

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

№ 2(14)

2011

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 2

•
2011

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

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

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

PUBLISHERS

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

Publishing editor N.G. Yurgelaitis
Editors: I.M. Omelchenko, L.B. Kotlyarova, I.V. Rayko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel.: 723-28-39, 748-11-01
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
№ 2

•
2011

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

Свідоцтво: серія КВ № 11462-335Р від 07.07.2006 р.

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

ВИДАВЦІ

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

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

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс
Редактори: І.М. Омельченко, Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39, 748-11-01

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

www.mbt.onu.edu.ua

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- V.O. Ivanytsia, M.B. Galkin**
MODERN LOOKS ABOUT BIOFILM FORMATION
MECHANISMS 8

EXPERIMENTAL WORKS

- R.V. Grytsay, L.D. Varbanets, O.S. Brovarska,
N.V. Zhytkevych, T.N. Oliynyk**
EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF *RALSTONIA*
SOLANACEARUM STRAINS USING RAPD-PCR..... 23
- S.L. Miros, L.F. Dyatchenko, N.S. Bobreshpova,
O.S. Bagaeva, V.O. Ivanytsia**
EXPRESSIONS OF CARBOXYLESTERASE ISOFORMS
OF *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST)
IN DIFFERENT GROWING CONDITIONS..... 34
- O.M. Alekseenko, I.V. Zhernosekova, A.I. Vinnikov**
STUDY OF *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS*
EXOMETABOLITES INFLUENCE ON THE GROWTH
OF MUSHROOM *PLEUROTUS OSTREATUS* 41
- N.V. Limanska, S.A. Serkov, Zh.Yu. Sergeeva, V.O. Ivanytsia**
DETECTION OF *RHIZOBIUM VITIS* AND *R. RADIOBACTER*
STRAINS BY PCR WITH THE PRIMERS TO DIFFERENT GENOME
SEQUENCES 48
- I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush**
PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF
THIOCAPSA SP. YA-2003 BACTERIA UNDER THE INFLUENCE
OF HYDROGEN SULFIDE 56
- L.V. Avdeeva, A.I. Osadcha, M.A. Kharkhota**
CELLOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA OF GENUS *BACILLUS* 65
- I.A. Blayda, T.V. Vasyleva, L.I. Slysarenko, V.F. Chitrich,
V.O. Ivanytsia**
EXTRACTION OF GERMANIUM FROM LEAD-ZINC PRODUCTION
WASTE BY THIOBACTERIA 73
- I.M. Malynovska, N.A. Zinovieva**
MICROBIOLOGICAL PROCESSES IN THE RHIZOSPHERE OF THE
PLANTS IN THE CONTAMINATED SOIL WITH OIL PRODUCTS 83

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

В.О. Іваниця, М.Б. Галкін СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ЩОДО МЕХАНІЗМІВ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ	8
--	---

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

Р.В. Грицай, Л.Д. Варбанець, О.С. Броварська, Н.В. Житкевич, Т.М. Олійник ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ШТАМІВ <i>RALSTONIA</i> <i>SOLANACEARUM</i> НА ОСНОВІ RAPD-ПЛР АНАЛІЗУ	23
С.Л. Міресь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця ЕКСПРЕСИВНІСТЬ ІЗОФОРМ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURTIS: FR.) P. KARST ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ НА СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ	34
О.М. Алексеєнко, І.В. Жерносекова, А.І. Вінніков ВПЛИВ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ <i>STREPTOMYCES RECIFENSIS</i> VAR. <i>LYTICUS</i> НА РІСТ ГРИБА <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	41
Н.В. Ліманська, С.А. Серков, Ж.Ю. Сергєєва, В.О. Іваниця ВИЯВЛЕННЯ ШТАМІВ <i>RHIZOBIUM VITIS</i> І <i>R. RADIOBACTER</i> МЕТОДОМ ПЛР З ВИКОРИСТАННЯМ ПРАЙМЕРІВ ДО РІЗНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМУ	48
І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРІЙ <i>THIOPARSA</i> SP. YA-2003 ЗА ВПЛИВУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ	56
Л.В. Авдєєва, А.І. Осадча, М.А. Хархота ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>BACILLUS</i>	65
І.А. Блайда, Т.В. Васильєва, Л.І. Слюсаренко, В.Ф. Хитрич, В.О. Іваниця ВИЛУЧЕННЯ ГЕРМАНІЮ З ВІДХОДІВ СВИНЦЕВО-ЦИНКОВОГО ВИРОБНИЦТВА ТІОНОВИМИ БАКТЕРІЯМИ	73
І.М. Малиновська, Н.А. Зінов'єва МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ В РИЗОСФЕРІ РОСЛИН У ЗАБРУДНЕНОМУ НАФТОПРОДУКТАМИ ҐРУНТІ.....	83

A.M. Solonenko
BACTERIA-DESTRUCTORS OF MORTMASS *CLADOPHORA*
SIWASCHENSIS IN BRINE OF THE AMPHIBIAN AREAS ON THE
ARABAT SPIT AND THE BERDYANSK FORELAND 92

THE CHRONICLE OF A SCIENTIFIC LIFE
VI SUMMER SCHOOL
«MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY» 97

INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 99

А.М. Солоненко

БАКТЕРІЇ-ДЕСТРУКТОРИ МОРТМАСИ *CLADOPHORA*
SIWASCHENSIS У РАПІ АМФІБІАЛЬНИХ ДІЛЯНОК АРАБАТСЬКОЇ
СТРІЛКИ ТА БЕРДЯНСЬКОЇ КОСИ 92

ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

VI ЛІТНЯ ШКОЛА
«МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» 97

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 99

УДК 579.222:579.262

В.О. Іваниця, М.Б. Галкін

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

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ЩОДО МЕХАНІЗМІВ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ

В оглядовій статті викладено сучасні уявлення щодо процесу формування біоплівки умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами. Сьогодні біоплівка розглядається як основна форма існування мікробних угруповань у природних умовах, процеси, що протікають у них, обумовлюють реалізацію багатьох притаманних бактеріям ознак. Численні дослідження дозволили розкрити ключові механізми, що лежать в основі цього процесу.

Ключові слова: біоплівка, міжклітинна комунікація, quorum sensing, аутоіндуктори, месенджери.

Розуміння процесів формування біоплівки мікроорганізмами має велике значення, як з наукового, так і з практичного погляду. Біоплівка за своєю суттю є основною формою існування мікробного співтовариства у природних умовах, яка характеризується набором досить унікальних властивостей.

Цей процес може відігравати як позитивну, так і негативну роль. Використання біоплівок у біотехнології дозволяє значно підвищити вихід корисних продуктів мікробного синтезу. У біоплівках відбувається посилення активності більшості ферментів, що є наслідком їх іммобілізації та концентрування в досить обмеженому просторі.

У медичній практиці формування біоплівки умовно-патогенними та патогенними мікроорганізмами спричиняє значне ускладнення терапії інфекцій, обумовлених ними. Це є наслідком значного підвищення у біоплівках резистентності мікроорганізмів до антимікробних препаратів, оскільки у біоплівках реалізуються процеси, які практично не відбуваються у вільних форм існування бактерій [13].

Процес формування біоплівки мікроорганізмами є дуже складним [27]. Він включає багато стадій, які характеризуються різними механізм-



мами їх реалізації. Одним з таких механізмів є система *quorum sensing* (дослівно — почуття кворуму). *Quorum sensing* є глобальною системою регуляції експресії генів, у якій використовуються низькомолекулярні сигнальні молекули — аутоіндуктори. Ця система регулює такі ознаки, як синтез деяких корисних продуктів, факторів патогенності, міжклітинну комунікацію, як в межах виду так і між представниками різних видів мікроорганізмів [10].

Загальні уявлення

Термін біоплівка використовується для визначення окремих сукупностей мікроорганізмів і продуктів їх метаболізму на межі твердої та рідкої фаз. Звичайно така біоплівка являє собою клітини мікроорганізмів на твердій поверхні, якою може бути поверхня каменів і окремих часток у водному середовищі; вологий ґрунт і частки опадів; листя, коріння, насіння рослин, що проростає; поверхня зубів; епітеліальні тканини рубця жуйних тварин; медичне обладнання, таке як катетери; корпуси кораблів, палі морських споруд, внутрішні поверхні хімічного та мікробіологічного устаткування, наприклад, фільтри і таке інше [10].

Будь-яка біоплівка складається щонайменше з двох компонентів [28]. Першим компонентом є самі мікроорганізми, здатні до біоплівкоутворення. Біоплівки можуть складатися як з клітин одного, так і різних видів мікроорганізмів. В них можуть бути присутні не тільки представники прокариотних, а і еукаріотних мікроорганізмів, наприклад бактерії та гриби роду *Candida*. Полівидові біоплівки є значно більш поширеними у природі.

Іншим важливим компонентом у біоплівках є продукти життєдіяльності мікроорганізмів, які створюють так званий матрикс біоплівки, що відіграє важливу роль в її функціонуванні [18, 23]. Основне місце серед таких метаболітів займають екзополісахариди. Структура деяких з них досить добре вивчена. Так, *Serratia macedonicus* синтезує екзополісахарид високої молекулярної маси та складної просторової організації, який складається з D-глюкози, D-галактози та N-ацетил-D-глюкозаміну у молярному співвідношенні 3:2:1 [35]. Такі полісахариди високо специфічні, і зустрічаються у певних видів мікроорганізмів. Наприклад, було показано, що *Staphylococcus epidermidis* синтезує унікальний полісахарид, який складається, щонайменше, з 130 залишків 2-диокси-2-аміно-D-глюкопіронозилу [24, 35]. Цей полісахарид не тільки сприяє агрегації клітин *S. epidermidis* між собою, але також виконує функції бактеріального адгезину. Характерною відмінністю цього полісахариду є те, що він існує у двох формах: мажорній (близько 80%) та мінорній (близько 20%). Мінорна форма містить у своєму складі менше не N-ацетильованих залишків, а також багато фосфатних залишків, які надають цьому полісахариду аніонні властивості [24].



Загальний профіль екзополісахаридів у грамнегативних бактерій є схожим з описаним вище у грампозитивних. Біоплівки, що формують *E. coli* та види роду *Pseudomonas*, практично не відрізняються за вмістом полі-N-ацетил-глюкозамінових полімерів від біоплівок грампозитивних бактерій [35]. Але в деяких випадках спостерігаються і суттєві відмінності. Так, для деяких штамів *E. coli*, а також *Salmonella typhimurium* дуже важливим компонентом біоплівки є целюлоза [35]. Для бактерій роду *Bordetella* основним складовим компонентом матрикса біоплівки є ксиліоза, з якої також будуються капсули цих бактерій [35].

Особливістю грамнегативних бактерій є також і те, що полісахариди у них практично не беруть участі у першому етапі формування біоплівки — адгезії до поверхні. Так, широко відомо, що у бактерій роду *Pseudomonas*, зокрема у *P. aeruginosa*, адгезія здійснюється за рахунок фімбрій, які здатні скорочуватися, тоді як полісахаридний матрикс починає формуватися лише на більш пізніх етапах [18, 34]. Окрім полісахаридів, до складу матриксу входять також білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти [37].

Вивчення механізмів формування біоплівки показало, що цей процес у мікроорганізмів проходить під контролем генетичного апарату клітин. Генетичне типування 48 штамів *P. aeruginosa* дозволило розділити ці штами на групи від А до Е. На основі отриманих даних встановлено зв'язок між належністю штамів до конкретних генетичних груп та здатністю до біоплівкоутворення. Так, найбільш високу здатність до формування біоплівки продемонстрували штами, які відносилися до груп D та Е. Усі штами, що належали до цих груп, мали у складі хромосомної ДНК однакові фрагменти, розміром близько 4 кБ [34].

Для *Bordetella bronchiseptica* була встановлена залежність здатності до формування біоплівки з експресією конкретних генів. Результати досліджень показали, що цією властивістю володіють штами мікроорганізмів з генотипом *Bvg*⁺, а також здатні до експресії аденилатциклази/гемолізіну *SuaA* і компонентів системи секреції третього типу [34]. При цьому ген *Bvg* виступає як регуляторний ген.

Механізми утворення біоплівок

Наразі не має сумнівів у тому, що процес утворення біоплівок є дуже складним. Він відбувається у декілька стадій, які послідовно змінюють одна одну [5]. Формально можна виділити наступні стадії цього процесу: адгезія до субстрату, моношар, формування мікроколоній, зріла біоплівка, розпад.

Кожна зі стадій процесу утворення біоплівки має фіксований проміжок часу та реалізується за рахунок різних факторів. Найбільш повно ці процеси вивчені у грамнегативних бактерій. Дослідження багатьох авторів показали, що у різних груп грамнегативних бактерій кожна з наведених вище стадій обумовлена дією різних факторів і систем, які характерні для представників цих груп [5].



У більшості грамнегативних бактерій основну роль у процесі адгезії відіграють фібрії. Якщо у *E. coli* це фібрії першого типу, то у *P. aeruginosa* процес адгезії обумовлюють спеціальні фібрії четвертого типу, які мають здатність скорочуватися [21]. Значну роль на перших стадіях адгезії відіграють також інші структури, такі як джгутики та компоненти клітинної стінки, різноманітність яких і обумовлює особливості різних груп мікрорганізмів [21]. Наприклад, якщо у *P. aeruginosa* джгутики є лише засобом «доставки» клітин до твердого субстрату і на самих ранніх етапах адгезія починається за рахунок взаємодії з поверхнею ліпополісахариду та спеціальних білків зовнішньої мембрани, то у представників родин *Enterobacteriaceae* та *Vibrionaceae* джгутики відіграють більш значну роль [10]. Це пов'язано з тим, що ранні етапи взаємодії цих бактерій з поверхнею не характеризуються жорсткою адгезією. Досліди показали, що клітини таких мікроорганізмів, як *E. coli* та *V. cholerae*, здатні завдяки джгутикам вільно переміщуватися по твердій поверхні [38]. Жорсткий зв'язок з твердою поверхнею у цих бактерій обумовлюється дією так званих стабілізуючих факторів [38]. Одним з найбільш вивчених є фактор Ag 43 у *E. coli* [9]. Фактор Ag 43 являє собою білок групи аглютининів, локалізований на зовнішній мембрані бактерій. У *E. coli* він відіграє роль кофактора адгезії, а також обумовлює зв'язок клітин бактерій між собою шляхом міжклітинної взаємодії молекул цього білка [9].

Процес адгезії призводить до формування на твердій поверхні моношару клітин. Після цього починається формування основних структурних одиниць біоплівки — мікроколоній [20, 30]. У грамнегативних бактерій формування мікроколоній, як і процес адгезії, відбувається двома принципово різними шляхами. Перший шлях є характерним для представників родин *Enterobacteriaceae* та *Vibrionaceae*. Формування мікроколоній у цих бактерій відбувається за рахунок агрегації між собою адгезованих до поверхні клітин, а також додаткової адгезії частини клітин планктону до моношару [30]. Це відбувається за рахунок аглютиніноподібних білків, зокрема описаного вище Ag 43.

Другий шлях формування мікроколоній є характерним для представників родини *Pseudomonadaceae*, зокрема *P. aeruginosa*. Як було описано вище, для представників цієї родини та деяких інших груп мікроорганізмів (особливо тих, що не мають джгутиків) є характерною жорстка адгезія з самого початку формування біоплівки. Таким чином, мікроколонії у них формуються шляхом поділу клітин, які формують моношар [20].

Значну роль у формуванні мікроколоній у цих бактерій відіграє також так звана *twitching motility* (смикальна рухливість) [27]. Цей процес є протиставленням *swarming motility* (роїнню), яке є характерним для представників родин *Enterobacteriaceae* та *Vibrionaceae* [3]. Обидва процеси надають змогу бактеріям рухатися по твердій поверхні. Але, тоді як *swarming motility* обумовлена наявністю джгутиків, то



механізм *twitching motility* принципово інший. У *P. aeruginosa* цей тип переміщення здійснюється за участі фімбрій четвертого типу [2]. Завдяки здатності до скорочування вони працюють як «пружини», які ніби підкидають клітини над поверхнею, але електростатичні сили не дають повністю відірватися від поверхні і клітини, «пролетівши» деяку відстань, знову прикріплюються до поверхні [2]. Але з цього правила є і виключення. Так, для тієї ж самої *P. aeruginosa* показана можливість здійснення *swarming motility*, тоді як для видів роду *Burkholderia*, які також входять до родини *Pseudomonodaceae*, *twitching motility* є менш характерною [27]. Встановлено, що в процесі агрегації у *P. aeruginosa* відбувається активація генів синтезу альгінату та пригнічення синтезу компонентів джгутиків, що проходить під контролем регуляторного білка Crc [10].

Після появи мікроколоній починається стадія формування саме біоплівки. У цей час проходять такі процеси, як структуризація біоплівки, синтез позаклітинного матриксу та запуск системи групової регуляції (*quorum sensing*). Так, у *V. cholerae* синтез екзополісахаридів починається вже на ранніх етапах, і вони являють собою важливий стабілізуючий фактор [38]. Сформована біоплівка має складну тривимірну структуру. Ці структури дуже різняться за своєю формою. Зокрема, зріла біоплівка *P. aeruginosa* має форму, яка нагадує плодові тіла грибів. Через деякий час існування біоплівка розпадається, як за рахунок відкріплення клітин, так і за рахунок загибелі частини клітин, що часто обумовлюється лізогенними бактеріофагами [39, 41].

Міжклітинна комунікація в біоплівках – *quorum sensing*

Одним з важливих досягнень сучасної науки було відкриття та встановлення принципів функціонування системи міжклітинної комунікації в біоплівках. Ця система зараз відома під назвою *quorum sensing*. [4].

Quorum sensing – це механізм, за яким мікрорганізми здатні координувати експресію деяких генів у своїх популяціях за рахунок використання малих сигнальних молекул. Цей механізм був уперше відкритий Neelson et al. у 1970 році у морської бактерії *Vibrio fischeri* [26] і на думку авторів, був притаманний лише досить вузькому колу бактерій. Пізніше його виявили практично у всіх представників грампозитивних та грамнегативних бактерій і у деяких еукаріотних мікроорганізмів [33]. Встановлено здатність до комунікації мікроорганізмів за допомоги не тільки близьких, а і далеких у філогенетичному відношенні таксонів цієї системи [33]. Завдяки *quorum sensing* у мікроорганізмів регулюється експресія значної кількості різноманітних генів, у тому числі важливих генів, які обумовлюють нормальну життєдіяльність, синтез факторів патогенності та розвиток біоплівки [4]. Ця система дозволяє також мікроорганізмам у складі біоплівок координувати, всією популяцією, відповідати на вплив різних чинників зовнішнього середовища.



Дослідження показали, що існує декілька типів системи *quorum sensing* [11]. Ці типи розрізняють за тим, які молекули використовуються для передачі сигналів та за деякими іншими параметрами. Сьогодні виділяють три основні типи системи *quorum sensing*. До основних типів відносять:

- гомосеринлактонзалежну систему *quorum sensing* грамнегативних бактерій [11];
- пептидзалежну систему *quorum sensing* грампозитивних бактерій [15];
- систему *quorum sensing* у *Vibrio harveyi* [11].

Додатковими є хінолонова система *quorum sensing* та система, у якій як сигнальні молекули використовуються фуранони [6, 25, 29]. Схематично основні системи представлені на рис. 1.

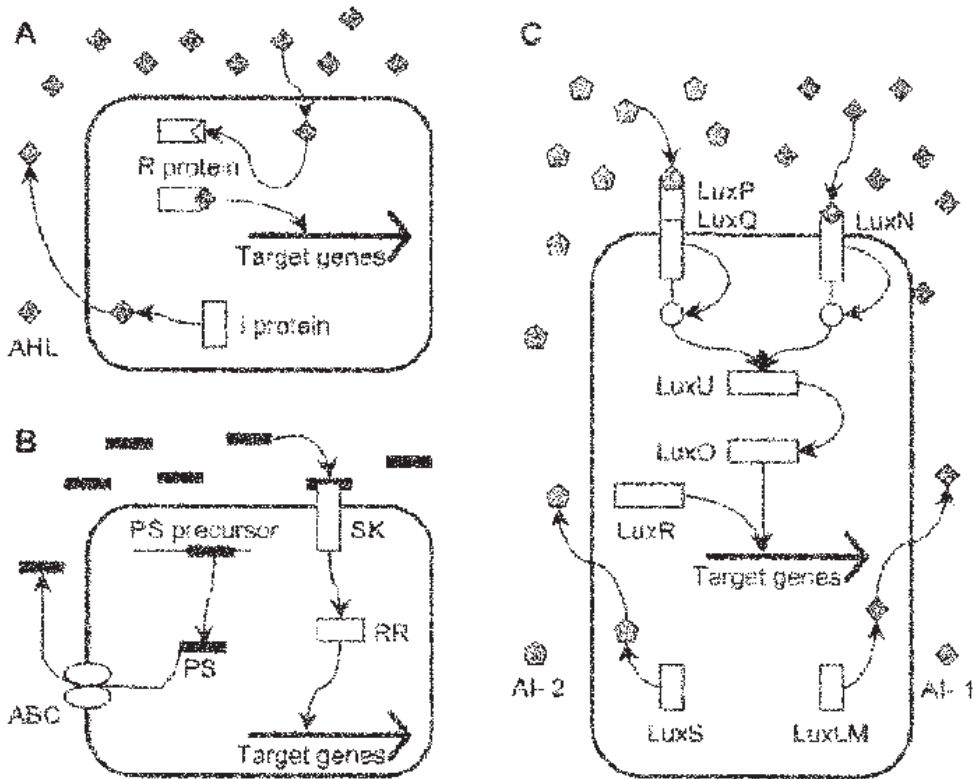


Рис. 1. Типи систем *quorum sensing* [19]

- A) гомосеринлактонзалежна система *quorum sensing* грамнегативних бактерій;
- B) пептид-залежна система *quorum sensing* грампозитивних бактерій;
- C) система *quorum sensing* у *Vibrio harveyi*-

Fig. 1. Three types of *quorum sensing* systems [19]

- A) homoserinlacton depend *quorum sensing* system of gram-negative bacteria;
- B) peptide depend *quorum sensing* system of gram-positive bacteria;
- C) *Vibrio harveyi quorum sensing* system.

Гомосеринлактонзалежна система грамнегативних бактерій складається з І-білку, який являє собою ацилгосерин лактон (АГЛ) синтетазу. Попередниками ацильованих гомосеринлактонів є ацилацетат (попередник ацильного ланцюга) та S-аденозилметионін (попередник гомосеринлактону). Біосинтез гомосеринлактону (рис. 2) відбувається шляхом відщеплення залишку метионіну від попередника за сульфідним зв'язком. У результаті реакції утворюється гомосеринлактон та високотоксична сполука – метилтіоаденозин. Остання інактивується шляхом гідролізу за участю ферменту Pfs (метилтіоаденозин/S-аденозингомоцистеїн нуклеази) з формуванням менш токсичного продукту – метилтіорибози [17].

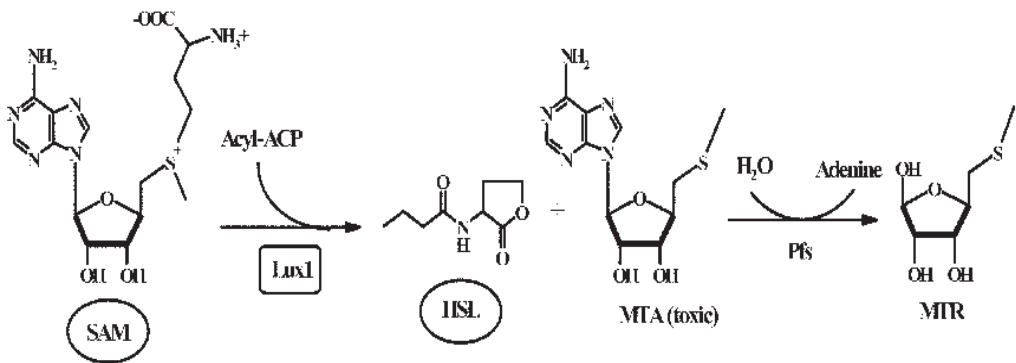


Рис. 2. Біосинтез гомосеринлактону [17]

Fig. 2. Homoserinlactone biosynthesis [17]

Біосинтез ацильного ланцюга (рис. 3) відбувається в циклі біосинтезу жирних кислот за допомоги ферментів родини Fab [17]. У ході циклу елонгації синтезуються два основних інтермедіати: 3-оксо-додеканоїл-ацетилфосфат та кротоніл-ацетилфосфат, які використовуються І-білками для синтезу ацильованих гомосеринлактонів. І-білки за своєю суттю є ацилтрансферазами, що переносять сформовані ацильні ланцюги на молекулу гомосеринлактону. Вважається, що як субстрат для біосинтезу АГЛ використовується D-3-гідрокси-кетоацил-ацетилфосфат. Таким чином синтезується також багато інших сполук, такі як гемолізени, ліпід А та фосфоліпіді. Різні види грамнегативних бактерій характеризуються різною довжиною ацильного ланцюга в аутоіндукторах.

Синтезовані молекули АГЛ вільно дифундують через цитоплазматичну мембрану. У зв'язку з ростом чисельності популяції відбувається зростання концентрації АГЛ і при досягненні критичного рівня вони починають зв'язуватися з R-білком, який являє собою універсальний регулятор. Сформований АГЛ-R комплекс димеризується та активує експресію генів мішеней [11, 12].

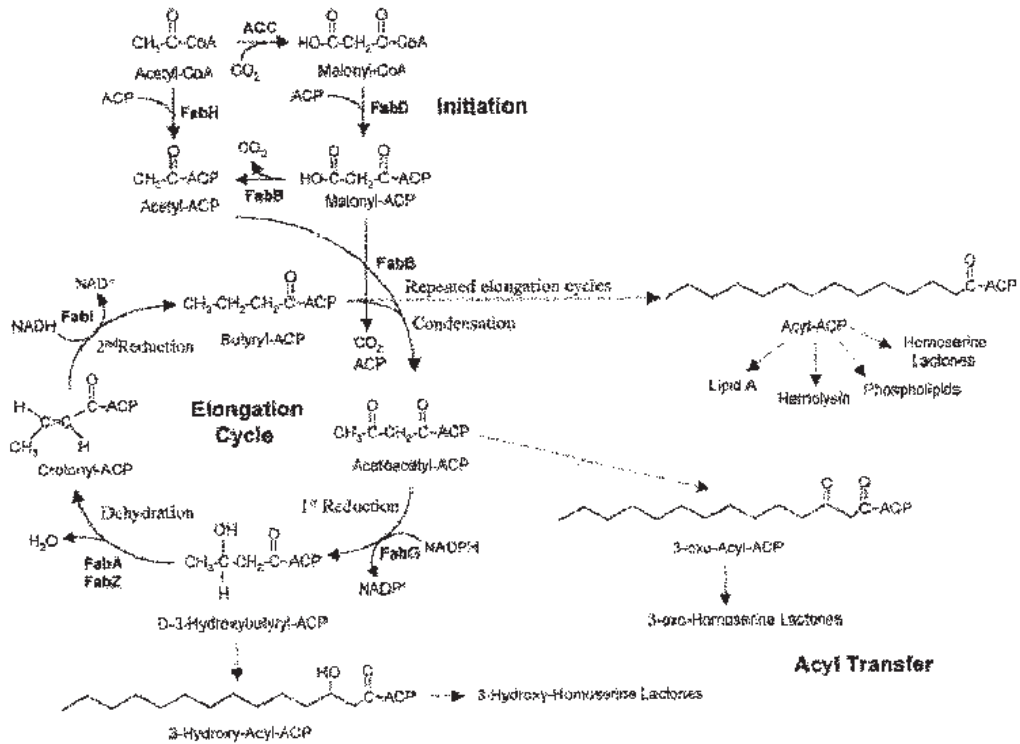


Рис. 3. Біосинтез ацильних ланцюгів гомосеринлактонів на прикладі аутоіндукторів *P. aeruginosa* [17]

Fig. 3. Homoserinlactone acyl-chains biosynthesis in *P. aeruginosa* [17]

Пептид-залежна система *quorum sensing* грамположитивних бактерій функціонує за іншим принципом — двокомпонентної сигнальної системи [24]. Синтезований попередник сигнальних пептидів нарізається на окремі сигнальні молекули. Вони транспортуються з клітин завдяки АТФ-залежному касетному транспортеру. По досягненні критичного рівня ці пептиди зв'язуються зі специфічним рецептором на поверхні клітин та активують сенсорні кінази, які у свою чергу активують білок-регулятор шляхом його фосфорильовання. Активованій таким чином білок-регулятор діє на гени мішені, що спричиняє їх експресію [15]. Третій тип системи *quorum sensing*, який функціонує у *V. harveyi*, на відміну від першого та другого типу, характеризується наявністю не одного, а двох типів сигнальних молекул — аутоіндуктор-1 (AI-1) та аутоіндуктор-2 (AI-2). AI-1 являє собою гомосеринлактон, біосинтез якого каталізується ферментом LuxLM. AI-2 — це фуранозил борат дієстер. Його біосинтез каталізується ферментом LuxS [40]. AI-1 та AI-2 розпізнаються на поверхні клітин рецепторними білками LuxN і LuxP-LuxQ. За малої чисельності клітин LuxN та LuxQ аутофосфорильовуються і транспортують фосфат на LuxO через LuxU. Фосфорильований LuxQ є репресором

генів-мішеней. За високої чисельності клітин LuxN та LuxQ зв'язуються зі своїми аутоіндукторами та змінюють свою активність з кіназної на фосфатазну, дефосфорилуючи LuxO через перенос фосфату на LuxU. При цьому репресор LuxO переходить у неактивну форму і гени-мішені активуються за допомогою LuxR [11].

У 2003 році Xavier і Bassier [40] встановили, що системи, які використовують AI-2 як сигнальні молекули, існують не тільки у *V. harveyi*, а і у деяких інших видів бактерій, як грамнегативних, так і грампозитивних. Автори також показали зв'язок між біосинтезом AI-2 і метильним циклом у мікроорганізмів. Таким чином, можна зробити припущення, що система *quorum sensing*, яка базується на AI-2, можливо, використовується бактеріями для міжвидової комунікації [11, 16].

Pesci E. C. та ін. показали, що у *P. aeruginosa* існує ще одна додаткова система *quorum sensing* — хінолонова, яка відіграє роль перемикача між двома компонентами основної системи [29].

Система месенджерів у бактерій

Незважаючи на те, що за сучасними даними у бактерій відсутня система метаболізму арахідонової кислоти, яка у еукаріот є постачальником основних месенджерів — простагландинів, лейкотриєнів та тромбоксанів, прокаріоти здатні використовувати низку хімічних сполук як месенджери. Основними месенджерами бактерій є дицикло-ГМФ та нуклеотидгуанізин-3',5'-бісдифосфат (ppGpp).

Дицикло-ГМФ є циклічним динуклеотидом, який здатний модифікувати значну кількість процесів метаболізму бактерій. Вперше ця сполука була описана у *Gluconacetobacter xylinus*, у якої вона контролює синтез целюлози [32]. Це досягається за рахунок підвищення або зниження рівня цієї сполуки у середині клітини. Рівень дицикло-ГМФ регулюється двома протилежними типами активності — нуклеотидциклазною (для підвищення рівня) та фосфотидилестеразною (для зниження рівня цієї сполуки) [7]. Пізніше було встановлено, що рівень дицикло-ГМФ здатний впливати не тільки на активність ферментів, а і на перехід бактерій від вільного рухливого існування до біоплівки [8]. Так, Ferreira та ін. [14] та два більш ранніх дослідження [19, 31] показали, що у *Vibrio parahaemolyticus* підвищення рівня дицикло-ГМФ призводить до припинення *swarming motility* та переходу клітин цього мікроорганізму до формування біоплівки. Ці дослідження також показали, що локуси *scrABC* та *scrG*, які вперше були ідентифіковані як регулятори генів родини *laf* за умов росту на рідкому середовищі (умови коли ці гени звичайно репресовані), здатні також зворотньо регулювати *swarming motility* та процес утворення біоплівки у *V. parahaemolyticus*, за рахунок зростання чи зниження рівня дицикло-ГМФ.

Останні дослідження також показали, що та ж сама картина притаманна і іншим мікроорганізмам, зокрема *P. aeruginosa*. *Swarm-*



ing motility у цього мікроорганізму здійснюється за рахунок полярних джгутиків та синтезу рамноліпиду, тоді як формування біоплівки залежить від фібріл IV типу та активності генів *pel* та *psl*, які регулюють синтез полісахаридного матриксу [18].

Дослідження показали, що у *P. aeruginosa* існують два мембранно-з'язані білки SadC та BifA. Перший являє собою нуклеотидциклазу, а другий — фосфотидилестеразу. Нуль мутанти за першим білком втрачають здатність до формування біоплівки, тоді як інактивація гену *bifA* призводить до повної втрати здатності *P. aeruginosa* рухатися по твердій поверхні. Подальші дослідження призвели до виявлення цитоплазматичного регуляторного білка SadB, який регулює роботу джгутиків у залежності від в'язкості середовища та асоційований з хемотаксис IV кластерною системою [22]. Було показано, що мутанти за цим білком виявляли більш сильну здатність до утворення біоплівки, але втрачали здатність до здійснення *swarming motility* та відповідати на зміни в'язкості середовища. У таких мутантів було зареєстровано також різке зростання активності SadC і, як наслідок, вищий рівень дицикло-ГМФ у порівнянні з диким типом. Результати цих досліджень показують що SadB, SadC та BifA регулюють здатність *P. aeruginosa* здійснювати *swarming motility* та формування біоплівки за рахунок хемотаксис-подібної регуляторної системи [22].

На сьогодні відомі ще декілька факторів, які можуть бути сигналами до змінення концентрації дицикло-ГМФ у клітинах бактерій. Серед них можна виділити опромінення світлом, зв'язування ДНК, амінокислот, фосфотиранину/фосфотирозину, NO, тощо. Відомо, що зниження концентрації дицикло-ГМФ обумовлює рухливість, патогенність, зниження чутливості до фагів та важких металів, тоді як підвищення концентрації цієї сполуки у клітинах мікроорганізмів обумовлює формування біоплівки, запуск системи *quorum sensing*, посилення синтезу екзополісахаридів, тощо [22].

Іншим важливим вторинним месенджером у бактерій, який зв'язаний з процесом формування біоплівки, є нуклеотид гуанізин-3',5'-бісдифосфат (ppGpp). Van Delden та ін. показали що накопичення цієї сполуки у клітинах призводить до активації ранніх регуляторних генів системи *quorum sensing* у *P. aeruginosa* за рахунок інактивації білків репресорів — RsmA, RpoS та QscR. Для *Rhodobacter sphaeroides* було показано, що ця сполука синтезується з дицикло-ГМФ за участю бактеріофітохрому [36]. Бактеріофітохром, який присутній у багатьох бактерій, характеризується досить цікавою організацією. Як кофактор до його складу входить білівердин, який накопичується за рахунок дії гемоксигенази, тобто функціонування бактеріофітохрому тісно пов'язано з метаболізмом геміну. Активація бактеріофітохрому відбувається або за рахунок опромінення світлом, або за рахунок енергії окисно-відновного потенціалу. Природа виникнення останнього на сьогодні ще остаточно не відома, але існує

припущення, що він формується за рахунок енергії переходу Fe (II) ↔ Fe (III) [1].

Таким чином, сучасні уявлення щодо формування біоплівки мікроорганізмами ґрунтуються на тому, що це є складний процес, реалізація якого відбувається за рахунок тонких механізмів регуляції. Складність та багатогранність цих процесів дозволяє мікроорганізмам і їх угрупованням активно існувати в біоценозах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Barkovits K., Harms A., Benkartek C., Smart J.L., Frankenberg-Dinkel N. Expression of the phytochrome operon in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on the alternative sigma factor RpoS // FEMS Microbiol Lett. — 2008. — V. 280. — P. 160–168.
2. Beatson Scott A., Whitchurch Cynthia B., Semmler Annalese B.T., Mattick John S. Quorum Sensing Is Not Required for Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. — 2002. — V. 184, № 13. — P. 3598–3604.
3. Birgit H., Riedel K., Hentzer M. *Vibrio parahaemolyticus* *scrABC*, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation // J. Bacteriol. — 2002. — V. 184. — P. 5946–5954.
4. Brown Sam P., Johnstone Rufus A. Cooperation in the dark: signaling and collective action in quorum-sensing bacteria // Proc. R. Soc. Lond. B. — 2001. — V. 268. — P. 961–965.
5. Bryers J.D., Characklis W.G. Processes governing primary biofilm formation // Biotechnol Bioeng. — 1982. — V. 24. — P. 2451–2476.
6. Camilli A., Bassler B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways // Science. — 2006. — V. 311. — P. 1113–1116.
7. Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A., Jenal U. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP // J. Biol. Chem. — 2005. — V. 280. — P. 30829–30837.
8. Cotter P.A., Stibitz S. C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation // Curr. Opin. Microbiol. — 2007. — V. 10. — P. 17–23.
9. Danese P.N., Pratt L. A., Dove S., Kolter R. The outer membrane protein, Ag43, mediates cell-to-cell interactions in *E. coli* biofilms // Mol. Microbiol. — 2000. — V. 37. — P. 424–432.
10. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiology and molecular biology reviews. — 2000. — V. 64, № 4. — P. 847–867.
11. Defoirdt T., Boona N., Bossier P., Verstraete W. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture // Aquaculture. — 2004. — V. 240. — P. 69–88.



12. Diggle S.P., Winzer K., Lazdunski A., Williams P., Camara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression // Journal of Bacteriology. — 2002. — V. 184, № 10. — P. 2576–2586.

13. Donlan R., Costerton J. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. — 2001. — V. 15. — P.167–193

14. Ferreira R.B.R., Antunes L.C.M., Greenberg E.P., McCarter L.L. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190. —P. 851–860.

15. Fujii T., Ingham C., Nakayama J. Two Homologous Agr-Like Quorum-Sensing Systems Cooperatively Control Adherence, Cell Morphology, and Cell Viability Properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190, № 23. — P. 7655–7665.

16. Geszvain K., Visick K.L. The Hybrid Sensor Kinase RscS Integrates Positive and Negative Signals To Modulate Biofilm Formation in *Vibrio fischeri* // J. Bacteriol.— 2008. — V. 190, № 13. — P. 4437–4446.

17. Hoang T.T., Sullivan S.A., Cusick J.K. Schweizer H.P. β -Ketoacyl acyl carrier protein reductase (FabG) activity of the fatty acid biosynthetic pathway is a determining factor of 3-oxo-homoserine lactone acyl chain lengths // Microbiology. — 2002. — V. 148. — P. 3849–3856.

18. Jackson, K.D., Starkey M., Kremer S., Parsek M.R., Wozniak D.J. Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation // J. Bacteriol. — 2004. — V. 186. — P. 4466–4475.

19. Jenal U., Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria // Annu. Rev. Genet. — 2006. — V. 40. — P. 385–407.

20. Klausen M., Aaes-Jorgensen A., Molin S., Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Molecular Microbiology. — 2003. — V. 50, № 1. — P. 61–68.

21. Klausen M., Heydorn A., Ragas P. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. // Mol Microbiol. — 2003. — V. 48. — P. 1511–1524.

22. Kuchm S.L., Brothers K. Merritt M., J. H., Liberati N.T., Ausubel F. M., O'Toole G. A. BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 // J. Bacteriol. — 2007. — V. 189. — P. 8165–8178.

23. Leid J.G., Willson C.J., Shirtliff M.E., Hassett D.J., Parsek M.R., Jeffers A. K. The Exopolysaccharide Alginate Protects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Bacteria from IFN-Mediated Macrophage Killing // The Journal of Immunology. — 2005. — V. 175. — P. 7512–7518.



24. Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinskya S., Knoblocha J.K.M., Peters G., Rohdea H., Herrmann M. Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses // International Journal of Medical Microbiology. — 2004. — V. 294. — P. 203–212.

25. McGrath S, Wade D.S., Pesci E.C. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the Pseudomonas quinolone signal (PQS) // FEMS Microbiol Lett. — 2004. — V. 230. — P. 27–34.

26. Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescence system // Journal of Bacteriology. — 1970. — V. 104. — P. 313–322.

27. O'Toole G. A. To Build a Biofilm // J. Bacteriol. — 2003. — V. 185, № 9. — P. 2687–2689.

28. Parsek M.R., Greenberg E.P. Sociomicrobiology: the connections between *quorum sensing* and biofilms // Trends Microbiol. — 2005. — V. 13. — P. 27–33.

29. Pesci E. C., J. Milbank B.J., Pearson J.P. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1999. — V. 96. — P. 11229–11234.

30. Rickard A. Gilbert H.P., High N.J. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms // Trends Microbiol. — 2003. — V. 11. — P. 94–100.

31. Römling U., Gomelsky M., Galperin M. Y. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system // Molecular Microbiology. — 2005. — V. 57, № 3. — P. 629–639.

32. Ross P., Weinhouse H., Alon Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel G.A., van Boom J.H., Benziman M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid // Nature. — 1987. — V. 325. — P. 279–281.

33. Shiner E.K, Rumbaugh K.P., Williams S.C. Interkingdom signaling: Deciphering the language of acyl-homoserine lactones // FEMS Microbiology Reviews. — 2005. — V. 29. — P. 935–947.

34. Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities. // Annu. Rev. Microbiol. — 2002. — V. 56. — P. 187–209.

35. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. // Microbiology. — 2001. — V. 147. — P. 3–9.

36. Tarutina M., Ryjenkov D.A., Gomelsky M. An Unorthodox Bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* Involved in Turnover of the Second Messenger c-di-GMP // J. Biol. Chem. — 2006. — V. 281. — P. 34751–34758.

37. Vinai C.T., Thurlow L.R., Boyle D., Hancock L.E. Regulation of Autolysis-Dependent Extracellular DNA Release by *Enterococcus faecalis*



Extracellular Proteases Influences Biofilm Development // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190, № 16. — P. 5690–5698

38. *Watnick P.I., Kolter R.* Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm // Mol. Microbiol. — 1999. — V. 34. — P. 586–595

39. *Webb J.S., Thompson L.S., Sally J.* Cell Death in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development // J. Bacteriol. — 2003. — V. 185, № 15. — P. 4585–4592.

40. *Xavier K.B., Bassler B.L.* LuxS quorum sensing: more than just a numbers game // Curr. Opin. Microbiol. — 2003. — V. 6. — P. 191–197.

41. *Zegans M.E, Wagner J.C., Cady K.C.* Interaction between Bacteriophage DMS3 and Host CRISPR Region Inhibits Group Behaviors of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. — 2009. — V. 191, № 1. — P. 210–219.

В.А. Иваница, Н.Б. Галкин

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

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МЕХАНИЗМАХ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЁНКИ

Реферат

В обзорной статье описано современное представление о процессе образования биоплёнки. На сегодняшний день, биоплёнка рассматривается как основная форма существования микробных сообществ в природных условиях, процессы, которые происходят в биоплёнках, обуславливают реализацию многих характерных для бактерий признаков. Многочисленные исследования позволили раскрыть ключевые механизмы, которые лежат в основе этого процесса.

Ключевые слова: биоплёнка, межклеточная коммуникация, *quorum sensing*, аутоиндукторы, мессенджеры.



V.O. Ivanytsia, M.B. Galkin

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

MODERN LOOKS ABOUT BIOFILM FORMATION MECHANISMS

Summary

Biofilm formation process play an important role in microorganisms existence. Numerous investigations improve our knowledge about basic mechanisms involved in this process. Nowadays the biofilm is identified as a basic form of microbial community existence in nature and the processes taking place in the biofilms provide realization of all the major properties of bacteria. This work is dedicated to a review of the basic works forming contemporary minds about biofilm formation processes.

Key words: biofilm, cell-to-cell communication, *quorum-sensing*, autoinductors, messengers.



УДК 57.015.3+579.25

Р.В. Грицай^{1,2}, Л.Д. Варбанець¹, О.С. Броварська¹, Н.В. Житкевич¹,
Т.М. Олійник²

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академ. Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

²Інститут картоплярства НААН України, вул. Чкалова, 22, смт. Немішаєве,
Київська обл., 07853, Україна, тел.: +38 (045) 774 15 42

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ ГЕТЕРОГЕННОСТІ ШТАМІВ *RALSTONIA SOLANACEARUM* НА ОСНОВІ RAPD-ПЛР АНАЛІЗУ

Проаналізовано 9 штамів Ralstonia solanacearum Міжнародної колекції фітопатогенних бактерій та колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного з використанням RAPD-ПЛР аналізу. Згідно отриманих результатів показано високий рівень генетичної гетерогенності об'єктів дослідження та побудовано дендрограму, що відображає генетичні дистанції між штамми. Розподіл штамів за кластерами дендрограми виявив певну закономірність для представників першого біовару. Серед ампліфікованих послідовностей не виявлено таких, що корелюють із детермінацією хемотипу ліпополісахариду.

Ключові слова: RAPD-ПЛР, Ralstonia solanacearum, генетичні дистанції, ліпополісахарид.

Ralstonia solanacearum – складний комплексний вид, який об'єднує грамнегативні бактерії, здатні викликати бактеріальне в'янення у більш ніж 200 видів вищих рослин. Це один із найбільш деструктивних рослинних патогенів, що зустрічається майже на всіх континентах. Ендемічними для *R. solanacearum* є регіон тропіків, звідки інтродукція його в інші країни відбулася протягом останнього століття. Все це свідчить про значну внутрішньовидову гетерогенність та високі темпи мінливості патогену.

З моменту свого відкриття таксономічне положення виду змінювалося і продовжує уточнюватися. Так, початкова фенотипова система класифікації на біотики і серовари поступово витісняється системою, основою на рестрикційному аналізі геному. Згідно останньої в межах



виду *R. solanacearum* виділяють чотири філотипи, кожен з яких відповідно поділяється на секвевари. На побудованому таким чином філогенетичному дереві, генетичні дистанції між окремими гілками сягають більше 25%, що підштовхує дослідників до необхідності дроблення таксону на декілька окремих видів [1].

Кластеризація штамів та ізолятів бактерій на основі молекулярно-генетичного аналізу дає змогу розділити їх на групи із подібними біологічними властивостями. Встановлення генетичного поліморфізму фітопатогенних бактерій методами, що базуються на полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР), використовується при вивченні екологічного поширення, пластичності геному та особливостей еволюції. Так, на гілках дендрограми, побудованої за результатами RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) аналізу *R. solanacearum*, спостерігалось чітке розділення біоварів 1 і 2, а також кластеру, що містив біовари 3 і 4 [2]. Відповідна кореляція мала місце при вивченні північноамериканських ізолятів патогену, де за допомогою ПЛР повторюваних елементів геному вдалося диференціювати штами за регіоном походження, біотипом і частково спектром рослин-живителів [3].

На основі вивчення особливостей хімічної будови ліпополісахаридів (ЛПС) ряду штамів *R. solanacearum*, було встановлено існування 7 можливих типів структур О-специфічного полісахариду (ОПС). За допомогою перехресних імунохімічних реакцій між досліджуваними штамми їх вдалося об'єднати в п'ять серогруп. При цьому хімічна структура ЛПС декількох штамів радикально відрізнялася від більшості [4]. Кореляції між структурою ОПС і належністю штаму до певного біовару чи рослини-хазяїна або географічної зони, з якої цей штам походить, не виявлено [5]. Встановлення генетичних дистанцій між серотипами *R. solanacearum* раніше не проводилося.

Тому метою даної роботи було вивчення генетичної спорідненості між штамми — представниками різних серогруп *R. solanacearum*, на основі ПЛР довільно ампліфікованих послідовностей (RAPD).

RAPD-аналіз — універсальний, чутливий і простий метод, що може бути застосований для широкого кола організмів. RAPD-маркери використовувалися для ідентифікації та диференціації штамів різних родів бактерій, в тому числі для виду *R. solanacearum* [6]. Для ентеротоксигенних штамів *Escherichia coli* розподіл на кластери згідно результатів RAPD практично повністю збігався із розподілом на серогрупи за антигенними властивостями ОПС ЛПС [7], тоді як для *Vibrio cholerae* такої кореляції не спостерігалось [8]. Недоліком даного методу є імовірність впливу на результати деяких умов проведення ПЛР, і відповідна невідтворюваність в межах різних лабораторій. Результати RAPD та BOX-ПЛР аналізу для диференціації 46 ізолятів *R. solanacearum* із Тайваню, виявилися подібними і продемонстрували значний поліморфізм в даній популяції [9].



Матеріали і методи дослідження

В роботі використовували 9 штамів *R. solanacearum*, перелік яких подано в таблиці 1. Бактерії вирощували на картопляному агарі при 28 °С протягом 48 годин.

Таблиця 1

Характеристика штамів *R. solanacearum*

Table 1

Characteristic of *R. solanacearum* strains

Номер штаму	Біовар	Рослина хазяїн	Географічна зона виділення	Тип структури ОПС
ICMP 5712 (типовий)	I	томати	США	3
35"	-	картопля	Україна	-
4"	-	картопля	Україна	-
ICMP 7954	II	-	Кенія	-
ICMP 7944	I	подорожник	Перу	6
ICMP 8089	III	солоний перець	Філіппіни	7
ICMP 8202	IV	картопля	Шрі Ланка	1
ICMP 7859	I	картопля	Перу	1
ICMP 7864	I	банани	Коста-Ріка	2

Примітка: «—» не визначено, ICMP – International collection of phytopathogenic bacteria (New Zealand), 35" і 4" – штами з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України

Виділення тотальної ДНК із клітин бактерій проводили водно-фенольним методом з використанням СТАВ-буферу [10]. Суспензію клітин у 500 мкл фізрозчину осаджували центрифугуванням. Осад ресуспендували в 600 мкл лізуючого буферу (1 мМ Трис-НСІ, рН 8,0, 0,25 М ЕДТА, 0,1% Sarcosyl (Sigma), 0,2 М NaCl), після додавання 2 од. активності протеїнази на зразок та 100 мкл 10%-го розчину СТАВ, пробірки інкубували 30 хв при 60 °С. Білки осаджували центрифугуванням (10 хв, 16 000 g) з рівним об'ємом фенолу і двічі – сумішню хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), за кімнатної температури. Нуклеїнові кислоти із водної фази осаджували 2,5 об'ємами етанолу, після чого розчиняли у 150 мкл води, вільної від нуклеаз. Отримані препарати ДНК зберігали при -20 °С.

RAPD-ПЛР проводили окремо з кожним із 5 декамерних праймерів, послідовності яких подані в таблиці 2. ПЛР-суміш, об'ємом 25 мкл, містила 1X Таq-полімеразний буфер, 3,5 мМ MgCl₂, 0,25 мМ dNTP, 0,2 мкМ



праймера, 2 од. Таq-полімерази, 50 нг бактеріальної ДНК. ПЛР проводили на ампліфікаторі “Eppendorf” у такому температурному режимі: початкова денатурація — 5 хв за температури 95 °С; 35 циклів: 30 с за 94 °С, 40 с за 39 °С, 45 с за 72 °С; термінальна елонгація — 7 хв за 72 °С. Ампліфікація з кожним із праймерів була здійснена щонайменше в двох повторностях.

Таблиця 2

Нуклеотидні послідовності праймерів

Table 2

Nucleotide sequences of primers

OPJ	CCACACTACC
BL26	GTAGCTGACG
OPD01	ACCGCGAAGG
OPD04	TCACGTCCAC
OPG08	TCTGGTGAGG

Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР проводили в 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мкл), протягом 2 годин, при напрузі 3 В/см довжини гелю.

Визначення довжин ампліконів в гелі здійснювали за допомогою програми Gel-Pro Analyzer 4,5, порівнюючи їх із маркером молекулярної маси O'GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). При обчисленні результатів гель-електрофорезу враховували лише ті смуги, інтенсивність яких сягала не менше 2,5% від максимальної. Спорідненість зразків ДНК визначали за часткою ампліконів однакової довжини, користуючись коефіцієнтом Джакарда. Кластерний аналіз, використовуючи незважений парногруповий метод із арифметичним усередненням (UPGMA), і побудову дендрограми проводили за допомогою програми DendroUPGMA (<http://genomes.urv.cat/UPGMA/>) [12].

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження проводили на 9 штаммах *R. solanacearum*, представників різних біоварів (табл. 1), з різних географічних зон. З Міжнародної колекції фітопатогенних бактерій (ICMP) одержані 7 з досліджуваних штамів, а 2 — з колекції мікроорганізмів відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України. Раніше [13] була вивчена структура О-специфічних полісахаридів ЛПС ряду штамів *R. solanacearum*. Встановлено, що за моносахаридним складом вони можуть бути віднесені до 4-х груп, причому 5 штамів є представниками 1-ої і 2-ої групи, а 3-я і 4-а представлені



тільки по одному штаму. Разом з тим, було встановлено 6 різних типів структур. Показано:

1) ОПС ряду штамів характеризуються лінійними структурами з тетрасахаридними ланцюгами, які включають три залишки L-Rha і один залишок GlcNAc (структури 1 і 2, штами 7859, 8202, 7864). Різниця в структурах обумовлена конфігурацією (α - або β -) (структури 1 і 2) GlcNAc або типом його зв'язку (1–2) (структура 1) або (1–3) (структура 2) з сусіднім залишком рамнози.

2) ОПС штаму 5712 (структура 3) характеризується розгалуженим пентасакхаридним ланцюгом, який представляє ксилозильовану форму структури 2, а ОПС штаму 7944 – рамнозильовану форму структури 1 (структура 6).

3) Структури ОПС ЛПС двох штамів принципово відрізняються від всіх досліджених штамів: вони представлені трисакхаридними ланцюгами – лінійними (шт. 8089, структура 7), які містять два залишки D-Rha, в той час як у ОПС інших штамів присутня L-Rha, а також один залишок GalNAc, або розгалуженим трисакхаридом (шт. 4157, структура 8), який включає залишки GlcNAc, GalNAc, а також D-Ara як латеральний замісник.

Своєрідність жирнокислотного складу є одним з додаткових хемотаксономічних критеріїв при диференціації видів. Дослідження ліпідів А ЛПС *R. solanacearum* 8089 і 4157 свідчать, що, на відміну від інших досліджених штамів [14], в їх складі присутні 3-гідроксидеканова і 3-гідроксидодеканова кислоти.

Одним із методів, який на сьогодні широко використовується для диференціації штамів та встановлення рівня генетичної спорідненості між ними, є фінгерпринтинг на основі полімеразної ланцюгової реакції. Ампліфікація довільних ділянок ДНК прокариот з декамерними праймерами (RAPD-аналіз), як один із найдавніших методів ПЛР, довів свою ефективність та прикладну значимість в широкій області популяційних досліджень.

В результаті ПЛР із п'ятьма декамерними праймерами, два з яких – OPD01 та OPJ, характеризувалися низькою інформативністю, були вибракувані і в подальшій роботі не використовувалися.

Сумарним продуктом ПЛР ДНК 9-ти штамів *R. solanacearum* із праймерами BL26, OPD04, OPG08 стали 52 фрагменти, молекулярна маса яких знаходилася в діапазоні 55–2700 нуклеотидних пар (п.н.). Спільні для двох і більше зразків продукти реакції становили трохи більше 55% від загальної кількості смуг. Жоден із ампліконів не був мономорфним, що свідчить про значну генетичну гетерогенність в межах досліджуваної групи штамів (рис. 1).

Отримані кількісні значення подібності між штамми, розраховані згідно коефіцієнту Джакарда, не перевищували 35%. Розрив із теоретичним пороговим, для організмів одного виду, значенням 70% пояснюється



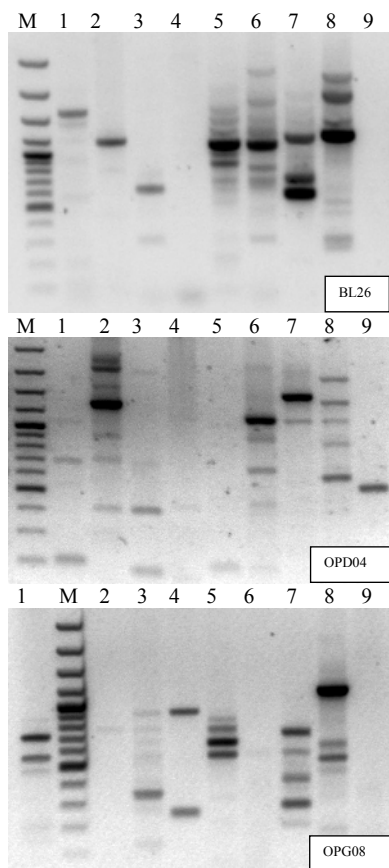


Рис.1. Электрофореграммы RAPD-ПЛР штамів *R. solanacearum*:
5712 (1), 8202 (2), 8089 (3), 35 (4), 7954 (5), 4 (6), 7944 (7), 7864 (8), 7859 (9),
М-маркер молекулярної маси

Fig 1. RAPD-PCR electrophoretic patterns of *R. solanacearum* strains:
5712 (1), 8202 (2), 8089 (3), 35 (4), 7954 (5), 4 (6), 7944 (7), 7864 (8), 7859 (9),
M-DNA ladder

обмеженим числом об'єктів дослідження (згідно стандартів Європейської дослідної комісії епідеміологічних маркерів (ESGEM) їх повинно бути не менше 100) [15]. Однак, часто на практиці, репрезентативні результати можуть бути отримані і для невеликої популяції бактерій, зокрема в клінічних дослідженнях близькоспоріднених ізолятів. Так, RAPD-профілі 14 ізолятів *Salmonella enterica* різних серотипів, виділених протягом 15 років, характеризувалися наявністю мономорфних смуг [16]. В той же час, за результатами фінгерпринтингу 46 штамів *R. solanacearum*, середнє значення генетичної спорідненості між ними становило 56% [9].

Іншим фактором, що впливає на репрезентативність електрофоретичних профілів RAPD-ПЛР генотипу дослідного штаму, є генетична стабільність ампліфікованих ділянок ДНК. Проблема полягає в тому, що

неможливо встановити: належали сайти гібридизації праймерів до робочих генів чи некодуючих мобільних генетичних елементів. Ампліфікація останніх може бути причиною завищення реальних філогенетичних дистанцій між об'єктами дослідження [17]. Проблема вирішується збільшенням числа RAPD-праймерів, що використовуються для дослідження певної групи мікроорганізмів. Однак, використання навіть 30 довільних декамерних праймерів при вивченні локальної популяції *R. solanacearum* в межах одного агроценозу, виявило середнє значення генетичної спорідненості між ізолятами – 60%. У цій же роботі, генетичні дистанції клонової лінії, між вихідною культурою і бактеріями дев'ятої генерації на штучних поживних середовищах, сягала 30% [18]. Всі ці дані вказують на виражену генетичну нестабільність та високі темпи еволюції, характерні для виду. Той факт, що для штамів *R. solanacearum* фенотиповий прояв мінливості виражений меншою мірою [19], свідчить про участь некодуючих ділянок ДНК в пластичності геному.

Побудована за результатами RAPD-аналізу дендрограма представлена двома основними кластерами (рис. 2). В першому кластері виділяється дві підгрупи: одна з них утворена штамми 7859, 7944 і 7864 – представниками біовару 1, до якого належить і 5712, що виділяється окремою гілкою в кластері. Друга підгрупа об'єднує шт. 8202 (біовар 4) і шт. 4 (біовар не встановлений). Другий кластер містив штамми 8089, 7954 (біовари 3 і 2, відповідно) і 35 (біовар не встановлений).

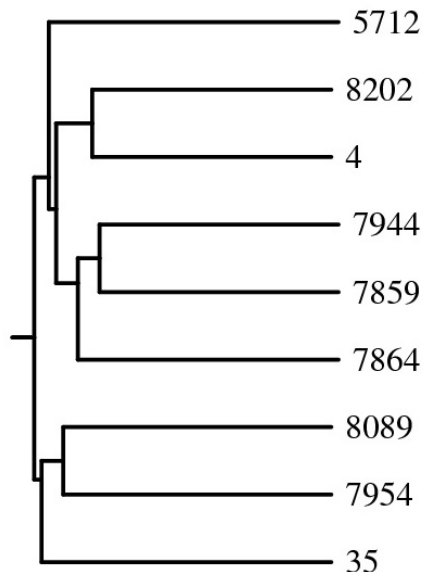


Рис. 2. Дендрограма, побудована на основі аналізу генетичних дистанцій між 9 штамми *R. solanacearum* з використанням методу UPGMA

Fig. 2. Dendrogram constructed by using of UPGMA method, showing correlation between RAPD-PCR profiles of 9 *R. solanacearum* strains

Те, що штами із першим типом структури ОПС — 7859 і 8202, чи його варіації (шт.7944), знаходяться в одному кластері RAPD дендрограми, не дає підстав говорити про кореляцію між вказаними класифікаційними схемами. Це підтверджується тим, що серед отриманих, відсутні унікальні амплікони для носіїв першої структури ЛПС, а праймер OPD04 для ДНК штамів 7859 і 8202 взагалі не утворив однакових за довжиною продуктів реакції (рис. 3). Поряд з цим, шт. 8089, який вирізняється серед більшості унікальністю жирнокислотного складу та структурою ОПС, виявився генетично тотожним дослідним штамам *R. solanacearum*.

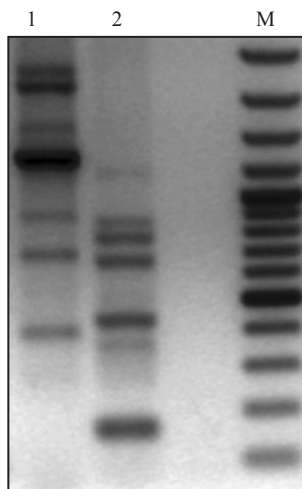


Рис. 3. RAPD-профілі *R. solanacearum*, утворені праймером BL26 штамів: 7859 (1), 8202 (2), М — маркер молекулярної маси

Fig. 3. RAPD-PCR profiles generated with primer BL26 of *R. solanacearum* strains: 7859 (1), 8202 (2), M — DNA ladder

Таким чином проведена RAPD-ПЛР дала змогу здійснити кластеризацію 9 штамів *R. solanacearum*. Згідно отриманих результатів, штами першого біовару проявили генетичну спорідненість. Розкриття глибшої кореляції між фенотиповими властивостями бактерій та генетичними дистанціями між ними обмежується кількістю об'єктів дослідження за високих значень їхньої внутрішньовидової гетерогенності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Remenant B., Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot, Remenant B., Barbe V., Müdigue C., Prior P. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence // BMC Genomics. — 2010. — V. 11. — P. 379–395.

2. Poussier S., Vandewalle P., Luisetti P. 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. Microbiology. — 1999. — Vol. 65. — P. 2184–2194.

3. 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 // Phytopathology. — 2009. — V. 99. — P. 1070–1077.

4. Винарская Н.В., Варбанец Л.Д. Химическая характеристика и серологическая активность липополисахаридов *Pseudomonas solanacearum* // Микробиологический журнал. — 2002 — № 1. — С. 37–47.

5. Москаленко Н.В. Структурно-функціональні дослідження ліпополисахаридів *Ralstonia solanacearum* : Автореф. дис. ... канд. біол. наук, К., 1999. — 21 с.

6. He Z.F., Yu H. and Luo F.F. Differentiation of pathogenicity and RAPD analysis of *Ralstonia solanacearum* in Guangdong // Acta Phytopathol. Sin. — 2003. — V. 33. — P. 415–420.

7. Pacheco A.B., Guth B.E., Soares K.C., Nishimura L., de Almeida D.F., Ferreira L.C. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans // J. Clin. Microbiol. — 1997. — V. 35. — P. 1521–1525.

8. Theophilo G.N. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. o Paulo. — 2006. — V. 48. — P. 65–70.

9. Jaunet T.X., Ddos R.P., Leal N.C., Hofer E., Jaunet T.X., Wang J.F. // Rev. Inst. Med. Trop. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan // Phytopathology. — 1999. — V. 89. — P. 320–327.

10. Rapley R. The nucleic acid protocols handbook // Totowa: Humana Press Inc. — 2000. — 1002 p.

11. Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P., Daniels M.J. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction // J. Gen. Microbiol. — 1993. — V. 139. — P. 1587–1594.

12. Garcia-Vallve S., Palau J., Romeu A. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Molecular Biology and Evolution. — 1999. — V. 9. — P. 1125–1134.

13. Kocharova N.A., Knirel Yu.A., Varbanets L.D., Moscalenko N.V., Brovarskaya O.S., Muras V.A., Young J.M. Studies of O-specific polysaccharide chains of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharides consisting

of structurally different repeating units//Carbohydr. Res. — 1993. — V. 250, N 1. — P. 277–285.

14. *Вінарська Н.В.* Залежність біологічної активності ліпополісахаридів *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) від їх складу і структурних особливостей//Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2002. — 21 с.

15. *Dijkshoorn L., Towner K.J. and Struelens M.* New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. — Amsterdam: ELSEVIER, 2001. — 371 p.

16. *Tikoo A., Tripathi S., Verma C., Agrawal N., Gopal Nath A.K.* Application of PCR fingerprinting techniques for identification and discrimination of *Salmonella* isolates // Curr Sci. — 2001. — V. 80. — P. 1049–1053.

17. *Gürtler V., Mayall B.C.* Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates // Int. J. Syst Evol. Microbiol. — 2001. — V. 51. — P. 3–16.

18. *Grover A., Azmi W., Gadewar A.V., Pattanayak D., Naik P.S., Shek-hawat G.S., Chakrabarti S.K.* Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 101. — P. 798–806.

19. *Stevens P., van Elsas J.D.* Genetic and phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 strains obtained from Dutch waterways // Antonie Van Leeuwenhoek. — 2010 — V. 97. — P. 171–188.

Р.В. Грицай^{1,2}, Л.Д. Варбанець¹, О.С. Броварская¹, Н.В. Житкевич¹,
Т.Н. Олейник²

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП Д03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

²Институт картофелеводства НААН Украины, ул. Чкалова, 22, пгт. Немишаево, Киевская обл., 07853, Украина, тел. 0457741542.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ШТАММОВ *RALSTONIA SOLANACEARUM* НА ОСНОВЕ RAPD-ПЦР АНАЛИЗА

Реферат

Проанализировано 9 штаммов *Ralstonia solanacearum* Международной коллекции фитопатогенных бактерий, а также коллекции отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного с использованием RAPD-ПЦР анализа. Согласно



полученным результатам показан высокий уровень генетической гетерогенности объектов исследования и построена дендрограмма, которая отображает генетические дистанции между штаммами. Распределение штаммов по кластерам дендрограммы выявило определенную закономерность для представителей первого биовара. Среди амплифицированных последовательностей не выявлено таких, которые коррелируют с детерминацией хемотипа липополисахарида.

Ключевые слова: RAPD-ПЦР, *Ralstonia solanacearum*, генетические дистанции, липополисахарид.

**R.V. Grytsay^{1,2}, L.D. Varbanets¹, O.S. Brovarska¹, N.V. Zhytkevych¹,
T.N. Oliynyk²**

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academician Zabolotny str., Kyiv, D03680, Ukraine

²Institute for potato Research, NAAS of Ukraine, 22, Chkalova str., Nemishaeve, Kyiv region, 07853, Ukraine

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF *RALSTONIA SOLANACEARUM* STRAINS USING RAPD-PCR

Summary

There were analysed 9 strains of *Ralstonia solanacearum*, obtained from New Zealand collection and collection of the Department of phytopathogenic bacteria of D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology on the basis of RAPD-PCR. According to the obtained results high level of genetic diversity was established and phylogenetic tree was constructed. The distribution of the strains into genetic clusters shown similarity between the strains of biovar 1. No association was found between amplified sequences and determination of lipopolysaccharide chemotypes.

Key words: RAPD-PCR, *Ralstonia solanacearum*, genetic distances, lipopolysaccharide.



УДК: 557.152.31:635.8

С.Л. Міресь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаєва,
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: till2002@mail.ru

ЕКСПРЕСИВНІСТЬ ІЗОФОРМ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗИ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST ЗА КУЛЬТИВУВАННЯ НА СЕРЕДОВИЩАХ РІЗНОГО СКЛАДУ

За допомоги методу електрофоретичного розподілу в поліакриламідному гелі було досліджено експресію ізоформ карбоксилестерази міцелію *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst) зрощеного на різних середовищах. Найбільша кількість ізоформ з найвищою експресивністю була визначена у зерновому міцелії, отриманому на вівсяному субстраті. В міцеліальній культурі, отриманій на рідкому середовищі, виявлено від трьох до шести ізоформ залежно від субстратної композиції. У міцелії з щільного середовища сусло-агар виявлено дві активні ізоформи ферменту.

Ключові слова: ізоформи карбоксилестерази, *Ganoderma lucidum*.

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst) відомий як лікарський гриб вже більше двох тисяч років. Його активно культивують для отримання біологічно активних добавок [1–4]. Вирощування даної культури в штучних умовах пов'язане з низкою труднощів, а саме з високим ступенем варіабельності залежно від складу субстрату та умов культивування [5], що яскраво відображається на морфологічних ознаках плодового тіла. Цей факт, очевидно, обумовлений зміною активності ферментних систем, що може впливати і на якості лікарських властивостей гриба. Про зміни, що відбуваються на ферментативному рівні, ми можемо судити вивчаючи поліморфізм молекулярних форм деяких ферментів, що добре ідентифікуються. Таким маркерним ферментом для *Ganoderma lucidum* може служити карбоксилестераза. Цей фермент каталізує гідроліз складних ефірів, дає при електрофоретичному розділенні чітко розподіленні спектри множинних молекулярних форм [6, 7], тому може бути використаний в оцінці модифікаційної мінливості гриба.

© С.Л. Міресь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця, 2011



Метою даної роботи було вивчення мінливості спектрів множинних молекулярних форм карбоксилестерази *Ganoderma lucidum* залежно від умов культивування. У зв'язку з поставленою метою розв'язувалися такі задачі: отримати екстракти з міцелію *Ganoderma lucidum*, зрощеного на різних видах субстратів — твердому агаризованому, рідкому та на зерні, провести електрофоретичний розподіл множинних молекулярних форм карбоксилестерази та визначити експресивність окремих ізоформ ферменту.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. Інституту сільськогосподарської генетики (м. Ханой).

Таблиця 1

Склад поживних середовищ

Table 1

Composition of the nourishing substrats

Спосіб культивування	Варіант	Склад середовища
Культивування на поверхні щільного середовища	1	сусло-агар
Глибинне культивування	2	дріжджовий екстракт — 10 г, FeSO ₄ · 7H ₂ O — 13 мг, ZnSO ₄ · 7H ₂ O — 4 мг, вода — до 1 л pH = 5,2
	3	гречане борошно — 2%, вода — до 1 л pH = 5,2
	4	вівсяне борошно — 2 %, вода — до 1 л pH = 5,2
Культивування на зерні	5	Пшениця — 1 кг, крейда — 30 г, гіпс — 120 г, вода — 2 л
	6	Овес — 1 кг, крейда — 30 г, гіпс — 120 г, вода — 2 л
	7	Ячмінь — 1кг, крейда — 30 г, гіпс — 120 г, вода — 2 л

Міцелій, що було отримано вищезазначеними способами культивування (табл. 1), вносили у 0,1 М гліцин-NaOH буфер, з 1% тритона X-100, обробляли методом заморожування-відтавання і розтиранням в ступці на холоді, після чого проби центрифугували на холоді при 10000 г протягом 15 хв. Досліджувані екстракти стандартизували за масою міцелію.

Електрофоретичне розділення молекулярних форм карбоксилестерази проводили в 7% поліакриламідному гелі. Після електрофоретичного розділення відмиті блоки гелів інкубували в 0,1 М тріс-гліциновому буфері рН 7,4, що містить діазоній і 25 мг β-нафтилпропіоната, який використовували як субстрат.



Одержані електрофореграми сканували і аналізували за допомоги спеціальної ліцензійної комп'ютерної програми «АнаИС», визначали показник Rf , кількість одержаних ізоформ і експресивність, яку виражали у відносних одиницях оптичної щільності (ΔD_o) забарвлених кінцевим продуктом реакції ферментативних зон. Експеримент проводили в триразовій повторності. Статистичне опрацювання первинних даних проводили згідно [8] з використанням непараметричного критерію Уїлкоксона.

У роботі використовували реактиви фірм «Reanal» (Угорщина), «Chemapol» (Чехія), «Fergak» (Німеччина), а також установку для вертикально-пластинчатого електрофорезу марки «VE-4» російського виробництва.

Результати та їх обговорення

Дослідження множинних молекулярних форм (ММФ) карбоксилестерази міцелію *Ganoderma lucidum*, узятого з різних культур, показало що їх кількість та експресивність значно різняться залежно від умов культивування та складу поживного середовища (рис. 1).

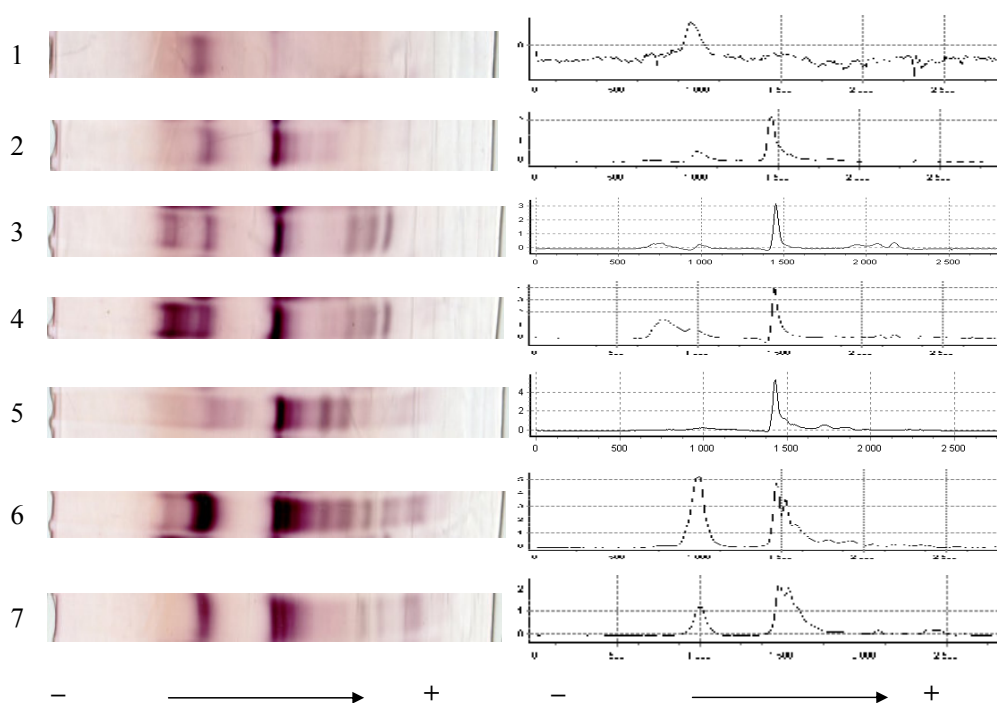


Рис.1. Електрофореграми досліджуваних зразків міцелію *Ganoderma lucidum*

Fig. 1. Electropherogrammes of the varieties of mycelium *Ganoderma lucidum*

Як видно з наведених електрофореграм найменша кількість смуг (2 ізоформи), що відповідають різним молекулярним формам ферменту, спостерігалася у варіанті з культивуванням міцелію на щільному середовищі — сусло-агарі, найбільша кількість (9 ізоформ) була визначена у шостому варіанті (зерновий міцелій, отриманий на вівсяному субстраті). Інші види зернового міцелію вирощеного на пшениці та ячмені мали по 6 і 7 ізоформ, відповідно.

Отримана на рідкому середовищі культура гриба мала наступний спектр ММФ: з додаванням дріжджового екстракту — 3 смуги, на гречаному і вівсяному борошні — по 6 смуг.

Результати денситометрії електрофореграм наведено у табл. 2. З двох ізоформ, що детектуються при електрофорезі міцелію, зрощеного на сусло-агарі, більш активна повільно мігруюча форма з відносною рухливістю R_f 0,350 (74% всієї експресивності), середньорухлива форма з R_f 0,510 у 2,8 разів є менш активною.

Таблиця 2

Експресивність ізоформ естерази *G. lucidum* при культивуванні на різних середовищах, ΔD

Table 2

Expressions of esterase isoforms of *G. lucidum* at cultivation on different substrats, ΔD

Rf Варіант	0,270	0,350	0,400	0,510	0,530	0,610	0,650	0,710	0,760	0,820	Σ
1	—	0,139	—	0,048	—	—	—	—	—	—	0,187
2	—	0,422	—	2,200	0,263	—	—	—	—	—	2,885
3	0,685	0,216	—	3,170	—	—	0,211	0,286	0,351	—	4,919
4	1,570	0,578	—	3,950	—	—	0,012	0,089	0,190	—	6,389
5	—	0,218	0,094	5,260	0,561	0,513	0,285	0,057	—	—	6,988
6	0,380	5,270	—	4,820	3,670	0,480	0,390	0,182	0,131	0,192	15,515
7	—	1,250	—	2,210	2,020	—	—	0,145	0,064	0,179	5,868

На електрофореграмах міцелію, одержаного при глибинному культивуванні *G. lucidum* на дріжджовому екстракті за відносною рухливістю ідентифікується тільки 3 ізоформи (R_f 0,350; 0,510; 0,650). Найбільш активна ізоформа з R_f 0,510 (76% всієї експресивності). У двох інших варіантах, при використанні гречаного та вівсяного борошна, ідентифікується по 6 форм естерази (R_f 0,270; 0,350; 0,510; 0,650; 0,710; 0,760), які відрізняються своєю експресивністю залежно від складу середовища. Найбільшу експресивність в обох варіантах має також середньорухлива форма з R_f 0,510 (64% та 61%, відповідно).



У зерновому міцелії гриба визначається від 6 до 9 форм карбоксилестерази. Електрофореграми ізоформ ферменту при використанні як середовища зерна пшениці (варіант 5) відрізняються від електрофореграм при культивуванні на інших поживних середовищах присутністю ізоформи з відносною рухливістю 0,400.

В міцелії гриба, вирощеного на зерні ячменю (варіант 7), детектується 6 форм естерази, проте дві з них (R_f 0,760 і 0,820) мають іншу відносну рухливість, ніж у варіанті з пшеницею. Найбільша експресивність у варіантах 5 та 7 характерна для середньорухливої ізоформи з R_f 0,510.

Електрофореграми зернового міцелію, отриманого на вівсі (варіант 6), налічують найбільшу кількість ММФ карбоксилестерази, відрізняються однією малорухливою формою (R_f 0,270) і найбільшою експресивністю ізоформи з R_f 0,350.

Сумарна експресивність ферменту також залежить від середовища культивування ганодерми. Математичне опрацювання результатів показало, що на статистичному рівні значущості $p < 0,05$ значення сумарної експресивності карбоксилестерази досліджуваних варіантів розрізняються між собою (у всіх можливих варіантах порівняння критерій $U_{\text{факт.}} = 0$).

Мінімальна експресія естерази у міцелію спостерігається при культивуванні його на щільному середовищі сусло-агар (0,187 відн.од).

Серед варіантів глибинного культивування якнайменшу сумарну експресивність карбоксилестерази має варіант 2 (з дріжджовим екстрактом) — 2,885 відн.од. Вирощування на гречаному борошні підвищує експресивність карбоксилестерази міцелію у 1,7 разу (до 4,919 відн.од), а вирощування на вівсяному борошні — у 2,2 разу (до 6,389 відн.од) порівняно з використанням дріжджового екстракту.

У зерновому міцелію найменша ферментативна активність естерази спостерігалася у варіанті 7 з використанням ячменю (5,868 відн.од). При заміні його на пшеницю експресія зростала на 19% (до 6,989 відн.од), а у присутності вівса — в 2,6 разу (до 15,515 відн.од).

Таким чином, нами було встановлено, що у міцелії *Ganoderma lucidum* детектується до 10 ізоформ карбоксилестерази, серед яких одночасно можуть проявляти свою активність від 2 до 9 в залежності від умов вирощування. Максимальна кількість ізоформ карбоксилестерази (9) та, відповідно, й максимальна експресивність ферменту (15,515 відн.од) спостерігається при вирощуванні гриба на вівсяному зерновому субстраті. Дві середньорухливі форми ферменту з відносною рухливістю R_f 0,350 та 0,510 визначаються у всіх варіантах незалежно від способу культивування та складу поживного середовища. Зважаючи на функції карбоксилестерази в грибному організмі, а саме гідроліз амідних та ефірних зв'язків полімерних молекул [9-11], можна припустити, що підвищена експресивність цього ферменту та збільшення кількості ізоформ пов'язано із ступенем і швидкістю засвоювання субстрату та адаптивними властивостями міцелію гриба. Які саме з визначених нами форм ферменту є продуктами різних



генів, а які набувають відмінності на посттрансляційному рівні ми поки що говорити не можемо, тому всі детектовані електрофоретичні варіанти карбоксилестерази в проведеному дослідженні визначали як ізоформи.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Stamets P.* Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. — Oxford, 1993. — 552 p.
2. *Wasser S., Weis A.* Medicinal Mushrooms. Reishi Mushroom (*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst). — Haifa, 1997. — 39 p.
3. *Willard T.* Reishi mushroom: herb of spiritual potency and medical wonder. — Issaquah, Washington: Sylvan Press. 1990. — 167 p.
4. *Щерба В.В., Бабицкая В.Г.* Полисахариды ксилотрофных базидиомицетов // Прикл. биохим. и микробиол. — 2008. — Т. 44, № 1. — С. 90–85.
5. *Постнова Е.Л.* Исследование внутреннего полиморфизма штаммов *Ganoderma lucidum* (W. Curtis:Fr.) P. Karst.: дис. на соиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.24. — Москва, 2009. — 23 с.
6. *Мирось С.Л., Андриевский А.М.* Содержание белка и экспрессия множественных молекулярных форм карбоксиэстераз в тканях трутовика лакированного (*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.) // Тези доповідей молодих вчених. Матеріали II Міжнародної конф. «Біологія: від молекули до біосфери». — Харків, 19-21 листопада 2007 р. — С. 358.
7. *Мирось С.Л., Андриєвський А.М.* Молекулярні форми карбоксиестераз трутовика лакованого (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.) // Аграрний вісник причорномор'я. Зб.наук.праць. — 2008. — вип. 46. — С. 29–35.
8. *Атраментова Л.О., Утевська О.М.* Статистичні методи в біології: Підручник. — Х.: ХНУ, 2007. — 288 с.
9. *Satoh T., Hosokawa M.* Structure, function and regulation of carboxylesterases // Chem. Biol. Interact. — 2006. — № 162. — P. 195–211.
10. *Smith B.J., Sivasithamparoma K.* Isozymes of *Ganoderma* species from Australia // Mycological Research. — 2000. — V. 104, № 8. — P. 952–961.
11. *Zorn H., Bouws H., Takenberg M., Nimtz M., Getzlaff R., Breithaupt D.E., Berger R.G.* An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters // Biol. Chem. — 2005. — V. 386, № 5. — P. 435–440.



С.Л. Мирсь, Л.Ф. Дьяченко, Н.С. Бобрешова, О.С. Багаева, В.А. Иваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: till2002@mail.ru

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ ИЗОФОРМ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗЫ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Реферат

С помощью метода электрофоретического распределения в полиакриламидном геле была исследована экспрессия изоформ карбоксилэстеразы мицелия *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, выращенного на средах разного состава. Наибольшее количество изоформ с наибольшей экспрессивностью было получено в зерновом мицелии, выращенном на овсяном субстрате. Мицелиальная культура, полученная на жидкой среде, давала от трёх до шести изоформ в зависимости от субстратной композиции. В мицелии, полученном на твердой среде сусло-агар было зарегистрировано две активные изоформы.

Ключевые слова: изоформы карбоксилэстеразы, *Ganoderma lucidum*.

S.L. Miros, L.F. Dyatchenko, N.S. Bobreshpova, O.S. Bagaeva,
V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082,
Ukraine, e-mail: till2002@mail.ru

EXPRESSIONS OF CARBOXYLESTERASE ISOFORMS OF *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST IN DIFFERENT GROWING CONDITIONS

Summary

Using the method on the alkaline preliminary electrophoretical distribution in the polyacrylamide gel the expression of carboxylesterases isoforms of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst cultivation mycelium from the different substrates composition has been described. The most quantity (9) and the most expression of carboxylesterase isoforms (15,515) were detected in the mycelium from oat-grain substrate. In the case of *Ganoderma* liquid culture there were obtained from 3 to 6 isoforms depending on the substrate composition. The spawn has only two active isoforms of carboxylesterase.

Key words: isoforms of carboxylesterase, *Ganoderma lucidum*.



О.М. Алексеєнко, І.В. Жерносекова, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: +38 (056) 374 97 34, e-mail: microviro@rambler.ru

ВПЛИВ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* НА РІСТ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS*

*Встановлено стимулювальний ефект культуральної рідини штамів стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* у відношенні ростових показників міцелію їстівного гриба роду *Pleurotus ostreatus*. Показники швидкості росту, діаметру колоній, ростового коефіцієнту *P. ostreatus* зростають, в порівнянні з контролем, у присутності екзометаболітів досліджуваних штамів стрептоміцету.*

*Ключові слова: культуральна рідина, стрептоміцет, *Pleurotus ostreatus*, літичні ферменти, міцелій.*

Мікроорганізми є потенційними продуцентами біологічно-активних речовин — стимуляторів метаболічних процесів у живих організмів. Відомо, що біопрепарати, створені на основі екзо- та ендометаболітів бактерій та грибів, здатні поліпшувати ріст та розвиток рослин, тварин, грибів та мікроорганізмів [6, 9, 11, 14]. Застосування стимуляторів мікробного походження в рослинництві, тваринництві, рибористві та бджільництві перспективно у зв'язку із спрощенням їх отримання, дешевизною, високими детоксикаційними властивостями в організмі, а також здатністю легко зв'язуватися у клітині і катаболізуватися [13]. З огляду на те, що стрептоміцети є активними продуцентами антибіотиків, ферментів, вітамінів, амінокислот, гетероауксинів та інших біологічно активних речовин, вони є важливими об'єктами біотехнології.

В літературі інформація про вплив на ріст їстівних грибів метаболітів стрептоміцетів відсутня. З кожним роком обсяг виробництва їстівних грибів зростає, що потребує більш глибокого вивчення біології культур грибів та удосконалення методів їх вирощування [1, 3]. На підставі проаналізованих даних літератури, зроблено висновок щодо можливості використання культуральної рідини штамів стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* як стимулятора ростових процесів *Pleurotus ostreatus* (глива звичайна).



Метою даної роботи було визначення впливу екзометаболітів стрептоміцету *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* на ріст міцелію їстівного гриба *P. ostreatus* (глива звичайна).

Матеріали і методи

В роботі була використана 72-годинна культуральна рідина (КР) штамів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 (батьківський) і 2P-15 (рифампіциностійкий) відділена від біомаси при центрифугуванні та агарова культура грибного міцелію гливи звичайної *P. ostreatus* (штам Китайський чорний) віком три тижні.

Штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 синтезує комплекс літичних ферментів (протеїнази, амілази, ліпази, целюлази, глікозидази, ендопептидази) та стимулятор росту, які проявляють бактеріо-, дріжджелітичну та рістстимулюючу активність [12, 17]. Рифампіциностійкий штам *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 також проявляє стимулюючу дію, синтезує високоактивні глікозидази, ендопептидази, протеази та не продукує дріжджолітичні ферменти [5, 12].

Для виявлення впливу екзометаболітів стрептоміцету на ріст міцелію гливи звичайної, останній вирощували на твердому живильному середовищі такого складу: відвар картоплі та агар-агар (1000 мл; 20 г/л) [1, 8], в який до стерилізації додавали культуральну рідину штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 або 2P-15 в концентраціях: 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%. Суміш автоклаували при 1,5 атм протягом 40 хв. Як контроль використовували міцелій вирощений на картопляному агарі без додавання КР. Проводили засів трьохтижневого агаризованого міцелію штаму Китайський чорний блочком діаметром 8 мм, розташовуючи його повітряним міцелієм донизу [4]. Спостерігали за ростовими змінами *P. ostreatus* під впливом різних концентрацій КР штамів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 і 2P-15 у динаміці розвитку гриба при 27 °C [15, 16]. Діаметр колонії гриба вимірювали у двох напрямках у кожному з 3-х повторів на 3-ю, 4-ту та 5-ту добу.

Швидкість лінійного росту визначали за формулою [10]:

$$V=S/t,$$

де V — швидкість росту (мм/доба);

S — діаметр колонії (мм);

t — час культивування (доба);

Густину колонії відмічали за 3-х бальною системою (1 — рідка, 2 — середня, 3 — щільна). На основі отриманих даних обчислювали ростовий коефіцієнт (РК) за формулою [2]:

$$PK=d \cdot h \cdot g/t,$$

де d — діаметр колонії (мм);



h — висота колонії (1 мм);
g — щільність колонії (бал);
t — вік колонії (год);

Досліди проводили у 3-х повторах та обчислювали статистично з використанням t-критерію Стьюдента з вірогідністю 95% [7].

Результати та їх обговорення

В результаті проведеного експерименту було виявлено пряму кореляцію залежності збільшення діаметру колонії гливи від концентрації КР штаму 2P-15, внесеної у тверде картопляне середовище. Міцеліальні колонії гливи найбільшого діаметру ($54,3 \pm 1,0$ мм та $50,8 \pm 0,3$ мм) виростили на 5-ту добу культивування при додаванні у середовище культуральної рідини штаму 2P-15 в концентрації 1,0% та 0,1%, відповідно, що достовірно перевищило контроль на 11% та 4% (табл. 1). Найменший діаметр колонії $48,5 \pm 0,8$ мм встановлено при додаванні у середовище мінімальної концентрації культуральної рідини, що практично співпадало з контрольним рівнем.

Таблиця 1
Вплив культуральної рідини *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на ріст міцелію *Pleurotus ostreatus*

Table 1
Influence of cultural liquid *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the growth of mycelium *Pleurotus ostreatus*

Концентрація культуральної рідини (%)	Діаметр колоній (мм)			Швидкість росту колоній (мм/доба)			Густина колонії (бал), 5 доба	Ростовий коефіцієнт (%), 5 доба
	3 доба	4 доба	5 доба	3 доба	4 доба	5 доба		
0,001	$18 \pm 0,3$	$29,5 \pm 0,3$	$48,5 \pm 0,8$	$6,00 \pm 0,09^*$	$7,38 \pm 0,14$	$9,7 \pm 0,15$	2	81
0,01	$17,7 \pm 0,9$	$30,5 \pm 1,5$	$49,2 \pm 0,7$	$5,89 \pm 0,06$	$7,63 \pm 0,07$	$9,8 \pm 0,18$	2	82
0,1	$19,3 \pm 0,5$	$31,0 \pm 0,7$	$50,8 \pm 0,3^*$	$6,44 \pm 0,06$	$7,75 \pm 0,19$	$10,2 \pm 0,27$	3	127
1,0	$20,5 \pm 0,1^*$	$33,5 \pm 0,4^*$	$54,3 \pm 1,0^*$	$6,84 \pm 0,17$	$8,38 \pm 0,5$	$10,87 \pm 0,35^*$	3	136
контроль	$19,2 \pm 0,4$	$30,5 \pm 0,8$	$49,0 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,1$	$7,63 \pm 0,07$	$9,8 \pm 0,12$	2	82

Примітка:* — різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна на 0,05% рівні значимості.

Згідно отриманих даних було визначено швидкість росту міцелію гливи звичайної на 5-ту добу. У контролі вона становила $9,8 \pm 0,12$ мм/добу. Найвищий показник швидкості росту — $10,87 \pm 0,35$ мм/добу перевищував показник контролю на 11% і спостерігався при додаванні 1% культуральної рідини, що призвело до максимального збільшення діаметру колонії.



метру колонії. Крім того, було визначено густину колонії гриба за трьох бальною шкалою. У контрольних та дослідних зразках з концентраціями КР 0,001% та 0,01% колонії були більш «прозорими», не пухнастими і ватяними, що візуально відповідало двом балам. При розрахунку ростового коефіцієнту найвище значення 136% отримано за найвищої концентрації культуральної рідини, що перевищувало контроль в 1,7 разу.

В порівнянні з наведеними вище результатами досліджень, при використанні культуральної рідини батьківського штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 стимулювальний ефект отримали при низьких досліджених концентраціях. Так, концентрації КР штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 0,001% і 0,01% були ефективнішими за вищі (0,1% та 1%). Діаметр колоній гриба на 5-ту добу становив $49,3 \pm 0,1$ мм, $50,2 \pm 0,3$ мм, що недостовірно перевищувало контроль лише на 2% та 4%, відповідно. Найменший діаметр колонії — $48,0 \pm 0,5$ мм отримано при додаванні у середовище 0,1% КР, отже ріст гливи не досягав контрольного значення (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив культуральної рідини *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 на ріст міцелію *Pleurotus ostreatus*

Table 2

Influence of cultural liquid *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 on the growth of mycelium *Pleurotus ostreatus*

Концентрація культуральної рідини (%)	Діаметр колоній (мм)			Швидкість росту колоній (мм/доба)			Густина колонії (бал), 5 доба	Ростовий коефіцієнт (%), 5 доба
	3 доба	4 доба	5 доба	3 доба	4 доба	5 доба		
0,001	$18,0 \pm 0,3^*$	$32,0 \pm 0,3^*$	$49,3 \pm 0,1$	$6,00 \pm 0,09$	$7,88 \pm 0,07$	$9,87 \pm 0,02^*$	2	82
0,01	$19,3 \pm 0,2$	$31,2 \pm 0,7$	$50,2 \pm 0,3^*$	$6,44 \pm 0,06$	$7,79 \pm 0,08$	$10,03 \pm 0,07^*$	3	126
0,1	$18,3 \pm 0,5$	$29,5 \pm 0,6$	$48,0 \pm 0,5$	$6,11 \pm 0,15$	$7,37 \pm 0,14$	$9,60 \pm 0,10$	3	120
1,0	$18,7 \pm 0,6$	$30,3 \pm 0,9$	$48,5 \pm 0,8$	$6,22 \pm 0,20$	$7,59 \pm 0,22$	$9,70 \pm 0,15$	3	121
контроль	$19,0 \pm 0,1$	$30,0 \pm 0,5$	$48,5 \pm 0,5$	$6,33 \pm 0,10$	$7,42 \pm 0,20$	$9,71 \pm 0,05$	2	81

Примітка: * — різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна на 0,05% рівні значимості.

Показник швидкості росту на 5-ту добу склав $10,03 \pm 0,17$ мм/добу, що встановлено при додаванні 0,01% КР штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435. Тобто, спостерігалось незначне підвищення швидкості росту гливи на 3% у порівнянні з контролем, що і було наслідком незначного



збільшення діаметра колоній. У той же період, найнижчі показники мали колонії гриба, які виростили на живильному середовищі з 0,1% та 1% КР. Крім того, зразки з внесенням 0,01%, 0,1% та 1% культуральної рідини мали більш щільний ватоподібний міцелій ніжно-білого забарвлення, який візуально оцінено в три бали.

Ростовий коефіцієнт 126% був максимальним при додаванні 0,01% культуральної рідини штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435, що перевищило контроль в 1,6 разу.

Таким чином, можна констатувати, що для культивування їстівного гриба роду *P. ostreatus* можливо використання метаболітів стрептоміцету, що містяться у КР штамів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 та 2Р-15, як стимулювальні речовини ростових процесів гриба. Встановлено, що показники росту гриба значно зростали при дії КР штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2Р-15. З отриманих експериментальних даних можна зробити висновок, що ефект стимуляції залежить від штамових особливостей продуцентів біологічно-активних речовин та концентрації КР, що вноситься у живильне середовище гливи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бисько Н.А., Билай В.Т., Митропольская Н.Ю. Рекомендации по выращиванию шампиньонов и вешенки. — К.: ООО Международная консультативно-производственная группа «Грибы», 2001. — 38 с.
2. Биттеева М.Б., Бирюков В.В., Черкезов А.А., Ширшиков Н.В., Щерблякин И.Н., Горшина Е.С., Шушеначева Е.В., Стехновская Л.Д., Китайкин В.М., Зюкова А.А. Способ получения белковой биомассы гриба: Патент на изобретение РФ № RU 2189395 // 2000.07.31
3. Бухало А.С., Бисько Н.А., Бухало А.С., Соломко Э.Ф. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. — К.: Урожай, 2004. — 128 с.
4. Гарибова Л.В. Выращивание грибов. — К.: Вече, 2005. — 96 с.
5. Жерносекова И.В. Изменчивость продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* и его селекция: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. / К., 2002. — 20 с.
6. Косенко Л.В., Мандровская Е.Д., Кругова Е.Д., Варбанец Л.Д. Действие стимулятора роста растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 250a и его азотоустойчивый мутант М-71 в условиях различной обеспеченности азотом // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 1. — С. 40.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
8. Морозов А.И. Выращивание вешенки. Донецк: Сталкер, 2001. — 48 с.
9. Патица В.П., Копилов Е.П., Патица Т.І., Черницький Ю.О., Надкерничний С.П. Мікробні препарати — важливий компонент біологізації технологій вирощування ярої пшениці // Агроекологічний журнал, 2004, № 4. — С. 3—4.



10. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 332 с.

11. *Цавкелова Е.А., Климова Ю.С., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И.* Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохим. и микробиол. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 133—147.

12. *Черногор Н.П.* Вивчення рістстимулюючих властивостей лізоenzимного препарату *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* Автореф. дис.... канд. біол. наук 03.00.07/ІМВ НАНУ. — К., 1998. — 16 с.

13. *Черногор Н.П., Бабенко Ю.С.* Влияние условий культивирования микоорганизмов на проявление ростстимулирующей активности лізоenzимного препарата *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 // Микробиол. журнал, 1996. — Т. 58, № 5. — С. 44—50.

14. *Чуйко Н.В., Бега З.Т., Булавенко Л.В., Курдиш І.К.* Вплив бактеріального препарату комплексної дії на ріст декоративних рослин // Мікробіол. і біотехнол. — 2010, № 2. — С. 43—50.

15. *Deacon J.W.* Fungal biology. — 4th ed. — Edinburgh: Blackwell Publishing Ltd., 2006. — 380 p.

16. *Minter D.W., Dudka I.O., Andrianova T.V.* Mycology in Ukraine. — CD: PDMS Publishing, 2003. — 826 p.

17. *Sokolova I.E., Kylochek T.P., Vinnikov A.I.* Biosynthesis activity of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* // Микробиол. журн., 2004. — Т. 66, № 6. — С. 10—17.

Е.Н. Алексеенко, И.В. Жерносекова, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара,
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
тел.: +38 (056) 374 97 34, e-mail: microviro@ Rambler.ru

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* НА РОСТ ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS*

Реферат

Установлен стимулирующий эффект культуральной жидкости штаммов стрептомицета *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* в отношении ростовых показателей мицелия съедобного гриба рода *Pleurotus ostreatus*. Показатели скорости роста, диаметра колоний, ростового коэффициента *P. ostreatus* увеличиваются по сравнению с контролем в присутствии экзозимов исследуемых штаммов стрептомицета.

Ключевые слова: культуральная жидкость, стрептомицет, *Pleurotus ostreatus*, литические ферменты, мицелий.



O.M. Alekseenko, I.V. Zhernosekova, A.I. Vinnikov

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine,
tel.: +38 (056) 374 97 34, e-mail: microviro@rambler.ru

**STUDY OF *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS*
EXOMETABOLITES INFLUENCE ON THE GROWTH
OF MUSHROOM *PLEUROTUS OSTREATUS***

Summary

Stimulating effect of cultural liquid of strains *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* was shown relatively to the growth parameters of mushroom *Pleurotus ostreatus*. Growth speed, colony diameter, the coefficient of growth of *P. ostreatus* was increased in the presence of streptomycetes strains exometabolites compared with control.

Key words: cultural liquid, streptomycetes, *Pleurotus ostreatus*, lytic enzymes, mycelium.



Н.В. Ліманська, С.А. Серков, Ж.Ю. Сергеева, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, e-mail: limanska@gmail.com

ВИЯВЛЕННЯ ШТАМІВ *RHIZOBIUM VITIS* І *R. RADIOBACTER* МЕТОДОМ ПЛР З ВИКОРИСТАННЯМ ПРАЙМЕРІВ ДО РІЗНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ГЕНОМУ

Методом полімеразної ланцюгової реакції виявлено наявність патогенних штамів *Rhizobium vitis* і *R. radiobacter* у тканинах безсимптомних рослин і у пухлинах винограду. Проведено порівняльне тестування з використанням п'яти пар праймерів до різних ділянок геному цих бактерій. Показано, що у рослинах винограду сорту Каберне Совіньон патогенні штами склали 18,5% від загальної популяції *Rhizobium*.

Ключові слова: *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter*, полімеразна ланцюгова реакція, бактеріальний рак винограду.

Бактеріальний рак — це захворювання, поширене в усіх регіонах культивування винограду. Серед сортів винограду виділяють як більш, так і менш сприйнятливі до бактеріального раку, але повністю резистентні сорти невідомі [5]. Сорт Каберне Совіньон є одним з найбільш чутливих до ураження бактеріальним раком в умовах України [1]. Саме тому необхідною постає своєчасна та високоточна діагностика захворювання на насадженнях, призначених для виробництва садивного матеріалу винограду.

Оскільки бактеріальний рак винограду — це системна інфекція, за якої збудники поширюються по судинах рослини, для діагностики латентного захворювання здійснюють виділення бактерій *Rhizobium vitis* і *R. radiobacter* (за колишньою номенклатурою — *Agrobacterium vitis* і *A. tumefaciens*) [4] з пагонів або коріння [1, 11, 14]. Для дослідження біологічних властивостей штамів збудників звичайно виділяють безпосередньо з пухлинної тканини рослин. Існує низка методик детекції патогенних ризобій у пухлинних тканинах, в тому числі ті, що передбачають виділення бактерій на живильні середовища [11, 14, 16].

Найкращим методом діагностики фітопатогенів є метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [16]. При підборі послідовностей праймерів у випадку збудників бактеріального раку слід враховувати той факт,



що *R. vitis* і *R. radiobacter* характеризуються значною генетичною різноманітністю [6, 15].

Метою роботи було виявлення штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* у рослинах винограду за допомоги ПЛР з різними парами праймерних ділянок.

Матеріали і методи дослідження

Для дослідження відбирали здерев'янілі пагони, а також пухлинні тканини рослин сорту Каберне Совіньон виноградника в Одеській області. Відбір проводили влітку і восени 2010 року, по три лози з рослини винограду, розташовані ближче до штамбу. Лозу мили, фламбували, нарізали на фрагменти 5 мм товщиною, заливали стерильною водою і поміщали на добу у холодильник при 4 °С. Отриману суспензію висівали на середовище Рой і Сасера [10, 12].

Пухлини мили, відважували 1 г та, видаливши верхній шар, подрібнювали у 1 мл стерильного середовища LB (рН 7,2) і висівали 100 мкл розведень 10^{-2} та 10^{-3} на напівселективне середовище Рой і Сасера [12]. Колонії, що вирости, підраховували через 7 днів. Досліди проводили у трьох-п'яти повторностях. Статистичне опрацювання здійснювали за допомоги пакета прикладних програм STATISTICA 6.0.

З колоній, що вирости, здійснювали пересів бактерій на скошений картопляний агар. Ізольовані штами досліджували методом ПЛР з використанням праймерів до ділянки гена ізопентенилтрансферази та ділянок гена ендонуклеази VirD₂, плазміди патогенності [17], послідовностей генів *virC* Ті-плазміди [13], а також ділянок хромосомного гена полігалактуронази [7, 14].

В роботі використовували метод біо-ПЛР [8]. Бактеріальну суспензію у концентрації 10^8 кл/мл на дейонізованій воді, яка містила Тритон Х-100 і азид натрію, витримували 10 хв при 95 °С. Зразки центрифугували 5 хв при 5700 g, і надосадову рідину використовували для проведення ПЛР [14]. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила по 10 пмоль кожного з праймерів, 200 мкМ кожного з дезоксинуклеозидтрифосфатів, 2 Од Таq-полімерази ("Fermentas"), 2 мМ MgSO₄, 2 мкл буфера (10x, ("Fermentas")). У реакційну суміш вносили по 5 мкл надосадової рідини зразка. Ампліфікацію проводили згідно з параметрами Haas et al. [17], збільшивши час початкової денатурації до 3 хв, а час елонгації в останньому циклі — до 7 хв [3]. Відпал здійснювали при 52 °С, крім праймерів до ділянок полігалактуронази, для яких окремо підбирали умови ампліфікації. Ампліфікацію здійснювали у програмованому термоциклері "BioRad" (США). Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 1,5% агарозному гелі. Трисборатний буфер для електрофорезу містив бромід етидію ("Амплисенс", Росія). Гель фотографували під УФ—випромінюванням за допомоги відеосистеми "GelDoc" "BioRad".



Результати досліджень та їх обговорення

Ділянка винограду, з якої відбирався досліджуваний матеріал, містила як рослини з симптомами захворювання, так і безсимптомні рослини, які обстежували на наявність латентної інфекції.

Посіви індигенної мікробіоти пагонів вісімнадцяти рослин винограду та подальше тестування методом ПЛР показали наявність збудників бактеріального раку у 67% тестованих зразків. Ймовірно, наявність на ділянці великої кількості рослин із пухлинами призвела до проникнення фітопатогенних бактерій у здорові рослини. Крім того, можливо й те, що досліджені рослини були первинно інфіковані ще під час отримання садивного матеріалу, а при висадженні на виноградник самі по собі слугували джерелом поширення фітопатогенів.

З десяти зразків на напівселективному середовищі штами ризобій було виділено із семи зразків пухлинних тканин. Загальна кількість ризобієподібних колоній на середовищі Рой і Сасера склала у середньому $(3,4 \pm 1,4) \times 10^5$ на 1 г пухлинної тканини. Для наступного тестування у ПЛР було відібрано 65 штамів ризобій, з яких патогенними виявилися 18,5%. Отримані результати співпадають з даними попередніх дослідників, що вказують на присутність у пухлинах переважної кількості авірулентних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter*. Частина таких штамів, ймовірно, є представниками нормальної мікробіоти рослини, а решта — штамми, що індукували пухлинний процес, а потім стали мутантними за генами патогенності внаслідок впливу захисних факторів рослини [9].

Первинне виявлення фітопатогенних штамів у ПЛР проводили з використанням пар праймерів до послідовності гена ізопентенилтрансферази та ділянок гена ендонуклеази *VirD₂*, *Ti*-плазміді так, як це було рекомендовано Manulis та ін. для тестування садивного матеріалу [11]. Так, Manulis та ін. вказують, що використання обох пар праймерів при тестуванні рослин, призначених для вегетаційного розмноження, дозволяло відібрати садивний матеріал, цілком вільний від збудника бактеріального раку [11]. Згідно з дослідженнями Naas та ін. (1995), які вперше запропонували використовувати саме ці праймерні ділянки, деякі патогенні штами *R. vitis* є *ipt*-негативними і виявляються за допомоги праймерів до ділянок *virD₂* [17]. Згідно з нашими попередніми дослідженнями, праймери *virD₂*, дійсно, дозволяли виявити ширше коло штамів [2]. Тестування штамів, виділених з рослинного матеріалу сорту Каберне Совіньон, показало невелику розбіжність у кількості штамів, що несли послідовності *ipt* і *virD₂* (17,0% і 18,5%, відповідно). Але при використанні праймерів до послідовності *virD₂* слід враховувати той факт, що за їх допомоги виявляється також вид *R. rhizogenes*, який не являє загрози для винограду, тоді як з праймерами до послідовності *ipt* виявляються безпосередньо пухлинотвірні штами [17]. Отже, кількість потенційно небезпечних штамів, виявлених у ПЛР з *virD₂*, може бути



перебільшеною, і праймери *ipt* є зручними “маркерами” саме одного з генів, що відповідає за пухлинне переродження тканин [2, 11, 17].

Ізольовані штами тестували у ПЛР також з використанням праймерів до послідовностей генів *virC* Ті-плазміди (праймери VCF3/VCR3 і VCF^{b3}/VCR^{b3}) і гена полігалактуранози (праймери PGF/PGR). Праймери VCF3/VCR3 [13] було обрано через те, що вони були визнані кращими для виявлення *R. vitis* і *R. radiobacter* у винограді згідно з дослідженням Kitagai та ін. [8]. Suzaki та ін. було запропоновано праймерні ділянки VCF^{b3}/VCR^{b3} [13], які є цікавими через амплікони великого розміру, що можуть бути надалі використані для рестрикційного аналізу при вивченні генетичного поліморфізму всередині популяцій *R. vitis* і *R. radiobacter*.

Наші дослідження показали, що ПЛР з праймерами VCF3/VCR3 і VCF^{b3}/VCR^{b3} дозволяє виявити таку ж саму кількість штамів, як і у випадку праймерів *virD₂* і *ipt*, відповідно (табл. 1).

Таблиця 1

Виявлення *R. vitis* і *R. radiobacter* серед ізольованих представників мікробіоти винограду методом ПЛР з різними праймерами

Table 1

Detecting of *R. vitis* and *R. radiobacter* strains among the isolated representatives of grapevine microbiota by PCR with different primers

Праймери	Послідовність	Автор	Виявлено штамів, %
<i>ipt</i> (CYT/CYT')	5' – GAT CG(G/C) GTC CAA TG(C/T) TGT - 3' 5' – GAT ATC CAT CGA TC(T/C) CTT - 3'	Haas et al., 1995	17,0
<i>virD₂</i> (A/C')	5' – ATG CCC GAT CGA GCT CAA GT - 3' 5' – TCG TCT GGC TGA CTT TCG TCA TAA - 3'	Haas et al., 1995	18,5
VCF3/ VCR3	5' – GGC GGG CGY GCY GAA AGR AAR ACY T - 3' 5' – AAG AAC GYG GNA TGT TGC ATC TYA C - 3', де N – A, C, G або T; R – A або G; Y – C або T.	Suzaki et al., 2004	18,5
VCF ^{b3} / VCR ^{b3}	5' – ATC ATT TGT AGC GAC T - 3' 5' – AGC TCA AAC CTG CTT C - 3'	Suzaki et al., 2004	17,0
PGF/PGR	5' – GGG GCA GGA TGC GTT TTT GAG - 3' 5' – GAC GGC ACT GGG GCT AAG GAT - 3'	Herlache et al., 1997	90,7



Праймери PGF/PGR було підбрано до послідовності гена полігалактуронази, присутнього у *R. vitis*, але не у *R. radiobacter*, при цьому даний ген виявляється як у патогенних, так і у непатогенних штамів [7]. ПЛР з праймерами PGF/PGR потребувала оптимізації параметрів у порівнянні із запропонованими [7, 14]. Так, через неспецифічні амплікони (рис. 1, а) концентрацію йонів магнію було зменшено до 1,25 мМ, а температуру відпалу праймерів підвищено до 68 °С. За таких параметрів було отримано поодинокі амплікони із заданими розмірами 466 п.о. (рис. 1, б).

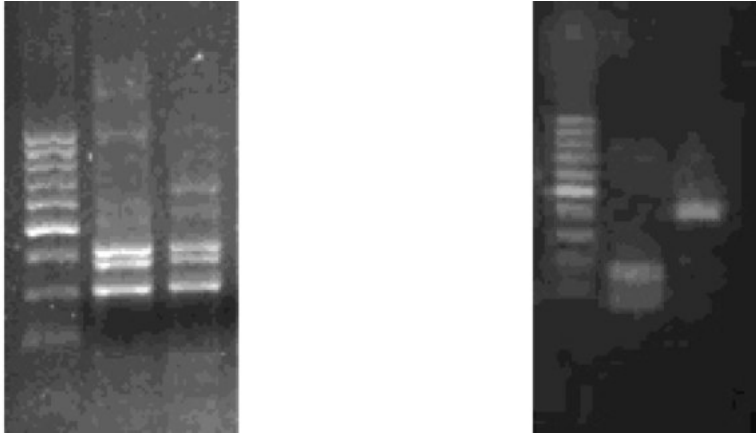


Рис. Електрофореграма продуктів ПЛР з ДНК штамів, виділених з рослин винограду:

а – температура відпалу праймерів 54 °С, концентрація йонів магнію 2,0 мМ, трек 1 – маркери молекулярної маси (100 – 1000 п.о.), треки 2 і 3 – продукти ПЛР з праймерами PGF/PGR; б – температура відпалу праймерів 68 °С, концентрація йонів магнію 1,25 мМ, трек 1 – маркери молекулярної маси (100 – 1000 п.о.), трек 3 – продукт ПЛР з праймерами PGF/PGR.

Fig. Electrophoregram of PCR products with DNA of strains isolated from grapevine plants:

a – annealing temperature is 54 °С, Mg⁺⁺ concentration is 2,0 мМ, track 1 – markers of molecular weight, tracks 2 and 3 – products of PCR with PGF/PGR primers; b – annealing temperature is 68 °С, Mg⁺⁺ concentration is 1,25 мМ, track 1 – markers of molecular weight, track 3 – a product of PCR with PGF/PGR primers.

Серед 65 штамів, виділених з винограду на напівселективне середовище Рой і Сасера, колонії яких були характерні для ризобій, 90,7% були визначені як такі, що належать до виду *R. vitis*. Решта штамів, ймовірно, є *R. radiobacter*, або ж іншими представниками мікробіоти, які дають подібні до ризобій колонії. Із 18,5% штамів патогенних ризобій ген полігалактуронази було виявлено у 17,0%, тобто переважна більшість

штамів з тканин винограду були представлені видом *R. vitis*, що співпадає з даними інших дослідників [9].

Отже, для діагностики латентної інфекції бактеріального раку на винограді слід рекомендувати праймери до послідовності *ipt* і праймери *virD₂* або VCF3/VCR3. Результати досліджень свідчать про переважну присутність у тканинах рослин винограду непатогенних штамів *R. vitis* і *R. radiobacter* (81,5% у порівнянні з 18,5% патогенних).

Роботу було виконано у рамках держбюджетної теми № 477, що фінансується МОНМС України.

ЛІТЕРАТУРА

1. Леманова Н.Б. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур / Н.Б. Леманова, Э.Ш. Гатина. — Кишинев: Штиинца, 1991. — С. 21–46.

2. Лиманська Н.В. Діагностика бактеріального раку винограду методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням двох пар праймерів / Лиманська Н.В. // Вісник Одеського національного університету. — 2004. — Т. 9, № 5. — С. 177–182.

3. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики *A. vitis* / Н.В. Лиманская, И.Д. Жунько, Л.А. Конуп, Б.Н. Милкус // Виноградарство и виноделие. — 2003. — № 6. — С. 14–16.

4. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajude et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis* / J.M. Young, L.D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr [et al.] // Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. — 2001. — 51. — P. 89–103.

5. Burr T.J. Crown gall of grape: biology and disease management / T.J. Burr, L. Otten // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53–80.

6. Characterization of plasmid borne and chromosome encoded traits of *Agrobacterium biovar* 1, 2 and 3 strains from France / M. Ride, S. Ride, A. Petit [et al.] // Appl. Environm. Microbiol. — 2000. — Vol. 66, № 5. — P. 1818–1825.

7. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Ralstonia solanacearum* / T.C. Herlache, A.T. Hotchkiss, T.J. Burr, A. Collmer // Appl. environm. microbiol. — 1997. — Vol. 63, № 1. — P. 338–346.

8. Kumagai L. Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR / L. Kumagai, A.-L. Fabritius // 2th Annual National Viticulture Research



Conference (Davis, USA, July 9 – 11, 2008). – Davis: University of California, 2008. – P. 42–43.

9. *Lastra B.* Characterization of *Agrobacterium* strains isolated from grapevine in Galicia (Spain) / B. Lastra, P. Llop, M. M. Lopez // Proc. Congress of the European Foundation for Plant pathology (Taormina (Italy), September 20–23, 2000). – Taormina: University Press, 2000. – P. 178–179.

10. *Lehoczky J.* Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection / J. Lehoczky // Phytopathol. Z. – 1968. – Vol. 63. – P. 239–246.

11. *Molecular* diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material / S. Manulis, L. Chalupowicz, O. Dror, F. Kleitman // Pest Manag. Science. – 2002. – Vol. 58. – P. 1126–1131.

12. *Roy M.* A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 / M. Roy, M. Sasser // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 810.

13. *Suzaki K.* Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers / K. Suzaki, K. Yoshida, H. Sawada // J. gen. plant pathol. – 2004. – Vol. 70, № 2. – P. 342–347.

14. *Szegedi E.* Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium / E. Szegedi, S. Bottka // Vitis. – 2002. – Vol. 41, № 1. – P. 37–42.

15. *Ti plasmids* from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries / S. Pionnat, H. Keller, D. Richer [et al.] // Appl. Environm. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 9. – P. 4197–4206.

16. *Tzfira T.* *Agrobacterium*: from biology to biotechnology / T. Tzfira, V. Citovsky. – New-York:Springer, 2008. – 750 p.

17. *Universal* PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains / J.H. Haas, L.W. Moore, W. Ream, S. Manulis // Appl. Environm. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 8. – P. 2879–2884.



Н.В. Лиманская, С.А. Серков, Ж.Ю. Сергеева, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, e-mail: limanska@gmail.com

ВИЯВЛЕНИЕ ШТАММОВ *RHIZOBIUM VITIS* И *R. RADIOBACTER* МЕТОДОМ ПЦР С ПРАЙМЕРАМИ К РАЗНЫМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ ГЕНОМА

Реферат

Методом полимеразной цепной реакции выявлено присутствие патогенных штаммов *Rhizobium vitis* и *R. radiobacter* в тканях бессимптомных растений и в опухолях винограда. Проведено сравнительное тестирование с использованием пяти пар праймеров к различным участкам генома данных бактерий. Показано, что в растениях винограда сорта Каберне Совиньон патогенные штаммы составляли 18,5% от общей популяции *Rhizobium*.

Ключевые слова: *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter*, полимеразная цепная реакция, бактериальный рак винограда.

N.V. Limanska, S.A. Serkov, Zh.Yu. Sergeeva, V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limanska@gmail.com

DETECTION OF *RHIZOBIUM VITIS* AND *R. RADIOBACTER* STRAINS BY PCR WITH THE PRIMERS TO DIFFERENT GENOME SEQUENCES

Summary

Pathogenic *Rhizobium vitis* and *R. radiobacter* strains in symptomless plants and grapevine tumors were revealed by PCR technique. The comparative tests with five primer pairs to different sequences of bacterial genome were carried out. It was shown that in plants of Cabernet Sauvignon cultivar 18.5% from total *Rhizobium* population were represented by pathogenic strains.

Key words: *Rhizobium vitis*, *R. radiobacter*, polymerase chain reaction, crown gall of grape.



І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРІЙ *THIOCAPSA SP. YA-2003* ЗА ВПЛИВУ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ

*Досліджено ріст фототрофних пурпурових сіркобактерій *Thiocapsa sp. Ya-2003* за впливу різних концентрацій гідроген сульфіду. Показано, що внесення 6, 8 та 10 мМ H_2S інгібує ріст досліджуваних сіркобактерій, а також утилізацію ними гідроген сульфіду. Визначено активність супероксиддисмутази і каталази клітин *Thiocapsa sp. Ya-2003*. Встановлено, що гідроген сульфід інгібує досліджуванні ферменти клітин сіркобактерій вже у концентрації 6 мМ.*

Ключові слова: пурпурові сіркобактерії, токсичність, гідроген сульфід, каталаза, супероксиддисмутаза.

Утворення гідроген сульфіду спостерігають у Чорному морі, а також у водоймах сірководобувних кар'єрів. У Яворівському районі (Львівська область) унаслідок затоплення сірчаного кар'єру утворилося озеро площею 1080 га [1]. Наявність органічних сполук у воді озера Яворівське спричиняє розвиток сульфат- та сірководновлювальних бактерій, продуктом життєдіяльності яких є гідроген сульфід. Останній також може утворюватися у результаті вивільнення сульфур у органічних сполук у процесі мінералізації.

У літературі є багато даних про дію гідроген сульфіду на організм людини, тварин та деякі мікроорганізми [2, 10, 14], проте не описано його вплив на аноксигенні фототрофні бактерії.

Фотосинтезувальні пурпурові сіркобактерії здатні використовувати гідроген сульфід при аноксигенному фотосинтезі. При цьому вони очищають від нього водне середовище [5] і є кормом для риб. Відомо, що найінтенсивніший ріст цих мікроорганізмів спостерігають за концентрації 4 мМ H_2S [11]. Проте, не відомий вплив високих концентрацій цієї сполуки на фотосинтезувальні сіркобактерії.

Метою роботи було дослідити вплив різних концентрацій гідроген сульфіду на нагромадження біомаси, його утилізацію, а також активність деяких ферментів системи антиоксидантного захисту пурпурових сіркобактерій *Thiocapsa sp. Ya-2003*.



Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були фототрофні аноксигенні пурпурові сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003. Штами сіркобактерій виділені з води Яворівського озера, одержані в чистій культурі та ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [3].

Фототрофні пурпурові сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003 культивували у середовищі Ван Ніля (рН 7,5) протягом 10 діб за анаеробних умов при температурі +25...+28 °С. Освітлення при вирощуванні бактерій було цілодобовим, забезпечувалось лампою розжарювання потужністю 75 Вт.

З метою дослідження здатності сіркобактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003 рости за різних концентрацій гідроген сільфїду, до середовища вносили 5, 6, 8 та 10 мМ Na₂S. Останній у водному середовищі гідролізується з утворенням H₂S. Середовище Ван Ніля у своєму складі містить 4 мМ гідроген сульфїду. Це середовище (без додаткового внесення H₂S) було контрольним у дослідженнях.

Біомасу визначали за мутністю суспензії клітин шляхом її фотометрування на фотоелектроколориметрі КФК-3 ($\lambda=660$ нм, оптичний шлях 3 мм).

Концентрацію гідроген сульфїду визначали за зміною оптичної густини внаслідок відновлення метиленового синього [15].

Для отримання безклітинних екстрактів до осаджених і промитих 0,9% розчином NaCl клітин додавали охолоджений екстрагуючий буфер (50 мМ калій-фосатний буфер, рН 7,5, 10⁻⁵ М етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) — для зв'язування іонів важких металів, 10⁻⁵ М фенілметилсульфонїлфторид (ФМСФ) — для інгібування протеаз, функціонуючих при рН, вищих 7,0 і отримували суспензію клітин у концентрації 50–100 мг/мл.

Клітини руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН–2Т при 22 кГц протягом 5 хв при 0 °С. Отриману суспензію переносили в центрифужні пробірки і відокремлювали безклітинний екстракт від клітинних уламків центрифугуванням при 12–15 тис. об/хв при 4 °С протягом 30 хв на центрифусі ЦР-2.

Для вивчення впливу гідроген сульфїду на активність ферментів, вирощену культуру бактерій за різних концентрацій (4; 5; 6; 8 та 10 мМ) H₂S, відбирали в експоненційній фазі росту, після цього отримували безклітинні екстракти і визначали активність ферментів. Концентрацію білка визначали методом Лоурі.

Активність каталази визначали спектрофотометрично за кількістю ферментованого гідроген пероксиду [13]. Активність супероксиддисмутази визначали за ступенем інгібування нею автоокиснення кверцетину, концентрацію якого вимірювали спектрофотометрично [4].

Основні статистичні показники вираховували за безпосередніми даними (трьохкратна повторність, середнє арифметичне — *M*, стандартна



похибка — m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками сукупностей даних обраховували коефіцієнт Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $p > 0,05$ [8]. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

Результати та їх обговорення

Виділені з Яворівського озера сіркобактерії *Thiocapsa* sp. Ya-2003 на середовищі Ван Ніля утворювали колонії рожево-пурпурового кольору, оточені слизом (рис. 1). Вони ростуть лише на світлі за наявності в середовищі гідроген сульфіду. При мікроскопуванні їх клітини мають сферичну або овальну форми діаметром 1,0–3,0 мкм. Клітини не містять газових вакуолей, нерухомі. Спостерігається контрастування глобул сірки всередині клітин, як це описано для представників пурпурових сіркобактерій [5, 11]. Мікроорганізми розміщуються поодинокі або в агрегатах по 2–4 клітини.



Рис. 1. Колонії бактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003 на агаризованому середовищі Ван Ніля

Fig. 1. Colonies of *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria on the Van Niel medium

Як показали результати наших досліджень, найбільша біомаса ($2,59 \pm 0,07$ г/л) була на десяту добу у контрольному варіанті за концентрації 4 мМ гідроген сульфіду у середовищі. Збільшення концентрації цієї сполуки до 5 мМ стимулює нагромадження біомаси бактерій протягом другої — шостої діб культивування (рис. 2). Після чого, спостерігається незначне інгібування росту *Thiocapsa* sp. Ya-2003.

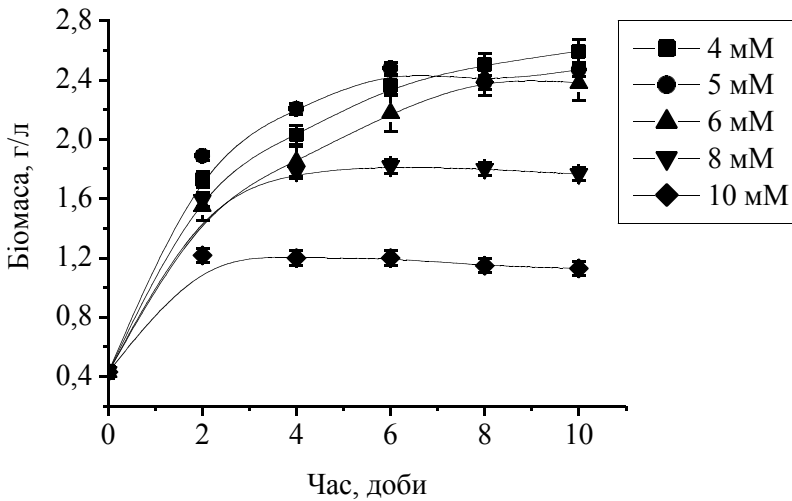


Рис. 2. Вплив гідроген сульфїду на рїст бактерїй *Thiocapsa* sp. Ya-2003

Fig. 2. The influence of hydrogen sulfide on the growth of *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria

Найбільш виражене зниження біомаси відбувалося за внесення 6, 8 та 10 мМ H_2S у середовище культивування. За цих концентрацій рїст пригнїчувався на шосту добу, порївно з контролем, на 10, 29, 60%, вїдповїдно (рис. 2). Найменша біомаса виявлялася за впливу 10 мМ гїдроген сульфїду.

Пригнїчення росту дослїджуваних бактерїй за впливу високих концентрацій гїдроген сульфїду, можливо, обумовлено дїєю H_2S на мембрани цих клїтин та на їхнї компоненти: структурнї бїлки чи ферменти. Гїдроген сульфїд також впливає на мембранний чи внутрїшньоклїтинний транспорт [2], оскїльки вїдомо про його здатнїсть зв'язувати метали, якї можуть бути компонентами активних центрів ферментів, задїяних не лише у транспортї, але і в метаболїчних процесах.

Пурпуровї сїркобактерїї здїйснюють окиснення гїдроген сульфїду, який є донором електронів у процесї аноксигенного фотосинтезу. У природнїх умовах цї бактерїї здїйснюють бїологїчне очищення води вїд цїєї токсичної сполуки [5, 11]. Як було показано, високї концентрації 6–10 мМ H_2S пригнїчують рїст пурпурових сїркобактерїй *Thiocapsa* sp. Ya-2003. Наступним завданням роботи було дослїдити використання гїдроген сульфїду дослїджуваними сїркобактерїями за рїзних його концентрацій у середовищї.

Дослїдження показало, що найбільше H_2S використовується сїркобактерїями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 за його оптимальної концентрації — 4 мМ. На восьму добу його концентрація становила $1,08 \pm 0,24$ мМ. За бїльших концентрацій гїдроген сульфїд споживається менш інтенсивно, а при 8–10 мМ — практично не використовується (рис. 3).

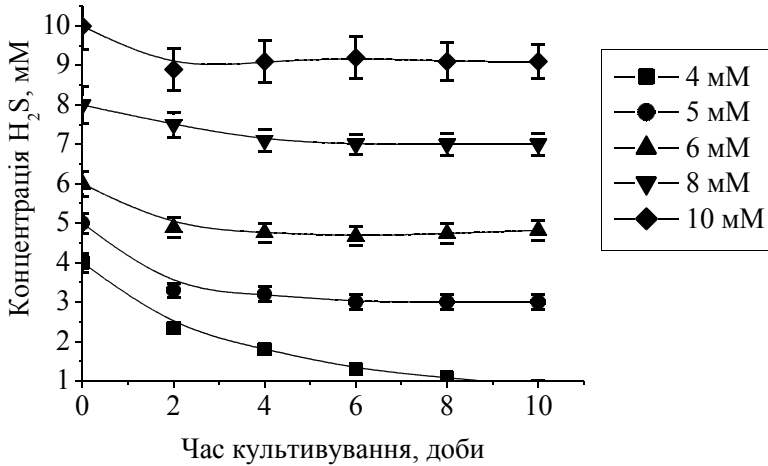


Рис. 3. Використання H_2S бактеріями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 за впливу різних його концентрацій

Fig. 3. Utilization of H_2S by *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria under its different concentrations

Очевидно бактерії не використовують гідроген сульфід у високих концентраціях через пригнічення ростових процесів. За нижчих концентрацій H_2S (5 мМ) на восьму добу культура використала 60% H_2S , порівняно з початковою. Таким чином, за високих концентрацій утилізація гідроген сульфідом культурою значно сповільнюється. Можливо, зниження вмісту H_2S за його високих концентраціях обумовлене нагромадженням його у відмерлих клітинах за рахунок їх пошкодження.

Більшість пурпурових сіркобактерій є облигатними анаеробами [11]. Проте є дані, що окремі представники родини *Chromatiaceae*, зокрема *Thiocapsa roseopersicina*, здатні рости за аеробних або мікроаерофільних умов, що має важливе значення для розвитку та виживання цих мікроорганізмів у середовищах, де часто змінюється кисневий режим [9]. При цьому стійкість організмів до активних форм кисню обумовлена наявністю у них специфічної системи антиоксидантного захисту. Відомо, що основними ферментами цієї системи у пурпурових сіркобактерій є супероксиддисмутаза та каталаза [6, 7].

Як видно з результатів досліджень, гідроген сульфід у концентрації 5 мМ не впливав на активність супероксиддисмутази (СОД), а за 6–10 мМ H_2S у середовищі культивування, рівень активності фермента помітно зменшується (рис. 4). На шосту добу культивування при 8 мМ вона становила $16,05 \pm 0,29$ ммоль/хв • мг білка, а при 10 мМ – $13,11 \pm 0,24$ ммоль/хв • мг білка. У контрольному варіанті величина активності СОД на другу, четверту та шосту доби становила відповідно – $18,34 \pm 0,38$; $18,47 \pm 0,49$ та $18,05 \pm 0,33$ ммоль/хв • мг білка. Можливо, супероксиддисмутаза активується певними кількостями сульфідом до межі, за якою починається інгібуючий вплив.

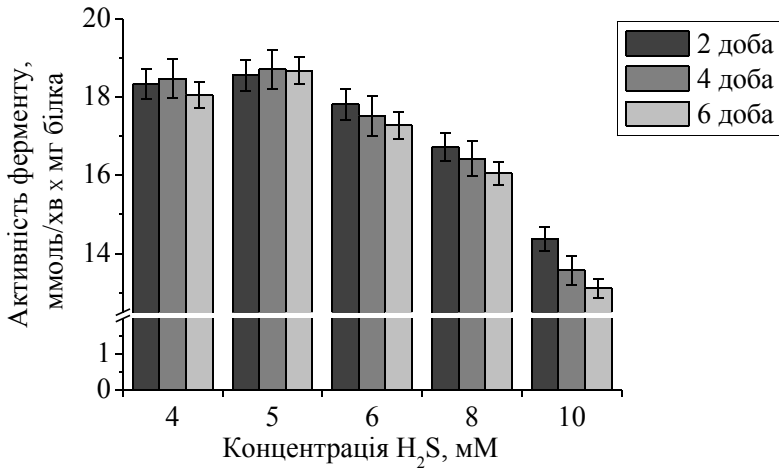


Рис. 4. Вплив гідроген сульфїду на активність супероксиддисмутази безклїтинних екстрактів сіркобактерїй *Thiocapsa sp. Ya-2003*

Fig. 4. The influence of hydrogen sulfide on superoxide dismutase activity of cell-free extracts sulfur *Thiocapsa sp. Ya-2003* bacteria

Отже, супероксиддисмутаза є чутливим ферментом до H₂S у високих концентраціях.

Подібна закономірність спостерігається при дослідженні впливу різних концентрацій гідроген сульфїду на активність каталази (рис. 5). Отримані результати показали, що внесення у середовище гідроген сульфїду концентрацією 5 мМ, не спричиняло впливу на активність каталази у *Thiocapsa sp. Ya-2003*. Пригнічення активності відбувалося при додаванні в культуральне середовище 6, 8 і 10 мМ H₂S.

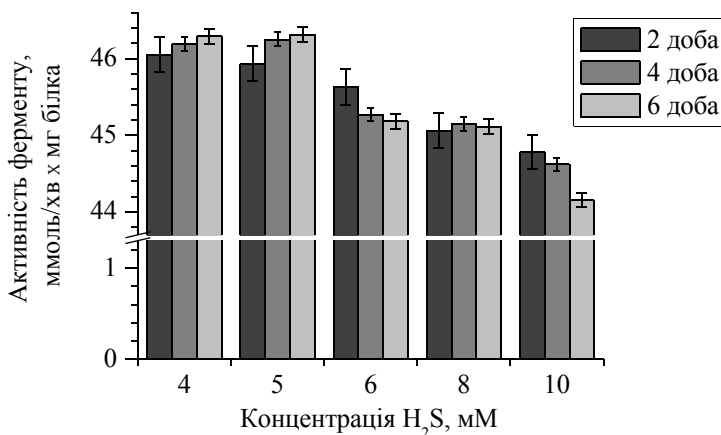


Рис. 5. Вплив гідроген сульфїду на активність каталази безклїтинних екстрактів сіркобактерїй *Thiocapsa sp. Ya-2003*

Fig. 5. The influence of hydrogen sulfide on the catalase activity of cell-free extracts sulfur *Thiocapsa sp. Ya-2003* bacteria

Таким чином, гідроген сульфід у концентрації 6, 8 та 10 мМ пригнічує нагромадження біомаси пурпуровими сіркобактеріями *Thiocapsa* sp. Ya-2003 на шосту добу на 10, 29, 60%, відповідно. У бактерій *Thiocapsa* sp. Ya-2003 інгібуючою концентрацією для СОД є 6 мМ H_2S . За впливу 10 мМ H_2S у середовищі активність ферменту інгібувалась на 28%. За цих умов також знижується активність каталази.

Припускаємо, що H_2S впливає на певний кофактор чи активний центр досліджуваних ферментів. Відомо, що транспорт металів в апобілки СОД здійснюють спеціальні білки, які належать до родини шаперонів — металошаперони. Їхня функція полягає у тому, щоб доставити метал-кофактор у фермент-мішень. У результаті цього фермент переходить з неактивного в активний стан [12]. Відомо, що існують кілька форм супероксиддисмутази залежно від перехідного металу-кофактора активного центру ферменту, який стабілізує конформацію: Cu, Mn, Zn-СОД, а також менш розповсюджені Fe-СОД та Ni-СОД. Каталаза в активному центрі містить іони феруму. Ферменти антиоксидантного захисту в пурпурових сіркобактерій є малодосліджені. Можливо, гідроген сульфід більш активно зв'язує іони металів з середовища, ніж білки, і вони не здатні потрапляти у клітини. Імовірно, дефіцит іонів металів у клітинах, які необхідні для ферментів, призводить до інгібування їх активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гайдін А.М., Зозуля І.І. Яворівське озеро / Львів: ВАТ “Інститут гірничо-хімічної промисловості”. — 2007. — 70 с.
2. Галушка А., Перетятко Т., Гудзь С. Вплив гідроген сульфиду на *Escherichia coli* // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. — 2008. — Вип. 48. — С. 129–134.
3. Кім Л.Я. Пурпурові сіркобактерії водойм Яворівського сіркового родовища: морфологічна характеристика і роль у детоксикації сірководню. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. Львів, — 2009. — 20 с.
4. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. — 1990. — Т. 36, № 2. — С. 88–91.
5. Кушкевич І.В., Гнатуш С.О. Аноксигенні фотосинтезувальні пурпурові бактерії. Біологічні Студії/Studia Biologica. — 2010. —Т. 4, № 3. —С. 137–154.
6. Кушкевич І.В., Кім Л.Я. Вплив атмосферного кисню на аноксигенні фототрофні пурпурові сіркобактерії. Матер. наук. конф. студентів біол. ф-ту ЛНУ імені Івана Франка. Львів, — 2004. — С. 47–51.
7. Кушкевич І.В., Кім Л.Я., Гнатуш С.О. Активність каталази та супероксиддисмутази у фототрофних сіркобактерій залежно від умов культивування: II Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів „Молодь і поступ біології”. Львів, — 2006. — С. 301–302.



8. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. шк., — 1990. — 352 с.
9. Петушкова Ю.П., Ивановский Р.Н. Дыхание клеток *Thiocapsa roseopersicina* // Микробиология. — 1976. — Вып. 1. — С. 389–395.
10. Beauchamp R.O., Bus J.S., Popp J.A. et al. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity / Critical reviews in toxicology. — 1984. — № 13. — P. 25–97.
11. Blankership R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis. USA. — 1995. — 1368 p.
12. Finney L.A., O'Halloran T.V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors // Science. — 2003. — Vol. 300. — P. 931–936.
13. Luck H. Catalase // Methods in enzymatic analysis / H. — U. Bergmeyer ed. — London: Academic Press, — 1963. — P. 855–894.
14. Miller S.R. Variation in sulfide tolerance of photosystem II in phylogenetically diverse cyanobacteria from sulfidic habitats / S.R. Miller, B.M. Bebout // Applied and environmental microbiology. — 2004. — Vol. 70, № 2. — P. 736–744.
15. Пат. 6340596 США, МКИ G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Masami Sugiyama (Японія); Fujirebio Inc. N248316; Заявл. 02.11.1999; Опубл. 22.01.2002; НКІ 436/121. — 9 с.

И.В. Кушкевич, С.А. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БАКТЕРИЙ *THIOCAPSA* SP. YA-2003 ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА

Реферат

Исследован рост фототрофных пурпурных серобактерий *Thiocapsa* sp. Ya-2003 под влиянием различных концентраций гидроген сульфида. Показано, что внесение 6, 8 и 10 мМ H₂S ингибирует рост исследуемых серобактерий, а также утилизацию ими гидроген сульфида. Определены активность супероксиддисмутазы и каталазы клеток *Thiocapsa* sp. Ya-2003. Установлено, что гидроген сульфид ингибирует исследуемые ферменты клеток серобактерий уже в концентрации 6 мМ.

К л ю ч е в ы е с л о в а : пурпурные серобактерии, токсичность, гидроген сульфид, каталаза, супероксиддисмутаза.



I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush

Ivan Franko National University of Lviv,
4, Hrushevski Str., Lviv 79005, Ukraine,
tel.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS
OF *THIOCAPSA* SP. YA-2003 BACTERIA UNDER THE
INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE**

Summary

The growth of phototrophic purple sulfur *Thiocapsa* sp. Ya-2003 bacteria under the influence of different concentrations of hydrogen sulfide was studied. The addition of 6, 8 and 10 mM H₂S inhibited the growth of sulfur bacteria under study, as well as utilization of hydrogen sulfide by them was shown. Superoxide dismutase and catalase activity of *Thiocapsa* sp. Ya-2003 cells was determined. Hydrogen sulfide at concentration of 6 mM inhibits the investigated sulfur bacteria cell enzymes.

Key words: purple sulfur bacteria, toxicity, hydrogen sulfide, catalase, superoxide dismutase.



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

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

ЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

*Изучена способность к синтезу и продуцированию целлюлаз бактериями рода *Bacillus* при культивировании на целлюлозе в глубинных условиях. Показано, что ферментативный гидролиз целлюлозы бациллами осуществляется под действием целлюлазного комплекса, состоящего из целлюлаз разного типа: C_x -фермента, расщепляющего карбоксиметилцеллюлозу, C_1 -фермента, расщепляющего хлопковую вату, C_2 -фермента, расщепляющего фильтровальную бумагу и целлобиазы. Прослежена динамика биосинтеза различных компонентов целлюлазного комплекса у изучаемых бактерий. Показано, что максимум выхода продуктов гидролиза можно получить на третьи сутки их культивирования на целлюлозе.*

К л ю ч е в ы е с л о в а : бактерии рода *Bacillus*, целлюлазный комплекс.

Микробная конверсия целлюлозы продолжает оставаться важнейшим направлением исследований в биотехнологии. Расщепление широко распространенных, ежегодно возобновляемых растительных отходов является важным и актуальным.

Большой интерес представляет специфичность гидролитических ферментов, способных расщеплять различные целлюлозосодержащие растительные отходы и делать их пригодными для использования в пищевых целях.

Согласно имеющимся представлениям по схеме Рииза, процесс ферментативного гидролиза целлюлозы у микроорганизмов может происходить под действием комплекса целлюлаз, состоящего из C_1 -, C_x - ферментов и β -глюкозидазы [8, 12]. Кроме C_1 - и C_x - ферментов исследователями выделен также C_2 -фермент, который очень близок к C_1 -ферменту. Под действием C_1 -фермента целлюлоза начинает набухать, а затем подвергаться воздействию C_2 -фермента до образования целлодекстринов, которые уже под действием C_x -фермента расщепляются до целлобиозы [11].

Ключевым свойством, характеризующим целлюлазный комплекс микроорганизмов, с помощью которого осуществляется конверсия, является способность к глубокому осахариванию и деструкции целлю-



лозосодержащих субстратов, другими словами, его сахаролитическая активность [1, 11]. Поэтому исследования ученых и специалистов были направлены, в основном, на поиск ферментных препаратов и их продуцентов, эффективно осуществляющих гидролиз целлюлозы до глюкозы, которые успешно найдены уже среди грибов и многих видов бактерий. Однако, лишь небольшое количество из них способны синтезировать внеклеточные целлюлазы и гидролизовать высокоструктурную кристаллическую целлюлозу. Среди них заслуживают внимания бактерии рода *Bacillus* [2, 7, 13].

Ранее нами был осуществлен скрининг продуцентов целлюлаз среди бактерий рода *Bacillus* и отобраны штаммы с высокой целлюлазной активностью [6].

Цель настоящей работы заключалась в изучении способности к синтезу и продуцированию целлюлазных комплексов бактерий рода *Bacillus* и определение их состава при глубинном культивировании на различных целлюлозосодержащих субстратах.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были использованы фильтраты культуральной жидкости шести штаммов *B. subtilis* ²³/₂, *B. subtilis* 5001, *B. subtilis* 13₂, *B. subtilis* 39, *B. subtilis* 51 и *B. licheniformis* ⁶/₂, отобранных в результате скрининга [6]. В каждом случае для определения активности исследуемых ферментов использовали 1 мл фильтрата культуральной жидкости. Культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде при условиях, описанных в работе [6].

Активность целлюлаз определяли, измеряя их активность при использовании в этой среде в качестве единственного источника углерода для синтеза исследуемых ферментов (%): Na-КМЦ (натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы) — 0,5; целлобиозу — 0,2; целлюлозу — 0,5; хлопковую вату — 0,5 и фильтровальную бумагу — 0,5. Хлопковую вату переводили в гидроцеллюлозу путем обработки 10 н HCl при комнатной температуре в течение одних суток и тщательного отмывания до нейтрального pH промывных вод [5]. Фильтровальную бумагу тщательно измельчали и размалывали на кофемолке.

Для определения активности целлюлаз группы C_x был применен метод определения эндоглюканазной активности по увеличению редуцирующей способности реакционной смеси с 0,5%-ной Na-КМЦ [7]. Активность C₁- и C₂-ферментов измеряли по количеству редуцирующих сахаров, образовавшихся из хлопковой ваты и фильтровальной бумаги, соответственно. Содержание сахара определяли колориметрическим методом по реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой [9]. Целлобиазную активность определяли по возрастанию редуцирующей способности реакционной смеси с 0,2%-ным раствором целлобиозы в 1/15 М фосфатном буфере (pH 5,5).



Статистическую обработку трех экспериментальных серий исследований проводили с помощью стандартных методов с определением t-критерия Стьюдента на 5% уровне значимости.

Результаты и их обсуждение

Эффективность гидролиза высокоструктурной и тяжелоразрушаемой целлюлозы микроорганизмами зависит от сбалансированности состава продуцируемого ими целлюлазного комплекса, а также от уровня активности его компонентов, то есть от качественного и количественного его состава. Это основные требования, без которых невозможен глубокий гидролиз целлюлозы [3, 7, 8, 10].

Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что внеклеточные бактериальные целлюлазы изучаемых штаммов бацилл проявляли активность не только по отношению к растворимым производным целлюлозы типа КМЦ, но и гидролизовали нерастворимую (хлопковую вату, фильтровальную бумагу), а также кристаллическую целлюлозу.

Активность ферментов целлюлазного комплекса, продуцируемого бактериями рода *Bacillus* на различных целлюлозосодержащих субстратах, представлена в табл. 1. По качественному компонентному составу целлюлазные комплексы разных штаммов бактерий практически не различались.

Таблица 1
Активность ферментов целлюлазного комплекса бактерий рода *Bacillus* на различных субстратах

Table 1
Activity of enzymes of cellulases complex produced by bacteria of genus *Bacillus* on various substrat

Штамм	Целлюлазная активность редуцирующих сахаров (мг редуцирующих сахаров на мл реакционной смеси)			
	На - КМЦ	Целлобиоза	Хлопковая вата	Фильтровальная бумага
<i>B. subtilis</i> 39	0,48±0,02	0,60±0,01	0,40±0,02	0,35±0,01
<i>B. subtilis</i> 51	0,44±0,03	0,52±0,02	0,34±0,03	0,35±0,02
<i>B. subtilis</i> 23/2	0,44±0,02	1,16±0,01	0,42±0,02	0,42±0,01
<i>B. subtilis</i> 5001	0,42±0,03	0,94±0,02	0,44±0,02	0,50±0,02
<i>B. subtilis</i> 132	0,46±0,01	1,16±0,01	0,39±0,03	0,48±0,03
<i>B. licheniformis</i> 6/2	0,46±0,01	0,82±0,03	0,36±0,04	0,42±0,04



Исследуемые штаммы гидролизovali КМЦ, хлопковую вату, фильтровальную бумагу с высвобождением в среду глюкозы от $0,34 \pm 0,03$ до $0,50 \pm 0,02$ мг/мл. Однако секретирuемыми на целлюлозе ферментами наиболее интенсивно расщеплялась целлобиоза с высвобождением наибольшего количества глюкозы — от $0,52 \pm 0,02$ до $1,16 \pm 0,01$ мг/мл. Наибольшей активностью среди всех исследуемых отличались штаммы *B. subtilis* 23/2, 5001, 132.

По результатам исследований способности синтеза и выделения в среду целлюлолитических ферментов, можно заключить, что целлюлазный комплекс каждого из изучаемых штаммов бактерий рода *Bacillus* представляет собой сложную систему с разным соотношением активностей отдельных компонентов, способных расщеплять глюкопиранозные цепи различных целлюлозных субстратов. Гидролиз целлюлозосодержащих субстратов осуществляется комплексом продуцируемых бациллами целлюлолитических ферментов и можно констатировать, что в их состав в соответствии с классификацией Рииза [12] входят: эндоглюканаза (C_x -фермент, расщепляющий КМЦ), C_1 -фермент (расщепляющий хлопковую вату), C_2 -фермент (расщепляющий фильтровальную бумагу) и целлобиаза, расщепляющая целлобиозу. Эндоглюканаза первой расщепляет связи, удаленные от концов полимерной цепи молекулы, и приводит к существенному уменьшению степени полимеризации целлюлозы и увеличению скорости ее гидролиза. Целлобиаза отщепляет от уже частично гидролизованной эндоглюканазой целлюлозы целлобиозу и образует глюкозу [2, 3, 7]. На рисунке приведена динамика биосинтеза ферментов целлюлазного комплекса штаммом *B. subtilis* 23/2.

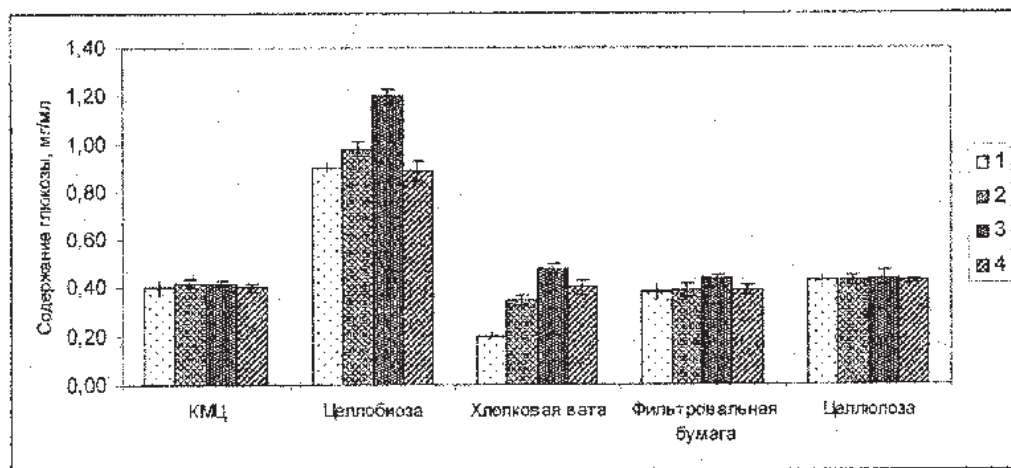


Рис. Динамика биосинтеза целлюлазного комплекса штаммом *B. subtilis* 23/2 в условиях глубинного культивирования на разных субстратах
Обозначения: время культивирования бактерий: 1—24, 2—48, 3—72 и 4—96 час.

Fig. Dynamics of biosynthesis of cellulolytic complex by *B. subtilis* 23/2 strain at deep cultivation on different substrata
Designations: time of cultivation of bacteria: 1—24, 2—48, 3—72 and 4—96 hours.

Для остальных штаммов бацилл получены аналогичные данные. С рисунка видно, что максимум выхода продуктов гидролиза (глюкозы) изучаемыми штаммами наблюдался в основном через трое суток на средах с различными целлюлозосодержащими субстратами (КМЦ, хлопковую вату, фильтровальную бумагу), используемыми в качестве единственного источника углерода и индуктора биосинтеза исследуемых ферментов.

Результаты проведенных исследований также показали, что в количественном отношении ферментный состав продуцируемого бациллами целлюлазного комплекса при культивировании на самом труднорасщепляемом субстрате — целлюлозе, варьирует в широких пределах в зависимости от вида и даже штамма (табл. 2). Соотношение отдельных целюлаз в продуцируемом комплексе у исследуемых штаммов бацилл различно. Так, если у штамма *B. subtilis* 5001 разные типы целлюлаз образуются примерно в равном соотношении, то у *B. subtilis* 39 и *B. licheniformis* ⁶/₂ продуцируется более всего C₂-фермента, у штамма *B. subtilis* 13₂ — C₁-фермента, у *B. subtilis* 51 — C_x-, C₂-ферментов. Для штамма *B. subtilis* ²³/₂ характерно соотношение с наибольшими по величине активностями C₁- и C_x-ферментов и целлобиазы. Вероятно, при совместном применении немаловажное значение имеют не только высокие активности отдельных ферментов, но и их соотношение.

Таблица 2

Соотношение отдельных целлюлаз в ферментативном комплексе бактерий рода *Bacillus*

Table 2

Interrelation of cellulases in enzymatic complex of bacteria of genus *Bacillus*

Штамм	Редуцирующие сахара (мг/мл)				C _x : C ₂ : C ₁ : C ₂
	C _x -фермент	Целлобиаза	C ₁ -фермент	C ₂ -фермент	
<i>B. subtilis</i> 39	0,370±0,015	0,370±0,016	0,400±0,012	0,480±0,012	1 : 1 : 1,1 : 1,3
<i>B. subtilis</i> 51	0,400±0,007	0,300±0,014	0,300±0,015	0,380±0,013	1,3 : 1 : 1 : 1,3
<i>B. subtilis</i> ²³ / ₂	0,370±0,016	0,380±0,015	0,380±0,014	0,320±0,010	1,2 : 1,2 : 1,3 : 1
<i>B. subtilis</i> 5001	0,490±0,014	0,490±0,014	0,490±0,015	0,490±0,012	1 : 1 : 1 : 1
<i>B. subtilis</i> 13 ₂	0,420±0,014	0,400±0,011	0,660±0,012	0,440±0,013	1 : 1 : 1,6 : 1
<i>B. licheniformis</i> ⁶ / ₂	0,490±0,016	0,490±0,012	0,490±0,012	0,620±0,014	1 : 1 : 1 : 1,3

Примечание: за единицу принято наименьшее по абсолютному значению содержание глюкозы, образовавшейся при разложении целлюлозы ферментами каждого штамма отдельно.

The note: for unit is accepted as the least on absolute value the maintenance of the glucose formed at decomposition of cellulose each strain separately.



По имеющимся данным, от соотношения активностей ферментов в целлюлазном комплексе, от их взаимодействия, то есть от наличия так называемого эффекта синергизма зависит эффективность и глубина гидролиза субстратов [2, 7, 10]. Этой теме будут посвящены отдельные исследования.

Таким образом, проведенными исследованиями показано, что изучаемые штаммы бацилл обладают важнейшим свойством — широкой субстратной специфичностью образуемых ими целлюлазных комплексов, состоящих из нескольких целлюлаз разного типа, то есть способностью активно расщеплять как различные производные целлюлозы, так и нативную кристаллическую целлюлозу. Результаты данных исследований компонентного состава и активности целлюлазного комплекса бацилл будут способствовать существенному увеличению эффективности и глубине гидролиза ими целлюлозосодержащих материалов, в частности, высокоструктурной наиболее недоступной для использования части растительных отходов сельского хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анкудимова Н.В., Баразненко В.А., Беккер Е.Г., Окунев О.Н. Целлюлазный комплекс *Chaetomium cellulolyticum*: выделение и свойства основных компонентов // Биохимия. — 1999. — Т. 64, в. 9. — С. 1267—1273.
2. Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів: біосинтез, властивості та структурно- функціональні особливості // Біотехнологія. — 2009. — Т. 2, № 2, — С. 23—41.
3. Клесов А.А. Ферменты целлюлазного комплекса // Проблемы био- конверсии растительного сырья. — М., Наука, 1986, — С. 93—51.
4. Клесов А.А., Черноглазов В.М., Рабинович М.А., Сеницын А.П. Роль адсорбционной способности эндоглюканазы в деградации кристаллической и аморфной целлюлозы // Биоорганич. химия. — 1982. — Т. 8, № 5. — С. 643—651.
5. Маслова Н.Ф., Крамаренко Е.А. Эффективность применения и актуальность создания новых ферментных препаратов на основе микробиологических субстанций для нормализации пищеварения // Фармакология. — 2008. — № 4. — С. 39—5.
6. Осадчая А.И., Сафронова Л.А., Авдеева Л.В., Иляш В.М. Скрининг штаммов с высокой целлюлазной активностью // Микробиологичный журнал. — 2009. — Т. 71, № 5. — С. 41—48.
7. Рабинович М.Л., Мельник М.С., Болобова А.В. Целлюлазы микроорганизмов (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 4. — С. 355—373.
8. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз, их распространенность, множественные формы и механизм действия целлюлаз // В сб. Итоги науки и техники ВИНТИ Биотехнология.— 1988. — Т. 11. — С. 1—224.



9. Рухлядева А.П., Польшгаліна Г.В. Методи визначення активності гідролітичних ферментів. — М.: Легк. і пищ. пром-сть, 1981. — 288 с.

10. Сіницін А.П., Митькевич О.В., Калюжний С.В., Клесов А.А. Изучение синергизма в действии ферментов целлюлазного комплекса // Биотехнология. — 1987. — №. 1. — С. 39—46.

11. Фениксова Р.В. Ферментативное расщепление целлюлозы.— М.; Изд-во «Наука», 1967. — 160 с.

12. Reise E.T., Sin R.Y.H, Levinson H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relation to the mechanism of cellulose hydrolysis // J. Bacteriol. — 1950. — 59 . — P. 485—488.

13. Wood T.M. Properties of cellulosic enzyme systems // Biochem. Soc. Trans. — 1985. — V. 13, № 2 . — P. 407—410.

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

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

ЦЕЛЮЛАЗНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

Реферат

Вивчена здатність до синтезу і продукування целюлаз бактеріями роду *Bacillus* при культивуванні на целюлозі в глибинних умовах. Показано, що ферментативний гідроліз целюлози бацилами здійснюється під дією целюлазного комплексу, що складається з декількох целюлаз різного типу: C_x -фермента, що розщеплює карбоксиметилцелюлозу, C_1 -фермента, що розщеплює бавовняну вату, C_2 -фермента, що розщеплює фільтрувальний папір, і целобіази. Вивчено динаміку біосинтезу різних компонентів целюлазного комплексу у досліджуваних бактерій. Показано, що максимум виходу продуктів гідролізу можна отримати на третю добу культивування на целюлозі.

Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, целюлазний комплекс.



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

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

CELLOLYTIC ACTIVITY OF BACTERIA OF GENUS *BACILLUS*

Summary

There has been studied cellolytic complex of bacteria of genus *Bacillus*, produced by them at cultivation on cellulose in deep conditions. There have been shown that enzymatic hydrolysis of cellulose is carried out under the action cellulytic complexes consisting of several cellulases of different types: C_x-enzyme splitting CMC, C₁-enzym, splitting cotton wool, C₂-enzym, splitting the filtering paper, and cellobioses, capable of hydrolyzing cellobiosas. There has been followed the dynamics of biosynthesis by studied bacteria of cellolytic complex components. There has been shown that the maximum of field of hydrolysis products can be received on the third day of deep cultivation.

Key words: bacteria of genus *Bacillus*, cellolytic complex.



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 (0482) 63 51 61,
e-mail: iblayda@ukr.net

ВИЛУЧЕННЯ ГЕРМАНІЮ З ВІДХОДІВ СВИНЦЕВО- ЦИНКОВОГО ВИРОБНИЦТВА ТІОНОВИМИ БАКТЕРІЯМИ

Приведено дослідження вилуговування германію з відходів свинцево-цинкового виробництва мікробіологічними і хімічними методами. Показана роль природної мікробіоти, присутньої у цій сировині, в процесі вилуговування металів з мінеральної сировини. Встановлено, що використання штамів тіонових бактерій дозволяє вилучати в розчин до 99,0% германію впродовж 1–2 діб незалежно від фазного складу сировини. Підтверджена мікробіологічна природа гідрометалургійних процесів, в яких використовуються неагресивні слабокислі розчини.

Ключові слова: германій, вилуговування, тіонові бактерії.

Мікробне вилуговування визнано привабливою альтернативою традиційним фізичним та хімічним методам вилучення металів завдяки скороченню споживання енергії, транспортних витрат і менш негативному впливу на навколишнє середовище [2, 7, 11]. У сучасних біометалургійних процесах бактеріального вилуговування металів із сульфідних руд використовуються і вважаються найбільш ефективними ацидофільні хемоліто-трофні тіонові бактерії — *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* [6–8].

Технологія вилучення германію з різної мінеральної сировини достатньо відпрацьована і базується в основному на методах гідро- або пірометалургійного розкриття, які протікають в присутності кислот, високих температур і тиску. Ефективність цих процесів безпосередньо залежить від хімічного і фазного складів вихідного продукту в цілому [5, 15]. Традиційно сировинними джерелами германію є природні мінерали, руди, кам'яне вугілля [10, 14]. В останні роки у зв'язку з постійно зростаючими потребами на германій і виснаженням запасів високоякісної природної сировини набувають значення нетрадиційні сировинні джерела рідкісних металів [12, 14]. До них з повним правом відносяться техногенні відходи підприємств металургії та вугільної промисловості. Витяг цінних мікро-

складових з них традиційними хімічними методами ускладнюється багатокомпонентністю, наявністю великої кількості макродомішок і баластних речовин, які потребують витрат дорогих, часто агресивних, екологічно небезпечних реагентів. Тому біовилуговування металів з таких продуктів розглядається як найбільш перспективний, екологічно безпечний і рентабельний метод. Проте в літературі відсутні данні про використання цього методу для вилучення германію з мінеральної та техногенної сировини.

Метою роботи було вивчення та порівняльна оцінка ефективності сучасного бактеріального і традиційного кислотного методів вилуговування германію з відходів свинцево-цинкового виробництва.

Матеріали і методи

Для бактеріального і кислотного вилуговування германію та інших металів використовували відходи свинцево-цинкового виробництва, надані для досліджень ЗАТ «Донмет».

Кількісний аналіз твердих субстратів здійснювали спектральним методом на приладі «Спектрограф СТЕ-1», рентгенограми записували на дифрактометрі УРС-50 ІМ та розшифровували за допомогою довідника [9, 10]. Для вилуговування використовували дистильовану воду (рН 5,6) і сірчаноокислий розчин (рН 1,8).

Вилуговування проводили при температурі $24,0 \pm 0,5$ і $80,0 \pm 0,5$ °С. У всіх варіантах досліду підтримували співвідношення твердої і рідкої фази 1:4, термін вилуговування 4 години. Контролем слугували попередньо автоклавовані мінеральна сировина і реактиви.

Бактеріальне вилуговування германію із досліджуваної сировини здійснювали з використанням трьох штамів тіонових бактерій: типового *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, колекційного *Acidithiobacillus thiooxidans* ВКМ 33, які отримані з Інституту мікробіології РАН та *Acidithiobacillus speciens* Pb-Zn, ізольованого з вихідного германійвмісного продукту. Культивування штамів та дослідження впливу умов на вилуговування металів проводили на середовищі Летена ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 5,0 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; MgSO_4 – 0,5 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,15 г; KCl – 0,05 г; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 0,01 г; дистильована вода – до 1,0 дм^3); рН середовища доводили до значення 2,0 сірчаною кислотою.

Бактеріальне вилуговування проводили в колбах об'ємом 0,5 дм^3 , на 2/3 заповнених середовищем Летена, вмістом твердої фази 1,0% (ваг.), при температурі $30 \pm 0,5$ °С і перемішуванні (150 об/хв) на гойдалці. Посівним матеріалом слугували культури тіонових бактерій в експоненційній фазі росту. Інокулят вносили з розрахунку 10,0% (об.) від кількості середовища.

Вміст металів у розчинах визначали із застосуванням методу спектроскопії атомної абсорбції на приладах ААС-1 і С-115ПК Selmi [13].

Статистичне опрацювання даних здійснювали стандартними методами. Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента.



Результати та їх обговорення

Хімічний склад вихідного свинцево-цинкового субстрату і продуктів його відновлювального високотемпературного обпалу представлено в таблиці 1. Рентгенограми вихідного і оброблених різними методами продукту наведено на рис. 1–3.

На першому етапі досліджень визначено фазний склад сировини, що містить германій як мікродомішку [5]. У результаті досліджень встановлено, що в свинцево-цинковому відході германій, незважаючи на значний вміст розчинних сполук свинцю, цинку і інших металів, на 80,48% пов'язаний із силікатною частиною, яка важко розкривається при обробці хімічними реагентами. На рис. 1 це визначається фазами PbO і PbS [9, 10], фазою їх взаємного проростання PbO·PbS. Встановлено значний вміст кремнезему у вигляді модифікації α -SiO₂, силікатів, оксидів кальцію і цинку.

Таблиця 1

Хімічний склад продуктів переробки свинцево-цинкової сировини і їх розкриття соляною кислотою

Table 1

Chemical composition of the products of processing of lead-zinc raw materials and their dissolving by hydrochloric acid

Найменування продукту	Вміст, %								Вилучення германію при відгоні, %
	Ge	Al	Pb	Si	Fe _{заг}	S	Zn	Ca+Mg	
Свинцево-цинкові відходи	0,32	0,48	28,74	7,72	2,15	13,98	5,22	5,14	19,52
Випалені відходи при 1150,0 °С (40,0% С)	0,09	2,84	10,75	12,41	3,52	5,52	3,32	7,98	20,85
Вторинні возгони (40,0% С)	0,59	0,13	61,38	2,97	1,97	17,20	9,12	0,97	90,78

Не дивлячись на низький вміст германію, на рентгенограмі є видимою фаза GeO₂, сполуки складу PbGeO₃, Pb₃GeO₅, GeO₂-2CaO та силікогерманати. Цим пояснюється вилучення германію з даного типу сировини традиційними кислотними методами лише на 19,52%.

Для збагачення продукту германієм, відокремлення його від основної частини кремнію та інших небажаних домішок, а також переводу до летючих фаз, які легко розкриваються, в технології германію застосовують метод високотемпературного (при 1100 °С) відновлювального обпалу (з додаванням 40% вуглецю) [4, 10, 14, 15]. Цим методом нами отримано вторинні возгони, з яких із застосуванням методу відгонки германію у

вигляді GeCl_4 досягли вилучення металу на 90,78% (табл. 1) за рахунок збільшення розчинності досліджуваного продукту в кислотах у зв'язку зі зміною його фазного складу.

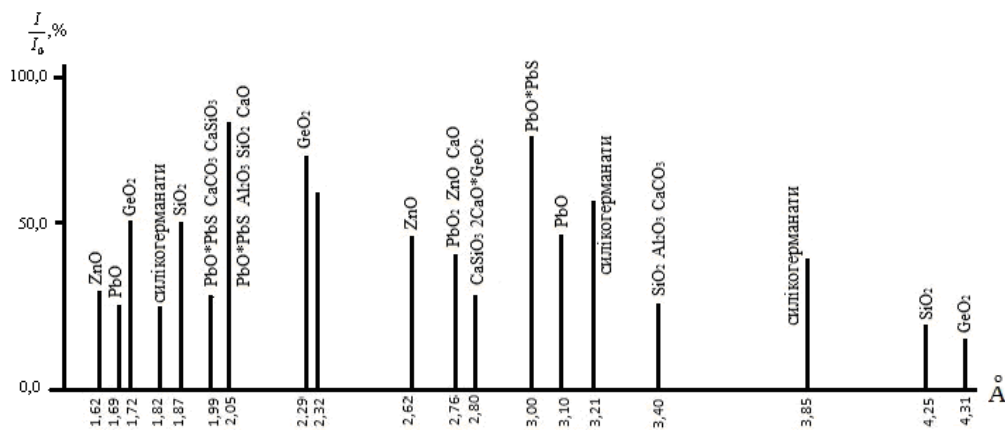


Рис. 1. Рентгенограма відходів свинцево-цинкового виробництва

Fig. 1. X-ray picture of the lead-zinc production wastes

Дійсно, рентгенограма фіксує більш виражену інтенсивність піків, що належать сульфідам і оксидам свинцю і цинку, діоксиду германію модифікації, а також сформованим фазам, які можна віднести до цинкатів, плюмбатів, а також германатів цинку і свинцю (рис. 2).

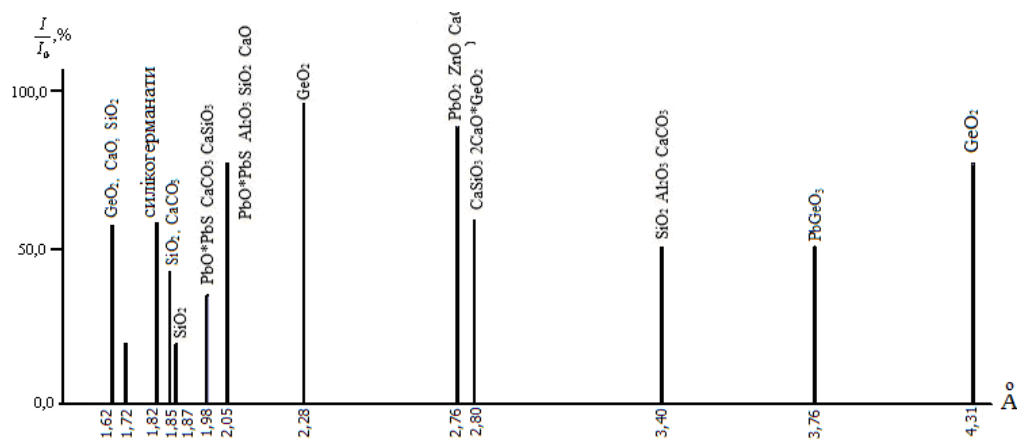


Рис. 2. Рентгенограма вторинних возгонів відходу свинцево-цинкового виробництва (1150 °С, 40% С)

Fig. 2. X-ray picture of the secondary fumes of lead-zinc production waste (1150 °C, 40% C)



Таким чином, переведення германію і інших легких компонентів вихідної сировини до возгонів у результаті високотемпературного відновного обпалення дозволяє сконцентрувати цінний компонент у возгонах у вигляді фаз, які легко розкриваються традиційними кислотними методами, і значно підвищити ступінь вилучення германію незалежно від хімічного і фазного складу вихідної сировини. Основна складність та технологічна проблема — це багатокомпонентність сировини, велика кількість макродомішок, баластних речовин, макроелементів (залізо, кремній, свинець), які супроводжують германій і потребують витрат дорогих реактивів на їх розкриття для доступу до цінних мікроскладових. Не завжди вдається зруйнувати кристалічну решітку і досягти високого ступеню вилучення необхідного металу без попередньої термічної обробки, що також потребує дорогого обладнання — печей, систем уловлювання возгонів і ін.

Таким чином, гідро- або пірометалургійне розкриття вихідного продукту вимагає використання агресивних хімічних реагентів, спеціальних умов і обладнання. Ці процеси ресурсо- і енерговитратні, екологічно небезпечні через використання кислот, лугів і утворення шкідливих возгонів.

З погляду біотехнологічних і мікробіологічних підходів свинцево-цинкові відходи є складною біокосною системою, бідною органічними речовинами. Виходячи із складу цієї мінеральної сировини — присутності значної кількості сульфідів металів, зокрема заліза, — було припущено наявність в ній різних представників ацидофільних сіркоокиснювальних бактерій, у першу чергу тіонових, як мезофільних, так і термофільних [2, 11]. Це припущення покладено до основи вивчення бактеріального вилуговування металів із відходу свинцево-цинкового виробництва.

Результати, які наведені у табл. 2, вказують на те, що за всіх умов досліджень коефіцієнт впливу природної мікробіоти на вилучення металів у розчин (K) більше 1.

Отримані результати свідчать про те, що незалежно від умов проведення процесу вилуговування існує значний вплив мікроорганізмів на ефективність процесу у цілому. Про вплив присутньої мікробіоти вказує збільшення ступеню вилучення металів у розчин, у порівнянні зі стерильними зразками, на 0,46–8,32%. Якщо врахувати достатньо м'які умови проведення процесу розкриття вихідної сировини, то отримані показники є достатньо суттєвими.

Збільшення коефіцієнту впливу (до $K=1,74$) на показники процесів при підкисленні вилуговуючого розчину свідчить на користь присутності і активізації представників ацидофільних мікроорганізмів. При збільшенні температури процесу також зростає величина K , що згідно даним літератури, пов'язано з діяльністю термофільних мікроорганізмів [1, 3].



Таблиця 2

Вплив природної мікробіоти сульфідного відходу свинцево-цинкового виробництва на процес вилугування металів

Table 2

Influence of own microbiota which are present in sulfide lead-zinc production waste on the metals leaching process

Умови біовилугування	рН розчину після вилугування		Коефіцієнт впливу мікроорганізмів на вилучення металів, К $K = E_{n/a}/E_a$			
	рН _{n/a}	рН _a	Ge	Fe	Pb	Zn
H ₂ O (рН 5,6) t = 24±0,5 °C	5,2	4,8	1,22	1,12	1,43	1,29
H ₂ O(рН 5,6) t = 80±0,5 °C	3,5	2,3	1,29	1,27	1,51	1,34
H ₂ SO ₄ (рН 1,8) t = 80±0,5 °C	6,7	3,6	1,43	1,74	1,63	1,74

Примітка: $E_{n/a}$ (рН_{n/a}) і E_a (рН_a) – відповідно ступінь вилучення металу (рН розчину) з вихідного продукту неавтоклаваного (n/a) і після автоклаування (a), %

Наявним прикладом прояву активності мікробіоти сировини є зміна рН розчинів після проведення експериментів. При вилугуванні металів із досліджуваного продукту водою зміщення рН спостерігається у більш кислу область порівняно з вихідним середовищем. Зменшення показника рН при високій температурі більш виражене. Це пов'язано із присутністю у сировині слабо кислих оксидів та інших сполук заліза, цинку, свинцю і германію, які при розчиненні у воді створюють у результаті гідролізу слабкі мета- і ортокислоти типу H₂GeO₃, причому рівновага процесу GeO₂ + H₂O ↔ HGeO₃⁻ + H⁺ при нагріванні зміщується у бік створення цих кислот [14]. Однак у нестерильних продуктах у присутності мікробіоти це зміщення менш виражене. За умов, що активізують діяльність ацидофільних мезофільних тіонових бактерій (рН 1,8 при t = 80±0,5 °C), реєстрували різке зміщення значень рН у нейтральну область (табл. 2).

Результати біовилугування металів із відходів свинцево-цинкового виробництва окремими штамами тіонових бактерій наведено у табл. 3. Згідно отриманим результатам, усі штами, які використовували в процесі бактеріального вилугування, сприяли переходу германію, кальцію, заліза, цинку і свинцю з твердої фази до розчину протягом 1–2 діб; при цьому кінетика вилучення металів була різною.

За присутності досліджуваних штамів тіонових бактерій реєстрували практично повне (на 99,82±0,2%) вилучення германію протягом перших



24 годин. Ці спостереження можуть бути використані при вирішенні питання про відділення цінних компонентів, наприклад, германію, від супутніх макродомішок ще на стадії розкриття при необхідності переробки мінеральної сировини, з якої не вдається вилучити метали традиційними хімічними методами.

Таблиця 3

Ступінь вилучення металів тіоновими бактеріями з відходів свинцево-цинкового виробництва, %

Table 3

Extraction of the metals by thio bacteria from lead-zinc production wastes, %

Метал	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	<i>A. thiooxidans</i> ВКМ 33	<i>A. species</i> Pb-Zn
Ge*	99,82	99,84	99,84
Ca*	99,77	99,80	99,85
Fe*	67,46	63,56	87,20
Zn**	62,35	60,23	72,40
Pb**	18,60	15,03	11,50

Примітка: * — перша доба експерименту

** — друга доба експерименту

Рентгенограма залишку (кеку) після мікробіологічної обробки відходу свинцево-цинкового виробництва характеризується значним розширенням ліній дифракції, що свідчить про появу аморфних фаз і руйнування кристалічної решітки сполук субстрату (рис. 3). Для цього залишку характерна менш виражена інтенсивність піків, що, з одного боку значно ускладнює ідентифікацію, з іншого — свідчить про здатність мікроорганізмів руйнувати достатньо стійкі кристалічні структури з високими показниками переведення металів до розчину.

Порівняльний аналіз результатів хімічного і мікробіологічного вилучування германію з відходів свинцево-цинкового виробництва свідчить не тільки про високу ефективність цього процесу у присутності бактерій, але й про руйнування кристалічної решітки сполук вихідної сировини, що є наявністю глибоких змін структури цієї мінеральної сировини.

Найбільш важливим отриманим результатом проведених досліджень є той факт, що практично повне вилучення германію в розчин при використанні тіонових бактерій відбувається в першу добу процесу незалежно від фазового складу вихідного субстрату і штаму. Проведені дослідження доповнюють і узгоджуються з нечисленними літературними даними про можливість використання біотехнологічних процесів в гірській і металургійній промисловостях, а їхня незаперечна перевага в порівнянні з

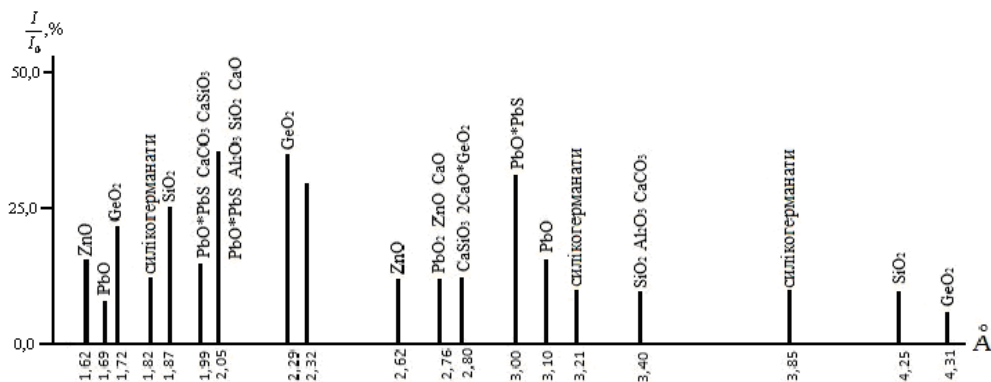


Рис. 3. Рентгенограма залишку (кеку) після бактеріального вилугування відходів свинцево-цинкового виробництва

Fig. 3. X-ray picture of the residue (kek) after bacterial leaching of lead-zinc production waste

традиційними хімічними методами очевидна завдяки екологічній чистоті, ефективності, сприятливим економічним показникам. Ці результати мають практичне значення і можуть бути покладені до основи розробки уніфікованого біотехнологічного методу переробки техногенних відходів з метою їх знешкодження і детоксикації з одночасним отриманням концентратів цінних металів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bogdanova T.I., Tsaplina I.A., Kondrat'eva T.F. *Sulfobacillus thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant, chemolithotrophic bacterium // International journal of systematic and evolutionary microbiology. — 2000. — 56. — P. 1039–1042.
2. Briely J.A. Expanding role microbiology in metallurgical processes // Mining Engineering. — 2000. — V. 52, № 11. — P. 49–53.
3. Zeng Wei-min, Wu Chang-bin, Zhang Ru-bing, Hu Pei-lei, Qiu Guan-zhou, Gu Guo-hua, Zhou Hong-bo. Isolation and identification of moderately thermophilic acidophilic iron-oxidizing bacterium and its bioleaching characterization // Trans. Nonferrous Met. Soc. China. — 2009. — V. 19. — P. 222–227.
4. Андреев В.М., Кузнецов А.С., Петров Г.И., Шигина Л.Н. Производство германия. - М.: Металлургия, 1969. — 96 с.
5. Блайда І.А., Слюсаренко Л.І., Шанина Т.П. Методи дослідження фазового складу германійсодержачого сиров'язь // Український хімічний журнал. — 2006. — № 4. — С. 84–87.
6. Заварзин Г.А. Литотрофные микроорганизмы. — М.: Наука. — 1972. — 322 с.
7. Каравайко Г.И. Практическое руководство по биоготехнологии металлов. — М., АН СССР, 1989. — 371 с.



8. *Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф.* Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // *Микробиология.* — 2006. — 75, № 5. — С. 593–629.
9. *Миркин Л.И.* Справочник по рентгеноструктурному анализу поликристаллов. — М.: Госиздат ФМЛ, 1961. — 864 с.
10. *Тананаев И.В., Шпирт М.Я.* Химия германия. — М.: Химия, 1967. — 452 с.
11. *Толстов Е.А., Латышев В.Е., Лильбок Л.А.* Возможности применение биоготехнологии при выщелачивании бедных и упорных руд // *Горный журнал.* — 2003. — № 8. — С. 63–65.
12. *Усова Т.Ю., Линдер Т.П.* Конъюнктура мирового рынка редких металлов. — В кн. «Рідкісні метали України — погляд у майбутнє». — Київ. — 2001. — С. 102–103.
13. *Хавезов И., Цалев Д.* Атомно-абсорбционный анализ. — Л.: Химия, 1983. — 144 с.
14. *Химия и технология редких и рассеянных элементов* /Под ред. К.А. Большакова — М.: Высшая школа, 1976. — Т. 3. — 368 с.
15. *Шпирт М.Я.* Физико-химические основы переработки германиевого сырья. — М.: Металлургия, 1977. — 264 с.

**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 (0482) 63 51 63,
e-mail: iblayda@ukr.net

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ГЕРМАНИЯ ИЗ ОТХОДОВ СВИНЦОВО-ЦИНКОВОГО ПРОИЗВОДСТВА ТИОНОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Реферат

Приведены исследования по извлечению германия из отходов свинцово-цинкового производства микробиологическими и химическими методами. Изучена роль микроорганизмов, присутствующих в исходном сырье, содержащем германий, в процессах выщелачивания металлов из него. Показана микробиологическая природа гидрометаллургических процессов, в которых используются неагрессивные слабокислые растворы. Установлено, что использование тионовых бактерий позволяет извлекать в раствор до 99,0% германия в течение 1–2 суток.

К л ю ч е в ы е с л о в а : германий, выщелачивание, тионовые бактерии.



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

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 63 51 63, e-mail: iblayda@ukr.net

EXTRACTION OF GERMANIUM FROM *LEAD-ZINC* PRODUCTION WASTE BY THIOBACTERIA

Summary

The comparative results on germanium extraction from lead-zinc production waste by microbial leaching, as well as by traditional chemical methods have been showed. The role of the microorganisms present in the original germanium raw material in the process of so-called chemical leaching of metals from it was studied. The bacterial-chemical nature of hydrometallurgical processes in which as opening solutions were used nonaggressive weakly acidic solutions is showed. It is established that using of thiobacteria allows to extract in the solution 99.0% of germanium within 1–2 days.

Key words: germanium, leaching, thiobacteria.



І.М. Малиновська¹, Н.А. Зінов'єва²

¹Національний науковий центр «Інститут землеробства НААН»,
вул. Машинобудівників, 2Б, с.м.т. Чабани, Київська обл., 08162, Україна,
тел.: +38 (045) 526 13 28, e-mail: h.o.p.e@mail.ru

²Національний авіаційний університет

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ В РИЗОСФЕРІ РОСЛИН У ЗАБРУДНЕНОМУ НАФТОПРОДУКТАМИ ҐРУНТІ

Досліджено мікробіологічні процеси у ризосфері рослин різних сільськогосподарських культур в умовах забруднення ґрунту 1% авіаційного палива. Встановлено, що у ризосфері рослин всіх досліджених культур в результаті забруднення нафтопродуктами уповільнюється мінералізація гумусу, максимально — в ризосфері кукурудзи — в 3 рази. Освоєння органічної речовини уповільнюється в ризосфері пшениці і соняшника, а у інших культур — інтенсифікується. Процеси опідзолення і мінералізації сполук азоту уповільнюються у ризосфері всіх досліджених культур, за виключенням кукурудзи, де спостерігається інтенсифікація цих процесів.

Ключові слова: мікробіоценоз, еколого-трофічні групи, мінералізація, гумус, фітотоксичність, сільськогосподарські культури, ризосфера, нафтопродукти.

Відомо, що вплив нафтового забруднення на рослинні організми відбувається двома шляхами: безпосередньо — внаслідок проникнення компонентів нафтопродуктів через кореневу систему або продихи листків і включення їх до метаболізму, та опосередковано — через зміни фізико-хімічного складу ґрунту та порушення його біотичних властивостей [1]. Видовий склад стійких до нафтового забруднення рослин і різні стадії заростання забруднених ділянок суттєво впливають на розкладання нафтопродуктів у ґрунті [2]. Зокрема, довгокореневищні види відзначаються найбільшою стійкістю до несприятливих умов нафтозабруднених екотопів. За низьких рівнів забруднення (48 г/кг) рослини фізіологічно адаптуються, включають внутрішні механізми захисту і беруть активну участь у деградації нафтопродуктів у ґрунті.

Для кожного виду рослин є характерним свій склад і функціональні властивості мікробного ценозу ризосфери. Кореневі виділення рослин — це головний фактор, який стимулює розвиток мікроорганізмів у прикореневій зоні, визначаючи видовий склад ризосферної мікробіоти [3]. В складній системі ризосферного ґрунту розкладання нафтопродуктів відбувається, з одного боку, за рахунок життєдіяльності рослин, з іншого — мікроорганізмів.

Мета роботи — дослідити вплив нафтового забруднення на перебіг мікробіологічних процесів у ризосфері рослин різних сільськогосподарських культур.



Матеріали і методи

Дослідження були проведені з використанням темно-сірого опідзоленого ґрунту варіанту інтенсивного агрозему стаціонарного досліду лабораторії інтенсивних технологій зернових колосових культур і кукурудзи ННЦ «Інститут землеробства НААН» (дослідне господарство “Чабани”, Києво-Святошинський район Київської області): польова сівозмінна з насиченістю мінеральними добривами $N_{96}P_{108}K_{112,5}$ на тлі заорювання побічної продукції рослинництва. У 0–20 см шарі ґрунту містилося: гумусу — 1,75%, лужногідролізованого азоту — 6,86 мг, нітратного азоту — 6,46, амонійного азоту — 0,20, рухомого фосфору 60,0 та обмінного калію 25,4 мг на 100 г сухого ґрунту, ступінь рухомості фосфору — 0,66 мг $P_2O_5/100$ г ґрунту, $pH_{(KCl)}$ — 4,9.

Ґрунт відбирали восени і перед проведенням досліду відновлювали його біологічну активність шляхом зволоження та термостатування за температури 25 °С протягом 21 доби. Насіння висівалося у судини одночасно і на момент досліджень рослини знаходилися у фазі: просо, пшениця — кущіння, соняшник, кукурудза у фазі 3–4-х листків, люпин, кормові боби — у фазі другої пари листків, горох — інтенсивного росту. Нафтопродукти (авіаційне паливо марки ТС–1) вносили в концентрації 1% у вигляді водної емульсії за добу до проведення мікробіологічних досліджень.

Чисельність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп оцінювали методом висіву ґрунтової суспензії на відповідні поживні середовища [4]. Показник інтенсивності процесів мінералізації сполук азоту розраховували за Є.Н. Мішустиним і Е.В. Руновим [5], індекс педотрофності — за Д.І. Нікітіним та В.С. Нікітіною [6], активність мінералізації гумусу — за І.С. Демкіною та Б.Н. Золотарьовою [7]. Кількість колоній підраховували впродовж 21 доби в залежності від швидкості росту і фізіологічних особливостей мікроорганізмів певної еколого—трофічної групи. Вірогідність формування бактеріальних колоній (ВФК) визначали за методом S. Ishikuri and T. Hattori, який описано П.А. Кожевіним та ін. [8]. Фітотоксичні властивості ґрунту визначали з використанням рослинних біотестів (пшениця озима) за Н.А. Красильниковим [9].

Результати та їх обговорення

Раніше у модельних дослідженнях із злаковою сумішшю було показано, що через добу після внесення нафтопродуктів у ризосферному ґрунті збільшується чисельність мікроорганізмів усіх досліджених груп, за виключенням азотобактера [10, 11]. Вивчення мікробіологічних процесів у ризосфері різних сільськогосподарських культур показало, що чисельність та фізіолого-біохімічна активність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп суттєво залежить від виду сільськогосподарської культури. Так, у ризосфері проса і кукурудзи чисельність амоніфікаторів в результаті забруднення ґрунту зменшується на 55,3 і 94,0%, відповідно (табл. 1). Для інших культур спостерігається загальна закономірність: чисельність амоніфікаторів у забрудненому ґрунті збільшується у 1,73–6,47 рази при зростанні кількості цих мікроорганізмів у контролі у 3,23 разу. Максимально чисельність амоніфікаторів збільшується внаслідок забруднення ґрунту ризосфери зернобобової культури — люпину. Люпин є також єдиною культурою, у якій фізіолого-біохімічна активність амоніфікаторів зростає у забрудненому ґрунті у 2,12 разу, у всіх інших досліджених культур вона зменшується у 1,35–2,62



Таблиця 1
 Чисельність мікроорганізмів у ризосферному ґрунті сільськогосподарських культур через добу після внесення нафтопродуктів, млн. КУО*/ г абсолютно сухоґо ґрунту

Table 1
 The number of microorganisms in the soil of rhizosphere of crops in a day after the introduction of petroleum products, million CFU**/g of absolutely dry soil

Варіант	Амоніфікатори	Імобілізатори мінерального азоту	Олігонітрофіли	Азотобактер, % оборотання ґрунчочок ґрунту	Денітрифікатори	Нітрифікатори	Педрофи	Целюлозоруйні	Полисахарид-синтезувальні	Автохтонні	Стрептоміцети	Мікроміцети	Кт	Мобілізатори мінеральних фосфатів
Просо	407,8	174,6	90,7	100,0	192,4	4,67	79,0	190,1	23,8	34,4	6,41	0,18	1,47	8,71
Просо + НП***	262,6	80,6	44,7	100,0	193,5	2,86	70,0	92,1	2,30	21,4	14,3	0,25	1,37	24,2
Пшениця	259,0	119,7	58,0	100,0	187,5	8,93	112,1	97,3	6,70	46,6	25,5	0,31	1,31	10,7
Пшениця +НП	447,2	188,1	49,8	100,0	193,6	3,60	71,2	97,3	3,23	23,4	16,6	0,32	1,43	28,1
Соняшник	494,9	268,2	48,4	92,0	152,8	6,11	153,6	166,3	23,7	28,1	5,46	0,15	2,55	15,3
Соняшник + НП	1101,6	193,6	77,4	73,3	160,1	6,10	268,3	229,5	40,0	44,1	3,05	0,25	1,99	15,0
Кукурудза	408,2	135,6	50,1	100,0	161,8	6,74	96,3	105,9	16,2	30,2	11,9	0,32	0,66	10,4
Кукурудза + НП	210,4	139,3	104,1	100,0	152,3	2,58	180,6	115,3	25,4	18,7	3,63	0,48	1,08	11,4
Люпин	212,4	104,1	93,7	96,7	174,9	3,33	156,6	134,5	9,16	28,9	24,6	0,43	0,45	31,2
Люпин + НП	1372,4	561,1	184,5	94,7	175,7	3,56	494,6	305,4	71,5	73,1	22,2	0,14	Не визн.	66,9
Контроль: ґрунт	132,1	65,3	38,1	46,7	1,70	1,80	67,2	36,2	0,38	38,1	17,4	0,20	Не визн.	3,78
Контроль: ґрунт +НП	426,0	147,2	48,0	78,0	173,7	5,33	116,6	100,5	4,55	20,7	36,4	0,26	0,41	19,4
НР05	15,3	12,1	5,16	7,82	4,45	0,56	5,68	5,00	1,02	4,97	1,99	0,09		0,94

Примітка: КУО* – колонієутворювальна одиниця, CFU** – colony forming unit, НП** – 1% нафтопродуктів

рази (табл. 2). Менш активними амоніфікатори стають не тільки у ризосферному ґрунті, а й у ґрунті без рослин — на 62,0%.

У ризосфері проса в результаті забруднення нафтопродуктами зменшується чисельність мікроорганізмів більшості досліджених груп: іммобілізаторів мінерального азоту — у 2,17 разу, олігонітрофілів — 2,03, нітрифікувальних — 1,63, целюлозоруйнівних — 2,06, полісахаридсинтезувальних — 10,3, автохтонних — у 1,6 разу (табл. 1). Збільшується чисельність КУО тільки міцеліальних форм і мобілізаторів мінеральних фосфатів. Ризосфера пшениці в умовах забруднення ґрунту нафтопродуктами характеризується зменшенням чисельності олігонітрофілів, нітрифікаторів, педотрофів, автохтонних мікроорганізмів і стрептоміцетів. В ризосфері люпину при забрудненні ґрунту збільшується чисельність мікроорганізмів усіх досліджених еколого-трофічних і функціональних груп, за виключенням мікроміцетів. Отже, закономірності встановлені нами при вивченні мікробного угруповання кореневої зони злакової суміші [10,11] не є загальними і перебіг мікробіологічних процесів у ризосфері рослин суттєво залежить від їхньої видової приналежності і особливостей складу корневих виділень.

Чисельність денітрифікаторів максимально збільшується у ґрунті без рослин — у 102,2 разу (табл. 1). Причиною стрімкого росту кількості денітрифікаторів може бути створення частково анаеробних умов при обволіканні часточок ґрунту гідрофобними молекулами нафтопродуктів. В ризосферному ж ґрунті спостерігається лише тенденція до збільшення кількості денітрифікаторів, можливо, через те, що внаслідок невисокого рівня забруднення нафтопродуктами (1%) рослини не гинуть і продовжують постачати кисень у ґрунт.

Нітрифікатори відчують токсичну дію нафтопродуктів у ризосфері рослин всіх досліджених культур, що співпадає з отриманими раніше даними [10]. Це проявляється як у зменшенні чисельності нітрифікаторів, так і їхньої фізіолого-біохімічної активності (табл. 1, 2). Можливою причиною цьому може бути створення нафтопродуктами в ґрунті анаеробних умов, а нітрифікатори відносяться до групи облігатних аеробів і відчують нестачу кисню. Причиною зниження чисельності та фізіолого-біохімічної активності нітрифікаторів може бути також їхня висока чутливість до водорозчинних органічних речовин, концентрація яких суттєво підвищується у результаті мікробної деградації нафтопродуктів.

Вивчення закономірностей зміни чисельності полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів в забруднених ґрунтах є дуже важливим, тому що полісахариди утворюють з бактеріальними білками сурфуктантні комплекси, які емульгують гідрофобні молекули нафти і роблять їх більш доступними для деградації [12]. Раніше на прикладі сірого лісового ґрунту багаторічного перелогу було показано [10], що внесення 5% нафтопродуктів протягом доби призводить до зниження чисельності полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів як в ґрунті без рослин, так і в ризосферному ґрунті злакової травосуміші в 1,7–3,1 рази. Протягом наступного інкубування забрудненого ґрунту чисельність полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів росла і через 23 доби перевищила показники незабрудненого ґрунту в 9,0–34,3 рази. В представлених дослідженнях внесення нафтопродуктів призводить до збільшення чисельності полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів вже через добу у ризосфері соняшника — в 1,69 разу, кукурудзи — 1,57, люпину — у 7,81 разу (табл. 1). Чисельність полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів зменшується тільки у ризосфері проса і пшениці. Отже, перебіг мікробіологічних процесів у ризосферному ґрунті, зокрема, деградація



Таблиця 2
 Вірогідність формування колоній мікроорганізмів (λ_1 , год⁻¹ · 10⁻²) у ризосферному ґрунті сільськогосподарських культур через добу після внесення нафтопродуктів

Table 2
 The probability of forming microorganisms colonies (λ_1 , h⁻¹ · 10⁻²) in soil of rhizosphere of crops in a day after the introduction of petroleum products

Варіант	Амоніфікатори	Імобілізатори мінерального азоту	Олігонітрофіли	Нітрифікатори	Денітрифікатори	Педрофи	Автохтонні	Целюлозо-руйнівні бактерії	Мікроміцети	Мобілізатори мінеральних фосфатів
Просо	4,17	1,44	0,90	1,31	0,47	2,13	4,73	3,09	2,89	3,35
Просо + НП*	1,59	1,49	2,78	1,23	6,42	3,87	4,97	5,08	1,93	3,33
Пшениця	3,82	1,79	1,91	1,20	1,62	3,11	4,52	6,65	1,57	2,77
Пшениця +НП	2,84	2,33	1,45	0,97	0,47	3,73	3,67	5,37	1,26	5,22
Соняшник	5,60	2,55	2,07	1,35	0,29	2,14	4,38	4,65	2,79	3,32
Соняшник + НП	3,64	3,94	2,47	0,70	1,62	4,04	3,87	4,13	3,66	5,47
Кукурудза	5,78	1,47	2,02	1,65	0,04	2,98	4,17	4,35	2,03	5,33
Кукурудза + НП	2,66	1,97	2,18	1,85	1,62	0,94	4,37	2,38	2,50	2,65
Люпин	3,59	1,60	1,44	1,60	1,62	2,69	5,44	4,51	2,11	3,21
Люпин + НП	7,62	1,30	1,09	0,26	1,62	5,84	2,05	5,10	4,34	5,11
Контроль: ґрунт	4,58	3,02	2,72	0,78	0,01	4,83	3,67	1,62	2,02	1,78
Контроль: ґрунт +НП	2,83	0,63	2,62	1,83	1,62	2,59	4,41	4,96	2,00	4,71

Примітка: НП* – 1% нафтопродуктів

Table 3
Indicators of intensity of mineralization processes and phytotoxic properties of soil crops in a day after the introduction of petroleium products

Варіант	Індекс педогрофності	Коефіцієнт опідзоленості	Коефіцієнт мінералізації азоту	Активність мінералізаційі гумуса, %	Маса 100 рослин пшениці озимої, г		
					стебло	коріння	
Просо	0,19	0,22	0,43	43,5	7,73	4,98	12,7
Просо + НП*	0,27	0,17	0,31	30,5	4,86	3,12	7,98
Пшениця	0,43	0,22	0,46	41,6	7,52	4,88	12,4
Пшениця +НП	0,16	0,11	0,42	32,9	3,74	2,29	6,03
Соняшник	0,31	0,10	0,54	18,3	6,40	4,00	10,4
Соняшник + НП	0,24	0,07	0,18	16,4	2,75	1,94	4,69
Кукурудза	0,24	0,12	0,33	31,4	5,80	3,10	8,90
Кукурудза + НП	0,86	0,49	0,66	10,3	2,69	1,58	4,27
Люпин	0,74	0,44	0,49	18,5	7,22	5,36	12,6
Люпин + НП	0,36	0,13	0,41	14,8	4,67	2,81	7,48
Контроль: ґрунт	0,51	0,29	0,49	56,7	7,28	5,30	12,6
Контроль: ґрунт +НП	0,27	0,11	0,35	17,7	3,19	2,10	5,29
НП05					0,50	0,12	0,42

Примітка: НП* — 1% нафтопродуктів

нафтопродуктів за участю полісахаридсинтезувальних бактерій залежить від виду сільськогосподарської культури.

Важливим з точки зору оцінювання перебігу мікробіологічних процесів у забрудненому ґрунті є факт активізації розчинення мінеральних фосфатів в ризосфері всіх досліджених культур (табл. 1). Отримані дані співпадають з результатами модельних дослідів з вирощуванням злакової травосуміші [10]. Поясненням цьому може бути той факт, що у нафтозабруднених ґрунтах знижується концентрація рухомого фосфору [13].

Раніше було показано, що за внесення 1% нафтопродуктів мікробіологічні процеси у ґрунті уповільнюються: мінералізація азотовмісних сполук, загальної органічної речовини і гумусу [10,11]. Ця закономірність підтверджена на прикладі ґрунту без рослин (контроль), де за внесення нафтопродуктів індекс педотрофності зменшується у 1,89 разу, коефіцієнт опідзоленості — 2,64, коефіцієнт мінералізації азоту — 1,4, активність мінералізації гумусу — в 3,2 разу (табл. 3). У ризосфері всіх досліджених сільськогосподарських культур в результаті забруднення уповільнюється мінералізація гумусу, максимально — в ризосфері кукурудзи — в 3,05 разу. Освоєння органічної речовини уповільнюється в ризосфері пшениці і соняшника, а у інших культур — інтенсифікується. Процеси опідзолення і мінералізації сполук азоту уповільнюються у ризосфері всіх досліджених культур, за виключенням кукурудзи, де спостерігається інтенсифікація цих процесів.

Внесення нафтопродуктів сприяє суттєвому збільшенню фітотоксичності ґрунту, у ризосфері проса вона зростає в 1,59 разу, у ризосфері пшениці — 2,06, соняшнику — 2,22, кукурудзи — 2,08, люпину — 1,68, у ґрунті без рослин — у 2,38 разу (табл. 3). Отже, максимально знижують фітотоксичність забрудненого ґрунту кореневі виділення проса і люпину. Можливо також, що рослини (особливо бобові) знижують токсичні властивості нафтопродуктів, поглинаючи їхні компоненти.

Оцінка фітотоксичності ризосферного ґрунту за відсутності нафтового забруднення показала, що найбільш токсичними є кореневі екsudати кукурудзи і соняшнику, токсичність ризосферного ґрунту яких перевищує контрольний показник на 41,6 і 21,2%, відповідно. Токсичність ризосферного ґрунту проса, пшениці і люпину практично не відрізняється від контролю, можливо тому, що у першу третину вегетаційного періоду синтез токсичних речовин у цих культур відбувається неактивно.

Необхідно зауважити, що вище наведені закономірності стосуються лише первинної реакції мікробного угруповання на забруднення ґрунту нафтопродуктами. Метою подальших досліджень повинно стати вивчення перебігу мікробіологічних процесів у динаміці деградації нафтового забруднення і динаміці росту рослин впродовж вегетаційного періоду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Джюра Н., Цвілинюк О., Терек О. Вплив нафтового забруднення ґрунту на морфофізіологічні особливості рослин // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. — 2005. — Вип. 40. — С. 51–58.
2. Цайтлер М.Й. Відновлення рослинного покриву і зміни структури ценопопуляцій трав'яних рослин на нафтозабруднених територіях Бориславського



- нафтового родовища. Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.16. — Дніпропетровськ, 2001. — 16 с.
3. Головка Э.А. Микробиологические аспекты агрофитоценологии // Круговорот аллелопатически активных веществ в биогеоценозах. — К.: Наукова думка, 1992. — С. 9—21.
 4. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. — М.: Дрофа, 2004. — 256 с.
 5. Мишустин Е.Н., Рунов Е.В. Успехи разработки принципов микробиологического диагностирования состояния почв // Успехи современной биологии. — М.: АН СССР, 1957. — Т. 44. — С. 256—267.
 6. Никитин Д.И., Никитина В.С. Процессы самоочищения окружающей среды и паразиты растений. — М.: Наука. — 1978. — 205 с.
 7. Демкина Т.С., Золотарева Б.Н. Микробиологические процессы в почвах при различных уровнях интенсификации земледелия // Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур. — Вильнюс. — 1986. — С. 101—103.
 8. Кожевин П.А., Кожевина Л.С., Болотина И.Н. Определение состояния бактерий в почве // Доклады АН СССР. — 1987. — Т. 297., № 5. — С. 183—214.
 9. Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов / Под ред. Н.А. Красильникова. — М.: МГУ, 1966. — 162 с.
 10. Малиновська І.М., Зінов'єва Н.А. Вплив забруднення сірого лісового ґрунту нафтопродуктами на його фітотоксичні властивості та стан мікробіоценозу // Збірник наукових праць Інституту землеробства. — К.: Ексмо, 2010. — Вип.1—2. — С. 61—69.
 11. Малиновська І.М., Зінов'єва Н.А. Спрямованість та інтенсивність мікробіологічних процесів у забрудненому нафтопродуктами темно-сірому опідзоленому ґрунті // Вісник Полтавської державної аграрної академії. — 2010. — № 4. — С. 17—23.
 12. Rosenberg M., Ron E.Z. High- and low molecular mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — 52, N 2. — P. 154—162.
 13. Хазиев Ф.Х., Тишкина Е.И., Киреева Н.А. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты агроэкосистемы // Агрехимия. — 1988. — № 2. — 89 с.

І.М. Малиновская¹, Н.А. Зиновьева²

¹Национальный научный центр «Институт земледелия НААН»,
ул. Машиностроителей, 2Б, п.г.т. Чабаны, Киевская обл., Украина,
тел.: +38 (045) 526 13 28, e-mail: h.o.p.e@mail.ru

²Национальный авиационный университет

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В РИЗОСФЕРЕ РАСТЕНИЙ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЕПРОДУКТАМИ ПОЧВЕ

Реферат

Исследованы микробиологические процессы в ризосфере растений различных сельскохозяйственных культур в условиях загрязнения почвы 1% авиационного



керосина. Установлено, що в ризосфері рослин всіх досліджуваних культур в результаті забруднення нафтопродуктами замедляється мінералізація гумуса, максимально — в ризосфері кукурузи — в 3 рази. Освоєння загального органічного речовини ґрунту замедляється в ризосфері пшениці і підсонячника, у решти культур — інтенсифікується. Процеси оподзаливання і мінералізації з'єдинень азоту замедляються в ризосфері всіх досліджуваних сільськогосподарських культур, за винятком кукурузи, у якій спостерігається інтенсифікація цих процесів.

Ключевые слова: мікробіоценоз, еколого-трофічні групи, мінералізація, гумус, фітотоксичність, сільськогосподарські культури, ризосфера, забруднення нафтопродуктами.

I.M. Malynovska¹, N.A. Zinovieva²

¹NRC "Institute of Agriculture of the UAAS", 26, Mashynobudivnykiv Str., township Chabany, Kyiv region, Ukraine, tel.: +38 (045) 526 13 28, e-mail: h.o.p.e@mail.ru

²National Aviation University

MICROBIOLOGICAL PROCESSES IN THE RHIZOSPHERE OF THE PLANTS IN THE CONTAMINATED SOIL WITH OIL PRODUCTS

Summary

We have investigated the flow of microbial processes in the rhizosphere of various crops in the soil contamination with 1% oil products. There were established that in rhizosphere of all the investigated crops consequently pollution by petroleum humus mineralization, maximally in rhizosphere of corn in 3 times. Assimilation of organic matter slowed in rhizosphere of wheat and sunflowers, while in other cultures enhanced. The process of nitrogen compounds mineralization became slower in rhizosphere of all the investigated cultures, except maize, where all the processes observed intensification.

Key words: microbiocenosis, ecological and trophic groups, phytotoxicity, mineralization, humus, rhizosphere, petroleum products pollution, crops.



А.М. Солоненко

Мелітопольський державний педагогічний університет
імені Богдана Хмельницького,
вул. Леніна, 20, Мелітополь, 72312, Україна,
тел.: +38 (0619) 44 04 64, e-mail: Anatol8@ukr.net

БАКТЕРІЇ-ДЕСТРУКТОРИ МОРТМАСИ *CLADOPHORA SIWASCHENSIS* У РАПІ АМФІБІАЛЬНИХ ДІЛЯНОК АРАБАТСЬКОЇ СТРІЛКИ ТА БЕРДЯНСЬКОЇ КОСИ

*Представлено результати досліджень бактерій-деструкторів мортмаси зеленої водорості *Cladophora siwaschensis* С. Meyer у рапі із амфібіальних ділянок Арабатської стрілки й Бердянської коси. В модельному експерименті встановлено динаміку чисельності амілолітичних, протеолітичних та ліполітичних бактерій, які беруть участь у деструкції органічних речовин зеленої водорості *Cladophora siwaschensis*.*

*Ключові слова: біомаса, *Cladophora siwaschensis*, деструкція, амілолітичні, протеолітичні, ліполітичні бактерії.*

Як основна фотосинтезувальна ланка екосистеми, водорості відіграють важливу роль у формуванні хімічного складу та запасів органічної речовини солоних водойм та донних відкладень. Характер перетворення водоростевої органічної речовини, його інтенсивність, кінцеві продукти є важливим предметом досліджень. Розпад водоростевої органічної речовини суттєво впливає на якість води, кругообіг речовин у водоймищах, збагачує донні відкладення органічними компонентами [1–3]. Але процес мікробної деструкції водоростевої мортмаси недостатньо вивчений. Наявна інформація стосується переважно деструкції синьо-зелених водоростей [4–7].

Органічна речовина водоростей солоних водойм піддається деструкції різними групами мікроорганізмів, тому метою дослідження було вивчення чисельності представників різних груп бактерій, що беруть участь у деструкції мортмаси зеленої водорості *Cladophora siwaschensis* С. Meyer у рапі амфібіальних ділянок Арабатської стрілки й Бердянської коси.

Матеріали і методи

Наважку водоростевої мортмаси макроскопічних розростань *Cladophora siwaschensis* очищали від механічних домішок та просушували при температурі 105 °С протягом 2 годин. Наважку вносили до склянок з притертими пробками ємністю 1 л та додавали рапу, яка була відібрана



з амфібіальних ділянок (солоність 140–165 г/л). Склянки знаходилися при сталій середньорічній та середньолітній температурі 14 °С і 25 °С впродовж 25 діб. Перед відбором проб для посіву склянки ретельно збовтували.

Визначення чисельності бактерій різних фізіологічних груп здійснювали на сольових елективних живильних середовищах [8]. Висів проводили з відповідних розведень. Наявність амілолітичних, протеолітичних та ліполітичних бактерій визначали за загальноприйнятими методиками [9–10].

Результати та їх обговорення

В ході експерименту показано динаміку чисельності амілолітичних, протеолітичних та ліполітичних мікроорганізмів, асоційованих з мортмасою зеленої водорості *Cladophora siwaschensis* (табл.).

Посіви на елективні середовища показали, що чисельність амілолітичних бактерій у вихідній рапі не перевищувала 200 КУО/мл (Арабатська стрілка) та 120 КУО/мл (Бердянська коса) при середньолітній температурі. Починаючи з 4-ої доби досліду їх чисельність різко зростала і досягала максимуму в інтервалі 10–18-ої доби. При цьому показники в 1000–1700 разів перевищували вихідні. До 20-ої доби чисельність бактерій знижувалася приблизно в 10 разів порівняно з максимумом. Аналогічна закономірність спостерігалася також при середньорічній температурі.

Чисельність протеолітичних бактерій у вихідній рапі Арабатської стрілки при середньолітній температурі не перевищувала 150 КУО/мл, а у вихідній рапі Бердянської коси представники цієї групи бактерій були відсутні. Протеолітичні бактерії з'являлися на 2-у добу в кількості 230 КУО/мл. До 4-ої доби у двох досліджених амфібіальних ділянках їх чисельність зростала у 56–100 разів і досягала максимуму на 10-у добу, перевищуючи вихідні показники в 2000–4000 разів. Починаючи з 12-ої доби, чисельність цих бактерій плавно знижувалася та до кінця експерименту вона не перевищувала 10000–20000 КУО/мл. Схожі тенденції виявлені також при середньорічній температурі.

Ліполітичних бактерій при середньолітній температурі у вихідній рапі двох досліджених амфібіальних ділянок не було виявлено. Ліполітичні бактерії були зафіксовані з 4-ої доби у кількості 200–400 КУО/мл. Максимум чисельності ліполітичних бактерій припадав на 12–16-у добу й досягав 150000–160000 КУО/мл (показники перевищували вихідні в 400–750 разів). Починаючи з 18-ої доби й до кінця експерименту, їхня чисельність різко знижувалася. При середньорічній температурі спостерігаються схожі закономірності.

Активність бактерій-деструкторів була максимальною в різний час та їх частка в рапі з амфібіальних ділянок Арабатської стрілки становила для протеолітичних бактерій – 52–64% та 56–65%, амілолітичних – 55–65% та 25–30%, ліполітичних – 21–24 та 20–26%; в рапі амфібі-



Таблиця
Динаміка чисельності мікроорганізмів-деструкторів ($\text{КУО} \cdot 10^4$ в мл) мортмаси
зеленої водорості *Cladophora siwaschensis* у рапі

Table
The dynamics of a number of micro-organisms – destructors ($\text{CFU} \cdot 10^4$ in ml) of
green seaweed *Cladophora siwaschensis* mortmass in brine

Час, доба	Рапа з Арабатської стрілки			Рапа з Бердянської коси		
	аміло- літичні	протео- літичні	ліпо- літичні	аміло- літичні	протео- літичні	ліпо- літичні
2	$\frac{0,03 \pm 0,005}{0,02 \pm 0,005}$	$\frac{0,025 \pm 0,004}{0,015 \pm 0,003}$	-	$\frac{0,02 \pm 0,002}{0,01 \pm 0,002}$	$\frac{0,023 \pm 0,002}{0,01 \pm 0,002}$	-
4	$\frac{2 \pm 0,1}{1,2 \pm 0,1}$	$\frac{1,5 \pm 0,2}{1 \pm 0,1}$	$\frac{0,04 \pm 0,005}{0,01 \pm 0,005}$	$\frac{1,8 \pm 0,2}{0,12 \pm 0,01}$	$\frac{1,3 \pm 0,2}{0,13 \pm 0,01}$	$\frac{0,02 \pm 0,002}{0,01 \pm 0,002}$
6	$\frac{2,1 \pm 0,2}{1,5 \pm 0,1}$	$\frac{1,7 \pm 0,2}{1,5 \pm 0,2}$	$\frac{0,06 \pm 0,006}{0,03 \pm 0,004}$	$\frac{1,9 \pm 0,3}{0,15 \pm 0,02}$	$\frac{1,5 \pm 0,2}{0,14 \pm 0,02}$	$\frac{0,04 \pm 0,01}{0,02 \pm 0,01}$
8	$\frac{2,3 \pm 0,2}{1,8 \pm 0,2}$	$\frac{1,8 \pm 0,2}{1,7 \pm 0,2}$	$\frac{0,07 \pm 0,02}{0,04 \pm 0,01}$	$\frac{2 \pm 0,4}{0,2 \pm 0,03}$	$\frac{1,6 \pm 0,2}{0,16 \pm 0,01}$	$\frac{0,05 \pm 0,01}{0,04 \pm 0,01}$
10	$\frac{20 \pm 3}{2 \pm 0,3}$	$\frac{60 \pm 5}{2,5 \pm 0,3}$	$\frac{15 \pm 3}{1,5 \pm 0,2}$	$\frac{15 \pm 2}{1,5 \pm 0,2}$	$\frac{45 \pm 4}{4 \pm 0,5}$	$\frac{3 \pm 0,4}{0,35 \pm 0,03}$
12	$\frac{20 \pm 4}{2 \pm 0,3}$	$\frac{40 \pm 4}{2,5 \pm 0,3}$	$\frac{16 \pm 2}{1,6 \pm 0,3}$	$\frac{17 \pm 2}{1,7 \pm 0,3}$	$\frac{44 \pm 5}{4,2 \pm 0,3}$	$\frac{3,2 \pm 0,2}{0,55 \pm 0,03}$
14	$\frac{20 \pm 4}{2,2 \pm 0,3}$	$\frac{30 \pm 4}{5 \pm 0,5}$	$\frac{16 \pm 3}{1,7 \pm 0,2}$	$\frac{20 \pm 3}{2 \pm 0,5}$	$\frac{30 \pm 3}{3 \pm 0,5}$	$\frac{4,2 \pm 0,2}{1,2 \pm 0,1}$
16	$\frac{20 \pm 3}{2,5 \pm 0,4}$	$\frac{20 \pm 3}{5,5 \pm 0,4}$	$\frac{15 \pm 2}{1,5 \pm 0,2}$	$\frac{20 \pm 2}{2,2 \pm 0,3}$	$\frac{20 \pm 2}{3,0 \pm 0,3}$	$\frac{1,5 \pm 0,1}{1,4 \pm 0,1}$
18	$\frac{20 \pm 3}{2,5 \pm 0,4}$	$\frac{10 \pm 1}{5 \pm 0,5}$	$\frac{1 \pm 0,2}{0,1 \pm 0,01}$	$\frac{20 \pm 2}{2,0 \pm 0,3}$	$\frac{10 \pm 2}{1,5 \pm 0,3}$	$\frac{0,9 \pm 0,1}{0,7 \pm 0,1}$
20	$\frac{2 \pm 0,5}{1 \pm 0,3}$	$\frac{1 \pm 0,2}{0,1 \pm 0,04}$	$\frac{0,5 \pm 0,01}{0,07 \pm 0,01}$	$\frac{1,8 \pm 0,3}{2,0 \pm 0,2}$	$\frac{4,0 \pm 0,2}{1,0 \pm 0,1}$	$\frac{0,4 \pm 0,02}{0,3 \pm 0,02}$
25	$\frac{2 \pm 0,4}{1 \pm 0,2}$	$\frac{1 \pm 0,2}{0,1 \pm 0,04}$	$\frac{0,5 \pm 0,05}{0,06 \pm 0,004}$	$\frac{2 \pm 0,3}{2 \pm 0,4}$	$\frac{2,0 \pm 0,2}{0,2 \pm 0,03}$	$\frac{0,3 \pm 0,02}{0,2 \pm 0,01}$
контроль	$\frac{0,02 \pm 0,002}{0,015 \pm 0,002}$	$\frac{0,015 \pm 0,002}{0,01 \pm 0,002}$	-	$\frac{0,012 \pm 0,001}{-}$	-	-

Примітка: чисельник — при середньолітній температурі (25 °C);
знаменник — при середньорічній температурі (14 °C); контроль — вихідна рапа без
біомаси водорості.



альних ділянок Бердянської коси: протеолітичні бактерії — 68–72% та 65–68%, амілолітичні — 37–52% та 33–47%, ліполітичні — 5–7% та 19–21% при середньолітній і середньорічній температурі, відповідно.

Таким чином, показано, що у процесі деструкції органічних речовин зеленої водорості *Cladophora siwashensis* у рапі амфібіальних ділянок Бердянської коси відмічено меншу кількість бактерій-деструкторів, ніж у рапі з Арабатської стрілки. Отже, можна зробити висновок, що в деструкції органічної речовини зеленої водорості *Cladophora siwaschensis* важливу роль відіграють протеолітичні, амілолітичні та ліполітичні групи бактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. — М.: Университет, 2001. — 255 с.
2. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии / отв. ред. Н.Н. Колотилова.— М.: Наука, 2003.— 348 с.
3. Сиренко Л.А., Козицкая В.Н. Биологически активные вещества водорослей и качество воды. — К.: Наукова думка, 1988. — 256 с.
4. Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М., Карпов Г.А., Стариныни Д.А. Анаэробная деструкция органического вещества микробных матов источника Термофильного (кальдера Узон, Камчатка) // Микробиология. — 1987. — Т. 56. — Вып. 36. — С. 1022–1028.
5. Бикбулатова Е.М., Бикбулатов Э.С., Мельникова Н.И. Влияние температуры на распад органического вещества синезеленых водорослей // «Микробиологические и химические процессы деструкции органического вещества в водоемах»: сб. статей / отв. ред. В.И. Романенко, Б.А. Скопинцев. — Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1979. — С. 204–211.
6. Бикбулатова Е.М., Скопинцев Б.А., Бикбулатов Э.С. Изменение химического состава воды и взвесей при распаде органического вещества фитопланктона в анаэробных условиях // «Микробиологические и химические процессы деструкции органического вещества в водоемах»: сб. статей / отв. ред. В.И. Романенко, Б.А. Скопинцев. — Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1979. — С. 187–203.
7. Добрынин Э.Г. Характеристика круговорота органического вещества в гипергалинных водоемах Крыма // «Микробиологические и химические процессы деструкции органического вещества в водоемах»: сб. статей / отв. Ред. В.И. Роменанко, Б.А. Скопинцев. — Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1979. — С. 60–74.
8. Антипчук А.Ф., Кіреєва І.Ю. Водна мікробіологія. Навчальний посібник — К.: Кондор, 2005 — 256 с.
9. Антипчук А.Ф. Микробиология рыбоводных прудов : На прим. водоемов Украины. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1983. — 145 с.
10. Антипчук А.Ф. Микробиологический контроль в прудовых хозяйствах. — М.: Пищ.пром., 1979. — 145 с.



А.Н. Солоненко

Мелитопольский государственный педагогический университет имени Богдана Хмельницкого, ул. Ленина, 20, Мелитополь, 72312, Украина, тел.: +38 (0619) 44 04 64, e-mail: Anatol8@ukr.net

БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ МОРТМАССЫ *CLADOPHORA SIWASCHENSIS* В РАПЕ ИЗ АМФИБИАЛЬНЫХ УЧАСТКОВ АРАБАТСКОЙ СТРЕЛКИ И БЕРДЯНСКОЙ КОСЫ

Реферат

Представлены результаты исследований бактерий-деструкторов мортмассы зеленой водоросли *Cladophora siwaschensis* C. Meyer в рапе из амфибиальных участков Арабатской стрелки и Бердянської косы. В модельном эксперименте установлена динамика численности амилолитических, протеолитических и липолитических бактерий, которые принимают участие в деструкции органических веществ зеленой водоросли *Cladophora siwaschensis*.

Ключевые слова: биомасса, *Cladophora siwaschensis*, деструкция, амилолитические, протеолитические, липолитические бактерии.

А.М. Solonenko

Melitopol State Pedagogical University named after Bohdan Khmelnytsky, 20, Lenin str., Melitopol, 72312, Ukraine, tel.: +38 (0619) 44 04 64, e-mail: Anatol8@ukr.net

BACTERIA-DESTRUCTORS OF MORTMASS *CLADOPHORA SIWASCHENSIS* IN BRINE OF THE AMPHIBIAN AREAS ON THE ARABAT SPIT AND THE BERDYANSK FORELAND

Summary

The author presents the research results of bacteria-destructors mortmass of green seaweed *Cladophora Siwaschensis* C. Meyer in brine of the amphibian areas on the Arabat spit and the Berdyansk foreland. The model experiment helped to determine the dynamics of the number of amylolytic, proteolytic and lipolytic bacteria which take part in the destruction of green seaweed *Cladophora Siwaschensis* organic substance.

Key words: biomass, *Cladophora siwaschensis*, destruction, amylolytic, proteolytic, lipolytic bacteria.



VI ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

З 24 травня по 4 червня 2011 року кафедра мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова у черговий раз приймала учасників VI Літньої школи «Молекулярна мікробіологія і біотехнологія». Усього заняття школи відвідували співробітники та молоді науковці 14 наукових закладів з 10 міст України і Росії, серед яких були й аспіранти з Німеччини і Румунії. Серед закладів, які направили своїх співробітників та аспірантів на Літню школу, були представлені Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Національний фармацевтичний університет (м. Харків), Південний біотехнологічний центр у рослинництві (м. Одеса), Московський державний університет прикладної біотехнології, Інститут мікробіології і імунології імені І.І. Мечникова (м. Харків), Миколаївський національний університет, Прикарпатський національний університет імені В. Стефаника (м. Івано-Франківськ), Ужгородський національний університет, Інститут біології південних морів (філія у м. Одеса), Інститут біології тварин НАНУ України (м. Дрогобич), Херсонський державний університет, Дрогобицький державний педагогічний університет, ННЦ Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова (м. Одеса), Одеський національний університет імені І.І. Мечникова.

Програма занять привабила як молекулярних біологів — початківців, так і досвідчених спеціалістів, які бажали детальніше ознайомитися з підходами, новими для них у практиці наукових досліджень.

Лекційні заняття, присвячені сучасним досягненням молекулярної мікробіології і біотехнології, проводилися доктором біологічних наук, завідувачем відділу молекулярної біології бактеріофагів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного Товкачем Ф.І.

На лабораторних заняттях слухачі школи навчалися виділяти ДНК, виявляти генетичні послідовності методом полімеразної ланцюгової реакції, працювати з найсучаснішим обладнанням лабораторій молекулярної мікробіології.

Навчання основам рідинної хроматографії проводили спільно з представником компанії «Біо-Рад» доктором Гюлою Шанаді (Угорщина), і під його керівництвом слухачі школи знайомилися з хроматографічним

обладнанням, навчалися збирати найпростішу хроматографічну систему, проводити розділення білкової суміші.

У програму лабораторних занять школи входило опанування методами горизонтального агарозного гелі-електрофорезу та вертикального електрофорезу у поліакриламідному гелі. Слухачі розділяли продукти полімеразної ланцюгової реакції та рестрикції, визначали розмір виділених бактеріальних плазмід. У денатуруючому поліакриламідному гелі учасники школи розділяли білки. Лабораторні заняття проводилися кандидатами біологічних наук, доцентами ОНУ імені І.І. Мечникова Іваницею Т.В., Сергєєвою Ж.Ю., Ліманською Н.В. та кандидатом біологічних наук, завідувачем лабораторії Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного Остапчуком А.М.

На заняттях з біоінформатики слухачі мали нагоду ознайомитися із застосуванням кластерного аналізу для біологічних досліджень, будівництвом дендрограм, методам вивчення нуклеотидних та амінокислотних послідовностей. Для новачків у біоінформатиці цікавим було відвідування та навчання роботи із сайтами, що містять дані щодо розшифрованих послідовностей ДНК та амінокислот білків різноманітних організмів. Лекції і лабораторні заняття з біоінформатики проводилися кандидатом біологічних наук, доцентом ОНУ імені І.І. Мечникова Васильєвою Н.Ю.

Особливу увагу на заняттях школи було приділено автономним генетичним елементам бактерій — бактеріофагам, плазмідам і транспозонам. Так, слухачі навчалися концентруванню фагових часток, індукції лізогенних фагів, трансдукції транспозону Tn9 бактеріофагом P1 у клітини *Erwinia carotovora*.

Учасники школи були забезпечені друкованими посібниками, в яких наводився опис основних засад лабораторного практикуму з молекулярної мікробіології, біотехнології та біоінформатики.

Фотозвіт з роботи школи можна знайти на сторінках сайту Одеського національного університету імені І.І. Мечникова <http://onu.edu.ua/> у розділі „Наука” — „Літні школи”.

Чекаємо бажаючих відвідати курс занять школи у наступному році!
Електронна адреса: limanska@gmail.com

Відповідальний секретар
Літньої школи,
кандидат біологічних наук, доцент
Ліманська Н.В.



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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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



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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

До кожного примірника статті додається анотація мовою оригіналу та реферати українською / російською (в залежності від мови оригіналу статті), та англійською мовами (кожен реферат на окремому аркуші). Перед словом «реферат» необхідно написати прізвища та ініціали авторів, назви установ, адреси, повну назву статті відповідною мовою. Після тексту реферату з абзацу розміщуються ключові слова.

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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



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

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

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

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

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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

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



На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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, діагностикумів, реактивів для наукових досліджень тощо.



INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



- short communications – at most 2 pages.

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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

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

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

Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



Наукове видання

«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

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

Підп. до друку 08.06.2011. Формат 70x108/16.
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

Видавець — ПП «Фенікс»
(Свідоцтво ДК № 1044 від 17.09.02).
Україна, м. Одеса, 65009, вул. Зоопаркова, 25. Тел. (048) 7777-591.
e-mail: maritimebooks@yandex.ru
www.law-books.od.ua

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