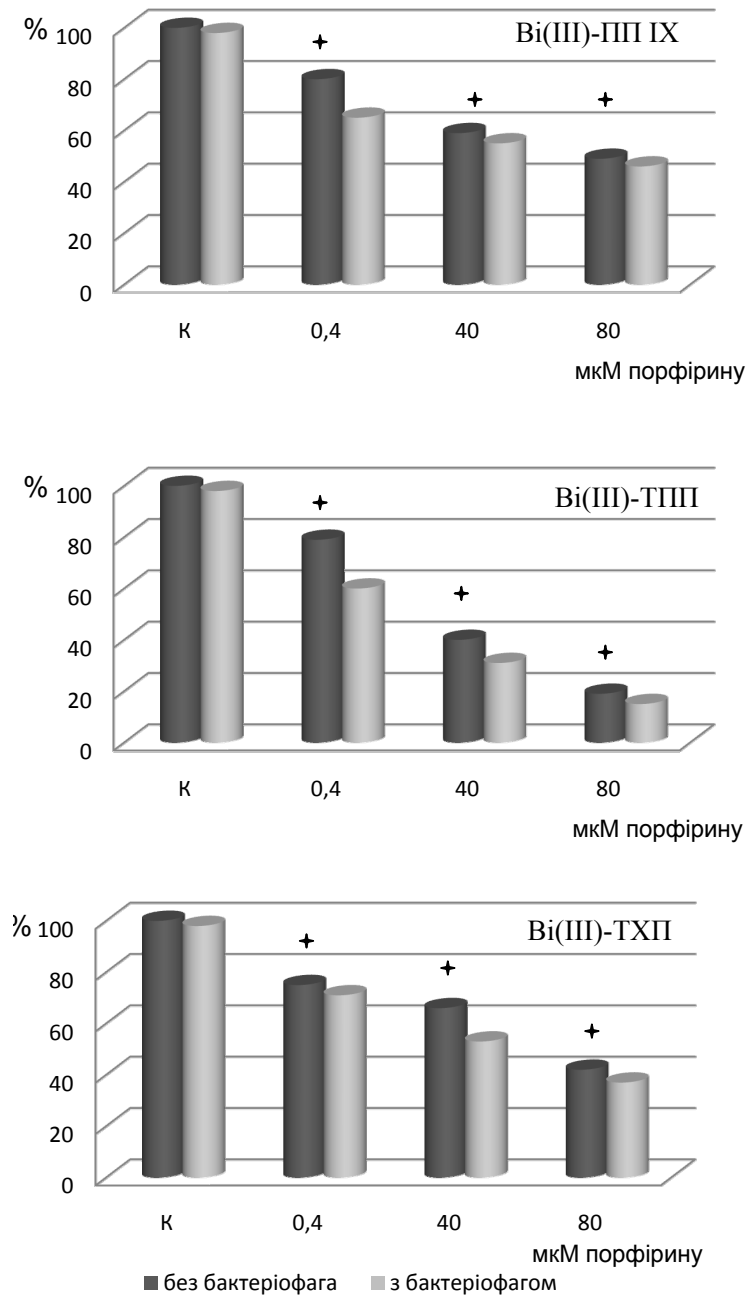


Рис. 1. Вміст планктонних клітин *P. aeruginosa* ATCC 15692 за впливу вісмутових комплексів порфіринів та бактеріофага

Примітка: — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig.1. *P. aeruginosa* ATCC 15692 planktonic cells contain on the porphyrines bismuth complexes and bacteriophage presence

Note: — significant different from control

Якщо за присутності 80 мкМ Ві(III)-ПП ІХ маса біоплівки становить біля 70% від контролю, то за дії Ві(III)-ТПП і Ві(III)-ТХП вона є нижчою у 12 та 5,5 разів, відповідно. Така сама залежність спостерігається при визначенні впливу на пігментоутворення *P. aeruginosa*. Більш високу інгібуючу активність у порівнянні з Ві(III)-ПП ІХ виявляють мезозаміщені вісмутові комплекси. Синтез піоціаніну зменшується у два рази за присутності вісмутового комплексу протопорфірину ІХ і у три рази за дії двох інших сполук. На нашу думку більша ефективність Ві(III)-ТПП і Ві(III)-ТХП може бути обумовлена присутністю в мезо-замісниках цих молекул чотирьох позитивно заряджених атомів азоту, що полегшує їх зв'язування з негативно зарядженою поверхнею клітин. В молекулі Ві(III)-ПП ІХ у бокових замісниках таких атомів немає. Крім того, цей комплекс може руйнуватися гемоксигеназою клітин.

Кількість клітин у планктоні (рис. 1) зменшується за впливу усіх досліджуваних сполук, але не так значно, як утворення біоплівки і синтез фенізінового пігменту. Оскільки пул планктонних клітин формується завдяки їх поділу та відкріпленню від біоплівки, можна припустити, що вісмутові комплекси порфіринів сприяють саме другому механізму. На користь цього свідчать отримані нами раніше дані про більш ефективне пригнічення досліджуваними сполуками росту *P. aeruginosa* у суспензійній культурі в порівнянні зі зменшенням вмісту клітин у рідкій фазі в системі «планктон–біоплівка» [12].

Наведені на рис. 1 і 2 дані демонструють, що за додавання тільки одного бактеріофага формування біоплівки і накопичення клітин у планктоні не порушуються. Однак при цьому вдвічі зменшується синтез піоціаніну (рис. 3). У разі сумісного використання з порфіринами препарат бактеріофага потенціє дію вісмутових комплексів, хоча у різному степені щодо окремих характеристик. Так, зменшення вмісту планктонних клітин спостерігається в усіх варіантах, але воно не перевищує 5–15% і не є достовірним (рис. 1). У той же час, контрольовані системою *quorum sensing* процеси формування біоплівки та синтез піоціаніну за присутності бактеріофага достовірно інгібуються у порівнянні з дією тільки одних порфіринів (рис. 2 і 3). Найбільш суттєві зміни (зниження у 2–3 рази) спостерігаються при концентраціях вісмутових комплексів 40 і 80 мкМ. Наприклад, за присутності 0,4 мкМ Ві(III)-ТПП кількість піоціаніну у добовій культурі зменшується у 1,8 разу від контролю, при 40 мкМ кількість пігменту була нижчою у 2,3 разу, а при 80 мкМ — у 3,1 разу. За додавання бактеріофага вміст пігменту був нижчим у 2,5; 4,7 та 10 разів від контролю при концентраціях вісмутового комплексу ТПП 0,4; 40 і 80 мкМ, відповідно. Маса біоплівки за сумісного впливу бактеріофага і Ві(III)-ТПП утричі менша ніж при дії тільки одного порфірину.

Вісмутові комплекси інших порфіринів чинять такий самий за спрямованістю ефект. Слід відмітити також значне зростання ефективності найменш активного з досліджуваних сполук Ві(III)-ПП ІХ.

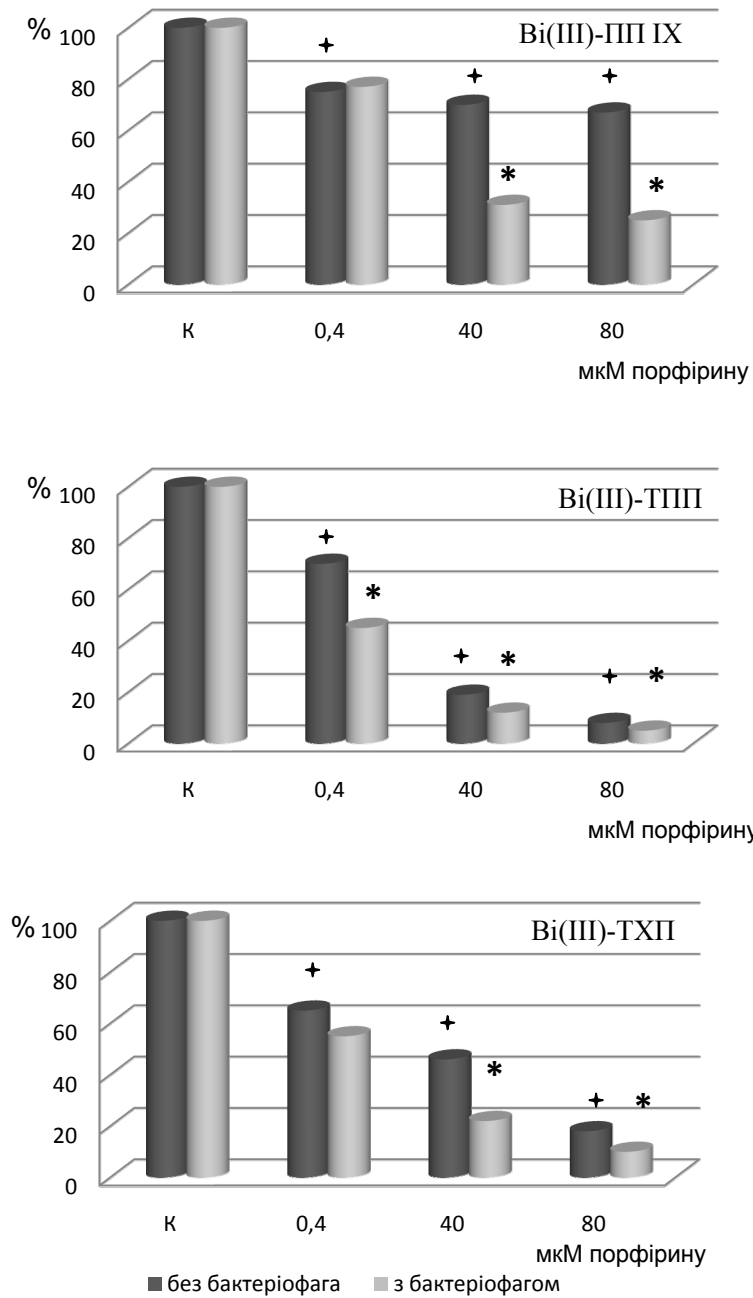


Рис. 2. Утворення біоплівки *P. aeruginosa* ATCC 15692 за впливу вісмутових комплексів порфіринів та бактеріофага

Примітка: * — різниця достовірна у порівнянні з дією тільки порфіринів
 — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. *P. aeruginosa* ATCC 15692 biofilm formation on the porphyrines bismuth complexes and bacteriophage presence

Note: * — significant different from porphyrines
 Note: — significant different from control

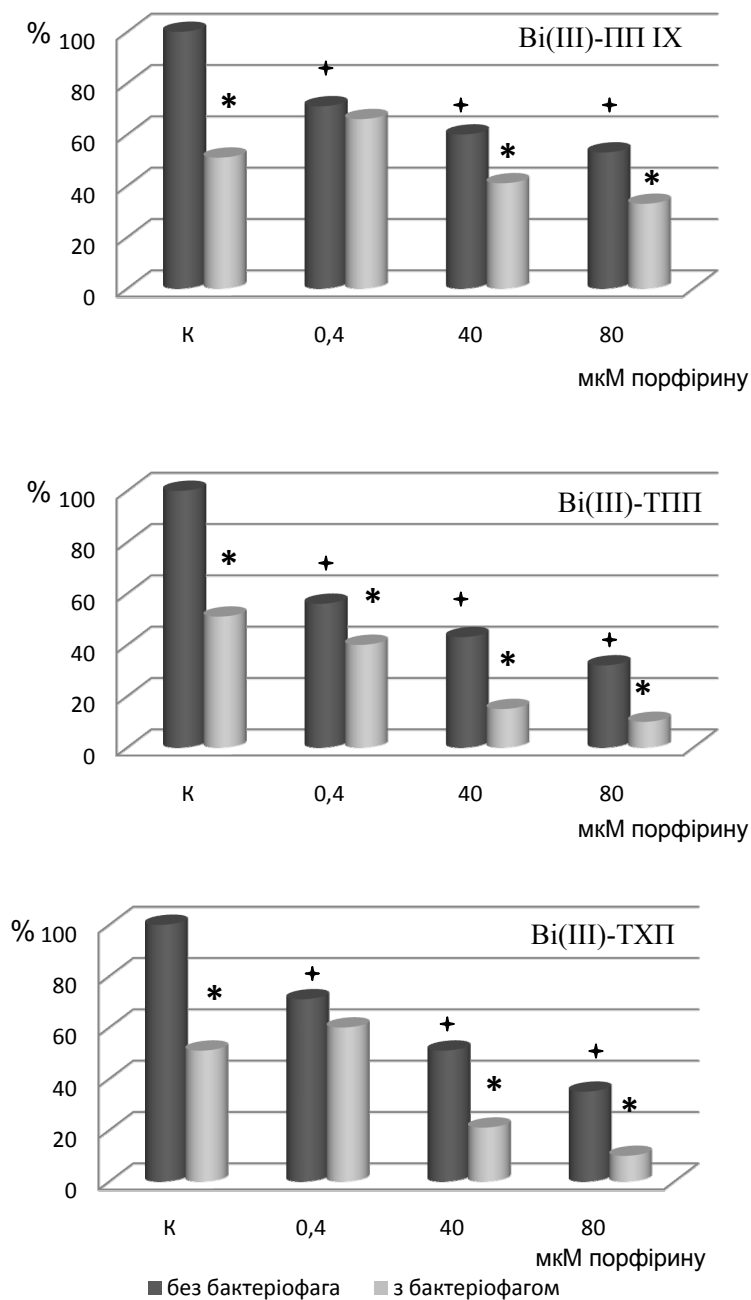


Рис. 3. Синтез піоціаніну *P. aeruginosa* ATCC 15692 за впливу вісмутових комплексів порфіринів та бактеріофага

Примітка: * — різниця достовірна у порівнянні з дією тільки порфіринів
 — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 3. *P. aeruginosa* ATCC 15692 piocyanin biosynthesis on the porphyrines bismuth complexes and bacteriophage presence

Note: — significant different from porphyrines

Note: — significant different from control

Таким чином, встановлено, що за комбінованого використання бактеріофага та інгібіторів системи quorum sensing *P. aeruginosa* спостерігається потенціювання ефектів цих засобів і пригнічення *rhl*-ланки міжклітинної комунікації *P. aeruginosa*. Значне зниження синтезу піоціаніну, як одного з факторів патогенності, зменшує інфекційний потенціал *P. aeruginosa*. Можливим механізмом потенціювання дії вісмутових комплексів порфіринів може бути розрідження матриксу біоплівки і слизового шару навколо клітин завдяки впливу деполімераз бактеріофага, що поліпшує контакт цих сполук з клітинами. Здатність самого препарату бактеріофага пригнічувати синтез піоціаніну свідчить про наявність в ньому компонентів, які є інгібіторами *rhl*-ланки quorum sensing. Останнє обґрунтовує доцільність дослідження більш широкого кола ознак, залежних від функціонування системи міжклітинної комунікації та її окремих ланок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Галкін М.Б., Водзінський С.В., Кириченко Г.М., Іваниця В.О. Особливості формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 при темновому та фотоіндукованому впливі вісмут-містких порфіринів // Мікроб. і біотехнол. — 2010. — № 3(11). — С. 51–60.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К. : Морион, 2001. — 260 с.
3. Пахомова Е.Ю., Галкин Н.Б., Филиппова Т.О. Формирование биопленки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 в присутствии порфиринов и бактериофага // Мат-ли Х міжнародної наукової конференції студентів та молодих науковців «Шевченківська весна 2012», Київ, 19–23 березня 2012. — С. 243–244.
4. Філіпова Т.О., Жіліна З.І., Іваниця В.О., Галкін М.Б., Малярчик І.О., Ішков Ю.В., Зінченко О.Ю. Антибактеріальна активність металокомплексу мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом // Вісник ОНУ. Біологія. — 2005. — Т. 10, вип. 7. — С. 167–172.
5. Alkawash M.A., Soothill J.S., Schiller N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. — APMIS. — 2006. — V. 114, № 2. — P. 131–138.
6. Chambless J., Hunt S., Stewart P. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — V. 72. — P. 2005–2013.
7. Cotter P.A., Stibitz S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // Curr. Opin. Microbiol. — 2007. — V. 10. — P. 17–23.
8. Essar D.W., Eberly L., Hadero A., Crawford I.P. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. // J. bacterial. — 1990. — V. 172. — № 2. — P. 884–900.
9. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model



for the adherence of staphylococci to medical devices // J. clin. microbiol. — 1985. — V. 22, № 6. — P. 996–1006.

10. *Fischetti V.A.* Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives // Trends Microbiol. — 2005. — V. 13. — P. 491–496.

11. *Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P.* Survival strategies of infectious biofilms // Trends Microbiol. — 2005. — V. 13. — P. 34–40.

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

13. *Glonti T., Chanishvili N., Taylor P.W.* Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Appl. Microbiol. — 2010. — V. 108, № 2. — P. 695–702.

14. *Sillankorva S., Neubauer P., Azeredo J.* Isolation and characterization of a T7-like lytic phage for *Pseudomonas fluorescens* // BMC Biotechnology. — 2008. — V. 8. — P. 79–90.

15. *Summers W.C.* Bacteriophage therapy // Annu Rev Microbiol. — 2001. — V. 55. — P. 437–451.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2012 р.

УДК 579.222:579.262

Е.Ю. Пахомова, Н.Б. Галкин, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова

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

ВЛИЯНИЕ ВИСМУТОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОРФИРИНОВ И БАКТЕРИОФАГА НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И СИНТЕЗ ПИОЦИАНИНА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Показано, что при совместном использовании с порфиринами препарат бактериофага *P. aeruginosa* потенцирует ингибирующее действие висмутовых комплексов на процессы, контролируемые системой *quorum sensing*. Сами по себе висмутовые комплексы порфиринов снижают синтез пиоцианина и образование биопленки *P. aeruginosa* пропорционально их концентрации в среде. Наибольшую угнетающую активность проявляет Bi(III)-ТПП , наименьшую — Bi(III)-ПП IX . В присутствии 0,4 мкМ Bi(III)-ТПП количество пиоцианина в суточной культуре уменьшается в 1,8 раза от контроля. При 40 мкМ Bi(III)-ТПП содержание пигмента было ниже в 2,3 раза, а при 80 мкМ — в 3,1 раза. В присутствии бактериофага (2×10^5 БОЕ/мл) содержание пигмента снижалось в 2,5; 4,7 та 10 раз от контроля при концентрациях висмутового комплекса



ТПП 0,4; 4 і 80 мкМ, відповідно. Маса біопленки при спільному впливі бактеріофага і Вi(III)-ТПП була менше втричі ніж при впливі тільки одного порфірину. Висмутові комплекси інших порфіринов надають такий же самий по направленості ефект, але по кількісним показателям поступають Вi(III)-ТПП. При використанні одного бактеріофага утворення біопленки не порушується, однак синтез піоціаніну суттєво знижується.

Ключевые слова: біопленка, піоціанін, *P. aeruginosa*, бактеріофаг висмутові комплекси порфіринов.

UDC 579.222:579.262

E.Yu. Pachomova, M.B. Galkin, B.M. Galkin, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@onu.edu.ua

ACTION OF PORPHYRINES BISMUTH COMPLEXES AND BACTERIOPHAGE ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION AND PIOCYNANIN BIOSYNTHESIS

Summary

It was shown that *P. aeruginosa* bacteriophage can possess inhibitory action on the quorum sensing system in presence of synthetic porphyrines bismuth complexes. Synthetic porphyrines bismuth complexes, used alone, show an ability to inhibit piocyanin biosynthesis depend of its concentration in culture media. Bi(III)-TPP shows the highest inhibitory activity, Bi(III)-ПП IX – the lowest. In presence of 0.4 μM Bi(III)-TPP piocyanin concentration in culture media decreases 1.8 times as compared to the control. In presence of 40 μM Bi(III)-TPP pigment concentration decreased 2.3 times and in presence of 80 μM – 3.1 times. In presence of bacteriophage (2×10^5 PFU/ml) and Bi(III)-TPP concentrations (0.4; 4 and 80 μM) pigment contain decreased 2.5; 4.7 and 10 times respectively. The biofilm mass on the synergistic action of the bacteriophage and Bi(III)-TPP was three times lower than in presence of this porphyrine bismuth complex alone. Bismuth complexes of other porphyrines used, show the same effects, but rather lower than Bi(III)-TPP. Bacteriophage used alone show no effects on the biofilm formation, while piocyanine biosynthesis in presence of bacteriophage strongly decreased.

Key words: biofilm, piocyanin, *P. aeruginosa*, bacteriophage, porphyrines bismuth complexes.



УДК 579. 266 / 68 (474)

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів,
79005, Україна, тел.: +38 (067) 492 76 81,
e-mail: m_gorishniy @ukr.net

ВПЛИВ МІНЕРАЛЬНОГО ТА ОРГАНІЧНОГО ЖИВЛЕННЯ НА КІЛЬКІСНІ ЗМІНИ ФОТОРЕАКЦІЙНИХ МОЛЕКУЛ У КЛІТИНАХ *CHLOROBIVUM LIMICOLA* ІМВ К-8

*Досліджено деякі метаболічні особливості кількісних змін фотореакційних молекул у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobivum limicola* ІМВ К-8. За максимумами абсорбційних поглинань встановлені відмінності у кількісному складі бактеріохлорофілів *c* і *d* та каротиноїдів ізоренієратину та хлоробактину, залежно від різних типів мінерального та органічного живлення. Концентрації бактеріохлорофілів *c* та *d*, та каротиноїдів хлоробактину та ізоренієратину зростали за умов одночасного інгібування процесів азотфіксації та глюконеогенезу і наявності низькомолекулярних джерел карбону.*

*Ключові слова: зелені сіркові бактерії, бактеріохлорофіли *c* і *d*, ізоренієратин та хлоробактин.*

Невелика група бактерій в природі здатна здійснювати аноксигенний фотосинтез — це зелені і пурпурові бактерії та геліобактерії. Перетворення квантової енергії в клітинах цих бактерій здійснюють бактеріохлорофіли та каротиноїди [2]. У зелених сіркобактерій цей процес відбувається у спеціалізованих везикулах — хлоросомах. Саме в цих структурах знаходяться бактеріохлорофіли *c*, *d* та *e*, а також ліпіди і каротиноїди. Бактеріохлорофіли виконують функцію світловловлюючих антен. Останні зв'язані з реакційним центром, локалізованим в плазмолемі, через бактеріохлорофіл *a*, який знаходиться в базальній пластинці і виконує функцію проміжної ланки при перенесенні енергії світла від хлоросом на реакційний центр [4, 5]. Зміни складу фоторецепторних молекул за різних умов живлення зелених сіркобактерій є не досліджені.

Метою роботи було дослідження зміни складу фоторецепторних молекул у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 за різних умов культивування.

© М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш, 2012



Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був штам зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* IMB К-8 [2, 4]. Для вирощування бактерій використовували середовище GSB (green sulfur bacteria), такого складу (г/л): KH_2PO_4 – 0,30, NH_4Cl – 0,34, KCl – 0,34, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,15, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5. Після автоклавування додавали окремо: 10% NaHCO_3 – 15 мл, 1 М $\text{Na}_2\text{S} \times 9\text{H}_2\text{O}$ – 2,5 мл, розчин вітаміну B_{12} (2 мкг/мл) – 1 мл, мікроелементи – 1 мл [1, 2, 4].

Суміш мікроелементів містила на літр дистильованої води: 25% HCl – 10 мл; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 г; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 190 мг; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 100 мг; ZnCl_2 – 70 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 36 мг; $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 24 мг; H_3BO_3 – 6 мг; і $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 2 мг. FeSO_4 розчинений у HCl , інші компоненти у дистильованій воді, рН середовища 6,7–6,8 [2, 4].

Додаткові органічні джерела карбону вносили у мінеральне середовище GSB завжди у концентрації 0,1% [3].

Анаеробні умови для культивування бактерій створювали шляхом заповнення посудини культивування середовищем доверху. При культивуванні на агаризованому середовищі у чашках Петрі використовували анаеростати (Gen box Jar 7.0 L, France) з поглиначем кисню.

Пігментний склад клітин аналізували після їх відділення від культуральної рідини, центрифугуванням при 12 000 г протягом години. Надосадову рідину зливали, клітини двічі відмивали мінеральним середовищем GSB, висушували на склі і розтирали з кварцовим піском. Окремі пігменти екстрагували сумішшю етанолу та ацетону у співвідношенні 1:1, процедуру екстракції повторювали чотири рази. Екстракти об'єднували і використовували для хроматографічного розділення пігментів та вивчення їх спектральних характеристик [2].

Хроматографічне розділення пігментів здійснювали на силуфольних пластинках Silufol у системі розчинника ацетон:бензин:петролейний ефір:гексан (10:10:3:10) [2, 6]. Концентрацію пігментів розраховували за формулою:

$$C = D/a \times l$$

де C – концентрація пігменту, г/л, D – оптична густина розчину, a – питомий коефіцієнт екстинкції [$E_{\text{кар}} = 271,8$ при 474 нм, $E_{\text{б/хл}} = 930$ при 770 нм $\times \text{л} \times (\text{г} \times \text{см}^{-1})$] l – товщина поглинаючого шару ($l = 0,3$ см), C – концентрація пігменту (г/л) [2, 5, 6].

Розрахунок концентрації пігментних молекул на суху вагу клітин досліджуваного штаму здійснювали за формулою:

$$A = C \times V \times K/H$$

де A – кількість пігменту на один грам сухої ваги клітин (мг/г с. в.), C – концентрація пігменту (г/л), V – об'єм екстракту, мл, K – відношення об'єму елюату до об'єму розчину, нанесеного на хроматограму [2, 5].



Концентрацію білка визначали за методом Лоурі [4] та паралельно за допомогою нінгідринного реактиву [2].

Отримані результати статистично опрацьовували з використанням програми Origin 7.0. Вибір тактики статистичного опрацювання і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [5] за рівня достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Склад і природа бактеріохлорофілів і каротиноїдів у різних представників фототрофних прокариот суттєво відрізняються [4, 5]. Ідентифікація пігментів *C. limicola* IMB К-8 була проведена нами раніше [1]. Натомість першим кроком цієї роботи було вивчення впливу низькомолекулярних органічних субстратів на якісні та кількісні зміни фотореакційних молекул. Як додаткові джерела карбону, використовували проміжні метаболіти циклу Арнона та деякі продукти цього циклу. З цією метою культуру вирощували протягом 12 діб у мінеральному середовищі GSB (контроль) з додатковим внесенням органічних джерел карбону. Після екстракції пігментів проводили їх хроматографічне розділення з подальшим кількісним визначенням концентрації пігментів (рис. 1). Встановлено, що за умов внесення органічних джерел карбону у середовище культивування якісних змін фотореакційних молекул не виявлено, доказом цього були результати тонкошарової хроматографії (рис. 1).

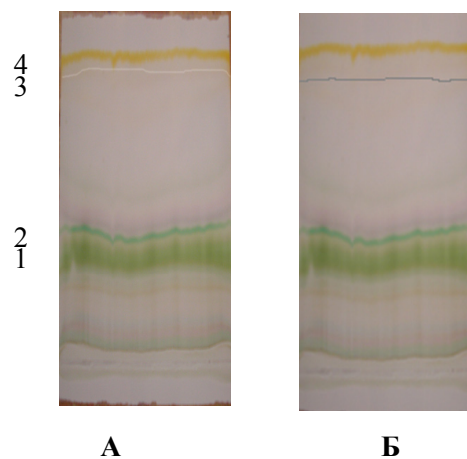


Рис. 1. Хроматограма пігментів, екстрагованих із *C. limicola* IMB – К-8.

1 – бактеріохлорофіл *c*, 2 – бактеріохлорофіл *d*, 3 – хлоробактин,
4 – ізоренієратин. А – CO₂, H₂S (контроль),
Б – CO₂, H₂S, органічні джерела карбону (експеримент)

Fig. 1. Chromatogram of pigments extracted from *C. limicola* IMB – К-8.

1 – bacteriochlorophyll *c*, 2 – bacteriochlorophyll *d*, 3 – chlorobactyn,
4 – izorenieratyn. А – CO₂, H₂S (control),
В – CO₂, H₂S, organic source of carbon (experiment).

Встановлено, що органічні низькомолекулярні інтермедіати (ацетат, піруват, фумарат, гліцин, сукцинат, глутамат) проявляли стимулюючий ефект на кількісні зміни фоторецепторних молекул. Зокрема найвища концентрація бактеріохлорофілів *c* та *d* встановлені за умов внесення глутамату — концентрація бактеріохлорофілу *c* зросла на 58%, а бактеріохлорофілу *d* на 50% (рис. 2).

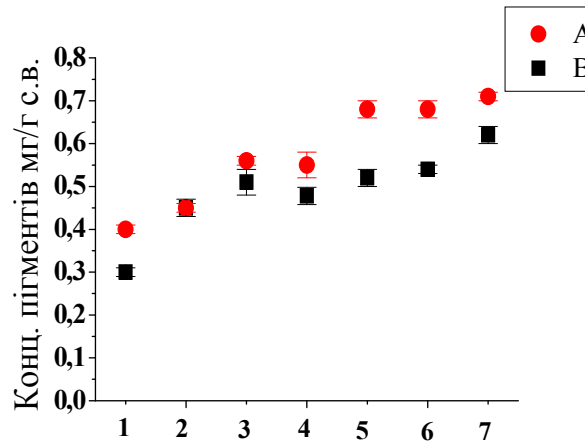


Рис. 2. Вплив різних джерел карбону на біосинтез бактеріохлорофілів *c* (A) і *d* (B)

1 — контроль (мінеральне середовище GSB), 2 — ацетат, 3 — піруват, 4 — фумарат, 5 — гліцин, 6 — сукцинат, 7 — L-глутамат.

Fig. 2. Effect of different carbon sources on biosynthesis bacteriochlorophylls *c* (A) and *d* (B)

1 — control (mineral GSB), 2 — acetate, 3 — pyruvate, 4 — fumarate, 5 — glycine, 6 — succinate, 7 — L-glutamate.

Найвища стимуляція синтезу каротину була за умов внесення ацетату в межах 71% порівняно з контролем (мінеральне середовище GSB) для хлоробактину та на 50% для ізоренієратину (рис. 3).

Згідно літературних даних [2, 5, 7] зелені сіркові бактерії *C. tepidum*, за умов активної азотфіксації нагромаджують катіони амонію які при взаємодії з L-глутаматом призводять до утворення L-глутаміну. Натомість за умов сповільнення процесів азотфіксації L-глутамат в основному використовується на біосинтез фотореакційних молекул. Для перевірки цього припущення, що до штаму *C. limicola* IMB K-8 нами було проведено інкубацію відмитих досліджуваних клітин за умов внесення інгібітора азотфіксації у зелених сіркобактерій — нітрат аніону.

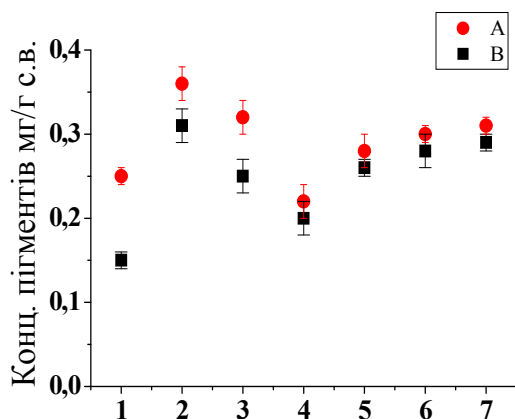


Рис. 3. Вплив різних джерел карбону на біосинтез каротиноїдів хлоробактину (А) і ізоренієратину (В)

1 – контроль (мінеральне середовище GSB), 2 – ацетат, 3 – піруват, 4 – фумарат, 5 – гліцин, 6 – сукцинат, 7 – L-глутамат.

Fig. 3. Effect of different carbon sources on biosynthesis of carotenoids chlorobactyn (A) and izorenieratyn (B)

1 – control (mineral GSB), 2 – acetate, 3 – pyruvate, 4 – fumarate, 5 – glycine, 6 – succinate, 7 – L-glutamate.

Після 48 годин інкубації встановлювали кількісні зміни білкових та фоторецепторних молекул в клітинах досліджуваного штаму (рис. 4).

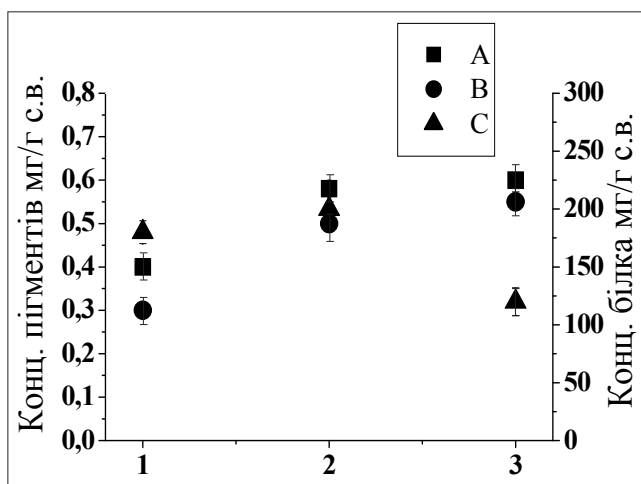


Рис. 4. Вплив факторів середовища на біосинтез бактеріохлорофілів *c* (А) і *d* (В) та вміст білка (С)

1 – контроль (мінеральне середовище GSB), 2 – L-глутамат, 3 – L-глутамат, NO₃⁻

Fig. 4. The influence of environmental factors on the biosynthesis of bacteriochlorophylls *c* (A) and *d* (B) and protein (C)

1 – control (mineral GSB), 2 – L-glutamate, 3 – L-glutamate, NO₃⁻

Встановлено стимулюючий ефект L-глутамату за умов інгібування азотфіксації на біосинтез бактеріохлорофілів *c* і *d*. Зокрема їх кількість порівняно з контролем зросла на 50 і 75%, відповідно. При цьому вміст концентрації білка в клітинах знизився майже у чотири рази, а хлоробактину та ізренієратину зріс до 10% (рис. 5).

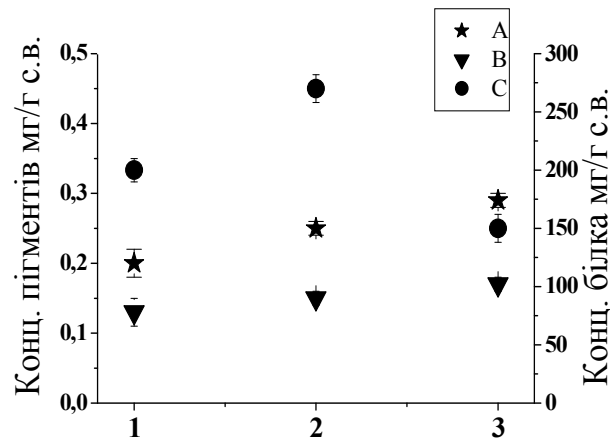


Рис. 5. Вплив різних джерел карбону на біосинтез каротиноїдів хлоробактину (А) та ізренієратину (В) та вміст білка (С)
1 — контроль (мінеральне середовище GSB), 2 — ацетат,
3 — ацетат, NO₃⁻

Fig. 5. Effect of different carbon sources on biosynthesis of carotenoids chlorobactyn (A) and izorenieratyn (B) and biomass cells (C)
1 — control (mineral GSB), 2 — acetate, 3 — acetate, NO₃⁻

В ході проведених досліджень встановлено закономірність у співвідношенні нагромадження відмитими клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 фотореакційних молекул за присутності в інкубаційній суміші інгібіторів протеїно- та глюконеогенезу. Цей експеримент було проведено при вирощуванні клітин у мінеральному середові GSB з одночасним внесення низькомолекулярних інтермедіатів (ацетату, L-глутамату, пірувату, фумарату та цитрату). Після 12-добового культивування клітини відмивали і вносили у інгібітори протеїногенезу (нітрат-іон), глюконеогенезу (моноіодацетат) та обидва інгібітори разом (рис. 6). Слід зазначити, що інгібітори протеїно- та глюконеогенезу вносили з метою переключення інтермедіатів циклу Арнона на процеси анаболізму фотореакційних молекул.

Показано, що при біосинтезі бактеріохлорофілів та каротиногенезі окреме інгібування протеїногенезу та глюконеогенезу призводить до зростання концентрації фотореакційних молекул у середовищі культивування порівняно з контролем, проте найвища їх концентрація спостерігалася за умов одночасного внесення інгібіторів протеїногенезу (NO₃⁻) та глюконеогенезу (моноіодацетату) і наявності одного із кінцевих продуктів циклу Арнона — L-глутамату (рис. 6).



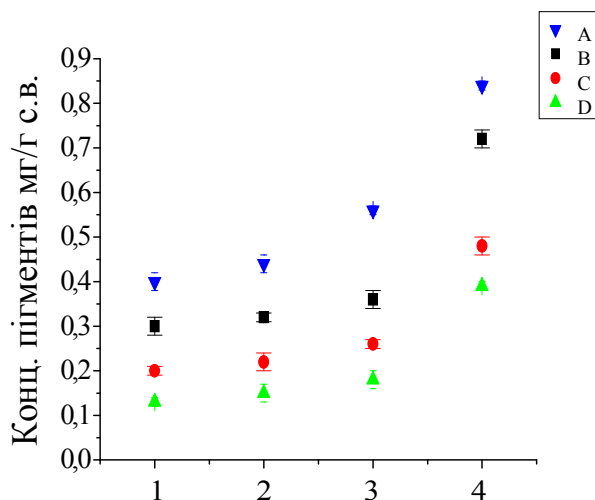


Рис. 6. Вплив факторів середовища біосинтез бактеріохлорофілів *c* (A) і *d* (B) та каротиноїдів хлоробактину (C) і ізоренієратину (D)

1 — контроль (мінеральне середовище GSB), 2 — L-глутамат, моноіодацетат,
3 — L-глутамат, NO₃⁻,
4 — L-глутамат, моноіодацетат, NO₃⁻.

Fig. 6. The influence of environmental factors on biosynthesis bacteriochlorophylls *c* (A), *d* (B) and carotenoids chlorobactyn (C) and izorenieratyn (D)

1 — control (mineral GSB), 2 — L-glutamate, monoyodacetate,
3 — L-glutamate, NO₃⁻, 4 — L-glutamate monoyodacetate, NO₃⁻.

Таким чином встановлено, що наявність інтермедіатів та кінцевих продуктів циклу Арнона стимулює нагромадження пігментних молекул у клітинах зелених сіркових бактерій. Особливе зростання концентрації бактеріохлорофілів *c* та *d*, а також каротиноїдів хлоробактину і ізоренієратину спостерігали за умов одночасного інгібування процесів азотфіксації та глюконеогенезу і наявності низькомолекулярних джерел карбону.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Фотосинтезувальні пігменти *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Вісн. Львів.ун-ту, Сер. біол. — 2009. — Вип. 50. — С. 95–100.

2. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: автореф. дис. на здобуття ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16. (екологія). / Горішний Мирослав Богданович. — Київ, 2008. — С. 18.

3. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркобактерій *Chlorobium limicola* // Вісн. Львів.ун-ту, Сер. біол. — 2008. — Вип. 46. — С. 129–136.

4. Гудзь С.П., Горішний М.Б., Гнатуш С.О. Бактеріальний фотосинтез. — Львів Видавничий центр ЛНУ ім. Івана Франка.: Коло, 2011 — 180 с.

5. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
6. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. — К.: Фітосоціоцентр, — 2001. — 200 с.
7. Bergstein T., Henis Y., Cavari B.Z. Nitrogen fixation by the photosynthetic sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides* from the lake Kinneret // Applied and environmental microbiology. — 1981. — Vol. 41. — P. 8288–8294.

Стаття надійшла до редакції 28.08.2012 р.

M.B. Gorishniy, S.P. Gudz, S.O. Hnathush

Lviv National Ivan Franko University, 4, Hrushevskogo str., Lviv, 79005, Ukraine,
tel.: +38 (067) 492 76 81, e-mail: m_gorishniy@ukr.net

**EFFECT OF MINERAL AND ORGANIC NUTRITION ON
QUALITATIVE CHANGES PHOTOSINTETIC MOLECULES
IN THE CELLS OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMB K-8**

Summary

Investigate some features of qualitative changes pigments molecules in the cells of green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* IMB K-8. For absorption maxima acquisitions established differences in quantitative structure bacteriochlorophils *c* and *d* and carotenoids izorenieratyn and chlorobactyn depending on the different types of mineral and organic nutrition. Investigate some changes to the quantity of pigment molecules under conditions of low organic intermediates and various types of mineral nutrition.

Key words: green sulfur bacteria, bacteriochlorophils *c* and *d*, izorenieratyn and chlorobactyn.



М.В. Горишний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов,
79005, Украина, тел.: +38 (067) 492 76 81,
e-mail: m_gorishniy@ukr.net

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО И ОРГАНИЧЕСКОГО ПИТАНИЯ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОТОРЕАКЦИОННЫХ МОЛЕКУЛ В КЛЕТКАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMB K-8

Реферат

Исследованы некоторые метаболические особенности количественных изменений фотореакционных молекул в клетках зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola* IMB K-8. По максимумам абсорбционных поглощений установлены различия в количественном составе бактериохлорофилов *c* и *d* и каротиноидов изорениератина и хлоробактина в зависимости от разных типов минерального и органического питания. Установлены некоторые изменения количественного состава пигментных молекул в условиях присутствия органических низкомолекулярных интермедиатов и разного типа минерального питания.

Ключевые слова: зеленые серные бактерии, бактериохлорофилы *c* и *d*, изорениератин и хлоробактин.



УДК 574.58:582.282.23

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

ЧИСЕЛЬНІСТЬ ТА ТАКСОНОМІЧНИЙ СКЛАД ДРІЖДЖІВ ПРИБЕРЕЖНОЇ АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЇНИЙ

Вперше для прибережних вод острова Зміїний вивчено чисельність та таксономічний склад дріжджової мікробіоти. Показано, що чисельність дріжджів коливалася у вузькому діапазоні від 202×10^3 до 760×10^3 КУО/л. Проведені дослідження дозволили ідентифікувати 11 видів дріжджів, що належать до 6 родів (*Cryptococcus albidus*, *C. neoformans*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*). Чотири представники ідентифіковано лише до роду (*Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*). Представники всіх 11 ідентифікованих видів є типовими космополітами і досить широко розповсюджені в інших біотопах Землі. Найбільш поширеними в прибережних водах акваторії острова виявилися представники не ідентифікованих видів *Rhodotorula* spp., *Candida* spp. та виду *Rhodotorula rubra*. Найбільша чисельність та таксономічна різноманітність дріжджів виявлена в районі порту, де в основному здійснюється господарська діяльність.

Ключові слова: морські дріжджі, чисельність, таксономічний склад, акваторія острова Зміїний.

Дріжджі широко розповсюджені в природі є невід'ємною складовою мікробіоти морських екосистем [6]. Їх чисельність та таксономічний склад регулюються умовами навколишнього середовища. Цей показник багато в чому залежить від типу та концентрації органічного матеріалу і є важливим для оцінки екологічного та санітарного стану довкілля [1, 5]. Морські дріжджі виявлені в морській воді, морських відкладеннях, на водоростях, рибах, морських ссавцях, морських птахів. В прибережних водах, як правило, їх чисельність складає десятки тисяч кл/л води, в глибоководних районах океану, де мало органічних речовин їх кількість складає десятки або менше клітина на літр. Аеробні форми зустрічаються здебільшого в чистих водах, в той час як анаеробні, що бродять, — у забруднених. Дані, що наведено в літературі свідчать про переважання у водах Світового океану аскоміцетових (*Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*

© В.О. Іваниця, С.О. Білоіваненко, 2012



і *Saccharomyces*) та базидіоміцетових (*Cryptococcus*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*) дріжджів [6]. Знайдено дріжджі, що зв'язані з ендемічною фауною глибоководних гідротерм Серединно-Атлантичного хребта і Південно-Тихоокеанського басейну. Філогенетичний аналіз послідовностей генів 26S рРНК показав, що ізольовані культури дріжджів належали до родів: *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Candida*, *Cryptococcus* и *Debaryomyces* [3].

Спеціалізація на виконанні певних функцій мікроорганізмів призводить до формування у них характерного комплексу морфологічних, фізіологічних і біохімічних властивостей. Так, дріжджі ізольовані із перифітону систем гідробіологічної очистки морської води в акваторії Нафтогавані Севастопольської бухти використовували нафту та нафтопродукти як єдине джерело вуглецю та енергії [2].

Метою дослідження було визначення чисельності та таксономічного складу дріжджів прибережних вод акваторії острова Зміїний, що знаходиться на шляху водних потоків ріки Дунай, яка збирає стічні води більшості країн Європи. У цій частині Чорного моря продовжується трансформація та деградація поллютантів та формування зміненої мікробіоти. Вивчення чисельності та біологічної різноманітності, зокрема таких мало вивчених на сьогодні мікроорганізмів, як морські дріжджі, в цьому районі набуває важливого значення.

Матеріали та методи

Добір проб для досліджень здійснювали з поверхневого шару (0–50 см) в липні 2009 р. на семи прибережних і одній віддаленій станціях, розташованих рівномірно навколо острова Зміїний (рис. 1).

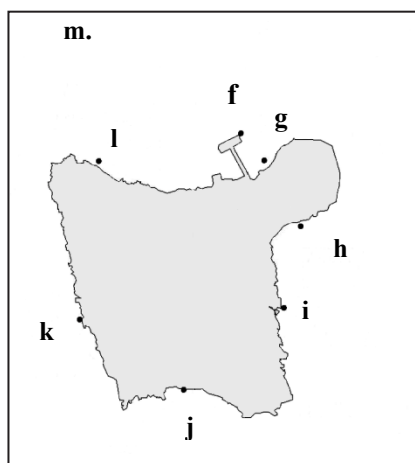


Рис. 1. Схема розташування станцій добору проб у прибережних водах акваторії о. Зміїний

Fig. 2. Scheme of probe sampling stations' location at Zmiinyi island coastal water area

Чисельність дріжджів визначали методом мембранних фільтрів [6]. Фільтри (Millipore Filter Corporation) з діаметром пор 0,22 мкм поміщали на середовище Сабуро з додаванням антибіотиків хлорамфеніколу (150 мкг/мл) та тетрацикліну (100 мкг/мл) для пригнічення росту бактерій) та інгібіторів росту міцеліальних грибів — бенгальського рожевого (0,003%) та кристалічного фіолетового (0,001%) [6, 7]. Всі дослідження проводили в трьох повторах. Культивування дріжджів здійснювали при 20 °С. Підрахунок колонієутворювальних одиниць (КУО) провадили через 3 доби культивування.

Ізольовані штами дріжджів культивували на середовищі Сабуро. Визначення таксономічної приналежності ізольованих культур дріжджів здійснювали за морфологічними, фізіологічними та біохімічними ознаками згідно класичної схеми за визначником та даними літератури [7].

Статистичне опрацювання результатів проводили згідно стандартних методик [9].

Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що чисельність дріжджів в прибережних водах акваторії острова в липні 2009 р. коливалася у вузькому діапазоні від 202×10^3 до 760×10^3 КУО/л (табл. 1). Середня чисельність становила 451×10^3 КУО/л. Чисельність червоних дріжджів була в межах від 11×10^3 КУО/л до 250×10^3 КУО/л. На станції *l* червоні дріжджі не були виявлені. Чисельність чорних дріжджів становила від 130×10^3 до 150×10^3 КУО/л. На станціях *f*, *j*, *k*, *l*, *m* чорні дріжджі не були виявлені.

Таблиця 1

Загальна чисельність дріжджів ($\times 10^6$ КУО/л) в воді акваторії о. Зміїний

Table 1

General yeast cell number ($\times 10^6$ CFU/l) in marine water of Zmiinyi basin

Станція	Загальна чисельність дріжджів	Червоні дріжджі (каротинсинтезувальні)	Чорні дріжджі (меланінсинтезувальні)
<i>g</i>	749±26	190±10	130±6
<i>h</i>	550±10	120±7	140±7
<i>f</i>	370±15	250±12	-
<i>i</i>	760±37	120±6	150±6
<i>J</i>	202±26	11±5	-
<i>k</i>	376±13	17±7	-
<i>l</i>	265±11	-	-
<i>m</i>	342±7	15±6	-



Відомо, що основним природним резервуаром дріжджів є ґрунт та рослини суші. У воді станцій, що межують з відкритими ґрунтами та рослинними рештками берега, виявлено певне збільшення чисельності дріжджової мікробіоти. Найбільша щільність дріжджів встановлена на станції **g** (до 749×10^3 КУО/л), яка межує з пологим ґрунтовим берегом острова та **i** (760×10^3 КУО/л). Цей район характеризується великою кількістю морських водоростей — кладофори, ульви та ентероморфи, які є, очевидно, багатим джерелом органічних речовин для цих мікроорганізмів.

Серед виявлених переважали каротинсинтезувальні дріжджі. Представники меланінсинтезувальних дріжджів найчастіше виділялися на станції **i**.

Дріжджі, що постійно мешкають в морській воді, набувають властивостей, які дають можливість подальшого існування та виживання в даному біогеоценозі. В ході досліджень ізольовано 42 штами переважальних представників морських дріжджів, охарактеризовано їх морфологічні, біохімічні, фізіологічні властивості та проведено їх ідентифікацію.

Проведені дослідження дозволили ідентифікувати 11 видів дріжджів (табл. 2), що належать до 5 родів (*Cryptococcus albidus*, *C. neoformans*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*). Чотири досліджені представники ідентифіковано лише до роду (*Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*).

У результаті проведених досліджень найбільша таксономічна різноманітність дріжджів виявлена на станції **g**, де зареєстровано присутність 11 видів (8 ідентифікованих та 3 не ідентифікованих). Це і не дивно, оскільки вода на станції **g**, розташованої в районі порту, є найбільш забрудненою. Слід відзначити, що на цій станції встановлено також найбільшу чисельність дріжджової мікробіоти. Райони акваторії, що межують із високим скелястим берегом, характеризуються найменшим числом видів — 4 (станції **h** та **j**). В інших районах виявлено 6—7 видів дріжджів.

Найпоширенішими в прибережних водах острова виявилися представники не ідентифікованих видів *Rhodotorula spp.* (на 7 станціях із 8), *Candida spp.* (на 6 станціях із 8) та виду *Rhodotorula rubra* (на 6 станціях із 8). Найбільш чисельними були представники *Rhodotorula spp.*, *Rhodotorula rubra* та *Aureobasidium pullulans*. Їх частка складала до 64,3%. Епізодично виявлялися представники родів *Saccharomyces* та *Pichia*.

Із групи сахаробіонтів («справжні» дріжджі, що характеризуються відсутністю пігментації, розвинених міцеліальних структур, хламідоспор, слизових капсул, а також здатністю до бродіння) знайдено *Saccharomyces cerevisiae* лише на одній станції **l** та в невеликій кількості (20×10^3 КУО/л), що пояснює відсутність в морському середовищі легкодоступних джерел вуглецю, до яких вони найбільш пристосовані. Ймовірно виявлені сахароміцети потрапили в морське середовище з прибережних рослин.

Чисельність представників окремих родів та видів дріжджів ($\times 10^3$ КУО/л)
в воді акваторії о. Зміїний

Number of certain yeast genera and species ($\times 10^3$ CFU/l)
in marine water of Zmiinyi basin

Вид	Станція відбору проб							
	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>f</i>	<i>i</i>	<i>j</i>	<i>k</i>	<i>l</i>	<i>m</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	130±6	140±6	-	150±6	-	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	79±1	-	15±1	-	6±1	18±1	29±1	27±1
<i>Candida albicans</i>	10±1	-	10±1	-	6±1	13±1	12±1	-
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	17±4	20±4
<i>Candida parapsilosis</i>	41±1	-	-	-	-	5±1	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	10±2	-	5±2	-	-	-	-	5±2
<i>Cryptococcus spp.</i>	68±11	-	15±11	15±11	-	-	144±11	-
<i>Cryptococcus albidus</i>	34±5	-	-	10±5	-	-	26±5	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	17±2	-	5±2	5±2	-	-	-	-
<i>Pichia spp.</i>	10±5	-	-	-	-	-	17±5	-
<i>Rhodotorula spp.</i>	190±28	220±28	250±28	340±28	110±28	170±28	-	150±28
<i>Rhodotorula glutinis</i>	10±2	-	-	-	-	40±2	-	-
<i>Rhodotorula minuta</i>	-	20±11	70±11	-	-	-	-	40±11
<i>Rhodotorula rubra</i>	150±19	170±19	-	240±19	80±19	130±19	-	100±19
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	20±1	-

Типовими представниками дріжджів-фітобіонтів, що виявлені в акваторії навколо острова Зміїний є представники роду *Rhodotorula* (до $3,4 \times 10^3$ КУО/л). Значна кількість дріжджів-фітобіонтів в прибережних водах острова пояснюється наявністю в цьому районі заростей водоростей-макрофітів, які значною мірою формують умови для існування інших організмів, у тому числі і для дріжджів. За рахунок розвинених капсул клітини цих дріжджів здатні до адгезії на поверхні морських водоростей.



В прибережній акваторії острова найширше представлена морфолого-фізіологічна група сапробіонтів (роди *Candida*, *Aureobasidium*, *Pichia*, *Cryptococcus*), які мають високу гідролітичну активність і беруть участь у деструкції органічних решток, продовжуючи трансформацію та деструкцію поліютантів, що приносять водні потоки ріки Дунай.

До складу групи дріжджів-опортуністів відносять представників, що викликають захворювання людини та тварин. У досліджуваному районі ідентифіковано представників родів *Candida* (до 79×10^3 КУО/л) та *Cryptococcus* (до 114×10^3 КУО/л), для яких характерним є протеолітична активність та здатність до адгезії.

Отже, в прибережних водах акваторії острова Зміїний чисельність дріжджів коливалася у вузькому діапазоні від 220×10^3 до 760×10^3 КУО/л. Проведені дослідження дозволили ідентифікувати 15 видів дріжджів, що належать до 6 родів *Cryptococcus*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Pichia*. Найбільш поширеними в прибережних водах острова виявилися представники не ідентифікованих видів *Rhodotorula spp.*, *Candida spp.* та виду *Rhodotorula rubra*. Найбільша чисельність та таксономічна різноманітність дріжджів виявлена на станції **g**, що розташована в районі порту і має найбільший антропогенний вплив, та станції **i** — з великою кількістю морських водоростей. Представники усіх ідентифікованих видів є типовими космополітами і досить широко розповсюджені в інших біотопах Землі [5, 6].

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Крисс А.Е. Морская микробиология: глубоководная. М.: Издательство Академии наук СССР, 1959. — 474 с.
2. Миронов О.Г., Дорошенко Ю.В. Нефтеокисляющие дрожжи перифитона систем гидробиологической очистки морских вод. Морський екологічний журнал, № 2, — Т. VI. — 2007. — С. 58–62.
3. Burgaud G., Arzur D., Durand L., Cambon-Bonavita M., Barbier G. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. FEMS Microbiol. Ecol. 73.2010. — P. 121–133.
4. Hagler A.N. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brasil. // Appl. Environ. Microbiol. — 1981. — P. 173–178.
5. Hagler A.N., Ahearn D.G. Ecology of aquatic yeasts. // The yeasts, second edition, vol. 1 Academic Press, London, United Kingdom. — 2000. — P. 11–21.
6. Koki Horikoshi, Hideto Takami, Takashi Nakase, Makiko Hamamoto. Distribution and identification of red yeasts in deep-sea environments around the northwest Pacific Ocean. // Kluwer Academic Publishers. — 2001. — P. 101–110.



7. Lachance M.A & Starmer W.T . Ecology and yeasts. The yeasts: a taxonomic study, fourth revised and enlarged edition //Elsevier Science Publishers B.V. – 2003. – P. 122–145.

8. Sreedevi N. Kutty and Rosamma Philip. Marine yeasts. // Yeast 2008; 25: P. 465–483. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/yea.1599.

9. The yeasts. A taxonomic study. Eds. C.P. Kurtzman, J.W. Fell// Fourth revised and enlarged edition.– 1998. – 1055 p.

Стаття надійшла до редакції 10.08.2012 р.

В.А. Іваниця, С.А. Белоиваненко

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

ЧИСЛЕННОСТЬ И ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДРОЖЖЕЙ ПРИБРЕЖНОЙ АКВАТОРИИ ОСТРОВА ЗМЕИНЫЙ

Реферат

Впервые для прибрежных вод острова Змеиный изучены численность и таксономический состав дрожжевой микробиоты. Показано, что численность дрожжей колебалась в узком диапазоне от 202×10^3 до 760×10^3 КОЕ/л. Проведенные исследования позволили идентифицировать 11 видов дрожжей, относящихся к 6 родам (*Cryptococcus albidus*, *C. neoformans*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*). Четыре представителя идентифицировано только до рода (*Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorulla*). Представители всех 11 идентифицированных видов являются типичными космополитами и достаточно широко распространены в других биотопах Земли. Наиболее распространенными в прибрежных водах акватории острова оказались представители не идентифицированных видов *Rhodotorula spp.*, *Candida spp.* и вида *Rhodotorula rubra*. Наибольшая численность и таксономическое разнообразие дрожжей обнаружены в районе порта, где в основном осуществляется хозяйственная деятельность.

Ключевые слова: дрожжи, численность, таксономический состав, акватория, остров Змеиный.



V.O. Ivanytsia, S.O. Biloivanenko

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38(0482)687964, e-mail: beloiv@onu.edu.ua

ABUNDANCE AND TAXONOMIC COMPOSITION OF THE COASTAL AREA OF YEASTS OF ZMIINIY ISLAND

Summary

Coastal waters for the first time Snake Island studied the number and taxonomic composition of yeast microbiota. It is shown that the number of yeast varied in a narrow range from 220×10^3 to 760×10^3 cfu/l. Research has identified 11 species of yeasts belonging to 6 genera (*Cryptococcus albidus*, *C. neoformans*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *Saccharomyces cerevisiae*). Identified only four members of the genus (*Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorulla*). Representatives of all 11 identified species are typical cosmopolitan and fairly common in other habitats of the Earth. The most common in the coastal waters of the waters of the island were the representatives of unidentified species of *Rhodotorula spp.*, *Candida spp.* and the type of *Rhodotorula rubra*. The greatest number and taxonomic diversity of yeast found in the port area and the economic activities of inhabitants.

Key words: yeast, abundance, taxonomic composition, water area, Zmiiniy Island.



УДК 631.461: 502.521

В.Н. Гришко, О.Н. Кориновская

Криворожский ботанический сад НАН Украины, ул. Маршака, 50,
Кривой Рог, 50089, Украина, тел.: +38 (097) 852 83 51,
e-mail: Korinovskaya2009@yandex.ru

УСТОЙЧИВОСТЬ МИКРОМИЦЕТОВ К СОВМЕСТНОМУ ДЕЙСТВИЮ СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

*Исследована устойчивость микромицетов к совместному действию азотнокислых соединений кадмия, цинка, меди, никеля и свинца. Самыми чувствительными к минимальному содержанию (0,75 ПДК) соединений тяжелых металлов в среде Чапека были *Absidia butleri* Lendn, *Mortierella vanecae* Dixon-Stewart, *Cunninghamella echinulata* Thaxter, *Curvularia tuberculata* Jain и *Fusarium solani* (C. Mart.) Appel et Wollenw, тогда как у *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Penicillium* sp4 и *Micor globosus* Fischer наблюдался умеренный рост даже при максимальной концентрации (50 ПДК). Наибольшее ингибирование синтеза биомассы (в 7,3 раза) при концентрации ионов тяжелых металлов в среде 3 ПДК отмечено у *Penicillium* sp1.*

Ключевые слова: микромицеты, тяжелые металлы, устойчивость, биомасса.

В результате повышенной антропогенной нагрузки эдафотопы промышленных регионов Украины загрязнены различного рода поллютантами, в частности, соединениями тяжелых металлов. Накапливаясь в почве, последние негативно влияют на микроорганизмы, в том числе, и на микроскопические грибы, приводя к изменению видового состава микробного ценоза. Кроме этого, микромицеты могут быть индикаторными видами и использоваться в мониторинге антропогенной нагрузки на эдафотопы [5, 6].

Для прогнозирования последствий загрязнения почв ионами тяжелых металлов целесообразным является изучение закономерностей перестройки структуры и функционирования комплекса микромицетов при воздействии различных концентраций токсикантов, поскольку именно высокая устойчивость микромицетов к тяжелым металлам позволяет занимать определенным видам доминирующее положение в микробном ценозе загрязненных почв. В настоящее время известно несколько типов взаимодействия микромицетов с тяжелыми металлами, которые обуславливают их высокую устойчивость: ограничение поглощения токсичных элементов, отложение их в клетке в безопасной форме, исключение из

© В.Н. Гришко, О.Н. Кориновская, 2012



метаболизма участка, чувствительного к определенному металлу [10]. Одним из интегральных показателей чувствительности организмов к изменяющимся условиям внешней среды является количество продуцируемой биомассы. В почвах тундры основной частью микробиоценоза являются микромицеты. Биомасса их в верхних корнеобитаемых горизонтах почвы составляет порядка 75–80% от общей микробной биомассы [1]. Микроскопические грибы являются одними из активных продуцентов органического вещества почвы. Разлагая растительные и животные остатки, они принимают непосредственное участие в образовании гумуса, а также осуществляют минерализацию разнообразных веществ [11]. Хотя отдельное влияние кадмия, никеля, цинка, меди и свинца на синтез биомассы некоторыми микромицетами изучено, остаются невыясненными эффекты влияния комплекса соединений тяжелых металлов на продуцирование ими биомассы [9, 10]. Целью работы была оценка действия различных соединений тяжелых металлов на рост почвенных микромицетов.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлись культуры микромицетов, выделенные из техноземов промышленных предприятий г. Кривого Рога и чернозема обыкновенного (всего 49 штаммов). Их идентификацию проводили по определителям отечественных и зарубежных авторов [7, 12, 13, 14]. Чувствительность микромицетов к тяжелым металлам оценивали при культивировании на среде Чапека с добавлением $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ из расчета предельно допустимых концентраций (ПДК) каждого элемента ($\text{Cu} - 3,0$; $\text{Cd} - 3,0$; $\text{Ni} - 4,0$; $\text{Pb} - 20,0$ и $\text{Zn} - 23,0$ мг/л) в концентрациях 0,75; 1; 3; 5; 7; 10; 15; 20 и 50 ПДК [4]. Рост колоний на агаризованной среде Чапека, не содержащей соединений тяжелых металлов, был контролем.

Для изучения способности накапливать биомассу были отобраны как доминантные, так и типичные частые в микробиоценозах природных и загрязненных эдафотопов штаммы, а также различные по устойчивости к тяжелым металлам [5]. *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Aspergillus niger* Tiegh, *A. wentii* Thom et Church, *Fusarium oxysporum* E.F.Sm. Et Swingle и *Penicillium sp1* культивировали 14 суток в конических колбах объемом 250 мл с 50 мл жидкой среды Чапека с добавлением $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ в концентрациях 0,5; 1; 1,5; 2 и 3 ПДК при 27 °С. Вес грибной биомассы определяли гравиметрически после фильтрования, промывания бидистиллированной водой и высушивания при 105 °С до постоянного веса [8].

Результаты и их обсуждение

Как видно из таблицы, микромицеты имеют разную чувствительность к повышенному содержанию тяжелых металлов. Наши эксперименты показали, что 10% тест-штаммов (*A. butleri*, *M. vanescea*, *C. echinulata*, *C. tuberculata* и *F. solani*) проявляли наибольшую чувствительность к ионам тяжелых металлов и прекращали рост уже при их минимальной концентрации. С увеличением содержания токсических соединений в питательной среде до 3 ПДК росли 81% культур микромицетов. При повышении концентрации до 5 ПДК отсутствие роста наблюдалось у 24% исследованных штаммов (кроме перечисленных выше, также у *M. corticola*, *B. cinerea*, *A. wentii*). На среде с содержанием соединений тяжелых металлов 7 ПДК наблюдали отсутствие роста только *A. glausa*. С последующим увеличением концентрации до 10 ПДК неустойчивыми оказались представители родов *Absidia*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Cunninghamella*, *Eupenicillium sp.* и *Paecilomyces*.

Однако 39% изученных микромицетов, относящихся к родам *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chetomium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mortierella*, *Mucor*, *Penicillium* и *Trichoderma*, проявляли относительную резистентность к действию ионов тяжелых металлов в среде в концентрации до 15 ПДК. Причем из них хороший и слабый рост имели 68%. Устойчивость к изученному комплексу соединений тяжелых металлов проявляли *Penicillium sp1*, *A. nidulans*, *A. ustus*, *M. isabelina*, *F. oxysporum*, *F. javanicum*, *C. globosum*, *H. brevis* и *A. fumigatus*, которые имели хороший и слабый рост при концентрации 20 ПДК, тогда как чувствительными к отмеченному содержанию тяжелых металлов оказались *Penicillium sp5*, *M. jenkini*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *T. viride* и *M. piriformis*. Самую высокую резистентность к азотнокислым соединениям меди, цинка, никеля, кадмия и свинца проявляли лишь *T. longibrachiatum*, *A. alternata*, *Penicillium sp4* и *M. globosus*, которые росли даже при их максимальной концентрации.

Интенсивность накопления биомассы у различных микромицетов зависит от скорости метаболических процессов и является видоспецифической характеристикой [6]. Поэтому в последующих экспериментах использовались виды, у которых она значительно различалась. Так, данные рисунка свидетельствуют, что в условиях контроля наибольшей скоростью накопления биомассы обладал *A. wentii* (574,1 мг). В 1,2–1,6 раза меньше эти значения были у *T. longibrachiatum*, *F. oxysporum*, *Penicillium sp1* и *A. niger*, тогда как биомасса *A. alternata* составляла 162,7 мг. Известно, что в различных экологических условиях другие факторы могут как стимулировать, так и ингибировать ее синтез, выступая в последнем случае лимитирующими. Показано, что селенат натрия в концентрациях 10^{-7} – 10^{-4} г/л среды обуславливает увеличение на 30–121% скорости роста *Penicillium chrysogenum*, *P. nigricans*, *Fusidium coccineum*, *Acremonium chrysogenum* и накопления биомассы [3].



Таблица 1

Рост микромицетов на среде Чапека с разным содержанием соединений тяжелых металлов

Table 1

Growth of micromycetes on the Чапек medium with different maintenance of heavy metals compounds

№ п/п	Штаммы	Контроль	0,75 ПДК	1 ПДК	3 ПДК	5 ПДК	7 ПДК	10 ПДК	15 ПДК	20 ПДК	50 ПДК
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	<i>Absidia butleri</i>	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	<i>A. glauca</i>	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—	—
3	<i>Alternaria alternata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
4	<i>Aspergillus niger</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
5	<i>A. ochraceus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
6	<i>A. ustus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
7	<i>A. nidulans</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
8	<i>A. versicolor</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
9	<i>A. wentii</i>	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
10	<i>A. flavus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
11	<i>A. fumigatus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—
12	<i>Arthrobotrys longispora</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
13	<i>Botrytis cinerea</i>	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
14	<i>Chaetomium globosum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
15	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>C. herbarum</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
17	<i>Curularia tuberculata</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>Cunninghamella echinulata</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>Eupenicillium sp.</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>Fusarium oxysporum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
21	<i>F. solani</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>F. javanicum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
23	<i>F. avenaceum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
24	<i>Humicola brevis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
25	<i>Mortierella jenkini</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
26	<i>M. isabelina</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
27	<i>M. vancea</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	<i>Mucor corticola</i>	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
29	<i>M. globosus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
30	<i>M. racemosus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
31	<i>M. piriformis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
32	<i>Raecilomyces lilacinus</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-



Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
33	<i>Penicillium sp1</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
34	<i>Penicillium sp2</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
35	<i>Penicillium sp3</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
36	<i>Penicillium sp4</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
37	<i>Penicillium sp5</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
38	<i>Penicillium sp6</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
39	<i>Penicillium sp7</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
40	<i>Penicillium sp8</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
41	<i>Penicillium sp9</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
42	<i>Phoma sp.</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
43	<i>Rhizopus oligosporus</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
44	<i>Stachybotrys alternans</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
45	<i>Trichoderma viride</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
46	<i>T. koningii</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
47	<i>T. lignorum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
48	<i>T. longibrachiatum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
49	<i>Verticillium album</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

Примечание: +++ обильный рост; ++ средний рост; + слабый рост; - отсутствие роста
 Note: +++ abundant growth; ++ middle growth; + weak growth; - absence of growth

Соединения меди, серебра и ртути в концентрациях до 1 ПДК стимулировали накопление биомассы и спороношение у микромицетов рода *Penicillium* [2].

В наших экспериментах при совместном воздействии азотнокислых солей меди, цинка, никеля и кадмия уже при минимальном содержании тяжелых металлов в среде наблюдалось ингибирование образования биомассы у *T. longibrachiatum*, *F. oxysporum*, *A. niger* и *Penicillium sp1*, тогда как у *A. alternata* и *A. wentii* она статистически достоверно не отличалась от контроля. Вместе с этим, у первой группы видов большее снижение биомассы (на 49–65%) было характерно для *F. oxysporum* и *A. niger*. Возрастание концентрации ионов тяжелых металлов до 1 и 1,5 ПДК приводило к уменьшению накопления биомассы всеми микромицетами, причем наименьшие темпы (до 33%) были у *A. alternata*, а наибольшее (74,3%) – у *Penicillium sp1*. Полученные результаты свидетельствуют как об увеличении синергического влияния ионов тяжелых металлов, так и о его видоспецифичности. При максимальном содержании тяжелых металлов в среде биомасса *Penicillium sp1* уменьшалась в 7,3 раза по сравнению с контролем, у *A. wentii* и *A. alternata* до 5 раз, тогда как у остальных видов составляла 15–19% от контроля.

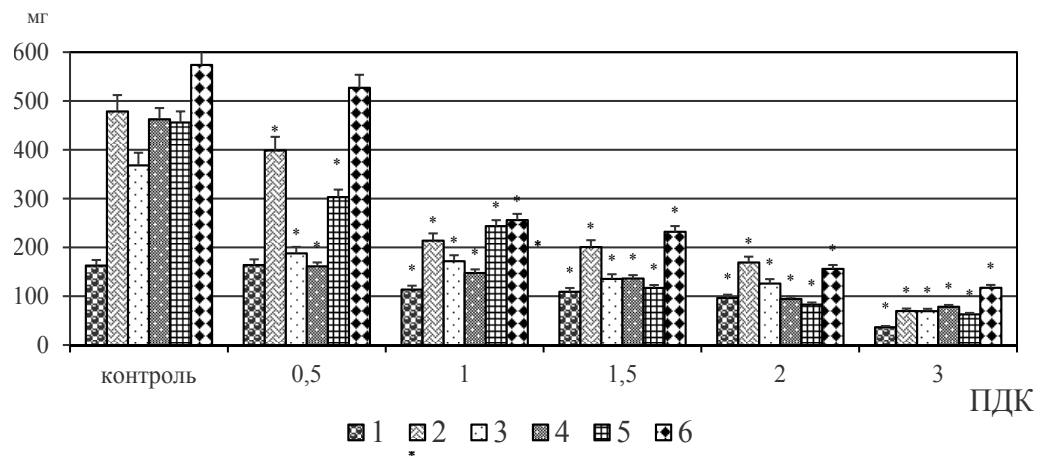


Рис.1. Биомасса микромицетов на среде Чапека с разным содержанием соединений тяжелых металлов (мг)

Alternaria alternata (1), *Trichoderma longibrachiatum* (2), *Fusarium oxysporum* (3), *Aspergillus niger* (4), *Penicillium sp1* (5), *Aspergillus wentii* (6), * – статистически достоверная разница относительно контроля, $p < 0.05$.

Fig.1. Biomass of micromycetes on the Чапек medium with different maintenance of heavy metals compounds (mg)

Alternaria alternata (1), *Trichoderma longibrachiatum* (2), *Fusarium oxysporum* (3), *Aspergillus niger* (4), *Penicillium sp1* (5), *Aspergillus wentii* (6), * – statistically reliable difference in relation to control at $p < 0.05$.



Наиболее чувствительными к минимальному содержанию тяжелых металлов в среде Чапека были 10% исследованных тест-штаммов, тогда как при их максимальной концентрации не переставали расти 8% культур микромицетов. Наибольшее ингибирование синтеза биомассы (в 7,3 раза) отмечено у *Penicillium sp1*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евдокимова Г.А. Микроорганизмы тундровых и лесных подзолов Кольского Севера / Евдокимова Г.А., Мозгова Н.П. // — Апатиты: Изд-во КНЦ РАН, 2001. — 184 с.
2. Жилин О.В. Биосорбция и трансформация золота и сопутствующих тяжелых металлов микромицетами: Автореф. дис канд. биол. наук: спец. 03.00.07. “Микробиология” / Жилин О.В. — Благовещенск, 2003. — 12 с.
3. Ильин Д.Ю. Влияние селена на рост и развитие микромицетов-продуцентов биологически активных веществ: Автореф. дис. канд. биол. спец. 03.00.24. “Микология” / Ильин Д.Ю. — Москва, 2001. — 12 с.
4. Іутинська Г.О. Резистентність ґрунтових мікроорганізмів до забруднення ґрунтів важкими металами / Іутинська Г.О., Петрушка З.В. // Мікробіол. журн. — 1999. — Т. 61, № 5. — С. 72–77.
5. Коріновська О.М. Загальна характеристика чисельності та видового складу мікроміцетів в ґрунтах забруднених сполуками важких металів / Коріновська О.М., Гришко В.М. // Біологічні системи. Науковий вісник Чернівецького університету. — 2012. — Вип. 2. — Т. 2 (4) — С. 176–179.
6. Марфенина О.Е. Антропогенная экология почвенных грибов / Марфенина О.Е. — М.: Медицина для всех, 2005. — С. 45–47.
7. Мельник В.А. Определитель грибов России класс *Hyphomycetes*, сем. *Dematiaceae* / Мельник В.А. — Спб.: Наука, 2000. — 358 с.
8. Методы экспериментальной микологии / под. ред. В.И. Билай. — К.: Наукова думка, 1982. — 432 с.
9. Олішевська С.В. Сорбція іонів міді ґрунтовими мікроміцетами / Олішевська С.В., Василевська А.І., Фоміна М.О., Манічаєв В.Й. // Мікробіол. журн. — 2006. — Т. 68, № 4 — С. 60–70.
10. Cervantes C. Copper resistance mechanism in bacteria and fungi / Cervantes C., Gutierrez-Corona F. // FEMS Microbiol Rev. — 1994. — Vol. 14, № 2. — P. 121–137.
11. Christensen M.A. View of fungal ecology / Christensen M.A. // Mycologia. — 1989. — Vol. 81, № 1. — P. 1–19.
12. Domsh K.H. Compendium of soil fungi / Domsh K.H., Gams W., Andersen T.H. — London: Acad. Press, 1993. — Vol. 1. — 859 p.
13. Ellis M.B. Dematiaceus hyphomycetes / Ellis M.B. — Common. Mycol. Inst.: Kew, 1993. — 608 p.
14. Modern concept in *Penicillium* and *Aspergillus* classification / Ed. by R.A. Samson, J.I. Pitt. — New York: Plenum Press, 1990. — 460 p.

Стаття надійшла до редакції 29.08.12.



В.М. Гришко, О.М. Кориновська

Криворізький ботанічний сад НАН України, вул. Маршака, 50,
Кривий Ріг, 50089, Україна, тел.: +38 (097) 852 83 51,
e-mail: Korinovskaya2009@yandex.ru

СТІЙКІСТЬ МІКРОМІЦЕТІВ ДО СУМІСНОЇ ДІЇ СПОЛУК ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Реферат

Досліджено стійкість мікроміцетів до сумісної дії азотнокислих сполук кадмію, цинку, нікелю і плюмбуму. Найчутливішими до мінімального вмісту (0,75 ГДК) сполук важких металів в середовищі Чапека були *Absidia butleri* Lendn, *Mortierella vanecae* Dixon-Stewart, *Cunninghamella echinulata* Thaxter, *Curvularia tuberculata* Jain і *Fusarium solani* (C. Mart.) Appel et Wollenw, тоді як у *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Penicillium sp4* і *Mucor globosus* Ficher спостерігався помірний ріст навіть за максимальної концентрації (50 ГДК). Найбільше інгібування синтезу біомаси (у 7,3 рази) за концентрації іонів важких металів в середовищі 3 ГДК відмічено у *Penicillium sp1*.

Ключові слова: мікроміцети, важкі метали, стійкість, біомаса.

V.M. Gryshko, O.N. Korinovska

Kryvyi Rig Botanical Garden, NASU,
50, Marshaka str., Kryvyi Rig, 50089, Ukraine, tel.:+38 (097) 852 83 51,
e-mail: Korinovskaya2009@yandex.ru

MICROMYCETES STABILITY TO THE HEAVY METALS COMPOUNDS JOINT ACTION

Summary

It has been studied the micromycetes stability to the joint action of nitric acid compounds of cadmium, zinc, copper, nickel and lead. Most sensible to minimum maintenance (0.75 MPC) of heavy metals compounds in the Chapek medium were *Absidia butleri* Lendn, *Mortierella vanecae* Dixon-Stewart, *Cunninghamella echinulata* Thaxter, *Curvularia tuberculata* Jain and *Fusarium solani* (C. Mart.) Appel et Wollenw, while at *Trichoderma longibrachiatum* Rifai, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Penicillium sp4* and *Mucor globosus* Ficher moderate growth was observed even at a maximal concentration (50 MPC). The most inhibition of biomass synthesis (in 7.3 times) at the concentration of heavy metal ions in medium 3 MPC is marked at *Penicillium sp1*.

Key words: micromycetes, heavy metals, stability, biomass.



УДК 579:502

**И.А. Блайда, Т.В. Васильева, Л.И. Слюсаренко, В.Ф. Хитрич,
В.А. Иваница**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 746 61 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

ИЗВЛЕЧЕНИЕ РЕДКИХ И ЦВЕТНЫХ МЕТАЛЛОВ СООБЩЕСТВОМ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ЗОЛЫ ОТ СЖИГАНИЯ ПАВЛОГРАДСКОГО УГЛЯ

Целью работы было изучение способности к выщелачиванию редких и цветных металлов из золы от сжигания Павлоградского угля на Ладыжинской теплоэлектростанции сообществом микроорганизмов сформировавшегося в процессе хранения техногенного микробиоценоза. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии установлено, что в золе содержатся в промышленных концентрациях медь, цинк, свинец, галлий, германий, олово, ванадий, кобальт, алюминий. Исследования по выщелачиванию металлов из золы от сжигания Павлоградского угля проводили в условиях благоприятных для роста мезофильных гетеротрофных микроорганизмов, мезофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий и умеренно термофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий. В процессе исследований показана высокая выщелачивающая активность сообщества ацидофильных хемолитотрофных бактерий, населяющих золу Ладыжинской ТЭС, относительно германия, галлия, кадмия и никеля. В мезофильных условиях в результате биохимической деятельности сообщества хемолитотрофных бактерий в раствор независимо от источника энергии, практически полностью переходили германий, галлий и кадмий, а также до 76,6% никеля.

Ключевые слова: зола, уголь, гетеротрофные микроорганизмы, ацидофильные хемолитотрофные бактерии, биовыщелачивание, редкие и цветные металлы.

Ценные компоненты, входящие в минеральную составляющую угля, концентрируются в зольных уносах и золах в количествах, значительно превышающих их содержание в исходном угле. Поэтому отходы, образующиеся в процессе сжигания угля, в последнее время привлекают к себе особое внимание как сырье для получения таких редких металлов, как германий и галлий, а также целого ряда ценных цветных металлов (алюминий, медь, железо, кадмий, никель и т.д.) [10].

© И.А. Блайда, Т.В. Васильева, Л.И. Слюсаренко, В.Ф. Хитрич, В.А. Иваница, 2012



Для извлечения металлов из исходного сырья применяют отработанные пиро- и гидрометаллургические методы, предусматривающие использование сильных кислот и оснований, высоких температур и давления [10, 13]. В связи с ужесточением мер по охране окружающей среды стандартные химические методы нецелесообразны как с экологических, так и с экономических позиций. В сложившейся ситуации возникает обоснованная необходимость разработки и внедрения современных методов биотехнологического выщелачивания металлов [1, 4, 5].

Ключевым фактором, определяющим скорость и степень извлечения металлов, является состав и окислительная активность микробного ценоза металлосодержащих техногенных отходов. Изучение микробного состава минерального сырья природного происхождения свидетельствует о наличии в них представителей мезофильных и умеренно термофильных серуоокисляющих бактерий. Оценка их биогеохимической активности показывает, что эти микроорганизмы в природных условиях играют важную роль в выщелачивании металлов из сульфидных руд [6, 7, 9]. Аналогичные процессы могут происходить и в минеральном сырье техногенного происхождения.

В связи с этим целью работы было изучение способности извлекать редкие и цветные металлы из золы от сжигания Павлоградского угля на Ладыжинской теплоэлектростанции сообществом микроорганизмов, сформировавшимся в процессе хранения.

Объекты и методы исследований

Объектом исследования служили микроорганизмы техногенного биоценоза, сформировавшегося естественным путем в процессе хранения золы на Ладыжинской ТЭС, полученной от сжигания Павлоградского угля. Зола представляет собой аморфный пылевидный мелкодисперсный продукт с однородными частицами серого цвета (размером $\leq 1,00 \pm 0,05$ мм), содержащий выкристаллизованные вкрапления основных фаз сырья - кварца $\alpha\text{-SiO}_2$, оксидов железа Fe_2O_3 , алюминия $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, кальция, магния, калия, натрия, карбонатов и силикатов (рис.1а). Содержание в золе невыгоревшего углерода достигает 10,0%; SiO_2 — 45,0%; серы — 2,0%. Основными ценными составляющими золы являются редкие и цветные металлы (германий, галлий, свинец, цинк, молибден, вольфрам, олово, бериллий, цирконий, висмут, селен, кадмий, ртуть и др.) в количествах, превышающих их промышленно значимые концентрации (табл. 1).

Способность микроорганизмов извлекать металлы из золы изучали в условиях и в средах благоприятных для роста мезофильных гетеротрофных бактерий, мезофильных хемолитотрофных ацидофильных бактерий и умеренно термофильных хемолитотрофных ацидофильных бактерий.



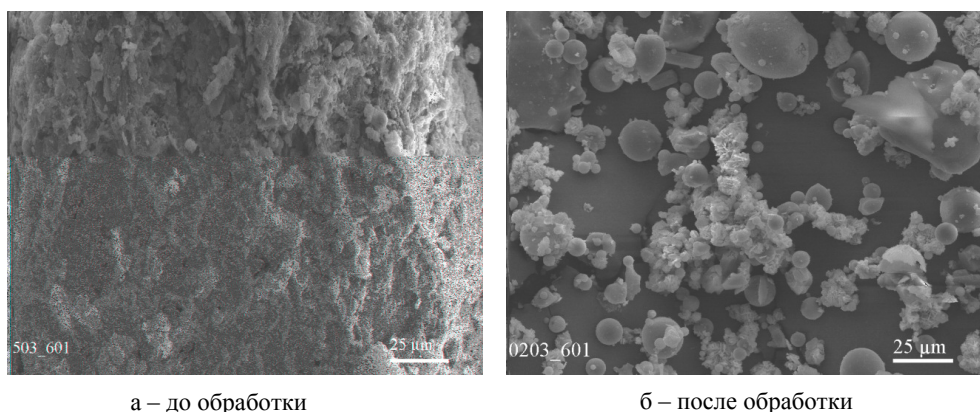


Рис. 1. Микрофотографии золы Ладыжинской ТЭС до и после обработки сообществом хемолитотрофных бактерий

Fig. 1. Photomicrographs of the ash of the Ladyzhynskaya TPP before and after chemolithotrophic bacteria community treatment

Для роста мезофильных гетеротрофных микроорганизмов использовали питательную среду Горбенко с pH 7,0 [8]. Посевы инкубировали при температуре $30,0 \pm 2,0$ °C в течение 5 суток.

Для преимущественного роста сообщества ацидофильных хемолитотрофных бактерий использовали стандартную среду Сильвермана и Лундгрема 9К (состав, г/дм³: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,0; KCl – 0,1; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,01; pH 2,0).

Для сообщества мезофильных хемолитотрофных ацидофильных бактерий, окисляющих серу и ее восстановленные соединения, в качестве питательной среды использовали среду Сильвермана и Лундгрема 9К с тиосульфатом или серой в качестве энергетического субстрата. Концентрация используемых источников энергии составляла 2,0 г/дм³ в пересчете на ион S^{2+} [6]. Мезофильные бактерии, использующие в качестве источника энергии двухвалентное железо, выращивали на среде Сильвермана и Лундгрема 9К с $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ в количестве 9,0 г/дм³ в пересчете на ион Fe^{2+} [6]. Культивирование мезофильных хемолитотрофных бактерий осуществляли при $30,0 \pm 2,0$ °C в течение 5 суток.

Для умеренно термофильных ацидофильных бактерий использовали модифицированную среду 9К*, рекомендованную для представителей рода *Sulfobacillus* (состав, г/дм³: $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 30,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,45; KCl – 0,1; K_2HPO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,01; дрожжевой экстракт – 0,2, pH 2,0) [8,15]. Умеренно термофильных представителей *Acidithiobacillus* культивировали на стандартной минеральной среде 9К с двухвалентным железом в количестве 9,0 г/дм³ в пересчете на ион Fe^{2+} , при температуре $45,0 \pm 2,0$ °C в течение 5 суток [14].

Значения pH для сообщества мезофильных и умеренно термофильных бактерий до $\leq 2,0$ доводили 1,0 N раствором H_2SO_4 .

Численность представителей сообщества гетеротрофных и хемолитотрофных ацидофильных бактерий после 5 дней культивирования определяли путем посева десятикратных последовательных разведений бактериальных суспензий на агаризованные среды того же состава. Количество спорообразующих бактерий определяли после предварительной термообработки при 80,0 °С в течение 15 мин.

Такой методический подход обеспечивал возможность обнаружения спектра различных представителей аборигенной микробиоты и оценить их вклад в процессы извлечения металлов [6, 8, 11].

Определение выщелачивающей активности микробного сообщества золы Ладыжинской ТЭС проводили в колбах объемом 0,2 дм³ при поддержании соотношения твердой и жидкой фаз 1:10. Для этого в колбы вносили по 2,0 г исследуемого субстрата и добавляли по 20,0 мл соответствующей питательной среды, предпочтительной для определенной группы микроорганизмов. В контрольных опытах золу перед внесением в питательную среду стерилизовали. О биогеохимической активности аборигенной микробиоты техногенных отходов судили по концентрации металлов, перешедших из твердой фазы в среду культивирования. Содержание металлов в растворах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборах ААС-1 и С-115ПК Selmi [12].

Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента. При определении содержания элементов в образцах относительное стандартное отклонение для трех повторяемых измерений не превышало 0,03–0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты количественного спектрального анализа (табл. 1) свидетельствуют о наличии в исследуемой золе ценных компонентов, в том числе галлия и германия, в количествах, достаточных для их рентабельного извлечения [2].

В сульфидных рудах и природных концентратах целевыми металлами являются медь, цинк, свинец и железо. В исследуемых нами техногенных отходах в качестве целевых были выбраны редкие металлы (германий, галлий), а также компоненты, содержание которых в минеральном сырье позволяет отнести их к промышленно-рентабельным (табл. 1).

Как показали контрольные исследования во всех опытах отсутствие микроорганизмов из твердой фазы в раствор переходит меньше 2,0% металлов.

Как следует из рис. 2 степень извлечения металлов, в том числе германия и галлия, представителями сообщества гетеротрофных бактерий не превышала 10,0%. При этом как образующие так и не образующие споры гетеротрофные бактерии росли достаточно активно.



Таблица 1

Содержание металлов в золе Ладыжинской ТЭС, полученной от сжигания Павлоградского угля

Table 1

The metals content in the Ladyzhynskaya TPP ash received from the burning of Pavlograd coal

Элемент	Промышленные концентрации, мг/кг	Обнаруженные концентрации, мг/кг
Медь	45,0–60,0	50,0
Цинк	65,0–70,0	70,0
Марганец	$(0,8–1,0) \cdot 10^3$	700,0
Свинец	18,0–22,0	30,0
Никель	80,0–120,0	50,0
Кадмий	45,0–55,0	2,0
Железо	$(1,5–2,0) \times 10^3$	$73,9 \times 10^3$
Галлий	10,0–15,0	10,0
Германий	5,0–7,0	700,0
Олово	90,0–120,0	351,9
Хром	190,0–210,0	99,1
Ванадий	140,0–160,0	214,5
Кобальт	37,0–42,0	116,1
Алюминий	$(2,5–5,0) \times 10^3$	$59,4 \times 10^3$

К концу пятых суток в среде накопилось $1,2 \pm 0,24 \times 10^5$ кл/мл спорообразующих и $4,5 \pm 0,28 \times 10^5$ кл/мл не образующих споры гетеротрофных бактерий (табл. 2). Эти данные, несомненно, свидетельствует о том, что представители этой группы микроорганизмов практически не принимают участия в освобождении металлов из исследуемых проб золы.

В среде благоприятной для роста сообщества мезофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий, окисляющих двухвалентное железо и тиосульфат, в раствор независимо от источника энергии, практически полностью переходили германий, галлий и кадмий, а также до 76,6% никеля (рис. 3). Максимальное количество марганца, меди и цинка (10,7, 19,0 и 20,2% %, соответственно) мезофильные хемолитотрофные бактерии извлекали в среде с двухвалентным железом в качестве энергетического субстрата.



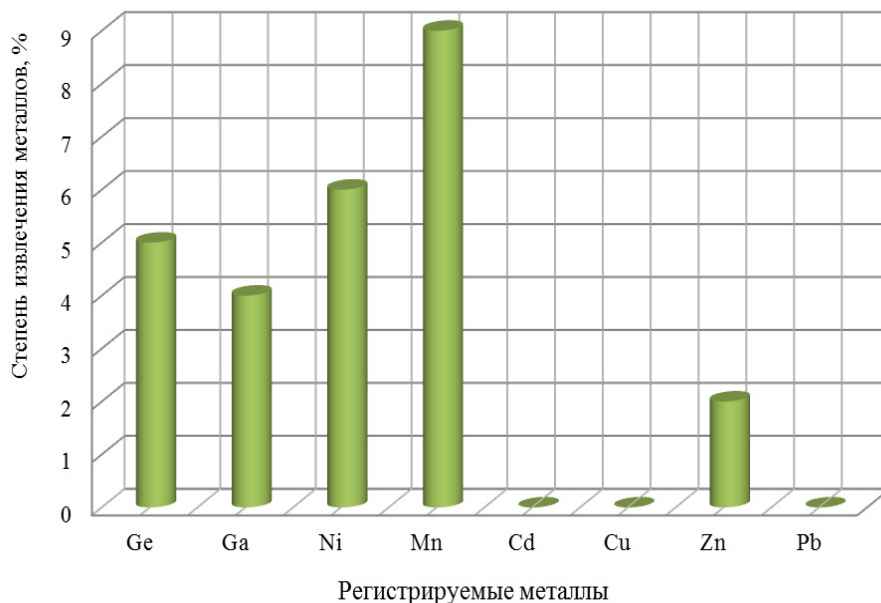


Рис. 2. Степень извлечения (%) металлов гетеротрофными бактериями из золы Ладыжинской ТЭС

Fig. 2. The metals extraction degree (%) by heterotrophic bacteria from the Ladyzhynskaya TPP ash

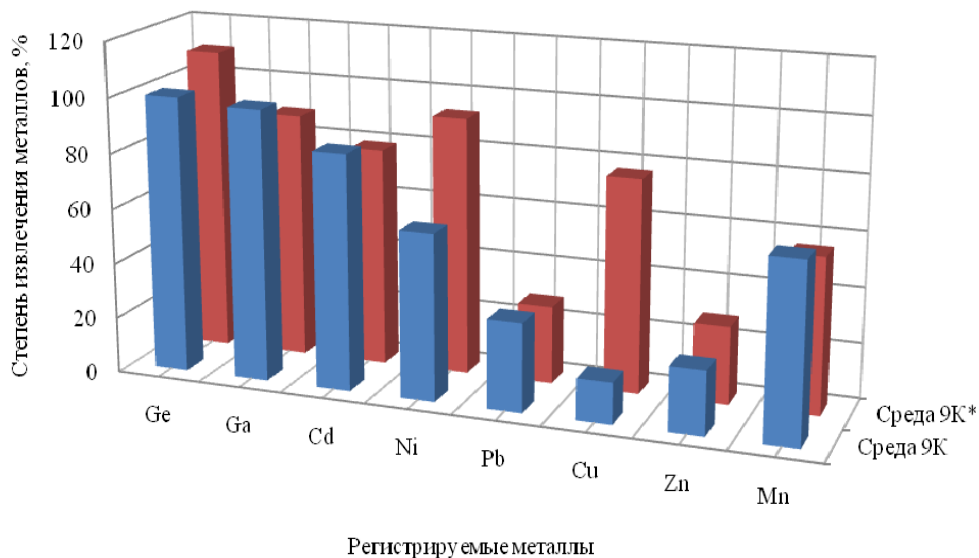


Рис. 3. Степень извлечения (%) металлов мезофильными хемолитотрофными бактериями из золы Ладыжинской ТЭС

Fig. 3. The metals extraction degree (%) by mesophilic chemolithotrophic bacteria from the Ladyzhynskaya TPP ash



Следует отметить, что в среде с двухвалентным железом, эффективность извлечения металлов была выше, чем при использовании других энергетических субстратов (тиосульфата и серы). При этом количество мезофильных ацидофильных хемолитотрофных бактерий на среде с двухвалентным железом было намного выше, чем на средах с тиосульфатом и серой, и составляло $6,6 \pm 0,64 \times 10^4$ кл/мл. Полученные результаты могут свидетельствовать о ведущей роли в этом сообществе бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* в процессах бактериального выщелачивания металлов в условиях данного эксперимента [3, 6, 7].

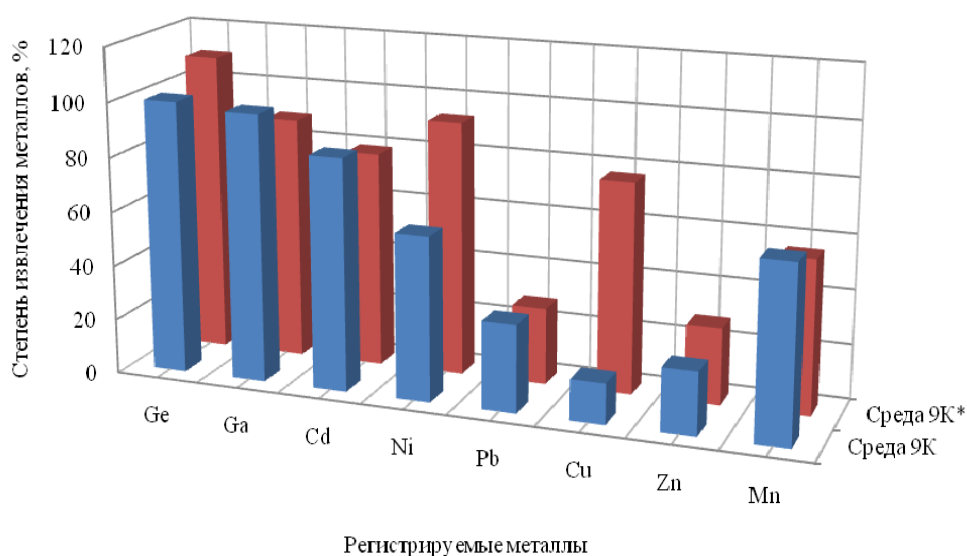


Рис. 4. Степень извлечения (%) металлов умеренно термофильными хемолитотрофными бактериями из золы Ладыжинской ТЭС

Fig. 4. The metals extraction degree (%) by moderately thermophilic chemolithotrophic bacteria from the Ladyzhynskaya TPP ash

Количественные показатели извлечения металлов из золы Ладыжинской ТЭС различными представителями умеренно термофильных хемолитотрофных бактерий на средах 9К и 9К* превышали 80% для германия, галлия, кадмия и никеля (рис. 4). На среде 9К* бактерии извлекали из золы практически весь германий, 90% никеля и более 70% меди. Умеренно термофильные хемолитотрофные ацидофильные бактерии на обеих средах выщелачивали в отличие от мезофильных бактерий около 50% марганца.

Таблица 2

Численность бактерий (КОЕ/мл) в средах выщелачивания металлов из золы Ладыжинской ТЭС (через 5 суток)

Table 2

Bacterial quantity (CFU/ml) in the media of the metals leaching from the Ladyzhynskaya TPP ash (after five days)

Гетеротрофные бактерии		Мезофильные хемолитотрофные бактерии			Умеренно термофильные хемолитотрофные бактерии	
Среда Горбенко		Среда 9К			Среда 9К	Среда 9К*
		Источники энергии				
образующие споры	не образующие споры	Na ₂ S ₂ O ₃	S ^o	Fe ²⁺	Fe ²⁺	Fe ²⁺
1,2±0,24 x10 ⁵	4,5±0,28 x10 ⁵	3,5±0,43 x10 ³	1,5±0,24 x10 ²	6,6±0,64 x10 ⁴	6,4±0,37 x10 ⁸	6,4±0,59 x10 ⁷

Электронномикроскопические исследования показали, что биохимическая деятельность хемолитотрофных ацидофильных бактерий сопровождается разрушением достаточно устойчивых кристаллических структур, образованием пустот и увеличением аморфности субстрата (рис. 1б).

Таким образом, проведенные исследования показали, что в процессе хранения в золе, полученной от сжигания Павлоградского угля на Ладыжинской ТЭС, формируется сообщество микроорганизмов, которое в определенных условиях эксперимента способны эффективно извлекать ряд редких и цветных металлов. Известно, что в ацидофильных условиях накопительная культура хемолитотрофных микроорганизмов включает преимущественно представителей бактерий, относящихся к родам *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidimicrobium*, а также археи, принадлежащие к родам *Acidianus*, *Sulfolobus*, *Ferroplasma* [3–7, 14, 15].

Через 5 дней в мезофильных условиях в результате биохимической деятельности сообщества хемолитотрофных бактерий в раствор независимо от источника энергии, практически полностью переходили германий, галлий и кадмий, а также до 76,6% никеля.

Полученные результаты позволяют с одной стороны судить об окислительно-восстановительных процессах, протекающих в исследуемых субстратах, с другой стороны — оценить вклад различных групп бактерий в процессы извлечения металлов и разработать экологически чистые биотехнологии эффективного выщелачивания металлов из техногенных отходов различного происхождения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блайда И.А. Извлечение ценных металлов при переработке про-



мышленных отходов биотехнологическими методами (Обзор)// Энерготехнологии и ресурсосбережение. — 2010. — № 6. — С. 39–45.

2. *Зубова Л.Г.* Терриконики угольных шахт — источники сырья для металлургии // Уголь Украины. — 2000. — № 6. — С. 32–33.

3. *Канаева З.К., Канаев А.Т.* Микробиоценозы хемолитотрофных растворов подземного выщелачивания уранового месторождения «Карамурун»// Биологические науки — 2012, № 5. — С. 153–157.

4. *Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф.* Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. — 2006. — Т. 75, № 5. — С. 593–629.

5. *Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик Э.И.* Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. — М.: Наука, 1972. — 248 с.

6. *Каравайко Г.И.* Практическое руководство по биоготехнологии металлов. — М., АН СССР, 1989. — 371 с.

7. *Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О.* Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестник наук о Земле. — 2008. — Т. 60, Вып. 12. — С. 76–85.

8. *Методы общей бактериологии.* Т. 2. — М.: Мир, 1984. — 265 с.

9. *Полькин С.И., Адамов Э.В., Панин В.В.* Технология бактериального выщелачивания цветных и редких металлов. — М.: Недра, 1982. — 288 с.

10. *Пашков Г.Л.* Зола природных углей — нетрадиционный сырьевой источник редких элементов // Соросовский образовательный журнал. — 2001. — Т. 7, № 11. — С. 67–72.

11. *Современная микробиология. Прокариоты* // Под ред. Ленгелера Й., Дрекса Г. и Шлегеля Г. Перевод с англ. / Под ред. Нетрусова А.И. М.: Мир, 2005. Т. 2. — С. 178–180.

12. *Хавезов И., Цалев Д.* Атомно-абсорбционный анализ. — Л.: Химия, 1983. — 144 с.

13. *Шпирт М. Я.* Физико-химические основы переработки германиевого сырья. — М.: Металлургия, 1977. — 264 с.

14. *Kevin B. Hallberg and E. Borje Lindstromt.* Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile// Microbiology. — 1994. — V. 140. — P. 3451–3456.

15. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant chemolithotrophic bacterium /Tat'yana I. Bogdanova, Iraida A. Tsaplina, Tamara F. Kondrat'eva, Vitalii I. Duda, Natalya E. Suzina, Vitalii S. Melamud, Tat'yana P. Tourova and Grigorii I. Karavaiko//International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2006. — V. 56. — P. 1039–1042.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2012.



І.А. Блайда, Т.В. Васильєва, Л.І. Слюсаренко, В.Ф. Хитрич, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 746 61 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

ВИЛУЧЕННЯ РІДКІСНИХ ТА КОЛЬОРОВИХ МЕТАЛІВ УГРУПОВАННЯМИ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗОЛИ ВІД СПАЛЮВАННЯ ПАВЛОГРАДСЬКОГО ВУГІЛЛЯ

Реферат

Метою роботи було вивчення здатності до вилучення рідкісних і кольорових металів з золи від спалювання Павлоградського вугілля на Ладижинській теплоелектростанції мікроорганізмами техногенного мікробіоценозу, який сформувався в процесі зберігання. Методом атомно-абсорбційної спектроскопії встановлено, що в золі містяться в промислових концентраціях мідь, цинк, свинець, галій, германій, олово, ванадій, кобальт, алюміній. Дослідження з вилучення металів з золи від спалювання Павлоградського вугілля здійснювали в умовах сприятливих для росту мезофільних гетеротрофних мікроорганізмів, мезофільних ацидофільних хемолітотрофних бактерій і помірно термофільних ацидофільних хемолітотрофних бактерій. У процесі досліджень показана висока вилуговуюча активність спільноти ацидофільних хемолітотрофних бактерій, що населяють золу Ладижинської ТЕС. В мезофільних умовах в результаті біохімічної діяльності угруповання хемолітотрофних бактерій в розчин практично повністю переходили германій, галій і кадмій, а також до 76,6% нікелю.

Ключові слова: зола, вугілля, гетеротрофні мікроорганізми, ацидофільні хемолітотрофні бактерії, біовилуговування, рідкісні і кольорові метали.



**I.A. Blayda, T.V. Vasyleva, L.I. Slysarenko, V.F. Khitrich,
V.O. Ivanytsia**

Odessa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 746 61 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

EXTRACTION OF RARE AND NONFERROUS METALS BY MICROBIAL COMMUNITIES OF THE ASH FROM BURNING PAVLOGRAD'S COAL

Summary

The aim of the paper was to study the ability to leach rare and nonferrous metals from the ash from the combustion of Pavlograd coal in the Ladyzhynskaya power plant by microorganisms formed during storage of anthropogenic microbiota. It was found out by atomic absorption spectroscopy that the ash contained copper, zinc, lead, gallium, germanium, tin, vanadium, cobalt, aluminum in industrial concentrations. Studies on leaching of metals from the ash from the combustion of Pavlograd coal were conducted under the favorable growth of mesophilic heterotrophic microorganisms, mesophilic acidophilic chemolithotrophic bacteria and moderately thermophilic acidophilic chemolithotrophic bacteria. During the study it was showed high activity of lixiviant community moderately thermophilic acidophilic chemolithotrophic bacteria inhabiting the ash of the Ladyzhynskaya TPP regarding germanium, gallium, cadmium and nickel. Almost completely germanium, gallium, cadmium and to 76.6% nickel extracted in solution in mesophilic conditions by the biochemical activity of community of chemolithotrophic bacteria regardless of the source of energy.

Key words: ash, coal, heterotrophic microorganisms, acidophilic chemolithotrophic bacteria, bioleaching, rare and nonferrous metals.



**II МІЖНАРОДНА
НАУКОВО-ПРАКТИЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ
«СУЧАСНІ РЕСУРСОЗБЕРІГАЮЧІ ТЕХНОЛОГІЇ.
ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ»
Україна, м. Одеса, 1-5 жовтня 2012**

II Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні ресурсозберігаючі технології. Проблеми і перспективи» уже вдруге пройшла в м. Одесі (Україна) на базі Біотехнологічного науково-навчального центру Одеського національного університету імені І.І. Мечникова з 1 по 5 жовтня 2012 року.

Захід відбувся за участю АТ «Центр наук про Землю, металургію та збагачення» Республіки Казахстан в рамках договору про науково-технічне співробітництво за підтримки:

- Міністерства освіти і науки, молоді та спорту України
- Міністерства екології та природних ресурсів України
- Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського
- Спільки біологів і біотехнологів Одеси.

До початку роботи конференції було сформовано програму та видано збірник матеріалів конференції, який включив 64 доповіді на 342 сторінках. У роботі конференції взяли участь понад 100 вчених з України, Республіки Казахстан, Росії та Азербайджану.

В ході роботи конференції було заслухано 6 пленарних, 36 усних та представлено 38 стендових доповідей за основними секціями:

1. Промислові відходи як вторинна сировина.
2. Промислові біогеотехнології. Біоенергетика.
3. Раціональне використання природних ресурсів.

Голова оргкомітету конференції проректор Одеського національного університету, професор, доктор біологічних наук В.О. Іваниця, а також члени міжнародного наукового оргкомітету конференції у присутності журналістів, офіційних представників урочисто оголосили про відкриття заходу. Конференцій, присвячених глобальним і локальним екологічним проблемам в Україні і в країнах СНД, проходить чимало. Відмінною рисою даного форуму є надання особливої уваги найперспективнішому і екологічно безпечному на сьогоднішній день підходу до переробки відходів — біотехнологічному, питанням переробки відходів з вилученням із них кольорових, рідкісних, дорогоцінних металів, а також питанням екологізації біоетанольного виробництва і використання альтернативних енергоресурсів.



сів. Одеський національний університет імені І.І. Мечникова і створений на його базі Біотехнологічний науково-навчальний центр проводить таку конференцію вже вдруге, оскільки саме тут останнім часом активно і успішно розвиваються багато з цих напрямів наукових досліджень.

Конференція мала науково-практичний характер. Мета — обмін досвідом, науковими і практичними досягненнями, визначення основних тенденцій, перспектив розвитку і координація зусиль вчених і представників підприємств з утилізації промислових відходів і оздоровлення навколишнього середовища, зміцнення контактів між зацікавленими сторонами, залучення до проблеми уваги інвесторів, промисловців, підприємців, громадськості, влади, ЗМІ.

У процесі насиченої конструктивної роботи учасники знайшли нових партнерів по науково-технічному співробітництву, з обміну практичними і науковими результатами.

Учасниками конференції було відзначено високий рівень фундаментальних і прикладних досліджень, представлених у доповідях, а також активну участь у роботі конференції та зростий інтерес до наукових проблем молодих вчених України, Казахстану і Росії. Було висловлено побажання зробити такий форум традиційним з періодичністю три роки і провести III-ю Міжнародну науково-практичну конференцію «Сучасні ресурсозберігаючі технології. Проблеми і перспективи» в м. Одесі (Україна) у вересні 2015 року з необхідністю залучення до роботи конференції учасників з боку профільних міністерств, промислових підприємств і бізнесменів для встановлення необхідних взаємовідносин «наука-виробництво».

Докладнішу інформацію конференцію, про плани та перспективи проведення III Міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні ресурсозберігаючі технології. Проблеми і перспективи» читайте на офіційному сайті заходу: <http://www.mrst.onu.edu.ua>.

Блайда І.А.,
канд. техн. наук



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, діагностичними, мікробні технології в сільському господарстві, мікробні технології у харчовій промисловості; захист та оздоровлення навколишнього середовища; отримання енергоносіїв та нових матеріалів тощо.

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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



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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то 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; графі, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

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

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

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

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

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

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

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

Лопатина Н.В., Терентьев А.Н., Наталич Л.А., Янгулов Ш.У. Оптимизация питательной среды для культивирования вакцинного штамма чумного микроба с применением метода математического планирования эксперимента / Редкол. «Микробиол. журн.» — К., 1991. — 7 с. — Деп. в ВИНТИ 03.01.92, № 1-B92.

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

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

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

Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



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

Зам. № 545. Тираж 100 прим.

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