

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

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

№ 2(18)
2012

Одеса
2012

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця (Одеса, Україна)

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова (Одеса, Україна)

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова
Свідоцтво: серія КВ № 11462-335Р від 07.07.2006 р.

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

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

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

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

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

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established
by Odesa National Mechnykov University.

Registration certificate: KV № 11462-335R. Date of issue 07.07.2006.

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov
University, 2012

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Ю.Ю. Дуденко, С.Л. Міресь, В.О. Іваниця БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURT.:FR) P. KARST.....	6
---	---

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

Р.В. Грицай, О.В. Голубець, О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець ЛІПОПОЛІСАХАРИДИ <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> : ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ.....	20
---	----

Н.В. Ліманська, Т.В. Іваниця, І. Шуазе, Н.В. Коротаєва, Ж.Ю. Сергеева, Ж.-М. Шобер, В.О. Іваниця, Т. Ертле ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНУ <i>ENTEROCOCCUS DURANS</i> НА ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО ВІЛТУ	30
--	----

В.М. Заєць, В.О. Кітам, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, М.О. Чашин ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЦИТОХРОМУ P450 2E1 МИШИ В <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
---	----

С.Л. Міресь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ СПЕКТРИ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗ <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURTIS: FR.) P. KARST ЗАЛЕЖНО ВІД УМОВ ЕКСТРАГУВАННЯ ТА СУБСТРАТУ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ ..	52
---	----

М.А. Хархота, А.І. Осадча, Л.В. Авдеева КОМПОЗИЦІЙНІ СПІВВІДНОШЕННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ <i>V. SUBTILIS</i> ТА ПРЕБІОТИКІВ ДЛЯ СИНБІОТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ	60
---	----

О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, І.І. Сейфулліна, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ ТА КОМПЛЕКСІВ СТАНУМУ(IV) НА ЇХ ОСНОВІ	69
---	----

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь ОСОБЛИВОСТІ КОНСТРУКТИВНОГО АНАБОЛІЗМУ ВУГЛЕВОДІВ У КЛІТИНАХ ЗЕЛЕНИХ СІРКОВИХ БАКТЕРІЙ <i>CHLOROBIVUM</i> <i>LIMICOLA IMB</i> K-8.....	79
--	----

М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, А.А. Косяга АНТИФУЗАРІОЗНА АКТИВНІСТЬ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ДЕЯКИХ ШТАМІВ РОДУ <i>PSEUDOMONAS</i>	89
---	----

О.М. Мороз, І.Б. Русин ВИКОРИСТАННЯ СПОЛУК НІТРОГЕНУ БАКТЕРІЯМИ ЦИКЛУ СУЛЬФУРУ ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ	96
--	----

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

VII ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»	109
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	111

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

YU. DUDENKO, S. MIROS, V. IVANYTSIA BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF MEDICAL MUSHROOM <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURT.:FR) P. KARST.....	6
---	---

EXPERIMENTAL WORKS

R.V. Gritsay, O.V. Golubets, O.S. Brovaraskaya, L.D. Varbanets LIPOPOLYSACCHARIDES OF <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i> : FATTY ACID COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY.....	20
--	----

N. Limanska, T. Ivanytsia, Y. Choiset, N. Korotaeva, Zh. Sergeeva, J.-M. Chobert, V. Ivanytsia, T. Haertlñ EFFECT OF <i>ENTEROCOCCUS DURANS</i> BACTERIOCIN ON BACTERIAL WILT AGENT	30
--	----

V. Zayets, V. Kitam, V. Rushchak, O. Maksymchuk, M. Chashchyn HETEROLOGOUS EXPRESSION OF RECOMBINANT MOUSE CYTOCHROME P450 2E1 IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	41
--	----

S. Miros, Yu. Dudenko, N. Bobreshova, T. Gudzenko, V. Ivanytsia ELEKTROPHORETIC SPECTRA OF CARBOXYLESTERASES ISOFORMS OF <i>GANODERMA LUCIDUM</i> (CURTIS: FR.) P. KARST DEPENDING ON THE EXTRACTION CONDITIONS AND THE COMPOSITION OF GROWING SUBSTRATE.....	52
--	----

M.A. Kharkhota, A.I. Osadcha, L.V. Avdeeva COMPOSITION INTERRELATIONS OF PROBIOTIC STRAINS <i>B. SUBTILIS</i> AND PREBIOTICS FOR THE SINBIOTIC DRUG	60
--	----

O. Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.I. Seifullina, B.M. Galkin, T.O. Philipova ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF IZONICOTINIC ACID DERIVATIVES AND STANNUM (IV) COMPLEXES ON THEIR BASIS	69
---	----

M.B. Gorishniy, S.P. Gudz FEATURES OF CONSTRUCTIVE ANABOLISM OF CARBOHYDRATES IN THE CELLS OF GREEN SULFUR BACTERIA <i>CHLOROBIVUM</i> <i>69LIMICOLA</i> IMB K-8.....	79
---	----

M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, T.O. Filipova, A.A. Kosyuga ANTIFUSARIUM ACTIVITY OF SOME <i>PSEUDOMONAS</i> STRAIN EXOMETABOLITES.....	89
---	----

O.M. Moroz, I.B. Rusyn USE OF NITROGEN COMPOUNDS BY SULFUR CYCLE BACTERIA OF YAVORIVSKE LAKE	96
---	----

THE CHRONICLE OF A SCIENTIFIC LIFE

VII SUMMER SCHOOL «MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY»	109
INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	115

УДК 615.32:582.284

Ю.Ю. Дуденко, С.Л. Міресь, В.О. Іваниця

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

БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА *GANODERMA LUCIDUM* (CURT.:FR) P. KARST

*Наведено сучасні дані про біологічно активні сполуки лікарського базидіоміцета *Ganoderma lucidum* і їх ефекти. Наведено хімічні формули глюканів та терпеноїдів – речовин, що визначають основні лікарські властивості гриба. Подана інформація про інші сполуки, що беруть участь у формуванні цілющої дії ганодерми, а саме про білки та глікопротеїни, нуклеотиди і нуклеозиди, стероли і стероїди, жирні кислоти, алкалоїди, глікозиди, летючі ефірні олії, вітаміни. Крім того, ганодерма, як ксилотрофний сапрофіт, має набір лігнолітичних ферментів, які знайшли застосування у харчовій, целюлозно-паперовій, текстильній промисловостях, а також у процесах біологічної очистки. Багатьма дослідженнями підтверджуються імуномодулююча, антимікробна, протівірусна та онкостатична активності. Дослідження показують біологічні ефекти і механізми дії продуктів метаболізму *G. lucidum*.*

*Ключові слова: *Ganoderma lucidum*, біологічно активні речовини, хімічний склад, антимікробна, протівірусна імуномодулююча, онкостатична активність.*

Пошук природних альтернатив до синтетичних лікарських препаратів у вигляді натуральних природних органічних джерел змушує учених звертати увагу на історичні відомості про вивчення різних корисних властивостей рослин та грибів. Важливим вкладом у цій сфері вважається дослідження макроміцета *Ganoderma lucidum*, який відноситься до базидіоміцетів і широко застосовується в країнах Південно-Східної Азії. У Японії цей гриб називають Манентаке, Сашитаке, Рейши, у Кореї – Йонгши, у Китаї – Лінчжи, в Україні – трутовик лакований [34].

Можливість використання гриба *Ganoderma lucidum* для створення профілактичних і лікувальних засобів стала реальною після багаторічних



фундаментальних досліджень процесів життєдіяльності базидіоміцетів, у тому числі особливостей їх росту і розвитку, характеру і механізму метаболічної і ферментативної активності. До сьогодні тривають активні дослідження лікувальних грибів у різних країнах. Розробляються методи культивування *G. lucidum*, вивчаються продукти їх метаболізму за різних умов вирощування, структура і властивості цих речовин, біологічна дія на організм людини в нормі і за різних патологічних станів. Наукові обґрунтування механізмів, що відповідають за біологічні ефекти продуктів природного походження роблять свій внесок у подальший розвиток природної медицини [6, 10, 11, 26]. Плодові тіла, міцелій та спори *G. lucidum* містять близько 400 різних біологічно активних компонентів, які переважно включають тритерпеноїди, поліцукриди, нуклеотиди, стероли, стероїди, жирні кислоти, протеїни, алкалоїди, глікозиди, летючі ефірні олії, вітаміни [2, 3, 41].

Найважливішими біологічно активними сполуками, виділеними з *G.lucidum*, є поліцукриди і тритерпени [5, 8]. Практично всі профілактичні і терапевтичні ефекти, відомі за використання трутовика лакованого, пов'язані саме з цими двома групами речовин [34].

За хімічною будовою поліцукриди грибів представлені головним чином глюканами з різними типами глікозидних зв'язків. У переважній більшості глюкоза має в головному ланцюзі β -1,3- або β -1,4-зв'язки, або чергування β -1,3-, β -1,4-зв'язків з β -1,6-зв'язком. Молекулярна будова та просторова структура глюканів представлена на рисунках 1, 2. Зустрічаються гетероглікани, а також глікопротеїни, які мають у своєму складі вуглеводну і білкову складову. Бокові ланцюги гетерополіцукридів, як правило, приєднані до головного ланцюга через 1,6-зв'язки [27].

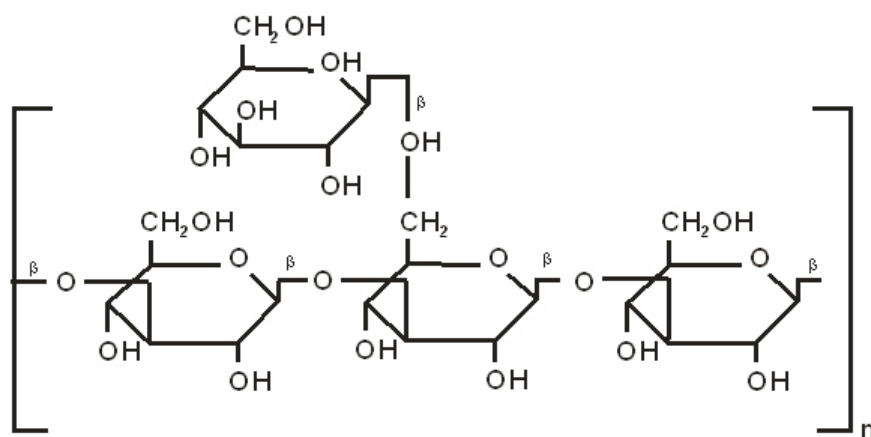


Рис. 1. Молекулярна будова β -1,3/1,6-глюкана [10]

Fig. 1. The molecular structure of β -1,3/1,6-glucan [10]

Біологічно активний β -D-глюкан має потрійну, правозакручену просторову структуру. Поліцукриди, виділені з плодових тіл або міцелію грибів, що мають подібні властивості, можуть відрізнятися між собою структурою, хімічним складом і фізичними характеристиками [44]. Їх активність може залежати від розміру, форми і ступеню розгалуженості молекули, розчинності її у воді.

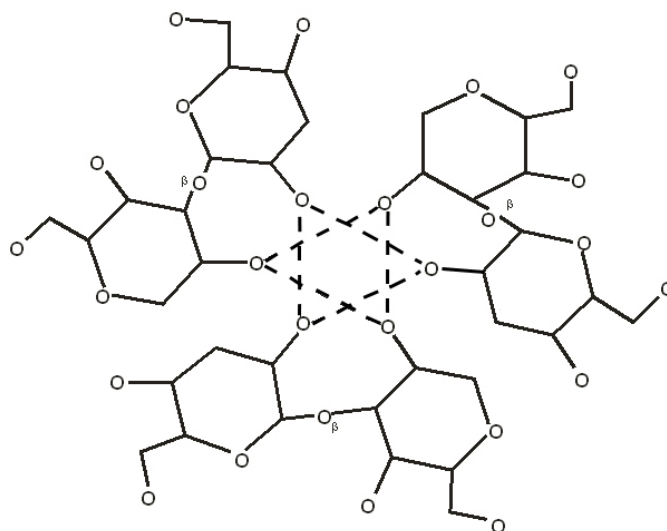


Fig. 2. The structure of β -D-glucan [10]

На сьогодні відомо, що *G. lucidum* містить 140 різних тритерпеноїдів [22]. Терпени — клас вуглеводнів, природних органічних речовин, вторинних рослинних метаболітів загальної формули $(C_5H_8)_n$, з вуглецевим скелетом, похідним ізопрену $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$. У великих кількостях терпени містяться в ефірних оліях рослин родини хвойні та ін. Терпени класифікують за числом ланок ізопренів, що утворюють вуглецевий скелет молекули:

Монотерпени (терпени), $C_{10}H_{16}$,

Сесквитерпени (півторатерпени), $C_{15}H_{24}$,

Дитерпени, $C_{20}H_{32}$, $(C_{10}H_{16})_2$

Тритерпени, $C_{30}H_{48}$, $(C_{10}H_{16})_3$

Тетратерпени, $C_{40}H_{64}$, $(C_{10}H_{16})_4$

Політерпени — сполуки з великою кількістю мономерних груп $(C_{10}H_{16})_n$. Похідні терпенів називають терпеноїдами. За традицією в біохімічній літературі до категорії терпеноїдів зазвичай не включають тетра-терпеноїди (каротиноїди, ксантофіли) і політерпени (каучук, гутаперча), а також стероїди. До терпеноїдів у вузькому значенні цього терміну відносять терпени (монотерпени), сесквитерпени, дитерпени і тритерпени, побудовані відповідно з 2, 3, 4 і 6 залишків мевалонової кислоти, а також їх похідні [22]. Особливості будови молекул терпеноїдів призводять до їх



помітної відмінності від інших органічних сполук підвищеною лабільністю, схильністю до ізомеризації, циклізації і полімеризації. Ізомеризація і трансформація часто проходить в м'яких умовах, під дією світла, кисню повітря, пари води і тому подібне. Вуглецеві ланцюги ряду терпеноїдів є ключовими проміжними продуктами у біосинтезі стероїдних гормонів, холестерину, вітамінів Д, Е, К, жовчних кислот.

Серед тритерпеноїдів *G. lucidum* описані ганодерові кислоти (ланостанові тритерпеноїди), люциденові, ганодермові, ганодерікові, ганолуцидові, апланоксидові кислоти, люцидони, ганодеріоли, ганодермадіоли, ганодерманонтріол, ганодерманондіол, люцидадіол, люцидальдегіди та ін. [12].

За даними [10, 23] відомі такі ганодерові кислоти, виділені з плодкових тіл *G. lucidum*: В, Z, А, С, D, F, G, Н, а також ганоспорова кислота А. Jun-Wei Xu із співавторами відзначають і інші ганодерові кислоти: V, U, DM, Y, X, S, T, Me, Mk [20].

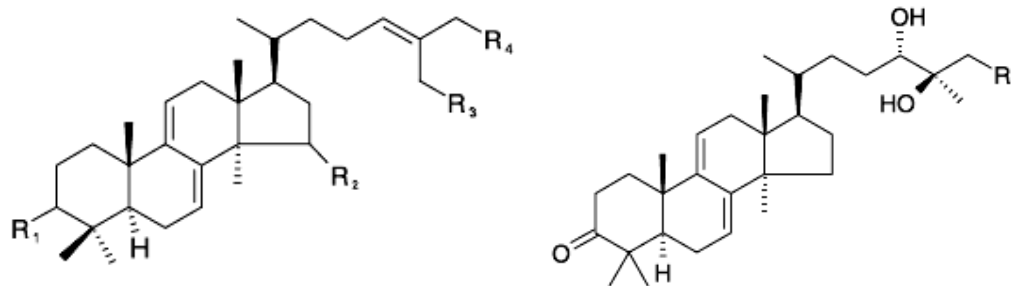
Зі спор гриба виділено шість нових ланостанових тритерпеноїдів які відзначили наступним чином — ганодерові кислоти γ , β , ϵ , ζ , η , θ [29]. Попередні дослідження показують, що спори гриба містять значно більшу кількість ганодерових кислот, ніж інші частини гриба і що тритерпеновий склад плодового тіла варіює залежно від місцевості, в якій він ріс. Також відомо, що спори гриба містять тритерпенові лактони [22]. Серед ганодермових кислот відома ганодермова кислота S [ланоста-7,9(11), 24-триен-3 β ,15 α -диацетокси-26-оєва кислота] [38]. Просторова структура деяких тритерпеноїдів, разом із радикалами представлені на рис. 3 [23].

З плодкових тіл *G. lucidum* виділено протеїн LZ-8 (Ling Zhi 8), що володіє імуномодулюючою активністю. Функціонально активна форма LZ-8 представляє собою димер з молекулярною масою 24 кДа, кожен з ланцюгів це поліпептид, що складається з 110 амінокислотних залишків, з ацетильованою термінальною аміногрупою і молекулярною масою 12 кДа [35].

Відомо про імуномодулюючий ефект LZ-8 білків. Згідно з Wiwanitkit LZ-8 може спричиняти імуносупресивний ефект за рахунок зниження антиген-індукованого утворення антитіл [42].

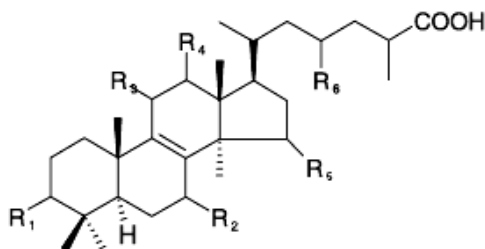
Відомо, що LZ-8 має мітогенну активність до клітин селезінки мишей, периферійних лімфоцитів людини та *in vitro* викликає аглютинацію еритроцитів барана, але не викликає її у еритроцитів людини [42]. Може функціонувати як супресор під час анафілаксії, що викликана бичачим сироватковим альбуміном у мишей *in vivo*. Сіквенс білка LZ-8 [35] показав схожість його амінокислотної послідовності та вторинної структури з варіабельною ділянкою важкого ланцюга мишачого Ig A. LZ-8 є потужним активатором Т-клітин. Цей ефект обумовлений стимуляцією синтезу ІЛ-2 та експресії рецепторів до ІЛ-2 і інтегрину ICAM-1 [16].

Протеоглікан GLIS, виділений з плодкових тіл ганодерми, сприяє активації В-клітин та експресії маркерів на їх поверхні [9].

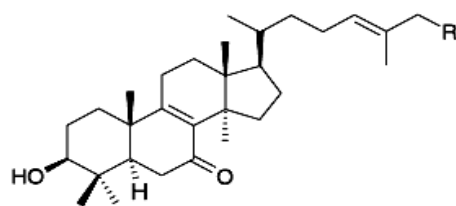


ганодеріол F $R_1=O$, $R_2=H$, $R_3=R_4=OH$
ганодермадіол $R_1= \beta-OH$, $R_2=R_3=H$, $R_4=OH$

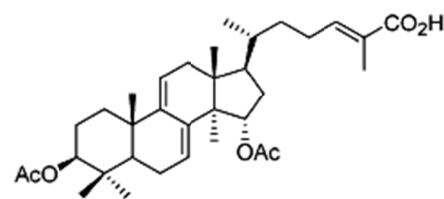
ганодерманонтріол $R=OH$
ганодерманондіол $R=H$



ганодерова кислота В $R_1=R_3=R_5=R_6=O$, $R_2= \beta-OH$, $R_4=H$
ганодерова кислота Z $R_1= \beta-OH$, $R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=H$
ганодерова кислота А $R_1=R_3=R_6=O$, $R_2=R_5= \beta-OH$, $R_4=H$
ганодерова кислота С $R_1=R_3=R_5=R_6=O$, $R_2= \beta-OH$, $R_4=H$
ганодерова кислота D $R_1=R_3=R_5=R_6=O$, $R_2=R_4= \beta-OH$
ганодерова кислота F $R_1=R_2=R_3=R_5=R_6=O$, $R_4= \beta-OH$
ганодерова кислота G $R_1=R_2=R_3=R_4= \beta-OH$, $R_5=R_6=O$
ганодерова кислота H $R_1= \beta-OH$, $R_2=R_3=R_5=R_6=O$, $R_4= \beta-OAc$
ганоспорова кислота А $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=O$



люцидадіол $R=OH$
люциальдегід $R=O$



ганодермова кислота S

Рис. 3. Тритерпеноїди, виділені з *G. lucidum* [10, 23].

Fig. 3. Triterpenoids isolated from *G. lucidum* [10, 23].

Серед азотистих сполук виділено нуклеотиди та нуклеозиди. Серед нуклеозидів — аденозин, 5-диокси-5'-метилсульфанілат-аденозин. Із *G. lucidum* виділено також стероли, зокрема, ергостеролу пероксид, цереброзиди, амінокислоти, розчинні білки, олеїнові кислоти, циклооктосірка (що є алотропом сірки). Спори гриба містять холін, бетаїн, гентріаконтан, β -сітостерол, тетракозанову (лігноцеринову), стеаринову, пальмітинову, бегенову, пірофосфорну кислоти [41].

Гриб *G. lucidum* належить до базидіоміцетів, що спричиняють білу трухлявину деревини. Плодові тіла гриба синтезують мультиферментний комплекс, що призводить до деградації лігніну [4, 7]. Ці ферменти можуть бути використані у різних біотехнологічних процесах.

Встановлено три основні групи ензимів лігнолітичної дії *G. lucidum*. Це лаккази, марганецьзалежні пероксидази, лігнінпероксидази. Вони здатні окиснювати фенольні сполуки з утворенням фенокси-радикалів. Нефенольні сполуки окиснюються через утворення катіонних радикалів. Лігнінпероксидази та марганецьзалежні пероксидази окиснюють нефенольні ароматичні сполуки з високим окисно-відновним потенціалом, до яких належить більшість компонентів лігніну. Лаккази окиснюють нефенольні ароматичні сполуки з відносно низьким окисно-відновним потенціалом [37].

Цій групі ферментів вчені надають найбільшу увагу, оскільки лаккази є ключовими у процесі деградації лігніну. Лаккази відносять до класу мідьвмісних оксидаз, що каталізують реакцію відновлення молекулярного кисню різними органічними і неорганічними сполуками безпосередньо до води, минаючи стадію утворення перекису водню [4, 7]. Здатність лакказ каталізувати реакцію електровідновлення кисню по безмедіаторному механізму привертає увагу до вивчення кінетичних та електрокаталітичних властивостей ферменту як перспективного каталізатору електродних процесів [7].

Властивості лакказ дають можливість широкого використання цих ферментів в целюлозно-паперовій промисловості для делігніфікації паперової пульпи, у текстильній промисловості для відбілювання тканин, для детоксикації і знебарвлення стічних вод, для біодеградації ксенобіотиків, для створення антимікробних композицій, у харчовій та косметичній промисловості, при отриманні деревоволокнистих плит без застосування токсичних сполук, при виробництві м'яких засобів, при розробці катодів біопаливних елементів та інших галузях [4, 7, 37].

Сучасні літературні джерела повідомляють про цілий ряд фармакологічних властивостей речовин, отриманих з плодових тіл, культурального міцелію або культуральної рідини *G. lucidum*: імуномодулюючі, антиатеросклеротичні, протизапальні, беззаспокійливі, протипухлинні, а також про радіопротекторні, антибактеріальні, противірусні, гіполіпідемічні, антифіброзні, гепатопротекторні, антидіабетичні, антиоксидантні, противиразкові [1, 41]. Трутовик лакований визнається як альтернативний або допоміжний засіб при лікуванні лейкемії, раку, гепатиту, діабету.

Активно вивчаються механізми дії продуктів метаболізму гриба на системи організму людини і тварин. Але саме в цій сфері залишається чимало недосліджених питань.

Біологічна активність метаболітів *G. lucidum* може бути зумовлена здатністю їх стимулювати, пригнічувати або регулювати імунні процеси організму. Чимало наукових джерел повідомляють про те, що екстракти з плодових тіл та культурального міцелію *G. lucidum* мають вказану активність. Одним із підходів до оцінки потенційної імуномодулюючої активності є визначення здатності конкретної речовини впливати на специфічні імунні функції [45]. Оскільки макрофаги є першою лінією захисту організму від бактеріальної інфекції і пухлиноутворення, вони відіграють важливу роль в ініціюванні адаптивної імунної відповіді. При цьому залежно від мікрооточення макрофаги можуть синтезувати продукти з про- або протизапальною дією. Найбільш ефективними стимуляторами макрофагів є поліцукриди *G. lucidum*, особливо β -D-глюкани [40].

Вивчено не тільки окремі речовини з гриба, але й їх суміші, отримані за допомогою різних розчинників.

Екстракти з *G. lucidum* (наприклад, фракція поліцукридів, метанольний екстракт) мають мітогенну активність щодо спленоцитів (клітин селезінки) мишей та до моноцитів периферійної крові людини в присутності різних імуностимулюючих або імунопригнічуючих агентів [25].

Очищена фракція протеогліканів з плодових тіл *G. lucidum* стимулює залежно від дози спленоцити мишей, активує макрофаги, сприяє зростанню рівня ІЛ-1 β , та експресії генів ІЛ-12p35 та ІЛ-12p40, а також значно підвищує синтез NO, що є важливим хімічним посередником у багатьох біологічних процесах [45]. Подібний ефект спостерігали при дослідженні цитотоксичності щодо клітин мишачої лейкемії L 1210. Виділений з *G. lucidum* β -D-глюкан — ганодеран, активував продукцію макрофагами NO. Залежно від кількості NO прямо пропорційно зростав рівень цитотоксичності [17].

Попередні дослідження показали, що під впливом поліцукридних похідних спостерігається стимуляція продукції гамма-інтерферону. Гамма-інтерферон, у свою чергу, може сприяти диференціації і активації дендритних клітин (ДК), які є антигенпрезентуючими і представляють антигени Т-клітинам. Т-клітини в свою чергу активуються. Таким чином непряма активація Т-клітин може бути забезпечена через активацію ДК [39].

Встановлено, що лужний екстракт з культурального міцелію *Ganoderma lucidum*, що містить 10% вуглеводів та 49% білків, має здатність активувати класичний та альтернативний шляхи системи комплементу [30].

Показано, що водний та етанольний екстракти з плодових тіл ганодерми здатні збільшувати число натуральних кілерів (НК) [15]. Низка біологічно активних сполук ганодерми здатна зменшувати проявлення алергійних реакцій за рахунок блокади вивільнення гістаміну. Як вказано в роботах [13, 34], водний екстракт з плодового тіла *G. lucidum*



може інгібувати вивільнення гістаміну з тучних клітин у щурів. Такі самі властивості має і циклооктосірка [34]. Крім того, відомо, що вивільнення гістаміну у щурів, індуковане сполукою 48/80 та конканаваліном А, може бути пригнічене ганодеровими кислотами С і D [41].

Встановлено антимікробну активність екстрактів, отриманих з плодкових тіл та міцелію *G. lucidum*, що виявляється на грампозитивних та грамнегативних бактеріях. Механізми такої активності недостатньо вивчені.

Відомо, що водні екстракти з *G. lucidum* здатні пригнічувати ріст близько 15 видів грампозитивних та грамнегативних бактерій. Встановлено адитивний ефект екстрактів у поєднанні з різними антибіотиками [43].

Метанольний та петролейний екстракти з плодкових тіл ганодерми показали інгібуючу активність по відношенню до антибіотикорезистентного штаму *Staphylococcus aureus* [32]. Відомо, що екстракти з плодкових тіл ганодерми можуть пригнічувати ріст бактерій родів *Bacillus* і *Salmonella*, а також *Escherichia coli* та *Helicobacter pylori* [21, 32].

У досліді з паперовими дисками, просоченими водними екстрактами з глибинного міцелію ганодерми, спостерігали затримку росту грампозитивних бактерій *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, в той час як до грамнегативних бактерій антагоністичної дії виявлено не було [24].

Гексановий екстракт з зануреного міцелію ганодерми здатен пригнічувати повністю ріст *B. cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, дихлорметановий екстракт — *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus epidermidis*. Етилацетатний екстракт повністю інгібує ріст *S. aureus*, *L. monocytogenes* [24]. Метанольний екстракт пригнічує ріст — *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* [21].

Метаболіти, що продукуються грибами *G. lucidum*, можуть пригнічувати розвиток вірусних інфекцій. Механізм антивірусного ефекту може полягати в запобіганні адсорбції вірусної частки на клітині, блокуванні вірусних ферментів і синтезу нуклеїнових кислот вірусів, а також у стимуляції імунної системи організму [14]. Компоненти, виділені з *G. lucidum*, зокрема, поліцукриди та тритерпеноїди, можуть інгібувати реплікацію вірусів герпесу, гепатиту В, вірусу імунодефіциту людини та інших вірусів [14].

Тритерпеноїди, люциденова кислота О і люциденовий лактон, ганодеріол F, ганодерманонтріол, ганодермова кислота В, ганодеріол В, ганодермова кислота Н, ганодеріол А, виділені з плодкових тіл і міцелію *G. lucidum*, здатні інгібувати реплікацію ВІЛ [28, 31].

Вірус Епштейна-Бар, за сучасними поглядами, здатен впливати на формування ракових клітин в організмі людини. Про дослідження активності грибних екстрактів проти цього вірусу даних небагато, проте відомо, що деякі ланостанові тритерпеноїди, виділені з *G. sinense*, *G. applanatum*, *Zingiberaceae rhizomes*, *Hebeloma versipelle* здатні пригнічувати його реплікацію [14, 18, 33].

Нещодавно показано, що речовини базидіальних грибів здатні інгібувати віруси рослин [19]. Механізми дії поліцукридних екстрактів щодо вірусної інфекції рослин залежать від їх походження і структурних особливостей: ступеню полімеризації, заряду молекули, розгалуженості ланцюга, типу глікозидних зв'язків, молекулярної маси [19]. Показано, що сумарні поліцукридні екстракти, отримані з культурального середовища *G. lucidum* і *G. applanatum*, а також глюкан з міцелію *G. adspersum* пригнічують утворення індукованих вірусом тютюнової мозаїки некрозів на всіх видах рослин-індикаторів. Проте активність сумарних поліцукридних екстрактів, отриманих з *G. lucidum* і *G. applanatum*, була значно нижчою, порівняно з глюканом з міцелію *G. adspersum* [6].

Відомо, що поліцукриди (β -D-глюкани, гетерополіцукриди) і глікопротеїни, виділені з грибів *G. lucidum*, демонструють протипухлинну активність проти саркоми 180 у дослідах на мишах. Тритерпеноїди, такі як ганодерові кислоти T-Z, виділені з цього гриба, мають цитотоксичний ефект на клітини гепатоми у дослідах *in vitro* [36].

Такі речовини як ланостаноїди (3- β -гідроксил-26-оксо-5- α -ланоста-8,24-дієн-11-он) і стероїди (ергоста-7,22-дієн-3 β ,3 α ,9 α -тріол), виділені з плодових тіл ганодерми показують пригнічувальний ефект проти KB-клітин (лінія клітин епідермальної носоглоткової карциноми) та PLC/PRF/5 (лінія клітин гепатоми) людини *in vitro* [36].

Механізм протипухлинної активності ганодерми досить складний. Основу його складає стимуляція речовинами гриба імунної системи людини. Вважається, що серед усіх відомих речовин гриба, найбільший антитуморогенний ефект мають саме поліцукриди — β -D-глюкани [10]. Ці сполуки сприяють активації Т-хелперів, НК-клітин та інших клітин-ефекторів. Все це призводить до збільшення продукції цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин (ФНП- α), інтерлейкінів (ІЛ), інтерферонів (ІНФ), оксиду азоту (NO) і антитіл.

Встановлено, що сполуки, отримані з *G. lucidum*, інгібують ріст K562 (клітин лейкемії) залежно від дози і часу [46].

Метаболіти ганодерми сприяють пригніченню активності ДНК-полімерази і посттрансляційних модифікацій онкобілків [31].

Отже, дані літератури свідчать про високу ефективність метаболітів грибів *G. lucidum* за різних захворювань. В цій сфері є багато нерозкритих питань щодо біологічно активних сполук та механізмів їх дії, взаємодії з лікарськими препаратами.

Відомо, що у клінічних дослідженнях метаболіти *G. lucidum* з успіхом застосовуються в терапії окремо та у комбінації з іншими лікарськими травами і хіміотерапевтичними препаратами вже багато років, в основному в країнах Азії [10, 34]. Незважаючи на це, у вітчизняній літературі практично відсутні повідомлення про рандомізовані, плацебо-контрольовані клінічні дослідження ефективності сполук ганодерми.

Автори сподіваються, що дана публікація приверне увагу вітчизняних дослідників, а також медиків, фермерів та бізнесменів у галузі фарма-



цвітничої промисловості до цієї перспективної наукової та практично важливої проблеми.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автономова А.В. Противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства гриба бессмертия *Ganoderma lucidum* // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. — 2007. — С. 216–224.
2. Дудка И.А., Бисько Н.А. Культивирование съедобных грибов. — Киев: Урожай, 1992. — 160 с
3. Иванова Т.С., Бисько Н.А. Біологічно-активні речовини грибів відділу *Basidiomycota* // Проблеми харчування. — 2010. — № 2. — С. 42–47.
4. Королева О.В. Лакказы базидиомицетов: свойства, структура, механизм действия и практическое применение/Диссертация...доктора биологическх наук. — Москва, 2006.
5. Оводов Ю.С. Полисахариды грибов, мхов и лишайников, структура и биологическая активность // Проблемы химии древесины и лесохимии. Тр. Коми НЦУрОРАН. Сыктывкар, 1997. — С. 21–30.
6. Поліщук О.М. Глікани базидіомицетів як інгібітори ВТМ-інфекції та індуктори вірусостійкості рослин // Дис.кандидата біологічних наук. — Київ-2011.
7. Шлеев С.В., Зайцева Е.А. Спектральное и электрохимическое изучение лакказ базидиальных грибов // Вестник Московского университета, сер.2, Химия. — 2003. — Т. 44. — № 1. — С. 35–39.
8. Aoki T., Chirigos M.A. Immune modulation agents and their mechanisms. — Basel:N-Y. — 1984. — P. 63–77.
9. Benny K. H. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional chinese medicinal herbs: a review // Curr. Med. Chem. — 2004. — № 11. — P. 1423–1430.
10. Bhagwan S., Gulab S. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2009. — V. 10. — № 8. — P. 717–742.
11. Bisko N.A., Bilay V.T. Biologically substances from mycelia of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* // Mushroom Sci. — 2004. — V. 16. — P. 619–625
12. Bojana B. Isolation and quantification of triterpenoid acids from *G. applanatum* of Istrian origin // Food technol. biotechnol. — 2000. — V. 38, № 1. — P. 11–18
13. Gao Y. A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr), P. Karst. extract (ganopoly) in patients with advanced cancer // Int. J. Med. Mush. — 2002. — V. 4. — № 3. — P. 207–214.
14. Gao Y. Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. species (Aphyllphoromycetidae): a review // Int. J. Med. Mush. — 2003. — V. 5. — № 3. — P. 235–246.



15. Ha C.L. The inhibitory effect of the Chinese herb *Ganoderma lucidum* mycelium on gut immunoglobulin. A responses to cholera toxin in mice // Nut. Res. J. — 2003. — V. 23. — № 25. — P. 691–701.
16. Haak-Frendscho M. Ling Zhi-8: a novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression // Cell. Immun. J. — 1993. — № 150. — P. 101–113.
17. Han M.D. Production of nitric oxide in RAW 264.7 macrophages treated with ganoderan, the beta-glucan of *Ganoderma lucidum* // Korean. J. Med. Mycol. — 1998. — № 26. — P. 246–255.
18. Hong J.S., Chen Q. A new cytotoxic lanostane triterpenoids from the basidiomicete *Hebeloma versipelle* // The Japan journal antibiotics. — 2005. — V. 58. — № 12. — P. 828–831.
19. Hui S. A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushrooms *Agrocybe aegerita* // J. Biochem. Mol. Biol. — 2003. — V. 36. — P. 214–222.
20. Jun-Wei Xu Biotechnological production and application of ganoderic acids // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2010. — V. 87, № 2. — P. 457–466.
21. Kamra A. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extracts against human pathogenic bacteria // Int. J. Pharm. Pharm. Sci. — 2012. — V. 4, Is. 2. — P. 359–362.
22. Kim H.W., Kim B.K. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphomycetidae) // Int. J. Med. Mush. — 1999. — V. 1. — № 2. — P. 121–138.
23. Lindequist U., Timo H.I. The pharmacological potential of mushrooms // eCAM. — 2005. — V. 2. — № 3. — P. 285–299.
24. Lyndal M.R. Australian *Ganoderma*: identification growth and antibacterial properties / Submitted in total fulfillment of the requirement for the degree of Doctor of Phylosophy. — July 2004.
25. Mao T. Two mushrooms, *Grifola frondosa* and *Ganoderma lucidum*, can stimulate cytokine gene expression and proliferation in human T lymphocytes // Int. J. Immunother. — 1999. — V. 15. — P. 13–22.
26. Mau J.L. Antioxidant properties of several medicinal mushrooms // J. Agric Food Chem. — 2002. — № 3. — P. 6072–6077.
27. Marchessault R.H. X-ray diffraction data for β -D-glucan // Canadian journal of chemistry. — 1977. — V. 55. — P. 300–303.
28. Menendez-Arias L. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance // Trends in pharmacological sciences. — 2002. — № 23. — P. 381–388.
29. Min B.S., Gao J.J. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells // Chemical & Pharmaceutical Bulletin. — 2000. — № 48. — P. 1026–1033.
30. Mizuno T. Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects // Food. Rev. Int. — 1995. — V. 11. — № 1. — P. 151–166.



31. Mizushima Y. A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases // BBRC — 1998. — № 249. — P. 17–22.
32. Prasad Y. Antibacterial activity of the bio – multidrug (*Ganoderma lucidum*) on multidrug resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // Advanced biotech. — 2008. — P. 9–16.
33. Qiao Y., Zhang X. Two novel lanostane triterpenoids from *G. sinense* // Molecules. — 2007. — V. 12. — P. 2038–2046.
34. Russel R., Paterson M. *Ganoderma* – a therapeutic fungal biofactory // Phytochemistry. — 2006. — V. 67. — P. 1985–2001.
35. Tanaka S., Kerry Ko Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein Ling Zhi (LZ-8) // JBC — 1989. — V. 264. — № 28. — P. 16372–16377.
36. Toth J.O. Ganoderic acid T and Z: cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Polyporaceae) // Tetrahedron letters. — 1983. — № 24. — P. 1081–1084.
37. Trevor M. Lignin-modifying enzymes of the white rot basidiomycete *Ganoderma lucidum* // AEM — 1999. — V. 65. — № 12. — P. 5307–5313.
38. Wang C.N. The aggregation of human platelet induced by ganodermic acid S // Biochim. Biophys. Acta. — 1989. — V. 986. — P. 15–160.
39. Wang M.Y. Effects of *G. lucidum* triterpenoids on three animal liver-injury models // APS — 2000. — № 35. — P. 326–329.
40. Wang S.Y. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes // IJC — 1997. — V. 70. — P. 699–705.
41. Wasser S.P. Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). Encyclopedia of Dietary Supplements. — Marcel Dekker, 2005. — P. 603–623.
42. Wiwanitkit V. Immunomodulation due to the herbal mushroom, Ling Zhi, and its potential usefulness in oncology // Archives of Hellenic medicine. — 2011. — V. 28, № 3. — P. 400–402
43. Yoon S.Y. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics // Arch. Pharm. Res. — 1994. — № 17. — P. 438–442.
44. Zaidman Ben-Zio Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2005. — V. 67. — P. 453–468.
45. Zhe J. Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum* // J. Ethnopharmacol. — 2007. — P. 5–6.
46. Zhong L. Effects of *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst. compound on the proliferation and differentiation of K652 leukemic cells // Egypt J. Med. Hum. Genet. — 1999. — № 24. — P. 521–524.

Стаття надійшла до редакції 30.01.2012 р.



Ю.Ю. Дуденко, С.Л. Мирось, В.А. Іваниця

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

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ГРИБА *GANODERMA LUCIDUM* (CURT.:FR) P. KARST

Реферат

В обзорной статье приведены современные данные о биологически активных соединениях лекарственного базидиомицета *Ganoderma lucidum* и их действии. Предоставлены химические формулы глюканов и терпеноидов — веществ, определяющих основные лекарственные свойства гриба. Приведена информация о других соединениях, участвующих в формировании целебного действия ганодермы, это: белки и гликопротеины, нуклеотиды и нуклеозиды, стеролы и стероиды, жирные кислоты, алкалоиды, гликозиды, летучие эфирные масла, витамины. Кроме того, ганодерма, как ксилотрофный сапрофит имеет набор лигнолитических ферментов, которые нашли применение в пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной промышленности, а также в процессах биологической очистки. Многими экспериментами подтверждаются иммуномодулирующее, антимикробное, противовирусное и онкостатическое действие. Исследования показывают биологический эффект и механизмы действия продуктов метаболизма *G. lucidum*.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, биологически активные вещества.



Yu. Dudenko, S. Miros, V. Ivanytsia

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

**BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF MEDICAL
MUSHROOM *GANODERMA LUCIDUM* (CURT.:FR)
P. KARST**

Summary

The issue related the current data on the biologically active substances of medicinal basidiomycete *Ganoderma lucidum* and their actions. There were given the chemical formulas glucans and terpenoids – the substances that determine the main medicinal properties of the fungus. There were presented the information on the other substances involved in the forming of the therapeutic effect of *Ganoderma*: they were proteins and glycoproteins, nucleotides and nucleosides, sterols and steroids, fatty acids, alkaloids, glycosides, volatile essential oils and vitamins. In addition, *Ganoderma* as a xylotrophic-saprophyte has the set of ligninolytic enzymes which have been used in food processing, pulp and paper, and textile industries, as well as in the processes of biological treatment. Immunomodulatory, antimicrobial, antiviral and antitumor activities are confirmed by many experiments. The studies show the biological effects and mechanisms of action of *G. lucidum* metabolites.

Key words: *Ganoderma lucidum*, biologically active substances.



УДК 579.841.11.114

Р.В. Грицай¹, О.В. Голубець², О.С. Броварська¹, Л.Д. Варбанець¹

¹Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна,

²Державне підприємство Всеукраїнський державний науково-виробничий центр
стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживача,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

ЛІПОПОЛІСАХАРИДИ *RALSTONIA* *SOLANACEARUM*: ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ

*Вивчення ендотоксичної активності свідчить про відносну нетоксичність (1–1,25 мг/кг маси тварини) ліпополісахаридів (ЛПС) більшості досліджуваних штамів *Ralstonia solanacearum* у порівнянні з ЛПС ентеробактерій. Винятком виявився ЛПС *R. solanacearum* 749, що проявив вищу (0,4 мг/кг маси тварин) токсичність. За пірогенною дією ЛПС штами *R. solanacearum* можна розділити на дві групи. ЛПС першої групи штамів (*R. solanacearum* 749, 758, 52 і 4) на другу годину після введення експериментальним тваринам викликали деяке зниження температури у кролів з тенденцією до її нормалізації і протягом третьої години значення температур досягли майже вихідних показників. ЛПС другої групи штамів (*R. solanacearum* 35, TX₁, TS₃, 7954) приводили до підвищення температури експериментальних тварин більше ніж на +0,45 °C, що виходить за межі фізіологічної норми здорових тварин. Вивчення ЛПС дослідних штамів *R. solanacearum* виявило високий рівень гетерогенності між ними за кількісним та якісним жирнокислотним складом.*

*Ключові слова: ліпополісахариди, жирнокислотний склад, *Ralstonia solanacearum*, токсичність, пірогенність.*

Ліпополісахариди (ЛПС), як амфифільні компоненти зовнішньої мембрани клітинної оболонки грамнегативних бактерій проявляють біологічну активність після виходу із складу бактеріальної клітини у внутрішнє середовище організму тварин. Ініціація сигнальних шляхів імунної системи розпочинається із зв'язування ліпиду А — активного начала ендотоксинів із поверхнею клітин за посередництва рецептора TLR4, наслідком чого стає експресія ними ряду цитокінів та хемокінів запального процесу.

© Р.В. Грицай, О.В. Голубець, О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець, 2012



Вуглеводній частині ЛПС відводиться роль модулятора біологічної активності, головним чином за рахунок участі у формуванні супрамолекулярної структури ендотоксинів у рідкому середовищі [4].

Доведеною є роль жирнокислотного складу ліпиду А в інтенсивності прояву ендотоксичних властивостей ліпополісахаридів, причому має значення не тільки кількість та довжина ацильних замісників, але і стереоізомерія ненасичених жирних кислот [7]. Структура ліпиду А є найбільш консервативною частиною молекули ЛПС. Він утворений β -(1-6)-диглюкозаміном, фосфорильованим в положеннях 1 та 4' і ацильованим первинними 3-гідроксикислотами у положеннях 2 і 3 кожної молекули глюкозаміну. Через гідроксильні групи первинних жирних кислот можуть бути приєднані вторинні ацильні залишки [5].

Характерним прикладом подібності композиції ліпиду А бактерій різних екологічних ніш існування можуть бути представники спорідненого до *Ralstonia solanacearum* роду *Burkholderia*, серед яких зустрічаються мешканці ґрунтів, водойм, паразити комах та хребетних тварин, рослин. З хімічної точки зору ліпід А бактерій цього роду відрізняється присутністю залишку 4-аміно-4-дезоксид-арабінопіранози та в незначній мірі — ступенем ацилювання [11].

Що стосується ліпиду А *R. solanacearum*, то в літературі немає даних про його структуру, проте за результатами хімічного аналізу, встановлено що переважаючими жирними кислотами ЛПС є $C_{14:0}$, 3-ОН- $C_{14:0}$, 3-ОН- $C_{16:0}$, 3-ОН- $C_{18:0}$ [1, 6]. Токсичність і пірогенність ЛПС *R. solanacearum* коливалися в широких межах, залежно від штаму [14]. Невідомим залишається біологічне значення варіації композиції ліпиду А для фітопатогенних бактерій.

Метою даної роботи є встановлення біологічної активності (токсичності і пірогенності) ЛПС штамів *R. solanacearum* — представників віддалених внутрішньовидових груп та кореляція її з жирнокислотним складом ліпиду А.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було 8 штамів *R. solanacearum* різного географічного походження: новозеландської (749, 758, 7954), в'єтнамської (ТХ₁, ТS₃) колекцій та колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного (4, 35, 52б).

Культури бактерій вирощували на картопляному агарі та рідкому синтетичному середовищі N [15] при 28 °С, протягом 31—70 годин.

Ліпополісахариди отримували водно-фенольною екстракцією висушених ефіром та ацетоном клітин. Отримані препарати очищали від низькомолекулярних домішок діалізом проти водогінної, а потім дистильованої води. Очистку ЛПС від нуклеїнових кислот здійснювали шляхом осадження ТХУ і ультрацентрифугування (104000 g, 4 год), після чого ліофілізували [2].



Токсичну дію ЛПС вивчали на здорових білих мишах (4 тварини на кожну серію розведення) вагою 19–21 г, попередньо сенсibilізованих 3,2% D-галактозамінгідрохлоридом в непірогенному стерильному розчині 0,9% NaCl, після чого негайно вводили внутрішньочеревинно підігрітий до 37 °С розчин. У серії розведень ЛПС (8–50 мкг/мл) визначали дозу препарату, що викликає загибель 50% тварин (LD_{50}), яку використовували для оцінки токсичності. Спостереження за тваринами проводили протягом 48 год [13]. Пірогенну дію ЛПС вивчали на кролях (по 3 тварини на кожний дослід) вагою 2–3,5 кг шляхом внутрішньовенного введення мінімальної пірогенної дози (МПД), встановленої в серії розведень, з наступною термометрією тварин протягом 3 год [3].

Для визначення жирнокислотного складу препарату гідролізували в 1,5% розчині хлористого ацетилю в метанолі (попередньо охолоджену) при температурі 100 °С в запаяних ампулах протягом 4 год. Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували тричі гексаном (по 3 мл). Фракцію n-гексану відбирали і висушували на вакуумному випаровувачі. Аналіз отриманих метилових ефірів жирних кислот та препаратів моносахаридів проводили на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent Technology HP-6890. Колонка CP-Wax 58 (FFAP), довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,32 мм, товщина фази 1,2 мкм. Температура інжектора 250 °С, детектора 280 °С, швидкість потоку через колонку 2,5 мл/хв., газ-носії — гелій. Ділення потоку 1:20. Обробку результатів проводили з використанням комп'ютерної бази даних та стандартної суміші метилових ефірів жирних кислот. Досліди проведені в трьох повторностях.

Статистичне опрацювання експериментальних даних проводили за допомогою ком'ютерних програм Microsoft Excel 2000.

Результати та обговорення

Для оцінки токсичності ЛПС досліджених штамів *R. solanacearum* (758, 7954, 749, TX₁, TS₃, 4, 35, 52б) визначали дозу препарату ЛПС, яка при внутрішньочеревинному введенні галактозамінгідрохлорид-сенсibilізованим мишам викликала загибель 50% експериментальних тварин (LD_{50}). Для більшості досліджуваних штамів токсичність ЛПС знаходилась в межах 1–1,25 мг/кг маси тварини (рис. 1). Винятком є ЛПС штаму 749, що проявив вищу токсичність (доза LD_{50} становила 0,4 мг/кг). Слід зазначити, що отримані результати вказують на відносну нетоксичність ЛПС *R. solanacearum* при порівнянні з ЛПС ентеробактерій [8].

Для проведення порівняльної оцінки пірогенних властивостей ЛПС досліджуваних штамів *R. solanacearum* була встановлена їх мінімальна пірогенна доза, яка складала $7,5 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл апірогенного ізотонічного розчину. Протягом першої години після введення ЛПС відбулося підвищення температури у піддослідних тварин, імунізованих *R. solanacearum* 749, 758, 4, 35, TS₃. У кролів, імунізованих *R. solanacearum* TX₁ і 7954, після першої години температура не перевищувала порогу пірогенності.



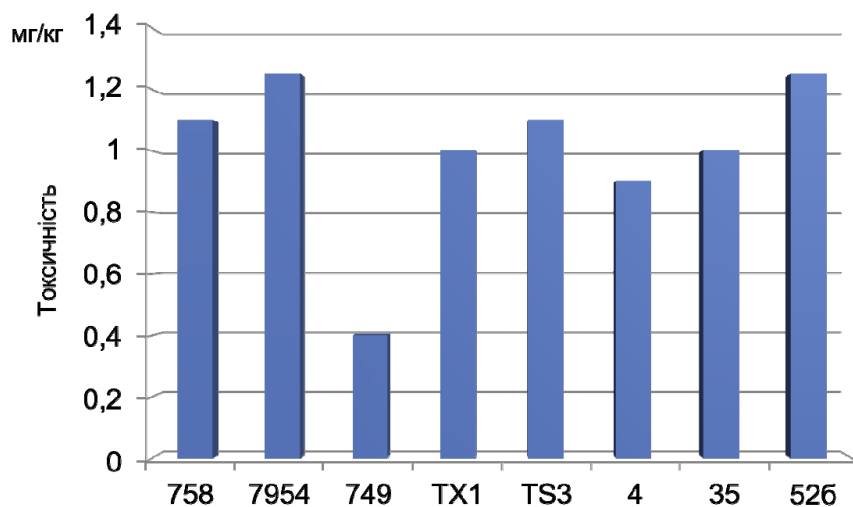


Рис. 1. Токсичність ЛПС *R. solanacearum* штамів: 758, 749, 7954, TX₁, TS₃, 4, 35, 526

Fig. 1. Toxicity of *R. solanacearum* LPS strains: 758, 749, 7954, TX₁, TS₃, 4, 35, 526

На другу годину штами *R. solanacearum* розділилися на дві групи: під дією ЛПС першої спостерігалася деяке зниження температури кролів з тенденцією до її нормалізації і протягом третьої години значення температур досягли майже вихідних показників (штами 749, 758, 526 і 4); ЛПС другої групи (штами 35, TX₁, TS₃, 7954) викликали підвищення температури експериментальних тварин більш ніж на +0,45 °С, що виходить за межі фізіологічної норми здорових тварин (рис. 2). За динамікою зміни температури виділяється *R. solanacearum* шт. 4, введення якого викликало стрімке підвищення температури тварин через годину, однак потім спостерігалася зниження її нижче за нормальну фізіологічну температуру тіла.

Відомо, що особливості будови ліпиду А визначають інтенсивність прояву його біологічних властивостей. На прикладі ентеробактерій показано, що токсичність ліпиду А залежить від якісного жирнокислотного складу та пропорційної кількості ацильних замісників і ступеню фосфорилування диглюкозаміну [7]. Однак поширення встановлених закономірностей на ендотоксини непатогенних для тварин бактерій потребує підтвердження.

Вивчення ЛПС дослідних штамів *R. solanacearum* виявляє високий рівень гетерогенності між ними за кількісним та якісним жирнокислотним складом (таблиця). Аналіз відмінностей за вмістом гідроксильованих жирних кислот у складі ЛПС, присутність яких є облігатною для прояву ендотоксичності ентеробактерій, показав, що ЛПС штаму *R. solanacearum* 35, із найбільшим вмістом 3-гідрокситетрадеканової кислоти, не виділяється за токсичністю, хоча проявляє відносно високий рівень пірогенності. В той

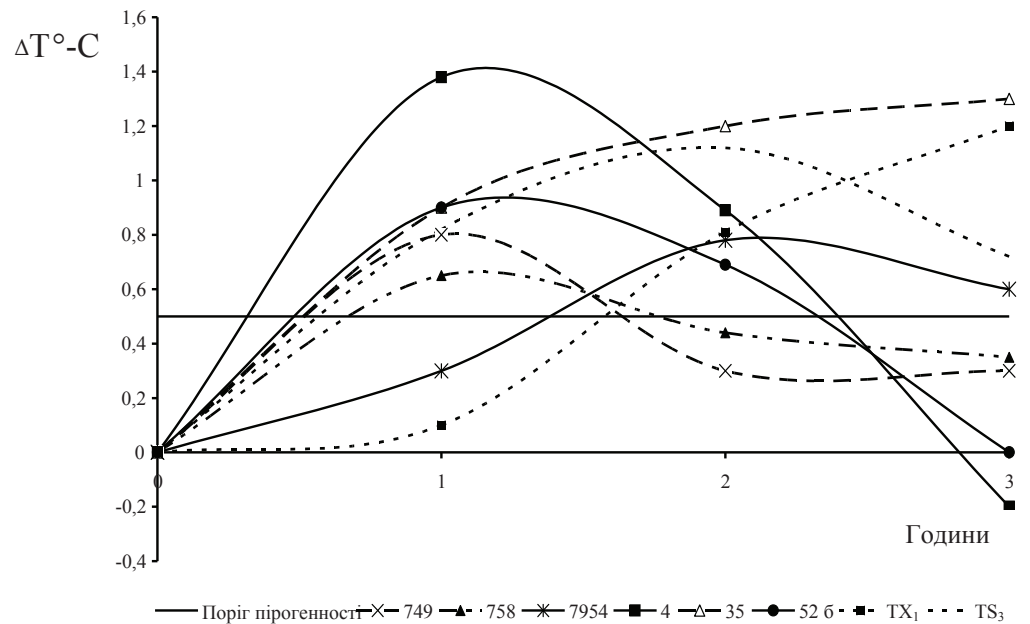


Рис. 2. Пірогенність ЛПС *R. solanacearum* штамів: 749, 758, 7954, 4, 35, 526 TX₁, TS₃

Fig 2. Pyrogenicity of *R. solanacearum* LPS strains: 749, 758, 7954, 4, 35, 526 TX₁, TS₃

час як висока токсичність ЛПС штаму 749 *R. solanacearum* супроводжується помірним вмістом гідроксикислот ліпиду А. Штами *R. solanacearum* TX₁, і 35, ЛПС яких характеризувалася максимальною пірогенністю та однаковим рівнем токсичності, виділяються підвищеним вмістом гексадецевої кислоти та в цілому виявляють подібності за жирнокислотним складом. Зокрема це стосується підвищеного вмісту, щодо ЛПС інших досліджуваних штамів, 3-гідроксидодеканової кислоти. Привертає увагу неможливість ідентифікації в ліпіді А *R. solanacearum* 526 гідроксикислот взагалі. Причиною останнього може бути не повний гідроліз ліпиду А, про що свідчить підвищений вміст гексадеканової кислоти в ЛПС цього штаму. Це саме стосується також ЛПС *R. solanacearum* 749 та 4, що продемонстрували найвищий рівень токсичності, та може бути обумовлено заниженими значеннями вмісту гідроксикислот. Всі досліджувані ЛПС характеризувалися присутністю тетрадеканової, гексадеканової, октадеканової та октадецевої кислот. *R. solanacearum* TX₁ TS₃ вирізняються відсутністю 3-гідрокситетрадеканової кислоти.

Отримані результати не розкривають загальних закономірностей залежності рівня біологічної активності досліджуваних ЛПС від їх жирнокислотного складу. Імовірно, що ендотоксичність аналізованих



Таблиця

Жирнокислотний склад (%) ЛПС *R. solanacearum*

Table

Fatty acid composition of LPS *R. solanacearum*

Жирна кислота	Штам <i>R. solanacearum</i>										TX ₁	TS ₃	
	749	758	7954	4	35	526	526	526	526	526			
C _{12:0}	-	-	1,80±0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28,53±1,42
3-OH-C _{12:0}	0,69±0,03	0,29±0,01	3,50±0,18	3,10±0,16	4,48±0,21	5,43±0,28	3,73±0,18	3,73±0,18	3,73±0,18	3,73±0,18	3,73±0,18	3,73±0,18	0,53±0,03
C _{14:0}	40,64±2,03	2,38±0,12	13,64±0,69	2,99±0,14	1,83±0,09	-	11,70±0,51	11,70±0,51	11,70±0,51	11,70±0,51	11,70±0,51	11,70±0,51	38,72±1,93
3-OH-C _{14:0}	2,12±0,11	-	2,61±0,14	5,12±0,25	72,93±3,64	18,14±0,91	-	-	-	-	-	-	-
C _{16:0}	7,97±0,39	29,18±1,45	26,95±1,34	7,90±0,36	5,14±0,26	-	34,34±1,17	34,34±1,17	34,34±1,17	34,34±1,17	34,34±1,17	34,34±1,17	21,67±1,08
C _{16:1}	1,16±0,05	1,31±0,07	-	8,18±0,31	9,57±0,47	-	-	-	-	-	-	-	1,53±0,03
3-OH-C _{16:0}	0,25±0,01	1,58±0,08	4,92±0,25	0,90±0,04	-	6,12±0,31	2,10±0,01	2,10±0,01	2,10±0,01	2,10±0,01	2,10±0,01	2,10±0,01	0,48±0,02
C _{18:0}	1,80±0,09	12,05±0,6	12,75±0,63	4,66±0,23	0,71±0,03	5,48±0,29	14,40±0,71	14,40±0,71	14,40±0,71	14,40±0,71	14,40±0,71	14,40±0,71	1,80±0,09
C _{18:1}	1,42±0,07	21,48±1,07	9,75±0,49	6,41±0,32	2,27±0,11	5,26±0,26	16,42±0,82	16,42±0,82	16,42±0,82	16,42±0,82	16,42±0,82	16,42±0,82	1,27±0,06
тC _{18:1}	0,85±0,04	17,18±0,85	16,99±0,82	35,40±1,77	1,67±0,08	59,57±2,97	17,31±0,86	17,31±0,86	17,31±0,86	17,31±0,86	17,31±0,86	17,31±0,86	5,47±0,28
C _{19:0}	43,10±2,15	14,55±0,73	7,09±0,35	25,31,264±	1,40±0,06	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка. «->» – жирна кислота не виявлена



препаратів обумовлюється факторами, які не охоплені в даному дослідженні, серед яких: конформація ацильних замісників ліпиду А, ступінь фосфорилювання диглюкозаміну і, як було показано в дослідженнях останніх років — композиція вуглеводної частини молекули, яка разом із фізико-хімічними факторами середовища обумовлює особливості супрамолекулярної структури ЛПС. Завдяки амфифільній природі молекули ендотоксинів при концентраціях вищих за 10^{-7} М (критична міцелярна концентрація) у фізіологічних розчинах формують тривимірні агрегати з молекулярною масою 0,3—1,0 МДа [16].

Згідно з сучасними уявленнями, біологічна активність ендотоксинів реалізується через афінну взаємодію із мембранними рецепторами макроорганізму, чому передує інтеграція доменів молекул ЛПС у ліпідний бішар клітини-мішені [12].

В результаті численних досліджень було встановлено, що ендотоксичність корелює зі здатністю ЛПС утворювати неламелярні тривимірні структури (кубічні або гексагональні) що, враховуючи гомеостаз внутрішнього середовища організму, обумовлюється хімічною структурою ліпиду А. Так, типові ЛПС ентеробактерій, диглюкозамін у ліпіді А яких ацильований жирними кислотами з довжиною вуглецевого ланцюга 10—16, характеризуються максимальним рівнем ендотоксичності. Варіації хімічного складу ЛПС, що відрізняються від вищеописаних, характеризуються нижчою біологічною активністю, однак залежність її рівня від хімічної структури є складно прогнозованою [7]. При цьому може мати місце модифікувальний вплив ендотоксично менш активних варіантів ліпиду А (із редукованим вмістом ацильних замісників), що хоч і в меншій кількості, завжди присутні в пулі повноцінних за складом молекул. Це явище було розкрито, зокрема в досліді з використанням синтетичних компонентів 506 та 406 (гекса- та тетраацил ліпиду А, відповідно) [9, 10]. Комбіновані препарати, що містили у своєму складі до 20% компоненту 406 (який є біологічно малоактивним) виявилися більш ендотоксичними, ніж чистого компоненту 506. Включення тетраацил ліпиду А, температура плавлення якого менша, призводило до збільшення вільної енергії взаємодії молекул ендотоксинів, і як наслідок, зростання спорідненості гексаацил ліпиду А до протеїнових рецепторів. Ці та ряд інших досліджень формують нову концепцію ендотоксичності, де функціональною одиницею біологічної активності є не окрема молекула, а впорядкована структура із молекул ЛПС (міцела).

Як було показано в актуальному та попередніх дослідженнях [14], ЛПС *R. solanacearum* характеризується багатокомпонентним жирнокислотним складом. Це дає підстави стверджувати про гетерогенність ліпиду А у представників цього виду, а відповідно формування ЛПС міцел складної композиції, із важкопрогнозованими біологічними властивостями.



Автори висловлюють щирю подяку зав. кафедрою мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, проф., докт. біол. наук Іваниці В.О., а також пров. інж. ІМВ НАН України Н.В. Житкевич за люб'язно надані культури *R. solanacearum*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Варбанець Л.Д., Мунас В.А., Гвоздяк Р.И., Васюренко З.П., Рубан Н.М. Липополисахариды *Pseudomonas solanacearum* // Мікробіол. журн. — 1992. — № 2. — С. 26–31.
2. Варбанець Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методи дослідження ендотоксинів. — К.: Наук. думка, 2006. — 237 с.
3. Глазова Н.В. О внедрении современных методов контроля пирогенности фармацевтических объектов // Фарм. производителю. — 2001. — 17, № 3. — С. 23–26.
4. Грицай Р.В., Варбанець Л.Д. Липополисахариди грамнегативних бактерій: структурні особливості, біосинтез, біологічна роль // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 41–59.
5. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides // Carbohydr. Res. — 2003. — V. 338. — P. 2431–2447.
6. Drigues P., Demery-Lafforgue D., Trigalet A., Dupin P., Samain D., Asselineau J. Comparative studies of lipopolysaccharide and exopolysaccharide from a virulent strain of *Pseudomonas solanacearum* and from three avirulent mutants // J. Bacteriol. — 1985. — V. 162, № 2. — P. 504–509.
7. Erridge C., Poxton B.J. Structure and function of lipopolysaccharides // Microbes Infect. — 2002. — V. 4. — P. 837–851.
8. Fujimoto Y., Adachi Y., et al. Synthesis of lipid A and its analogues for investigation of the structural basis for their bioactivity // J Endotoxin Res. — 2005. — V. 11, № 6. — P. 341–347.
9. Kumazawa Y., Nakatsuka M., Takimoto H. et al. Importance of fatty acid substituents of chemically synthesized lipid A-subunit analogs in the expression of immunopharmacological activity // Infect Immun. — 1988 — V. 56, № 1. — P. 149–155.
10. Mueller M., Lindner B., Dedrick R., Schromm A.B., Seydel U. Endotoxin: physical requirements for cell activation // J Endotoxin Res. — 2005. — V. 11, № 5. — P. 299–303.
11. Silipo A., De Castro C., Lanzetta R., Molinaro A., Parrilli M. Complete structural characterization of the lipid A fraction of a clinical strain of *B. cepacia* genomovar I lipopolysaccharide // Glycobiology. — 2005. — V. 15. — P. 561–570.
12. Seydel U., Wiese A., Schromm A., Brandenburg K. A biophysical view on the function and activity of endotoxins // In: Endotoxin in health and disease (Eds. Brade H., Opal S., Vogel S., Morrison D.) Marcel Dekker, Inc. — 1999. — P. 195–219.



13. Takahashi K., Morikawa A., Kato Y. et al. Flavonoids protect mice from two types of lethal shock induced by endotoxin // FEMS Immun. Microbiol. —2001. — V. 31. —P. 29–33.
14. Varbanets L.D., Brovarkaya O.S., Vasiliev V.N., Vinarskaya N.V., Gogoman I.V. Characterization of lipids A of *Ralstonia solanacearum* lipopolysaccharides // Біополімери і клітина. — 2004. — Т. 20, № 5. — С. 398–401.
15. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic *Pseudomonads*: Effect of the carbon source // Appl. Microbiol. — 1967. — V. 15. — P. 1523–1524.
16. Williams K. Endotoxins pyrogens, LAL testing and depyrogenation. — N.Y.: Informa Healthcare, 2007. — 419 p.

Стаття надійшла до редакції 16.01.2012 р.

Р.В. Грицай¹, О.В. Голубец², О.С. Броварская¹, Л.Д. Варбанец¹

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

²Государственное предприятие Всеукраинский государственный научно-производственный
центр стандартизации, метрологии, сертификации и защиты прав потребителя, тел.: +38
(044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

ЛИПОПОЛИСАХАРИДЫ *RALSTONIA SOLANACEARUM*: ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Реферат

Изучение эндотоксической активности свидетельствует об относительной нетоксичности (1–1,25 мг/кг массы животных) липополисахаридов (ЛПС) большинства исследуемых штаммов *Ralstonia solanacearum* в сравнении с ЛПС энтеробактерий. Исключение составлял ЛПС *R. solanacearum* 749, который проявил более высокую (0,4 мг/кг массы животных) токсичность. По пирогенному действию ЛПС штаммы *R. solanacearum* можно разделить на две группы. ЛПС первой группы штаммов на второй час после введения экспериментальным животным вызывали некоторое снижение температуры у кроликов с тенденцией к ее нормализации и в течение третьего часа значения температур достигли почти исходных показателей (*R. solanacearum* 749, 758, 52, 4). ЛПС другой группы штаммов (*R. solanacearum* 35, TX₁, TS₃, 7954) приводили к повышению температуры экспериментальных животных более чем на +0,45 °С, что выходит за пределы физиологической нормы здоровых животных.



Изучение ЛПС исследуемых штаммов *R. solanacearum* выявило высокий уровень гетерогенности между ними по количественному и качественному жирнокислотному составу.

Ключевые слова: липополисахариды, жирнокислотный состав, *Ralstonia solanacearum*, токсичность, пирогенность.

R.V. Gritsay¹, O.V. Golubets², O.S. Brovaraskaya¹, L.D. Varbanets¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv,
154, Academ. Zabolotny str., Kyiv, Ukraine

²State enterprise All-Ukrainian state research and production center for standardization,
metrology, certification and consumers' rights protection

LIPOPOLYSACCHARIDES OF *RALSTONIA SOLANACEARUM*: FATTY ACID COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

The study of endotoxic activity indicates the relative non-toxicity (1–1.25 mg/kg) of lipopolysaccharides (LPS) from the majority of studied *Ralstonia solanacearum* strains comparative to enterobacterial LPS. The exception was LPS *R. solanacearum* 749, which showed a higher (0.4 mg/kg) toxicity. The strains of *R. solanacearum* exhibited division into two groups on the basis of their LPS pyrogenic action. LPS of the first group of strains in the second hour after administration caused decreasing of the temperature in rabbits with a tendency to normalisation and during the third hour, the temperature values reached nearly baseline (*R. solanacearum* 749, 758, 52, 4). LPS of other strains (*R. solanacearum* 35, TX₁, TS₃, 7954) led to increasing of the temperature in experimental animals by more than 0.45 °C, which overcomes the physiological norm of healthy animals.

The study of *R. solanacearum* LPS revealed a high level of heterogeneity in quantitative and qualitative fatty acid composition.

Key words: lipopolysaccharides, fatty acid composition, *Ralstonia solanacearum*, toxicity, pyrogenicity.

N. Limanska¹, T. Ivanytsia¹, Y. Choiset², N. Korotaeva¹,
Zh. Sergeeva¹, J.-M. Chobert², V. Ivanytsia¹, T. Haertlé²

¹Odessa National I.I. Mechnikov University, 2, Dvoryanska str.,
Odessa, 65082, Ukraine

²UR 1268 Biopolymères, Interactions, Assemblages, Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA), BP 71627, rue de la Géraudière, 44316 Nantes Cedex 3, France

EFFECT OF *ENTEROCOCCUS DURANS* BACTERIOCIN ON BACTERIAL WILT AGENT

Abstract

Effect of a bacteriocin produced by Enterococcus durans A5-11 on growth of Ralstonia solanacearum strains and their ability to cause wilt in tomatoes was investigated. Among tested phytopathogenic strains, 33% were sensitive and inhibited as it was shown after spotting bacteriocin on Ralstonia lawns. Minimal inhibitory concentrations and sizes of lysis or inhibition zones varied depending on the strain used for study. The same differences were evidenced for the effect of the bacteriocin on Ralstonia in a liquid medium and when inoculating Lycopersicon esculentum Mill test plants. Treatment of plant roots with the bacteriocin of E. durans A5-11 simultaneously with inoculation with bacteria of a highly susceptible strain R. solanacearum 6189 resulted in diminished number of wilted tomatoes.

Key words: Ralstonia solanacearum, Enterococcus durans, bacteriocin, wilt of tomatoes.

Introduction

Ralstonia solanacearum [32] causes bacterial wilt in a wide range of plant hosts. Depending on its strain, the pathogen infects economically important species from genera *Solanaceae* (potato, tomato, pepper, tobacco, egg plants), *Musaceae* (banana), *Malvaceae* (cotton), *Zingiberaceae* (ginger, curcuma), *Euphorbiaceae* (rubber), etc. [10; 11; 14; 24].

The disease is mostly dangerous in the tropical and subtropical climatic zones with increased humidity, but the infections caused by strains adapted to cold temperatures (race 3) can occur also in temperate climate [20; 30].

As biological control agents used against bacterial wilt, avirulent *Ralstonia* [31], actinomycetes like *Streptomyces coralus* [2] and bacteria of *Pseudomonas* and *Bacillus* genera are the most known [5; 7; 9; 28]. Antagonistic bacteria have been isolated from soil like *Bacillus* spp. inhibiting growth of *R. solanacearum* from *Curcuma alismatifolia* Gagnep. [28], or from plants like *P. fluorescens* found in healthy roots of *Solanum melongena* L. [4]. Among other microorganisms, satisfactory results were

© N. Limanska, T. Ivanytsia, Y. Choiset, N. Korotaeva, Zh. Sergeeva, J.-M. Chobert, V. Ivanytsia, T. Haertlé, 2012



obtained applying *Enterobacter cloacae*, *Pichia guilliermondii*, *Candida ethanolitica* [22; 23], and *Stenotrophomonas maltophilia* [19].

Lactic acid bacteria (LAB) dwell on plant surfaces and can compete therefore with the phytopathogens for nutrients and attachment sites. For instance, *Enterococcus durans* bacteriocin-producing strain was initially isolated from the carrot peel [13].

A biopreparation EM4 containing 90% of other LAB – lactobacilli and the remaining percentage of photosynthetic bacteria, fungi and yeasts – had a positive effect on humus formation in soil resulting in increased growth of test plants [12]. EM4 bacterial mixture has also shown a protection effect against some phytopathogens [3], including *Ralstonia solanacearum* [18]. These results demonstrate the potential of LAB use in agriculture for plants protection against bacterial wilt.

The objective of this work was to estimate the possibility of bacterial wilt control by metabolites of LAB *Enterococcus durans*.

Materials and methods

Ralstonia solanacearum strains used in this study were kindly provided by Dr. L.D. Varbanets: *R. solanacearum* ATCC 11696, ICMP 7859 (bv 1), 7944, 6189, 8202, 749, 4157, 8089, 7954, 758, 7986. Strains VC4, ML, TS3, HL, TX1, KL2, HD2 were kind gifts from the Institute of Agricultural Genetics (Hanoi, Viet Nam). All studied strains were stored in LB-broth with 20% glycerol at –20 °C.

Enterococcus durans A5-11 strain was isolated from Mongol yogurt in BIA-FIP laboratory of INRA, France [1; 8].

Bacteriocin from *Enterococcus durans* A5-11 strain was purified by cation-exchange chromatography, reversed phase chromatography and HPLC-chromatography with CHT-column according to Batdorj et al. [1]. Bacteriocin solutions of different concentrations (0.10–0.03 mg/ml) were stored at +4 °C and –20 °C, and were adjusted to pH 6.8–7.0 before use for test of antagonistic activity.

Initial screening for susceptible strains was performed using double-agar layer method [27]. Pre-poured 1.5% LB agar was overlaid with a soft agar (0.6% LB) containing 10% bacterial culture in an exponential phase of growth. Enterococcal bacteriocin was spotted on the upper agar surfaces (5 µl of each repeat), and Petri dishes were incubated overnight at 28–30 °C. The results of tests were obtained by observation of clear zones of bacteriocin activities. Serial dilutions were made to determine the minimal inhibitory concentrations (MIC) of bacteriocin.

To prove the antagonistic action of proteinaceous enterococcal bacteriocin and to exclude the effect of other compounds in investigated solutions, the samples of bacteriocin were treated with proteinase K (Amersham) according to manufacturer's instructions.

Study of antagonistic effect was also carried out in a liquid medium. Mixtures containing cultures of phytopathogens in exponential phase of growth (50 µl), LB-broth (1 ml), and bacteriocin (500 µl) initial concentrations of 0.2 mg/ml and 0.1 mg/ml were prepared to investigate the dynamics of microbial growth measured by counting viable cells inoculated on Petri dishes with LB-agar and incubated overnight at 28 °C.

Root dipping method was performed immersing roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. cv Odessa pearl plants at a stage of three leaves into different mixtures of bacterial suspensions and antagonistic substances [25] prepared as mentioned below. Tips of roots were preliminarily damaged to insure the penetration of *Ralstonia*. For this part of experimental work, two strains of tested *R. solanacearum* (*R. solanacearum* 6189 and *R. solanacearum* 7859) showing different results in sensitivity were used.

Positive control plant roots were dipped for 1 h into suspensions of 50% of overnight pathogen cultures (concentrations 2–4 x 10⁹ CFU/ml) and 50% of sterilized distilled water (SDW). Negative controls were soaked in SDW for the same time. 50:50% suspensions of overnight *R. solanacearum* cultures and enterococcal bacteriocin (concentration 0.03 mg/ml) were prepared and immediately used for 1 h treatments of plant roots. In such treatment, plants were exposed to pathogens and to antagonistic substance at the same time [18], but without preliminary interaction of *Ralstonia* and antagonistic substances. The control and inoculated tomatoes were planted into commercially available non-sterile nursery soil with abundance of peat (pH 5.8–6.0) and placed in a greenhouse for 2 weeks with 70–75% of humidity and 26–30 °C air temperature. Number of treated plants was 20 of each variant in each of three independent experiments. The results of inoculation were evaluated in 14 days by the following scale [16]: 1 – no visible symptoms; 2 – from 1% to 25% of plants showing wilt symptoms; 3 – from 26% to 50% of plants displaying wilt symptoms; 4 – from 51% to 75% of plants showing wilt symptoms; 5 – greater than 75% of plants with wilt symptoms or dead.

Results and discussion

LAB antagonistic activity *in vitro*. Among 18 investigated *R. solanacearum* strains, 33% showed the susceptibility to enterococcal bacteriocin resulting in clear spots on bacterial lawns. MIC of bacteriocin varied from 1.00 to 0.02 mg/ml.

To prove the suggestion that clear zones resulted from the action of proteinaceous bacteriocin, proteolysis with proteinase K was carried out athen the resulting mixture was spotted on *Ralstonia* lawn. No zone of inhibition or lysis occurred. The obtained results indicate that it was a proteinaceous substance, which caused the decline in bacterial population.

Producer strain (*E. durans* A5-11) could not cause itself the lysis zones around its colonies on *R. solanacearum* 7859 and 6189 strains.



The effect of bacteriocin on target bacteria can differ in solid and liquid media [26]. To investigate this phenomenon in case of antagonistic substance, two strains were chosen showing differences in size lysis or inhibition zones on solid media (*R. solanacearum* 6189 and *R. solanacearum* 7859).

In case of susceptible strain *R. solanacearum* 6189, decline of cell quantity occurred from the first hour of experiment (Fig. 1).

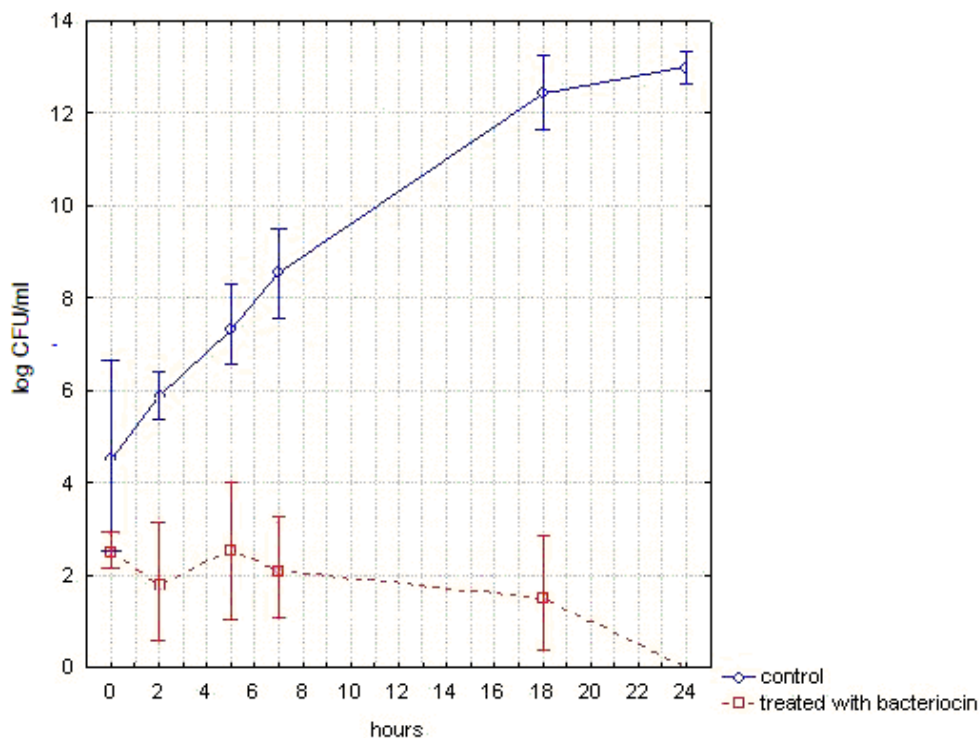


Fig. 1. Growth of *R. solanacearum* 6189 in LB broth in presence of *E. durans* A5-11 bacteriocin (concentration 0.03 mg/ml). Error bars show standard deviation.

After 24 h of incubation no viable cells of *Ralstonia* were recovered from the suspension. Indeed, bacteriocins produced by enterococci are known for their lytic activities [21]. Additionally, the clearing of mixture of “target bacteria – bacteriocin” after first 2 h of incubation as was observed spectrophotometrically (Fig. 2), indicates that the effect of this antagonistic compound on *Ralstonia* is lytic and not inhibitory.

In case of less susceptible strain *R. solanacearum* 7859, slight differences in viable cell quantities were observed during exponential phase (Fig. 3) due to decrease of its growth rate but at the end, after 24 h of cultivation, similar yields of cells in control and treated samples were obtained indicating the retarding effect of bacteriocin on the *Ralstonia* strain cell growth.

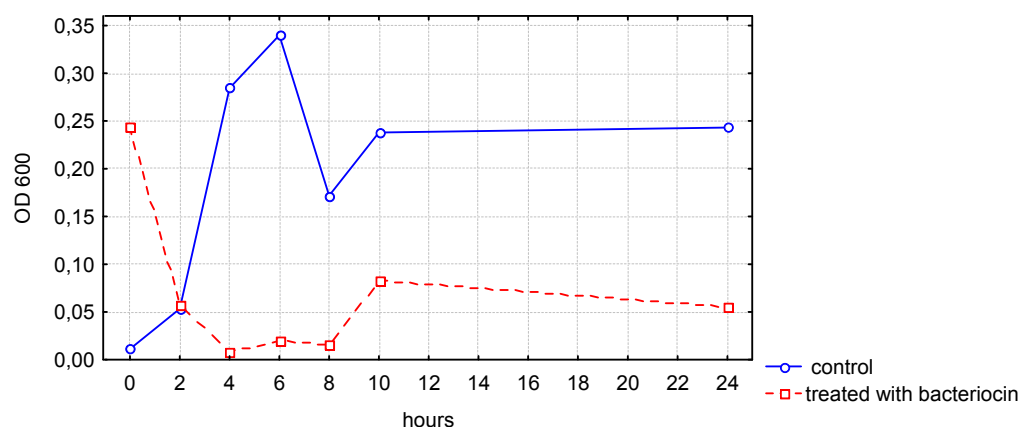


Fig. 2. Effect of *E. durans* A5-11 bacteriocin (final concentration in a mixture 0.06 mg/ml) on the growth of *Ralstonia solanacearum* 6189 in LB broth as measured spectrophotometrically.

This excludes the existence of lytic properties of studied bacteriocin A narrow, strain-restricted susceptibility of Gram-negative microorganisms to bacteriocins of LAB has been already described [6; 15; 17]. Susceptibility of *R. solanacearum* seems to be strain-specific too and it needs to be investigated with the vast diversity of target and producing strains.

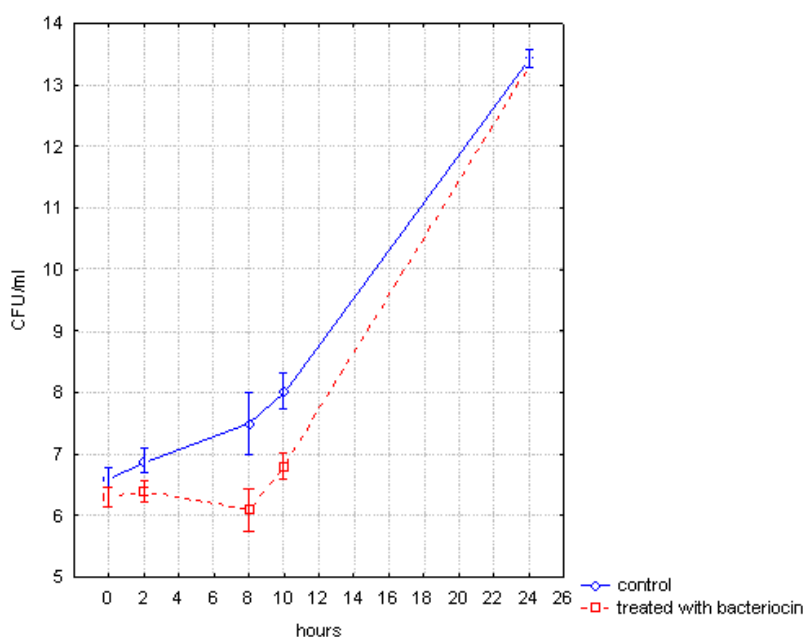


Fig. 3. Growth of *R. solanacearum* 7859 in LB broth in presence of *E. durans* A5-11 bacteriocin (concentration 0.03 mg/ml); bars show standard deviation.

The next step undertaken was to check antagonistic possibilities of LAB on test-plants.



Lactic acid bacteria antagonistic activity *in vivo*

Dipping plant roots into suspensions with the pathogens and bacteriocin of *E. durans* A5-11 resulted in decreasing numbers of wilted tomatoes in case of the strain *R. solanacearum* 6189 (Fig. 4).

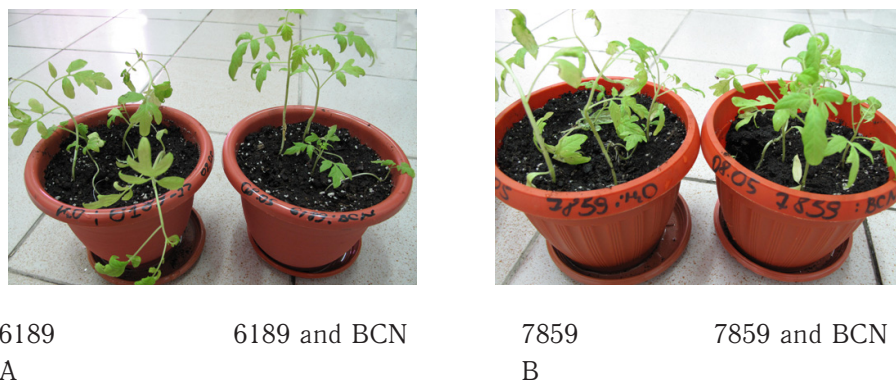


Fig. 4. Tomatoes treated with pathogen suspension and the mixture of pathogen and bacteriocin

A – *R. solanacearum* 6189 and enterococcal bacteriocin (BCN),
 B – *R. solanacearum* 7859 and BCN.

Thus, after 15 days of experiment, severity of wilt on 6189-inoculated plants was one unit lower as measured using Kelman and Person scale [16] (Table).

Table

Estimation of wilt symptoms on treated tomatoes

Assessment of wilt symptoms	<i>Ralstonia solanacearum</i> 6189	<i>Ralstonia solanacearum</i> 6189 and <i>E. durans</i> bacteriocin	<i>Ralstonia solanacearum</i> 7859	<i>Ralstonia solanacearum</i> 7859 and <i>E. durans</i> bacteriocin
Kelman and Person scale	4	3	4	4
Number of diseased plants (%)	63.6%	45.0%	72.7%	75.0%

The inhibition of certain *Ralstonia* strains by LAB and by their secondary metabolites is a promising method of biological control meriting further study. However, several problems should be solved before. The laborious way of bacteriocin purification forces to search for the LAB strains releasing antagonistic compounds against Gram-negative bacteria during their growth on nutritional media.

This will eliminate the stage of bacteriocin extraction and purification from cell suspension. A lot of LAB strains originate from soil and plant surfaces [29; 33] hence they should survive well on plant surfaces.

Further investigations should be carried out including screening for even more effective antagonistic LAB and laboratory and field trials should confirm usefulness of their application on plants.

Acknowledgments. The work was supported by a program of Bilateral French-Ukrainian collaboration programme “Dnipro” (2011–2012) granted by the Ministry of Foreign and European Affairs of France and the State Agency of Science, Innovations, and Information of Ukraine, and in frames of the project “Science in universities” NU3-2011 granted by the Ministry of Education, Science, Sport and Youth of Ukraine.

BIBLIOGRAPHY

1. Batdorj B., Dalgarrondo M., Choiset Y., Pedroche J., Mütro F., Průvost H., Chobert J.-M., Haertlū T. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag // J Appl Microbiol. — 2006. — Vol. 101, № 4. — P. 837–848.
2. Bonjar G.H.Sh., Zamanian S., Aghighi S., Farrokhi P.R., Mahdavi M.J., Saadoun I. Antibacterial activity of Iranian *Streptomyces coralus* strain 63 against *Ralstonia solanacearum* // J. Biol. Sciences. — 2006. — Vol. 6, № 1. — P. 127–129.
3. Castro C.M., Motta S.D., Adiba F., Ribeiro R.L.D. Potential use of EM for control of phytopathogenic fungi and bacteria / Parr J.F., Hornick S.B., Simpos M.E. (eds.). Proceedings of Third Int. Conf. on Kyusei Nature Farming. — 1995. — Washington: US Department of agriculture. — P. 236–238.
4. Chakravarty G., Kalita M.Ch. Management of bacterial wilt of brinjal by *P. fluorescens* based bioformulation // ARPJ. Agric. Biol. Science. — 2011. — Vol. 6, № 3. — P. 1–11.
5. Ciampi-Panno L., Fernandez C., Bustamante P., Andrade N., Ojeda S., Contreras A. Biological control of bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum* // American Potato J. — 1989. — Vol. 66. — P. 315–332.
6. Ferreira A.E., Canal N., Morales D., Fuentesfria D.B., Corcao G. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from human feces // Brazilian Archives of Biol. Technol. — 2007. — Vol. 50, № 2. — P. 249–258.
7. Gallardo P.B., Panno L.C. Biological control of bacterial wilt of potato induced by *Pseudomonas solanacearum* // Revista de Microbiologia. — 1989. — Vol. 20. — P. 18–26.
8. Hadji-Sfaxi I., Batdorj B., El-Ghaish S., Ahmadova A., Le Blay G., Barbier G., Haertlū T., Chobert J.M. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt // Food Control. — 2011. — Vol. 22. — P. 2020–2027.
9. Hartman G.L., Elphinstone J.G. Advances in the control of *Pseudomonas solanacearum* race 1 in major food crops / Bacterial wilt: the disease



and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Hayward A.C., Hartman G.L. (eds.). — Wallington: CAB International, 1994. — P. 157–177.

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

11. Hayward A. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* / Hartman G.L., Hayward A.C. (ed.)/ — Oxford: CAB International, 1994. — P. 127–135.

12. Higa T., Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation // Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming. — 1989. — Khon Kaen, Thailand: Khon Kaen University. — P. 140–147.

13. Hu C.B., Zendo T., Nakayama J., Sonomoto K. Description of durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49 // J. Appl. Microbiol. — 2008. — Vol. 105. — P. 681–690.

14. Huang Q., Allen C. Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants // Physiological and molecular plant pathology. — 2000. — Vol. 57. — P. 77–83.

15. Ignatova T., Iliev J., Kirilov N., Vassileva T., Dalgarrondo M., Haertle T., Chobert J.-M., Ivanova I. Effect of oligosaccharides on the growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from dairy products // J. Agricult. Food Chemistry. — 2009. — Vol. 57, № 20. — P. 9496–9502.

16. Kelman A., Person L.H. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut // Phytopathology. — 1961. — Vol. 51. — P. 158–162.

17. Line J.E., Svetoch E.A., Eruslanov B.V., Perelygin V.V., Mitsevich I.P., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Seal B.S., Siragusa G.R., Stern N.J. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria // Antimicrob. Agents Chemotherapy. — 2008. — Vol. 52, № 3. — P. 1094–1100.

18. Lwin M., Ranamukhaarachchi S.L. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations // Int. J. Agricult. Biol. — 2006. — Vol. 8, № 5. — P. 657–660.

19. Messiha N.A.S., van Diepeningen A.D., Farag N.S., Abdallah S.A., Janse J.D., van Bruggen A.H.C. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot // Eur. J. Plant Pathol. — 2007. — Vol. 118. — P. 211–225.

20. Milling A., Meng F., Denny T.P., Allen C. Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 // Phytopathology. — 2009. — Vol. 99. — P. 1127–1134.

21. Nes I., Diep D.B., Holo H. Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus* // J. Bacteriol. — 2006. — Vol. 189, № 4. — P. 1189–1198.
22. Nguyen M.T., Ranamukhaarachchi S.L. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper // J. Plant Pathol. — 2010. — Vol. 92, № 2. — P. 395–406.
23. Nguyen M.Th., Ranamukhaarachchi S.L., Hannaway D.B. Efficacy of antagonist strains of *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pichia guilliermondii* and *Candida ethanolica* against bacterial wilt disease of tomato // J. Phytopathology. — 2011. — Vol. 3, № 2. — P. 1–10.
24. Paret M.L., de Silva A.S., Criley R.A., Alvarez A.M. *Ralstonia solanacearum* race 4: risk assesment for edible ginger and floricultural ginger industries in Hawaii // Horttechnology. — Vol. 18, № 1. — P. 90–96.
25. Park K., Paul D., Kim Y.K., Nam K.W., Lee Y.K., Choi H.W., Lee S.Y. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum* // Plant Pathol. — 2007. — Vol. 23. — P. 22–25.
26. Qi F., Chen P., Caufield P.W. The group I strain of *Streptococcus mutans* UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV // Appl. Environm. Microbiol. — 2001. — Vol. 67. — P. 15–21.
27. Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria // Bacteriol. Rev. — 1976. — Vol. 40. — P. 722–756.
28. Thongwai N., Kunopakarn J. Growth inhibition of *Ralstonia solanacearum* PT1J by antagonistic bacteria isolated from soils in the northern part of Thailand // Chiang Mai J. Sci. — 2007. — Vol. 34, № 3. — P. 345–354.
29. Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // Int. Microbiol. — 2008. — Vol. 11. — P. 231–236.
30. Van Elsas J.D., Kastelein P., van Bekkum P. van der Wolf J.M., de Vries P.M., van Overbeek L.S. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates // Phytopathology. — 2000. — Vol. 90. — P. 1358–1366.
31. Wagih E. Neither indole acetic acid nor bacteriocin is apparently involved in the *in vitro* antagonism between the virulent and the avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* // J. Phytopathology. — 1991. — Vol. 123. — P. 153–160.
32. Yabuuchi E., Kosako Y., Yano L., Hotta H., Nishiuchi Y. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — Vol. 46. — P. 625–626.
33. Yanagida F., Chen Y., Onda T., Shinohara T. Durancin L28-1A, a new bacteriocin from *Enterococcus durans* L28-1, isolated from soil // Letters in Appl. Microbiol. — 2005. — Vol. 40. — P. 430 – 435.

Стаття надійшла до редакції 08.06.2012 р.



Н.В. Ліманська¹, Т.В. Іваниця¹, І. Шуазе², Н.В. Коротаєва¹,
Ж.Ю. Сергєєва¹, Ж.-М. Шобер², В.О. Іваниця¹, Т. Ертле²

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

²Дослідницький відділ взаємодії та будови біополімерів 1268, Національний науково-дослідний інститут сільського господарства (INRA), BP 71627, вул. де ля Жеродьєрі, 44316 Нант 3, Франція

ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНУ *ENTEROCOCCUS DURANS* НА ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО ВІЛТУ

Реферат

Досліджено вплив бактеріоцину *Enterococcus durans* А5-11 на ріст бактерій *Ralstonia solanacearum* та здатність їх викликати вілт у томатів. Нанесення бактеріоцину на газони штамів *Ralstonia solanacearum* показало, що 33% тестованих штамів фітопатогенів були чутливими до інгібуючої дії бактеріоцину. Мінімальні інгібуючі концентрації бактеріоцину та розміри зон лізису або інгібування росту бактерій варіювали залежно від штаму. Такі ж відмінності були виявлені щодо впливу бактеріоцину на бактерії штамів *Ralstonia solanacearum* у рідкому середовищі. Обробка коренів рослин томатів *Lycopersicon esculentum* Mill бактеріоцином *E. durans* А5-11 одночасно із зараженням бактеріями *R. solanacearum* 6189 призвела до зменшення кількості рослин томатів із симптомами вілту.

Ключові слова: бактеріоцин, *Enterococcus durans*, вілт томатів, *Ralstonia solanacearum*.

Н.В. Лиманская¹, Т.В. Иваница¹, И. Шуазе², Н.В. Коротаева¹,
Ж.Ю. Сергеева¹, Ж.-М. Шобер², В.А. Иваница¹, Т. Эртле²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, 65082, Одесса, Украина

²Исследовательский отдел взаимодействия и строения биополимеров 1268, Национальный научно-исследовательский институт сельского хозяйства (INRA), BP 71627, ул. де ля Жеродьери, 44316 Нант 3, Франция

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНА *ENTEROCOCCUS DURANS* НА ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО ВИЛТА

Реферат

Исследовано влияние бактериоцина *Enterococcus durans* А5-11 на рост бактерий *Ralstonia solanacearum* и способность их вызывать вилт у томатов. Нанесение бактериоцина на газоны штаммов *Ralstonia*



solanacearum показало, что 33% тестированных штаммов фитопатогенов были чувствительными к ингибирующему действию бактериоцина. Минимальные ингибирующие концентрации бактериоцина и размеры зон лизиса или ингибирования роста бактерий варьировали в зависимости от штамма. Такие же различия были установлены для влияния бактериоцина на бактерии штаммов *Ralstonia solanacearum* в жидкой среде. Обработка корней растений бактериоцином *E. durans* А5-11 одновременно с заражением бактериями штамма *R. solanacearum* 6189 привела к уменьшению количества растений томатов с симптомами вилта.

Ключевые слова: *Enterococcus durans*, бактериоцин, вилт томатов, *Ralstonia solanacearum*.



УДК 612.015.1:577.152.08

В.Н. Заец, В.О. Китап, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, Н.А. Чашин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина, тел.: +38 (044) 526 11 69,
e-mail: prima@imbg.org.ua

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА P450 2E1 МЫШИ В *ESCHERICHIA COLI*

Цель. Клонировать кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши и получить экспрессию клонированной кДНК в *E. coli*. *Методы.* Полимеразная цепная реакция, методы клонирования, электрофорез, вестерн-блот анализ. *Результаты.* При клонировании кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши были использованы экспрессирующий вектор pCWOri+ и штамм *E. coli* DH5 α . Для получения экспрессии рекомбинантного цитохрома P450 2E1 проведена модификация последовательности кДНК гена, кодирующей N-концевой фрагмент белка, приводящая к делеции последовательности с 3 по 23 аминокислотный остаток, нуклеотидной замене во втором кодоне аланина (GCG на GCT) и увеличению содержания АТ в 6 последующих кодонах за счет молчащих замен. *Выводы.* Впервые была клонирована с использованием экспрессирующего вектора pCWOri+ кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши (с указанной модификацией) и получена его экспрессия в *E. coli*.

Ключевые слова: цитохром P450 2E1, гетерологическая экспрессия в *E. coli*, рекомбинантный белок Cyp2E1.

Микросомальный белок цитохром P450 2E1 (Cyp2E1) принадлежит к суперсемейству цитохромов P450 — гемсодержащих монооксигеназ, метаболизирующих большинство поступающих в организм человека и животных ксенобиотиков [4, 10]. Субстратами Cyp2E1 являются преимущественно небольшие гидрофобные (липофильные) химические соединения, такие как спирты, кетоны, альдегиды, нитрозоамины, ароматические и галогенсодержащие углеводороды, многие из которых входят в состав косметических, лекарственных средств, продуктов питания, а также промышленных и бытовых отходов, загрязняющих окружающую среду [2, 6]. Известна роль Cyp2E1 в метаболической активации протоксенов, проканцерогенов и в образовании повреждающих клетки свободных радикалов кислорода и гидроперекисей. Показано участие фермента в патогенезе сахарного диабета, алкогольном повреждении печени, болезни Альцгеймера и др. [2, 8]. Таким образом, выяснение

© В.Н. Заец, В.О. Китап, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, Н.А. Чашин, 2012



структурно-функциональных характеристик Сур2Е1 особенно важно в таких областях, как фармакология, токсикология, а также при лечении и профилактике развития многих патологических процессов [7, 11].

Для изучения структурных и функциональных свойств Сур2Е1 необходим гомогенный фермент в препаративном количестве. Наиболее перспективным способом получения большого количества гомогенного белка является генно-инженерный метод. В настоящее время индивидуально чистые функционально активные формы многих цитохромов Р450 получены в различных гетерологичных системах — бактериях, дрожжах, бакуловирусах и клетках животных [7, 9, 15]. Наиболее предпочтительной считается бактериальная система *E. coli*, преимуществом которой по сравнению с другими системами является наличие ряда высокоэффективных экспрессирующих векторов, возможность быстрого получения большого количества исследуемых белков в гомогенном состоянии, простота их выделения и очистки, легкость проведения мутагенеза, а также относительная дешевизна бактериальных сред [9].

Целью настоящей работы является получение рекомбинантного белка Сур2Е1 мыши в гетерологичной системе *E. coli* для исследования его структурно-функциональных и биохимических свойств.

Материалы и методы

Для скрининга рекомбинантных клонов и экспрессии кДНК гена *Cyp2e1* использовали генноинженерный штамм *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ф80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*).

Модификацию и амплификацию модифицированной кДНК гена *Cyp2e1* проводили методом ПЦР с помощью прямого 5'-ctcctcgtacatatg gctaaacaatttatcgttcttggaacctgccc-3' и обратного 5'-tggtggtgaagcttttatgacgaggaatgacacaga-3' праймеров в буферной смеси, содержащей 2 мМ хлорида магния, 200 мкМ каждого dNTP, 1 мкМ праймеров, 50 нг матрицы и 2 U Taq полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва). Первоначальная денатурация матрицы проводилась в течение 3 мин при 94 °С. Последующие 30 циклов реакции состояли из этапов денатурации в течение 30 сек. при 94 °С, отжига в течение 30 сек. при 59 °С и элонгации в течение 1 мин. при 72 °С. Последний этап синтеза проводили в течение 5 мин. при 72 °С.

Компетентные клетки получали согласно методу Нишимуры и соавт.[13]. Все процедуры по клонированию кДНК гена *Cyp2e1* мыши — рестрикцию, лигирование, трансформацию и выделение плазмидной ДНК — проводили с помощью ферментов фирмы «Fermentas» (Литва) в соответствии с [14]. Для клонирования использовали вектор pCWOri+, любезно предоставленный доктором Ф. Генгерихом (Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, USA).

Индукцию экспрессии рекомбинантного гена *Cyp2e1* в культуре *E. coli* и выделение мембран из бактериальных клеток проводили согласно [6].



Трансформированные рекомбинантной плазмидой компетентные клетки *E. coli* DH5 α выращивали на 1,5% агаризованной питательной среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), в течение ночи при 37 °С. Трансформированные колонии переносили в жидкую среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали при 37 °С и 170 оборотах в минуту в течение ночи. На следующий день ночную культуру инокулировали в соотношении 1:1000 в среду TB [14], содержащую ампициллин (100 мкг/мл) и микроэлементы (100 мл 4000-стокового раствора содержат 2,7 г FeCl₃ · 6H₂O, 0,2 г ZnCl₂ · 4H₂O, 0,2 г CoCl₂ · 6H₂O, 0,2 г Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0,1 г CaCl₂ · 2H₂O, 0,1 г CuCl₂ и 0,05 г H₃BO₃, растворенных в 1,2 М HCl) и инкубировали 3–4 часа в тех же условиях до оптической плотности A₆₀₀=0,6–0,8 ОЕ. Затем в культуру добавляли предшественник гема аминоклевуленовую кислоту до конечной концентрации 0,5 мМ и проводили индукцию экспрессии рекомбинантного гена *Cyp2e1* 1 мМ IPTG. Индуцированную бактериальную культуру инкубировали на шейкере в течение 48 часов при 30 °С и 160 об/мин. Клетки осаждали при 4000 об/мин в течение 5 минут, отмывали в калий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,15 М хлорид натрия, взвешивали и суспендировали в 2 объемах (v/w) 75 мМ Трис-хлоридного буфера, рН 7,5, содержащего 250 мМ сахарозы и 0,25 мМ ЭДТА.

Для получения мембран отмытые бактериальные клетки суспендировали в 100 мМ Трис-ацетатном буфере, рН 7,6, содержащем 500 мМ сахарозы, 0,5 мМ ЕДТА, из расчета 5 мл буфера на 100 мл культуральной среды. Суспензию клеток разбавляли равным объемом бидистиллированной воды, добавляли к ней лизоцим до концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали 1 час на шейкере при мягком перемешивании при 4 °С. Сферопласты осаждали при 5000 об/мин в течение 10 минут, взвешивали и суспендировали в 100 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 6 мМ ацетат магния, 20% глицерин и 0,1 мМ ДТТ в соотношении 1 мл буфера на 0,5 г сферопластов. К суспензии сферопластов добавляли ингибиторы протеаз ПМСФ и леупептин до концентрации 1 мМ и 2 мкМ, соответственно, после чего сферопласты лизировали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе 3 раза по 30 сек. Полученный лизат осветляли центрифугированием при 10000 об/мин при 4 °С в течение 10 мин. Мембраны из осветленного лизата осаждали при 100000 g в течение 90 мин. Осажденные мембраны суспендировали в минимальном объеме 100 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,4, содержащего 6 мМ ацетат магния, 20% глицерин и 10 мМ β-меркаптоэтанол.

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу Лэммли с использованием 4% концентрирующего и 12% разделяющего гелей [14]. Разделенные в ДДС-ПААГ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану BA-85 методом полусухого активного электропереноса с помощью прибора CSL Semi Dry Blotting Units (Clever Scientific Ltd, Велико-

британия) при силе тока 200 мА в течение 40 минут. Для иммуноблот-анализа использовали кроличьи поликлональные антитела к Сур2Е1 мыши, полученные в лаборатории [12], и вторичные anti-Rabbit антитела фирмы “Sigma” (США), конъюгированные с пероксидазой хрена. Для предупреждения неспецифического связывания мембраны обрабатывали 5% раствором сухого молока в буфере TBST. Визуализацию белковых полос проводили хемилюминисцентным методом с использованием в качестве субстратов люминола, р-кумаровой кислоты и пероксида водорода согласно протокола ECL Western Blotting («Amersham», Англия). Экспозицию выполняли на рентгеновской пленке CP-BU («AGFA», Бельгия).

Результаты и обсуждение

Ранее на матрице выделенной из клеток печени мыши тотальной РНК нами была получена суммарная кДНК полиА-содержащих мРНК, которая была использована для праймерспецифичного ПЦР-синтеза полноразмерной кДНК гена микросомального белка цитохрома P450 2E1 [1]. Амплифицированная последовательность была клонирована в векторе рЕТ24а, широко используемом для экспрессии экзогенных белков в *E. coli*. Однако попытки получить экспериментально определяемый уровень экспрессии белка в совместимых с данным вектором штаммах *E. coli* BL21 (DE3), С41 и Rosetta, трансформированных полученной конструкцией рЕТ24а-Сур2Е1, оказались безуспешными [12]. Данные согласуются с работами других авторов, указывающими на то, что токсичные для бактериальной клетки цитохромы P450 млекопитающих крайне трудно получить в экспрессирующих векторах серии рЕТ, поскольку высокий уровень экспрессии рекомбинантных ферментов в данных векторах приводит либо к гибели клеток, либо к накоплению синтезированных белков в тельцах включения вследствие нарушения их фолдинга [3].

Анализ используемых для гетерологичной экспрессии в *E. coli* плазмидных векторов показал, что наиболее подходящим для экспрессии цитохромов P450 млекопитающих является разработанный в лаборатории Дальквиста вектор рCWOgi+, содержащий два тандемно расположенных индуцируемых *tac* промотора и ориджин репликации плазмиды рBR322 [3, 5]. Было показано также, что для эффективной экспрессии клонированных кДНК генов цитохромов P450 требуется модификация их нуклеотидной последовательности, кодирующей N-концевой фрагмент соответствующих белков. Модификация заключается в замене кодона второй аминокислоты на наиболее часто встречаемый в белках *E. coli* кодон аланина GCT. Кроме этого, в последующих нескольких кодонах кодируемой последовательности необходимо увеличение содержания АТ за счет молчащих замен, что снижает потенциал синтезированных мРНК к формированию вторичной структуры, препятствующей их связыванию с рибосомами [3, 9]. Данная модификация, часто в сочетании с делецией нуклеотидной последовательности первых 10–30 аминокислот N-концевой



сигнальной последовательности белков, а также использование вектора pCWOri+ позволили получить большинство каталитически активных рекомбинантных изоформ цитохромов P450 млекопитающих, в том числе Cyp2E1 кролика и человека [7, 9, 15].

Данный подход был использован нами для получения экспрессии рекомбинантного гена цитохрома P450 2E1 мыши и наработки соответствующего гетерологичного белка в клетках *E. coli*. Модификацию кДНК гена *Cyp2e1* и ее наработку для клонирования в вектор pCWOri+ проводили методом ПЦР на матрице рекомбинантной плазмиды pET24a-Cyp2E1. Для этого нами были синтезированы ограничивающие полную последовательность гена прямой и обратный праймеры, из которых прямой праймер нес замену второго кодона GCG на GCT и делецию нуклеотидной последовательности следующих 21 N-концевых аминокислотных остатков белка. Кроме того, для повышения АТ содержания в первых кодонах модифицированной последовательности кДНК гена *Cyp2e1* нами были спроектированы в прямом праймере замены нуклеотидов в 4, 5, 7 и 8 кодонах, не меняющие аминокислотную последовательность белка Cyp2E1 (рис. 1.А).

Для встраивания кДНК гена в pCWOri+ в прямой праймер был введен сайт рестрикции эндонуклеазы NdeI, совпадающий с иницирующим кодоном ATG, а в обратный — эндонуклеазы HindIII, следующий непосредственно за стоп кодоном. После ПЦР-синтеза на матрице плазмиды pET24a-Cyp2E1 амплифицированный и очищенный в агарозе ДНК-фрагмент клонировали по этим сайтам рестрикции в вектор pCWOri+ (рис. 1.Б). В результате была получена рекомбинантная плазида pCW/ Δ Cyp2E1 с модифицированной последовательностью кДНК *Cyp2e1* мыши. Из рис. 2 и рис. 3 видно, что как амплифицированный, так и клонированный в плазмиде pCWOri+ фрагменты одинаковы по размеру и равны примерно 1500 пар оснований, что соответствует длине кДНК гена *Cyp2e1*.

Следует отметить, что любая модификация последовательности кДНК генов цитохромов P450 еще не гарантирует эффективный синтез кодируемых ими ферментов. Это связано с тем, что на экспрессию белков может оказывать влияние состав последовательности клонируемой ДНК. Кроме того, показано, что экспрессия цитохромов P450 в клетках *E. coli* зависит от используемых штаммов бактерий. Наибольший уровень экспрессии клонированных цитохромов P450 был получен в штамме DH5 α [6]. Поэтому в данной работе мы использовали этот штамм, а также наиболее удачный вариант модификации кДНК цитохрома P450 2E1 человека, обеспечивающий самый высокий уровень экспрессии белка в векторе pCWOri+ [6]. Для выявления экспрессии рекомбинантного белка Cyp2E1 в клетках DH5 α , трансформированных полученной нами рекомбинантной плазмидой pCW/ Δ Cyp2E1, были использованы специфичные к Cyp2E1 мыши поликлональные антитела кролика, полученные ранее в нашей

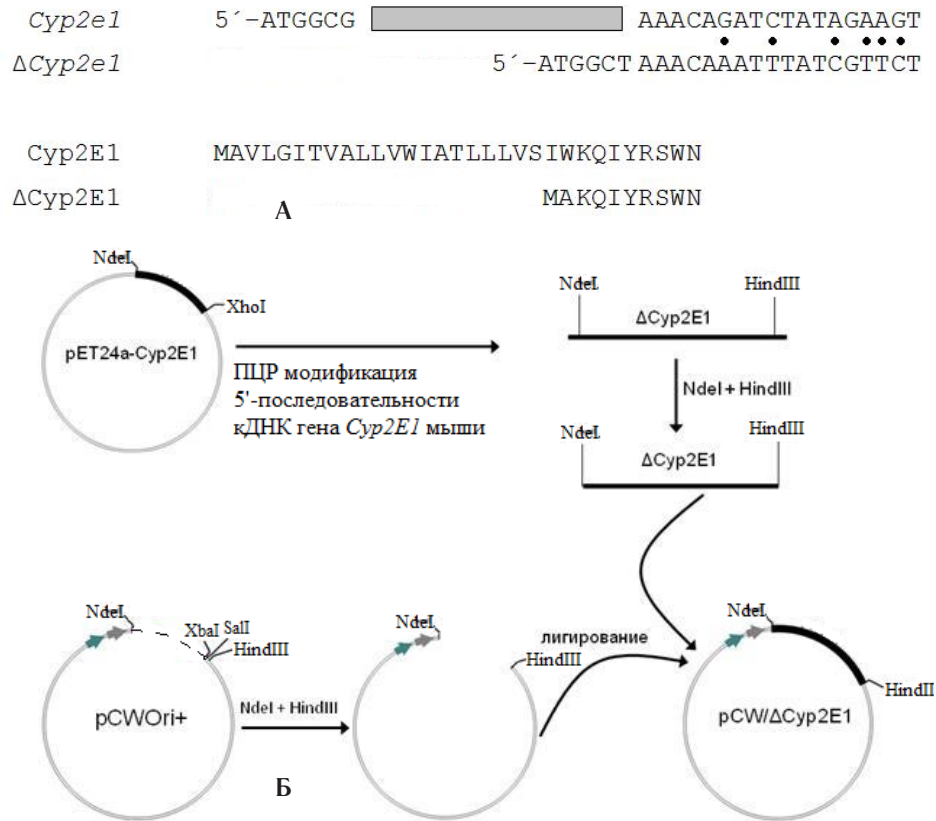


Рис. 1. Клонирование кДНК цитохрома P450 2E1 в векторе pCWOri+.

А — модификация нуклеотидной последовательности кДНК цитохрома P4502E1 мыши, кодирующей N-концевую последовательность белка: *Cyp2e1* — нативная нуклеотидная и аминокислотная последовательности цитохрома P4502E1; $\Delta Cyp2E1$ — модифицированная нуклеотидная и аминокислотная последовательности цитохрома P4502E1. Черточками обозначены делетированные нуклеотиды и соответствующие им аминокислоты в модифицированной N-концевой последовательности *Cyp2e1*. Точками над модифицированной нуклеотидной последовательностью *Cyp2e1* обозначены нуклеотидные замены, не изменяющие первичную структуру белка.

Б — схема клонирования кДНК гена цитохрома P4502E1 мыши в векторе pCWOri+.

Fig. 1. Cloning of cytochrome P450 2E1 cDNA in the vector pCWOri+.

A — Modification of the mouse cytochrome P450 2E1 gene cDNA nucleotide sequence encoding the N-terminal amino acid sequence of the protein: *Cyp2e1* and $\Delta Cyp2e1$ — native and modified cytochrome P450 2E1 gene cDNA nucleotide sequence; *Cyp2E1* and $\Delta Cyp2E1$ — native and modified cytochrome P450 2E1 amino acid sequence. Rectangular box in the native nucleotide sequence of *Cyp2e1* cDNA shows nucleotides deleted in the modified N-terminal sequence of the *Cyp2e1* protein. The points under the modified *Cyp2e1* nucleotide sequence show nucleotide substitutions which do not alter the primary structure of protein.

B — Scheme of the mouse cytochrome P450 2E1 gene cDNA cloning into expression vector pCWOri+. Modified by PCR *Cyp2e1* cDNA was restricted with NdeI - HindIII enzymes and ligated at sticky ends into plasmid vector pCWOri+ cut by the same enzymes. In the plasmid construct pCW/ $\Delta Cyp2E1$ created by us *Cyp2e1* cDNA is located under two inducible tac promoters, which direct its transcription.



лаборатории [12]. На рис. 4 приведены результаты иммуноблот-анализа белкового состава тотального клеточного лизата трансформированных рекомбинантной плазмидой и индуцированных IPTG бактериальных клеток *E. coli* DH5 α , а также выделенной из этих клеток мембранной фракции.

Рис. 2. ПЦР ампликон кДНК *Cyp2e1* мыши, синтезированный с помощью модифицирующих праймеров на матрице рекомбинантной плазмиды pET24a-Cyp2E1

- 1 – ДНК маркер (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Литва);
2 – ПЦР ампликон кДНК *Cyp2e1* мыши

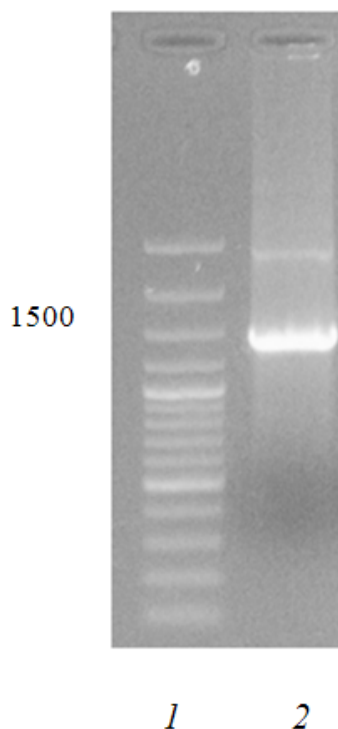


Fig. 2. PCR amplicon of mouse *Cyp2e1* cDNA synthesized by using of modifying primers on the matrix of the recombinant plasmid pET24a-Cyp2E1

- 1 – DNA marker (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Lithuania),
2 – PCR amplicon of mouse *Cyp2e1* cDNA.

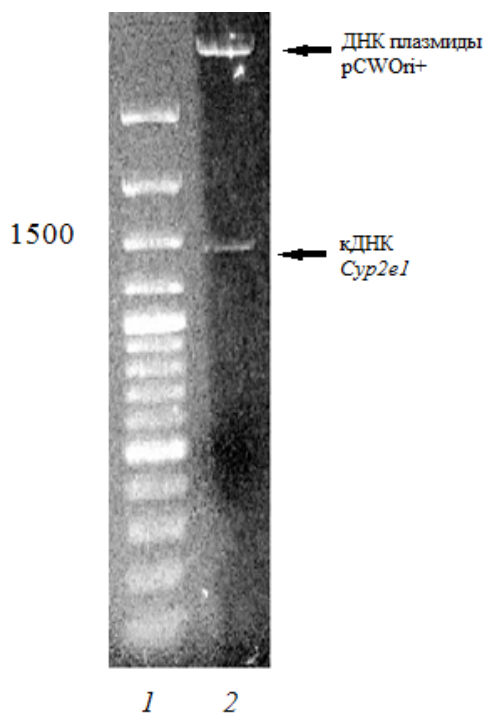


Рис. 3. Рестриктивный анализ рекомбинантной плазмиды pCW/ Δ Cyp2E1

- 1 – ДНК маркер (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Литва);
2 – ДНК рекомбинантной плазмиды pCW/ Δ Cyp2E1, обработанной рестриктазами NdeI-HindIII

Fig. 3. Restriction analysis of recombinant plasmid pCW/ Δ Cyp2E1

- 1 – DNA marker (GeneRuler™100bp DNA Ladder, «Fermentas», Lithuania),
2 – DNA of the recombinant plasmid pCW/ Δ Cyp2E1 treated with restriction enzymes NdeI-HindIII.

Рекомбинантний очищений цитохром P450 2E1 человека был взят нами в качестве контроля, поскольку полученные нами антитела к Cyp2E1 мыши были также кросс-специфичны и к этому цитохрому. Как видно из иммуноблота, модифицированная и клонированная нами в векторе pCWOg1+ кДНК гена *Cyp2e1* эффективно экспрессируется в бактериальной культуре, о чем свидетельствует наличие синтезированного Cyp2E1 мыши как в клеточном лизате, так и в мембранной фракции *E. coli*.

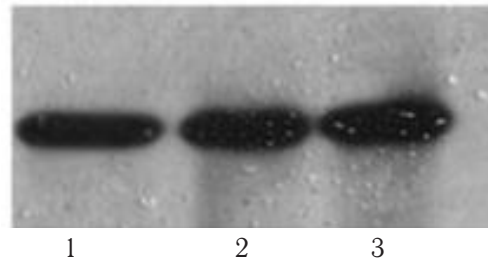


Рис. 4. Экспрессия рекомбинантного Cyp2E1 мыши в индуцированных IPTG клетках *E. coli* DH5α, трансформированных плазмидой pCW/ΔCyp2E1. Иммуноблот-анализ с использованием поликлональных анти-Cyp2E1 антител
1 — суммарный лизат клеток *E. coli* DH5α; 2 — мембранная фракция клеток *E. coli* DH5α; 3 — рекомбинантный Cyp2E1 человека

Fig. 4. Western blot analysis of recombinant mouse cytochrome P450 2E1 expressed in *E. coli* DH5α cells, transformed with the pCW/ΔCyp2E1 plasmid and induced with IPTG

1 — the total protein lysate of *E. coli* DH5α cells; 2 — protein membrane fraction of *E. coli* DH5α cells; 3 — control-recombinant human cytochrome P450 2E1.

Таким образом, в результате проделанной работы нами модифицирована и клонирована кДНК гена цитохрома P450 2E1 мыши и показана ее экспрессия в клетках *E. coli* DH5α. Дальнейшим направлением наших работ является секвенирование клонированной последовательности и оптимизация экспрессии Cyp2E1 в клетках *E. coli* для наработки фермента и исследования его структурных и функциональных свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Максимчук О.В., Данко І.М., Росохацька І.В., Чашин М.О. Експресія гена *Cyp2e1* у клітинах печінки мишей під впливом низьких доз радіації // Біополімери і клітина. — 2002. — 18, № 6. — С. 518–521.
2. Пентюк О.О., Качула С.О., Герич О.Х. Цитохром P450 2E1. Поліморфізм, фізіологічні функції, регуляція, роль у патології // Укр. біохім. журн. — 2004. — 76, № 5. — С.16–28.
3. Barnes H.J. Maximizing expression of eucariotic cytochrome P450s in *Escherichia coli* // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1991. — 88, № 13. — P. 3–14.



4. Enzyme systems that metabolizes drugs and other xenobiotics / edited by C. Ioannides. — Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., UK, 2001. — 566 p.
5. *Gegner J. A. and Dahlquist F.W.* Signal transduction in bacteria: CheW forms a reversible complex with protein kinase CheA // *Methods Enzymol.* — 1996. — 72. — P. 750–754.
6. *Gillam E.M.J., Guo Z. and Guengerich F.P.* Expression of modified human cytochrome P450 2E1 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic properties // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1994. — 312, № 1. — P.59–66.
7. *Gillam E.M.J.* Human cytochrome P450 enzymes expressed in bacteria: reagents to probe molecular interactions in toxicology // *Clinic. Exp. Pharm. Physiol.* — 1998. — 25, № 11 — P. 877–886.
8. *Gonzalez F.J.* Role of cytochrome P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1 // *Mutat. Res.* — 2005. — 569, № 1–2.— P. 101–110.
9. *Guengerich F.P., Gillam E.M.J., and Shimada T.* New applications of bacterial systems to problems in toxicology // *Crit. Rev. Toxicol.* — 1996. — 26, № 5. — P. 551–583.
10. *Guengerich F.P.* Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity // *The AAPS Journal.* — 2006. — 8, № 1. — P. 101–110.
11. *Kumar S.* Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* — 2010. — 6, № 2. — P. 115–131.
12. *Maksymchuk O.V., Tykhonkova I.A., Chaschin M.O.* Heterological expression of mice Cytochrome P450 2E1 gene in *Escherichia coli* // 2-nd Polish-Ukrainian conference “Microbiology in the XXI century” (24-26 Sept. 2007, Warsaw). — Warsaw, 2007 — P. 251.
13. *Nishimura A., Morita M., Nishimura Y. and Sugino G.* A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — 18, № 20. — P. 6169.
14. *Sambrook J., Fritsch T., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* — 2th ed. — New York: Cold Spring Harbor, 1989. — 545 p.
15. *Yun C.-H., Yim S.-K., Kim D.-H. and Ahn T.* Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in *Escherichia coli* // *Curr. Drug Metab.* — 2006. — 7, № 4. — P. 411–429.

Стаття надійшла до редакції 19.03.2012 р.



В.М. Заєць, В.О. Кітам, В.В. Рушак, О.В. Максимчук, М.О. Чашин

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного 150,
Київ, 03680, Україна, e-mail: prima@imbg.org.ua

ГЕТЕРОЛОГІЧНА ЕКСПРЕСІЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ЦИТОХРОМУ P450 2E1 МИШІ В *ESCHERICHIA COLI*

Реферат

Мета. Клонувати кДНК гена цитохрому P450 2E1 миші та отримати експресію клонованої кДНК в *E. coli*. **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція, методи клонування, електрофорез, вестерн-блот аналіз. **Результати.** При клонуванні кДНК гена цитохрому P450 2E1 миші були використані експресуючий вектор pCWOri+ та штам *E. coli* DH5 α . З метою отримання експресії рекомбінантного цитохрому P450 2E1 проведено модифікацію послідовності кДНК гена, яка кодує N-кінцевий фрагмент білку, що призводить до делеції послідовності з 3 по 23 амінокислотний залишок, нуклеотидної заміни у другому кодоні аланіну (GCG на GCT) та збільшення вмісту AT у 6 подальших кодонах за рахунок мовчазних заміन. **Висновки.** Вперше було клоновано із використанням експресуючого вектору pCWOri+ кДНК гена цитохрому P450 2E1 миші (із вказаною модифікацією) та отримано його експресію в *E. coli*.

Ключові слова: цитохром P450 2E1, гетерологічна експресія в *E. coli*, рекомбінантний білок Cyp2E1.

V. Zayets, V. Kitam, V. Rushchak, O. Maksymchuk, M. Chashchyn

Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150,
Zabolotnogo str., Kyiv, 03680, Ukraine, e-mail: prima@imbg.org.ua

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF RECOMBINANT MOUSE CYTOCHROME P450 2E1 IN *ESCHERICHIA COLI*

Summary

Aim. The cloning of the mouse cytochrome P450 2E1 cDNA and obtaining of expression of cloned cDNA in *E. coli*. **Methods.** Polymerase chain reaction, cloning techniques, electrophoresis, Western blot. **Results.** For cloning of the mouse cytochrome P450 2E1 cDNA pCWOri+ expression vector and the strain *E. coli* DH5 α were used. To obtain recombinant



cytochrome P450 2E1 expression the cDNA gene sequence encoding the protein N-terminal fragment was modified, it was leading to deletion from 3 to 23 amino acid residues, nucleotide substitution in the second Ala codon (GCG to GCT) and increasing AT content in the next six codons by silent substitutions. Conclusions. For the first time by using the pCWOri+ expression vector the mouse cytochrome P450 2E1 cDNA (with this modification) was cloned and its expression was obtained in *E. coli*.

Key words: cytochrome P450 2E1, heterologous expression in *E. coli*, recombinant Cyp2E1.



УДК: 557.152.31:635.8

С.Л. Міресь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко,
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ СПЕКТРИ КАРБОКСИЛЕСТЕРАЗ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST ЗАЛЕЖНО ВІД УМОВ ЕКСТРАГУВАННЯ ТА СУБСТРАТУ ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ

*За допомогою методу електрофоретичного розподілу в поліакриламідному гелі досліджено склад спектрів множинних молекулярних форм карбоксилестераз плодового тіла та міцелію гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, який вирощували на середовищах з вівсом та ячменем. Визначено вплив складу та рН екстрагенту на виявлення ізоформ ферменту карбоксилестерази. Залежно від складу поживного середовища та умов екстрагування ферменту на електрофореграмах виявлено від 2 до 9 ізоформ карбоксилестераз. Константними множинними молекулярними формами карбоксилестераз, що визначалися у всіх варіантах, були дві середньорухливі ізоформи з R_f 0,380 та 0,510.*

*Ключові слова: *Ganoderma lucidum*, карбоксилестераза, спектр ізоформ, мінливість.*

Карбоксилестерази (КФ 3.1.1.1) — серинові гідролази широкого спектру дії, що каталізують гідроліз переважно аліфатичних і ароматичних ефірів нижчих жирних кислот, а також ефірів молочної, бурштинової та інших органічних кислот і багатьох амінокислот. Їх виявлено в клітинах бактерій, грибів, рослин та тварин [1]. У карбоксилестераз базидіомицетів встановлено також наявність ліпазної активності. За молекулярною будовою карбоксилестерази різних організмів дещо різняться. У базидіомицетів ця група ферментів має вісім субодиниць з загальною масою 430 кД [2]. Завдяки значній внутрішньовидовій мінливості та простоті гістохімічного виявлення [3] карбоксилестераз використовують як маркерний фермент у популяційно-генетичних дослідженнях та при ідентифікації організмів [4–10]. Поліморфізм карбоксилестераз вищих базидіомицетів вивчено мало. Разом з тим, отримана інформація може стати у нагоді при визначенні модифікаційної та генотипової мінливості грибів, особливостей формування їх цілющих властивостей залежно від умов вирощування, тощо.

© С.Л. Міресь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця, 2012



Метою роботи було вивчення складу електрофоретичних спектрів множинних молекулярних форм карбоксилестераз у лікарського базидіоміцета *Ganoderma lucidum* ((Curtis) P. Karst) за різних поживних середовищ та умов екстрагування ферменту.

Матеріали і методи

У роботі використовували штам *Ganoderma lucidum* ONU F101, отриманий з Інституту сільськогосподарської генетики (м. Ханой).

Вплив розчинника та рН середовища при екстрагуванні на спектр ізоформ карбоксилестераз досліджували на плодкових тілах трутовика лакованого, що були отримані при культивуванні міцелію на суміші соломи пшениці та ячменю. Гриб вирощували при температурі 22 °С (при переході до плодоношення — при 16 °С) і вологості повітря 90%. Фермент екстрагували розчинниками: гліцин — 0,1 М (рН 4,0); тріс-гліциновий буфер — 0,1 М (рН 7,4); гліцин-NaOH буфер — 0,1 М (рН 9,0); гліцин-NaOH буфер — 0,1 М, з доданням 1% тритону X-100 (рН 9,0). Проби свіжозібраного плодового тіла з розчинником розтирали у ступці на холоді у співвідношенні біомаса/розчинник (w/v) 1:5.

Залежність експресії множинних молекулярних форм карбоксилестераз (ММФ) від виду субстрату досліджували на пробах отриманих з міцелію, який вирощували на субстраті з зернового ячменю та вівса:

Зерновий міцелій I
овес — 1 кг
крейда — 30 г
гіпс — 120 г
вода — 2 л

Зерновий міцелій II
ячмінь — 1 кг
крейда — 30 г
гіпс — 120 г
вода — 2 л

Із зібраного міцелію готували наважки по 100 мг, додавали по 100 мкл або 1000 мкл екстрагенту і гомогенізували так само, як плодове тіла. Для екстракції ММФ карбоксилестераз з міцелію використовували 0,1 М гліцин-NaOH буфер з 1% тритону X-100. Підготовлені таким чином проби центрифугували на холоді (+4 °С) при 10 000 g впродовж 15 хв, після чого піддавали заморожуванню-відтаюванню. Отримані таким чином екстракти піддавали електрофоретичному розділенню у 7% поліакриламідному гелі. ММФ карбоксилестераз виявляли за методикою Л.І. Корочкина [3] з модифікаціями [11].

Одержані електрофореграми сканували і аналізували за допомогою спеціальної ліцензійної комп'ютерної програми «АнаИС».

Результати та їх обговорення

Для дослідження залежності виявлення ММФ карбоксилестераз від складу екстрагента отримували свіжі плодове тіла трутовика лакованого. Для екстракції ММФ карбоксилестераз використовували три буфери із



різними значеннями рН та один — з доданням детергента тритон Х-100. Результати електрофорезу отриманих екстрактів ММФ карбоксилестераз плодового тіла трутовика лакованого представлено на рис. 1.

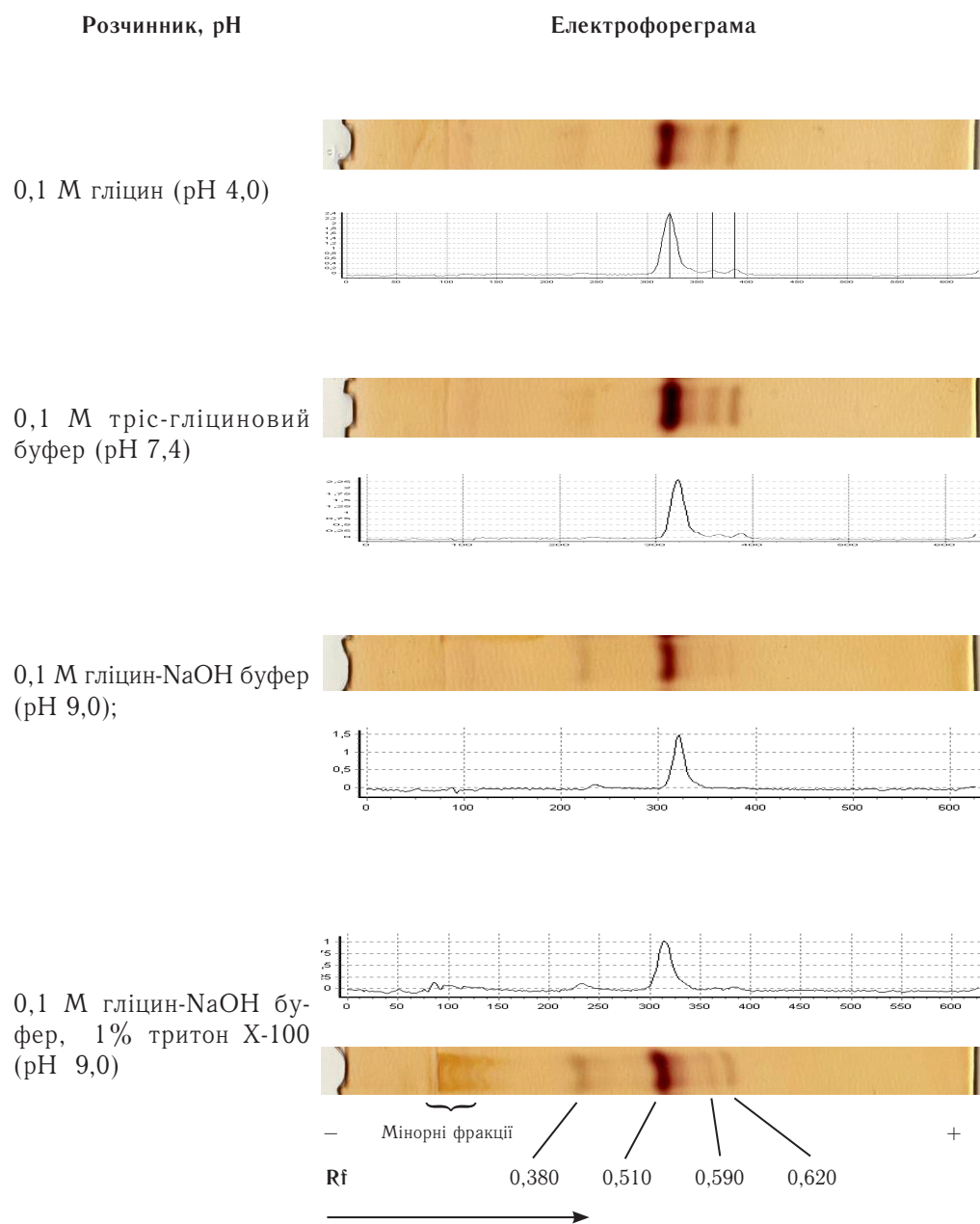


Рис. 1. Спектри ММФ карбоксилестераз плодових тіл *G. lucidum* за екстракції різними розчинниками

Fig. 1. The spectra of carboxylesterases molecular forms of *G. lucidum* fruit bodies extracted by different solvents

Як видно з електрофореграм у пробах з плодового тіла *Ganoderma lucidum* визначається до чотирьох основних ізоформ з відносною рухливістю 0,380; 0,510; 0,590; 0,620. Ступінь їх екстрагування залежить від складу розчинника і значення рН. Найкращі результати отримано для екстрагенту, що містить 0,1 М гліцин-NaOH буфер з доданням 1% тритону X-100 (рН 9,0). Цей склад розчинника дозволяє виявити також мінорні слабо рухливі форми карбоксилестераз.

В подальшому вивчали залежність експресивності множинних молекулярних форм карбоксилестераз міцелію від виду субстрату, на якому його вирощували, використовуючи як розчинник гліцин-NaOH буфер з тритоном у співвідношенні міцелій/розчинник (w/v) 1:10 та 1:1. Для цього зразки міцелію вирощеного на зерні вівса та ячменю гомогенізували та екстрагували ММФ карбоксилестераз.

Результати експресивності ММФ карбоксилестераз залежно від виду субстрату для вирощування міцелію гриба представлені на рис. 2.

Аналіз спектрів показав, що для екстракції карбоксилестерази з зернового міцелію кращим є співвідношення його з розчинником 1:1. Більше розведення (1:10) призводить до того, що частина ізоформ, вміст яких менший, не виявляються.

При порівнянні спектрів ММФ карбоксилестераз з міцелію, отриманого на різних субстратах, було виявлено їх відмінності. У міцелії, що культивувався на вівсяному середовищі детектовано найбільшу кількість ізоформ — дев'ять (з R_f 0,190; 0,380; 0,510; 0,520; 0,590; 0,620; 0,660; 0,720 та 0,800). У пробі міцелію отриманого з ячменю спостерігали експресію лише шести ММФ (відсутніми виявилися ізоформи з R_f 0,190; 0,590 та 0,620). Це може бути пов'язано з відмінностями хімічного складу зернового субстрату. Так, у вівсяному зерні міститься жирів у 2,5 рази, а клітковини у 2 рази більше ніж у зерні ячменю [12]. Ймовірно саме більша кількість жирів у вівсяному субстраті призводить до експресії більшої кількості ММФ карбоксилестераз. Відомо, що гриби можуть використовувати ліпіди як джерело вуглецю та енергії розщеплюючи їх за допомогою ліпаз. В результаті утворюються складні ефіри і альдегіди, які є субстратом для карбоксилестераз [13].

При порівнянні спектрів ММФ карбоксилестераз з міцелію та плодових тіл також встановлено відмінності в кількості ізоформ цього ферменту. У пробах з плодового тіла їх нараховується до чотирьох. Спільними множинними молекулярними формами карбоксилестераз з плодового тіла і міцелію були ізоформи з відносною рухливістю 0,380 та 0,510. Решта, визначених у пробах з плодового тіла ММФ з R_f 0,590 та 0,620, була зафіксована лише у міцелії, що вирощували на вівсяному зерні. Встановлені відмінності в спектрах ММФ карбоксилестераз можуть бути обумовлені як складом субстрату для вирощування так і стадією розвитку гриба.

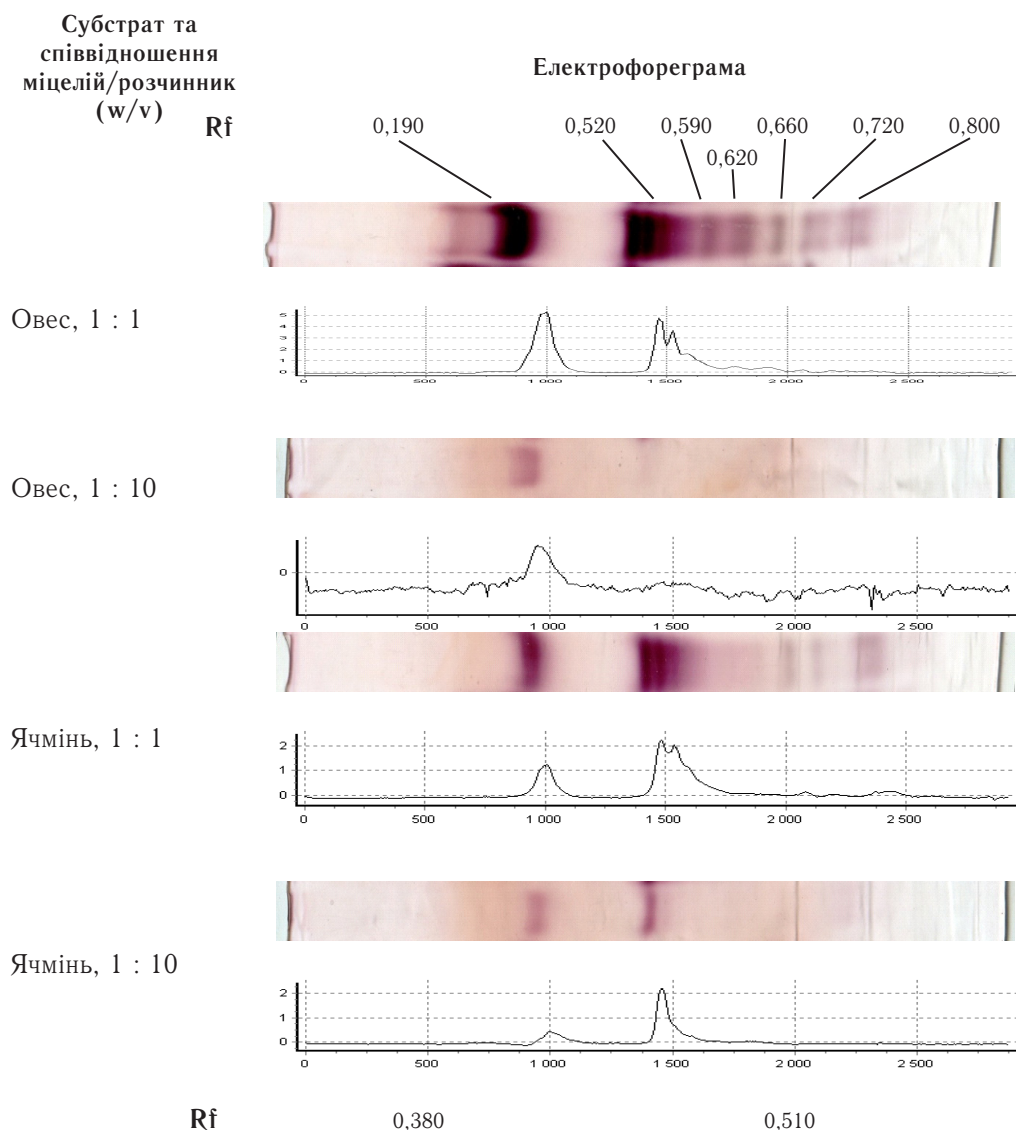


Рис. 2. Експресивність ММФ карбоксилестераз залежно від виду субстрату для вирощування міцелію гриба *G. lucidum*

Fig. 2. Expressivity of carboxylesterases molecular forms depending on the substrate for growing *G. lucidum* mushroom mycelium

Т. Tseng і L. Lay [14] при вирощуванні *G. lucidum* на рідкому середовищі, що містило солод, декстрозу та пептон визначили у міцелії 8 ізоформ карбоксилестераз. При цьому ферменти екстрагували фосфатним буфером з рН 6,5. С. Бойко виявив у диспорової культури *G. lucidum* 8 ММФ цього ферменту, а у моноспорової культури — лише 3 з низькою електрофоретичною рухливістю [9].

Визначення електрофоретичного спектру естераз грибів застосовують для встановлення таксономічного положення та належності до екологічних груп невідомих штамів [10, 14]. Проте, як показали наші дослідження, залежно від умов отримання міцелію та екстрагування спостерігається мінливість електрофоретичних спектрів ММФ карбоксилестераз у діапазоні від 2 до 9 ізоформ. Отже, мінливість, обумовлена механізмами регуляції експресії за різного складу поживного середовища, стадією розвитку гриба та умовами екстрагування ферментів, необхідно враховувати при застосуванні спектрів ММФ карбоксилестераз для таксономії та ідентифікації цих грибів. З цією метою можна рекомендувати визначені нами конститутивні форми ферменту, якими є середньорухливі ізоформи з Rf 0,380 та 0,510.

ЛІТЕРАТУРА

1. Албертс В., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. М.: «Мир». 1987. — Т. 3. — С.107—110.
2. 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.
3. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И., Аронштам А.А., Боркин Л.Я., Малецкий С.И., Полякова Е.В., Манченко Г.П. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.
4. Дворник В.Я., Михеенко И.П., Котов В.С. Генетическая дифференциация по локусам эстераз краевых популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на территории Украины // Цитология и генетика. — 1998. — Т. 32. — № 3. — P. 59—63.
5. Радионов Д.Б., Андриевский А.М., Хаустова Н.Д., Красносельская А.А. Анализ частот встречаемости генотипов и аллелей по локусу эстеразы в природных и лабораторных популяциях *Drosophila melanogaster* // Вісник ОНУ. — 2009. — Т. 14. — Вип. 8. — С. 54—60.
6. Godinho L.F., Reis C.R., Rozeboom H.J., Dekker F.J., Dijkstra B.W., Poelarends G.J., Quax W.J. Enhancement of the enantioselectivity of carboxylesterase A by structure-based mutagenesis // Journal of Biotechnology. — 2012. — № 158. — P. 36—43.
7. Серебров В.В., Алексеев А.А., Глунов В.В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц воштинной моли *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) при микозах // Изв. АН. Сер. биол. 2001. — № 5. — С. 588—592.
8. Заморов В.В., Рыжко И.Л., Друзенко О.В. Полимофизм эстераз бычка-кругляка *Neogobius melanostomus* (Pallas) из акватории острова змеиный // Вестник ОНУ. — 2010. — Т. 15, Вып. 17. — С. 73—81.

9. Бойко С. М. Исследование внутриклеточных ферментных систем моноспоровых культур изолята *Irpex lacteus* Fr. // Immunology, Allergology, Infectology. — 2010. — № 10. — С.18.
10. Матросова Е.В. Цитологический и изоферментный анализ видов рода *Agaricus* Fr. emend. Karst.: дис. на стиск. науч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.24. — Москва, 2007. — 26 с.
11. Андрієвський О.М. Фізико-хімічні методи дослідження білків. Посібник для студентів, аспірантів і стажистів, що навчаються на біологічному факультеті. — Одеса, 2003. — 39 с.
12. Кретович В. Л., Метлицкий Л. В., Бокучава М. А. Скобелева Н.И., Кишковский З.Н., Ильин Г.С., Фениксова Р.В. Техническая биохимия. Учебное пособие для студентов университетов и техн.институты пищевой пром-ти. — М.: «Высшая школа», 1973. — 456 с.
13. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд. МГУ, 1988. — 229 с.
14. Tseng T.G., Lay L.L. Studies of *Ganoderma lucidum*. Dentification of stains by chemical compositions in mycelial extracts // Bot. Bull. Academia Sinica. — 1988. — № 29. — P. 189–199.

Стаття надійшла до редакції 30.07.2012 р.

С.Л. Мирсь, Ю.Ю. Дуденко, Н.С. Бобрешова, Т.В. Гудзенко, В.А. Иваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: kaigen@onu.edu.ua

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ СПЕКТРЫ КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗ *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P. KARST В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ И СУБСТРАТА ВЫРАЩИВАНИЯ

Реферат

При помощи метода электрофоретического разделения в полиакриламидном геле были исследованы спектры множественных молекулярных форм карбоксилэстераз мицелия *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, выращенного на средах с овсом и ячменем. Установлено влияние состава и рН экстрагента на выявляемость изоформ фермента. В зависимости от состава питательной среды и условий экстрагирования фермента на электрофореграммах насчитывалось от 2 до 9 изоформ. Константными множественными молекулярными формами карбоксилэстераз, которые определялись во всех вариантах были две среднеподвижные формы с Rf 0,380 и 0,510.

Ключевые слова: *Ganoderma lucidum*, изоформы карбоксилэстераз, изменчивость.



S. Miros, Yu. Dudenko, N. Bobreshova, T. Gudzenko, V. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082,
Ukraine, e-mail: kafgen@onu.edu.ua

**ELECTROPHORETIC SPECTRA OF CARBOXYLESTERASES
ISOFORMS OF *GANODERMA LUCIDUM* (CURTIS: FR.) P.
KARST DEPENDING ON THE EXTRACTION CONDITIONS
AND THE COMPOSITION OF GROWING SUBSTRATE**

Summary

There were investigated the spectra of carboxylesterases isoforms of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies and cultivation mycelium from the substrates composition with oats and barley using the method of alkaline preliminary electrophoretic differentiation in polyacrylamide gel. The effect of pH of extractant in the expressive forms of the enzyme have been determined. Depending on the version of the experiment on electrophoregramme numbered from 2 to 9 isoforms. Const forms, which were determined in all the variants were two forms with Rf 0,380 and 0,510.

Key words: *Ganoderma lucidum*, isoforms of carboxylesterases, variability.



УДК 579.852.11.61

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

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

КОМПОЗИЦИОННЫЕ СООТНОШЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *B. SUBTILIS* И ПРЕБИОТИКОВ ДЛЯ СИНБИОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

*Изучена активность различных соотношений пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140, а также лактита и лактулозы по отношению к условно-патогенным микроорганизмам (УПМ).*

Установлено, что наиболее выраженный антимикробный эффект проявляла композиция, состоящая из культур исследованных штаммов бацилл в соотношении 1:1. Добавление в среду культивирования пребиотических веществ в концентрации 15% усиливало антагонистическую активность бацилл относительно условно-патогенных микроорганизмов. Степень ингибирования их роста при добавлении в среду культивирования лактита была более высокой по сравнению с внесением лактулозы.

Ключевые слова: синбиотики, композиционный состав, лактит, лактулоза.

Для лечения и профилактики острых кишечных инфекций, а также коррекции дисбактериозов широко применяются пробиотические препараты, созданные на основе различных микроорганизмов: бифидобактерий, лактобактерий, аэробных спорообразующих бактерий рода *Bacillus*.

Однако существующий спектр препаратов-пробиотиков не позволяет полностью решить проблему коррекции микробиоты кишечника вследствие избирательной антагонистической активности пробиотических штаммов входящих в их состав, что в некоторых случаях обуславливает недостаточную эффективность пробиотиков при различных патологических состояниях. Поэтому актуальным и перспективным направлением совершенствования пробиотиков является создание комплексных био-препаратов, в том числе синбиотиков, в состав которых входят различные штаммы бактерий, взаимодополняющие друг друга по спектру антимикробной активности, а также пребиотики. Применение таких препаратов позволит ускорить процесс элиминации из макроорганизма возбудителей

© М.А. Хархота, А.И. Осадчая, Л.В. Авдеева, 2012



различных заболеваний и восстановит видовой и количественный состав микробиоты кишечника [2, 7].

При конструировании экспериментальных образцов таких препаратов необходимо, прежде всего, подобрать оптимальные композиционные соотношения пробиотических культур, а также веществ, используемых в качестве пребиотиков. Одним из критериев эффективности создаваемых композиций является сохранение или усиление высокой антагонистической активности пробиотических штаммов микроорганизмов.

Целью настоящей работы было оценить *in vitro* антагонистическую активность пробиотических штаммов *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140 и пребиотиков лактита или лактулозы.

Материалы и методы

Объектами исследования были пробиотические штаммы *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140, являющиеся основой препарата-пробиотика эндоспорина, созданного для лечения и профилактики дисбактериозов и различных кишечных инфекций [6]. В качестве тест-культур использовали *Staphylococcus aureus* УКМ В-4001, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* УКМ Y-690, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-329 из Украинской коллекции микроорганизмов.

Технология культивирования изучаемых штаммов бацилл, обеспечивающая получение их биомассы, содержащей 10^8 – 10^9 КОЕ/мл, разработана ранее и отражена в технологическом регламенте производства эндоспорина [6].

Бактерии выращивали в периодических условиях на качалке (200 об/мин) при 37 °С в колбах емкостью 750 мл с 50 мл питательной среды (г/л): глюкоза — 15,0, натрия цитрат — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, рН среды — $7,0 \pm 0,2$.

Суспензии штаммов бацилл с исходными концентрациями клеток 10^8 , 10^9 , 10^{10} КОЕ/мл (в работе названные «нагрузкой») смешивали в различных соотношениях (1:1, 1:2, 2:1), к ним добавляли лактит или лактулозу в концентрациях 5, 10, 15%, получая таким образом ряд экспериментальных образцов препарата. Для подбора наиболее оптимального состава создаваемых композиций использовали факторный план для двух независимых переменных на трех уровнях [1]. С учетом предложенной матрицы получили 9 различных композиций из пробиотических штаммов бацилл в различных концентрациях и лактита, а также 9 композиций из бацилл и лактулозы. В качестве критерия оценки эффективности композиции была использована ее антагонистическая активность.

Антагонистическую активность определяли в среде Гаузе-2 при совместном культивировании штаммов тест-культур микроорганизмов, бацилл и пребиотических веществ при 37 °С в течение 24 часов. После выращивания 0,1 мл суспензии из соответствующих разведений высевали на дифференциально-диагностические среды: Эндо для определения ко-



личества жизнеспособных клеток *Escherichia coli*, стафилококковый агар — *Staphylococcus aureus*, малахитовый агар — *Pseudomonas aeruginosa* и Сабуро-агар — *Candida albicans*. Концентрацию бактерий выражали в КОЕ/мл. Степень ингибирования роста тест-культур условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) определяли по методике и выражали в виде потерь их клеток в % [3].

Математическая обработка результатов заключалась в расчете эффектов влияния полученных синбиотических композиций на рост исследуемых тест-культур. Эффекты влияния различных композиций проводили путем определения разницы между показателями средних значений генеральной совокупности и средних отдельных выборок. К генеральной совокупности относили все варианты композиций, содержащие определенный фактор, к отдельным выборкам — варианты композиций, содержащие определенный фактор на отдельном уровне [1].

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

Результаты и их обсуждение

В предыдущих работах показана высокая биосовместимость лактата и лактулозы с пробиотическими штаммами *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140, возможность использования их в качестве пребиотиков для усиления ингибирования роста условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [5].

Результаты исследования по выходу биомассы клеток тест-микроорганизмов при одновременном внесении в среду различных концентраций пробиотических штаммов и пребиотических веществ приведены в табл. 1 и 2.

Установлено, что степень ингибирования тест-культур условно-патогенных микроорганизмов, в первую очередь зависела от начальной концентрации (КОЕ) штаммов пробиотиков в исследуемых композициях. Так, если при использовании в композициях начальной суспензии бацилл, равной 10^8 – 10^9 КОЕ/мл, почти не наблюдалось разницы в уровне антагонистичной активности композиций, то при концентрации клеток штаммов пробиотиков до 10^{10} КОЕ/мл, антагонистичная активность композиций была достоверно более высокой ($p < 0,05$). Так, эффективность композиций с начальной концентрацией клеток бацилл 10^8 – 10^9 КОЕ/мл /мл относительно *E. coli* составляла 34–39%, то при концентрации 10^{10} КОЕ/мл — 44–51%

Также, следует заметить, что эффективность синбиотических композиций значительно зависит от концентрации пребиотических веществ. Наиболее активными были композиции с 15% содержанием лактата или лактулозы. Антагонистичная активность этих композиций была на 4–8% выше, чем в композициях, которые содержали другое количество пребиотических веществ.



Таблица 1

Антагонистическая активность экспериментальных симбиотических композиций с концентрацией клеток пробиотических штаммов 10^8 КОЕ/мл

Table 1

Antagonistic activity of experimental symbiotic compositions with concentration of probiotic cells 10^8 CFU/ml

Вариант композиции	X1	X2	Подавление роста, %			
	<i>B. subtilis</i> УКМ – 5139 : <i>B. subtilis</i> УКМ - 5140	Концентрация пребиотика, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1*	1:1	5	32,98	34,34	45,83	22,11
2*	1:2	5	31,91	38,38	43,75	21,05
3*	2:1	5	32,98	34,34	46,88	22,11
4*	1:1	10	35,11	38,38	47,92	23,16
5*	1:2	10	32,98	34,34	45,83	21,05
6*	2:1	10	32,98	34,34	46,88	21,05
7*	1:1	15	44,68	41,41	52,08	26,32
8*	1:2	15	32,98	33,33	45,83	21,05
9*	2:1	15	32,98	39,39	37,50	23,16
10**	1:1	5	32,26	34,34	46,39	24,47
11**	1:2	5	31,18	34,34	46,39	24,47
12**	2:1	5	32,26	34,34	46,39	24,47
13**	1:1	10	33,33	34,34	46,39	25,53
14**	1:2	10	31,18	34,34	45,36	25,53
15**	2:1	10	32,26	34,34	46,39	23,40
16**	1:1	15	34,41	35,35	47,42	25,53
17**	1:2	15	32,26	34,34	46,39	25,53
18**	2:1	15	33,33	34,34	46,39	22,34

Условные обозначения: * — композиции с лактитом, ** — композиции с лактулозой.

Notations: * — compositions with a lactitol, ** — compositions with lactulosa.



Таким образом, показано, что чем выше исходное содержание клеток пробиотических штаммов бацилл в суспензии при совместном глубинном культивировании композиции, тем более выражено их антагонистическое влияние на рост тест-культур. Причем лактит усиливал этот эффект больше, чем лактулоза.

Таблица 2

Антагонистическая активность экспериментальных синбиотических композиций с концентрацией клеток пробиотических штаммов 10^{10} КОЕ/мл

Table 2

Antagonistic activity of experimental symbiotic compositions with concentration of probiotic cells 10^{10} CFU/ml

Вариант композиции	X1	X2	Подавление роста, %			
	<i>B. subtilis</i> УКМ – 5139 : <i>B. subtilis</i> УКМ - 5140	Концентрация пребиотика, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1*	1:1	5	43,62	44,44	56,25	32,63
2*	1:2	5	42,55	48,48	54,17	31,58
3*	2:1	5	32,98	44,44	57,29	32,63
4*	1:1	10	45,74	49,49	58,33	33,68
5*	1:2	10	43,62	44,44	56,25	42,11
6*	2:1	10	43,62	44,44	57,29	31,58
7*	1:1	15	55,32	51,52	62,50	36,84
8*	1:2	15	43,62	44,44	56,25	31,58
9*	2:1	15	43,62	49,49	47,92	33,68
10**	1:1	5	39,42	44,34	56,39	35,26
11**	1:2	5	38,46	39,34	56,39	35,26
12**	2:1	5	39,42	41,34	56,39	35,26
13**	1:1	10	40,38	42,34	56,39	36,32
14**	1:2	10	38,46	40,34	55,36	36,32
15**	2:1	10	39,42	44,34	56,39	34,21
16**	1:1	15	42,31	49,35	57,42	37,32
17**	1:2	15	38,46	44,34	56,39	36,32
18**	2:1	15	40,38	44,34	56,39	33,16

Условные обозначения: * — композиции с лактитом, ** — композиции с лактулозой.
Notations: * — compositions with a lactitol, ** — compositions with lactulosa.



Полученные результаты подкреплялись математическими расчетами эффектов влияния различных синбиотических композиций (табл. 3).

Так, для композиций, созданных на основе штаммов пробиотиков *B. subtilis*, взятых в соотношении 1:1 с начальным количеством клеток штаммов пробиотиков 10^{10} КОЕ/мл и 15% содержанием пребиотиков, получены наибольшие по абсолютной величине и со знаком «+» значения эффектов влияния.

Таблица 3

Эффекты влияния различных композиций на тест-культуры, рассчитанные математическим путем

Table 3

Influence of the experimental compositions of sinbiotics on the growth of conditional pathogenic microorganisms, calculated mathematically

Вариант композиции	X1	X2	Эффекты влияния			
	<i>B. subtilis</i> УКМ – 5139 : <i>B. subtilis</i> УКМ - 5140	Концентрация пребиотика, %	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1*	1:1	5	-0,24	-2,36	0,00	-1,40
2*	1:2	5	-0,24	-2,36	0,00	-2,46
3*	2:1	5	1,89	2,69	2,08	-0,35
4*	1:1	10	-0,24	-2,36	0,00	8,07
5*	1:2	10	-1,30	1,68	-2,08	-2,46
6*	2:1	10	11,47	4,71	6,25	2,81
7*	1:1	15	-0,24	2,69	-8,33	-0,35
8*	1:2	15	-0,24	-2,36	1,04	-2,46
9*	2:1	15	-10,87	-2,36	1,04	-1,40
10**	1:1	5	-0,21	-0,11	0,00	0,16
11**	1:2	5	-1,18	-0,11	0,00	0,22
12**	2:1	5	0,75	-0,11	0,00	0,63
13**	1:1	10	-1,18	-0,11	-1,03	0,32
14**	1:2	10	-1,18	-0,11	0,00	0,16
15**	2:1	10	2,67	0,90	1,03	1,21
16**	1:1	15	0,75	-0,11	0,00	-1,95
17**	1:2	15	-0,21	-0,11	0,00	-0,89
18**	2:1	15	-0,21	-0,11	0,00	0,16

Условные обозначения: * — композиции с лактитом, ** — композиции с лактулозой.
Notations: * — compositions with a lactitol, ** — compositions with lactulosa.



В композициях с использованием других соотношений штаммов бацилл и других концентраций пребиотиков значения эффектов были получены со знаком «—» или более низкие по абсолютной величине.

Таким образом, для создания композиций из штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140, обладающих наибольшей антагонистической активностью, наиболее эффективным является композиция с одинаковым содержанием клеток каждого штамма. Полученные данные подтвердили целесообразность использования такого сочетания этих штаммов при создании синбиотической композиции на их основе [4, 6].

В предыдущих работах была также показана зависимость степени влияния пребиотиков от их концентрации. Добавление в питательную среду лактата или лактулозы в концентрации 15–20% стимулировало рост пробиотических штаммов бацилл и ингибировало рост условно-патогенных микроорганизмов [5].

Результаты изучения влияния концентрации пребиотических веществ в составе экспериментальных композиций на антагонистическую активность входящих в их состав пробиотических штаммов относительно условно патогенных микроорганизмов подтвердили вышесказанное. Как лактит, так и лактулоза в концентрации 15% показали наиболее высокий эффект угнетения роста тест-культур. На это также указывают рассчитанные при математической обработке эффекты влияния. Они получились со знаком «+» и отличались по абсолютной величине от таковых композиций с концентрациями пребиотиков 5 и 10% (табл. 3).

Следовательно, наиболее высокая антагонистическая активность штаммов пребиотиков *B. subtilis* УКМ-5139 и *B. subtilis* УКМ-5140 по отношению к условно-патогенным микроорганизмам может быть получена при равном соотношении их клеток (1:1). Такую композицию можно рассматривать как вариант технологии для создания комплексного синбиотического препарата на основе исследуемых штаммов бактерий рода *Bacillus*. Включение в состав синбиотика таких пребиотических веществ как лактит или лактулоза в концентрации 15% будет способствовать усилению их антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бирюков В.В. Практическое руководство по применению математических методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий в многофакторных процессах. Изд.-во Зинатне, Рига. 1969. — 79 с.
2. Бондаренко В.М., Грачева В.М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов // Фарматека. — 2003. — № 7. — С. 1–2.



3. Пульхеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям по дисциплине «пробиотики». Ульяновск. — 2010. — 70 с.

4. Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М. Пребиотик лактит как компонент биопрепарата из аэробных бацилл // Микробиологический журнал. 2008. — Т. 70, № 6. — С. 34–41.

5. Хархота М.А., Осадча А.И., Авдеева Л.В. Пребиотические свойства лактита и лактулозы // Микробиологический журнал. — 2011. — № 6. — С. 32–36.

6. Пат. 14569 Україна. Біопрепарат «ендоспорин» для лікування та профілактики ендометритів у тварин. // В.В. Смірнов, В.О. Кудрявцев, А.І. Осадча, Г.М. Калиновський. — Опубл. 20. 01.1997 р.

7. Bengmark S. Coloni food: pre- and probiotics // Amer. J. Gastroenterol. — 2000. — 95, № 1, — suppl. — P. 55–57.

Стаття надійшла до редакції 06.09.2011 р.

UDC 579.852.11.61

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

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

COMPOSITION INTERRELATIONS OF PROBIOTIC STRAINS *B. SUBTILIS* AND PREBIOTICS FOR THE SINBIOTIC DRUG

Summary

Activity of various compositions of probiotic strains *B. subtilis* УКМ-5139 and *B. subtilis* УКМ-5140, and also lactitol and lactulosa in relation to conditionally pathogenic microorganisms is studied.

It is established that the most expressed antimicrobial effect was shown by the composition consisting the cultures of the investigated strains of bacilli in the ratio 1:1. The addition of prebiotics substances to cultivation medium in concentration of 15% strengthened antagonistic activity of bacilli of conditionally pathogenic microorganisms. The level of inhibition of their growth in addition to cultivation medium of lactitol was higher in comparison with addition of lactuloses.

Key words: synbiotics, structure of composition, lactitol, lactulosa.



УДК 579.852.11.61

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

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

**КОМПОЗИЦІЙНІ СПІВВІДНОШЕННЯ ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ
B. SUBTILIS ТА ПРЕБІОТИКІВ ДЛЯ СИНБІОТИЧНОГО
ПРЕПАРАТУ**

Реферат

Вивчена активність різних співвідношень пробіотичних штамів *B. subtilis* УКМ-5139 і *B. subtilis* УКМ-5140, а також лактиту і лактулози по відношенню до умовно патогенних мікроорганізмів.

Встановлено, що найбільш виражений антимікробний ефект проявляла композиція, яка складалася з культур досліджуваних штамів бацил в співвідношенні 1:1. Додавання в середовище культивування пребіотичних речовин в концентрації 15% посилювало антагоністичну активність бацил відносно умовно патогенних мікроорганізмів. Ступінь інгібування їх росту при додаванні у середовище культивування лактиту була вищою в порівнянні з внесенням лактулози.

Ключові слова: синбіотики, композиційний склад, лактит, лактулоза.



УДК 582.282.23.045

**О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, І.І. Сейфулліна, Б.М. Галкін,
Т.О. Філіпова**

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

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ ІЗОНІКОТИНОВОЇ КИСЛОТИ ТА КОМПЛЕКСІВ СТАНУМУ (IV) НА ЇХ ОСНОВІ

*Досліджено вплив гідразиду ізонікотинової кислоти, ізонікотиноїлгідразонів 4-диметиламінобенз-, 2-гідроксибенз-, 2-гідрокси-1-нафтальдегідів та нових комплексів стануму (IV) на основі перелічених сполук на ріст тест-штамів умовно-патогенних бактерій *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, що досліджені сполуки в концентраціях 25, 50 та 100 мкг/мл здатні негативно впливати на ріст бактерій. Найбільш активними щодо більшості мікроорганізмів виявилися ізонікотиноїлгідразон 2-гідрокси-1-нафтальдегіду та комплекс стануму (IV) на його основі, які за концентрації 50 мкг/мл та 100 мкг/мл відповідно практично повністю пригнічують ріст умовно-патогенних бактерій. Найчутливішим до похідних ізонікотинової кислоти та комплексів стануму (IV) на їх основі є штам *Proteus vulgaris*.*

Ключові слова: гідразид, ізонікотиноїлгідразон, комплекси стануму (IV), умовно-патогенні бактерії, антимікробний ефект.

Формування у мікроорганізмів стійкості до антибіотиків — одна з найактуальніших проблем клінічної медицини. Вона обумовлена, з одного боку, безконтрольним застосуванням хіміотерапевтичних засобів, а з іншого — широким використанням антибіотиків у тваринництві, харчовій промисловості та ін. Сучасна наука розглядає декілька шляхів вирішення цієї проблеми, серед яких один із найперспективніших, — спрямований синтез сполук, що виявляють специфічну активність.

Останнім часом велика увага з боку дослідників надається координаційним сполукам біологічно активних металів та лігандів, що, як правило, виявляють синергізм дії та низьку токсичність [4]. У цьому відношенні дуже цікаві комплекси гідразонів, для яких встановлені різні види фізіологічної активності: антибактеріальна [1, 2, 6], протизапальна [7], а також протипухлинна активності [3, 5]. Раніше авторами була виявлена висока антибактеріальна активність та її широкий спектр у комплексів

© О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, І.І. Сейфулліна, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, 2012



стануму(IV) з нікотиніолгідразонами [2]. Отримані результати підтвердили відомі з літератури дані про антимікробну активність сполук стануму, які тривалий час застосовуються в медицині, зокрема, в стоматологічній практиці [10], тому синтез та дослідження антимікробних властивостей нових координаційних сполук стануму(IV) з біологічно активними лігандами є актуальним.

Метою даної роботи було вивчення впливу гідразиду ізонікотинової кислоти та продуктів його конденсації з різними альдегідами, а також комплексів стануму (IV) на їх основі на ріст умовно-патогенних бактерій *S. aureus*, *M. luteus*, *P. vulgaris* та *P. aeruginosa* для визначення їх потенційної антимікробної активності.

Матеріали і методи

У роботі використані гідразид ізонікотинової кислоти (HL¹) кваліфікації «осч». Ізонікотиніолгідразони отримані реакцією конденсації (HL¹) з 4-N,N-диметиламінобенз- (HL²), 2-гідроксибенз- (H₂L³) і 2-гідрокси-1-нафтальдегідами (H₂L⁴) за загальною методикою [11]. Їх чистоту та індидуальність контролювали методом тонкошарової хроматографії та за $t_{пл.}$. Комплекси стануму(IV) вперше синтезовані на кафедрі загальної хімії та хімії полімерів ОНУ імені І.І. Мечникова взаємодією SnCl₄ з HL^{1,2} та HL^{3,4} за розробленими методиками [11]. Отримані сполуки [SnCl₄(L·H¹)] (1), [SnCl₄(L·H²)] (2) [SnCl₃(HL·H³)] (3), [SnCl₃(HL·H⁴)] (4) характеризували за показниками сукупності фізико-хімічних методів дослідження: вимір електропровідності, мас-спектрометрія, термогравіметрія, інфрачервона спектроскопія, рентгено-структурний аналіз (сполуки 1, 3, 4). Схеми будови HL¹⁻⁴ та відповідних комплексів наведені в табл. 1.

Як тест-мікроорганізми використовували штами бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України. Зберігання тест-штамів здійснювали на м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 4 °С. Для досліджень використовували добові культури, вирощені на МПА при 37 °С.

Для визначення антибактеріальної активності HL¹⁻⁴ і комплексів 1–4 готували робочі розчини, що містили по 1,25; 2,5 та 5,0 мг кожної сполуки в 1 мл диметилсульфоксиду. У дослідні пробірки відбирали по 20 мкл робочих розчинів і доводили об'єм до 1 мл рідким середовищем Гісса з глюкозою без індикатора Андреде [8]. Кінцева концентрація сполук в середовищі складала 25; 50 і 100 мкг/мл. Кількість паралелей для кожної концентрації дорівнювала 5. Усі експерименти проводили в 3-х повторях.

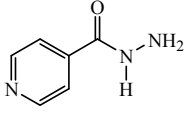
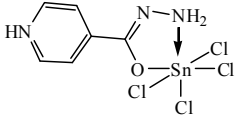
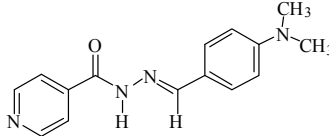
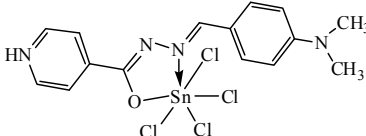
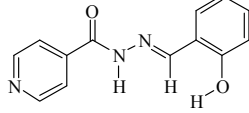
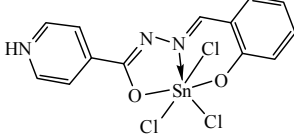
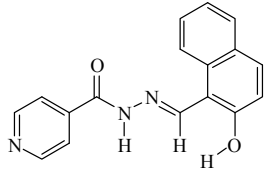
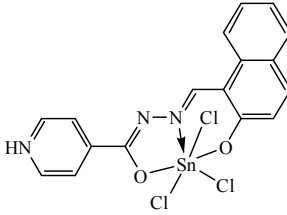
Культури тест-мікроорганізмів змивали з МПА стерильним фізіологічним розчином і вносили в пробірки з досліджуваними сполуками до кінцевої концентрації 1 · 10³ КУО/мл. Культури інкубували при температурі 37 °С протягом 24 год. Оптичну щільність культури вимірювали



Будова HL¹⁻⁴ та комплексів 1-4

Table 1

The structure of HL¹⁻⁴ and complexes 1-4

		HL ¹	1
		HL ²	2
		H ₂ L ³	3
		H ₂ L ⁴	4

на спектрофотометрі «Spekol-10» (Німеччина) за 540 нм. Контролем слугували культури мікроорганізмів, вирощені в середовищі Гісса без досліджуваних сполук.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Розраховували середні значення показників (\bar{X}) та їх стандартну помилку ($S\bar{X}$). Вірогідність відмінностей між середніми визначали за критерієм Стьюдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів на рівні значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$).

Результати та їх обговорення

Вивчення впливу гідразиду ізонікотинової кислоти на ріст тест-штамів показало, що дана сполука в досліджених концентраціях стимулювала накопичення біомаси всіх мікроорганізмів, за виключенням *M. luteus* (рис. 1). На відміну від нього, комплекс 1 виявляв інгібувальну активність щодо усіх тест-штамів. При цьому ріст *M. luteus* і *P. vulgaris* пригнічувався практично повністю. Максимальний інгібувальний ефект за використаних концентрацій сполуки на культури *S. aureus* та *P. aeruginosa* складав 10–35% і 30–54% відповідно.

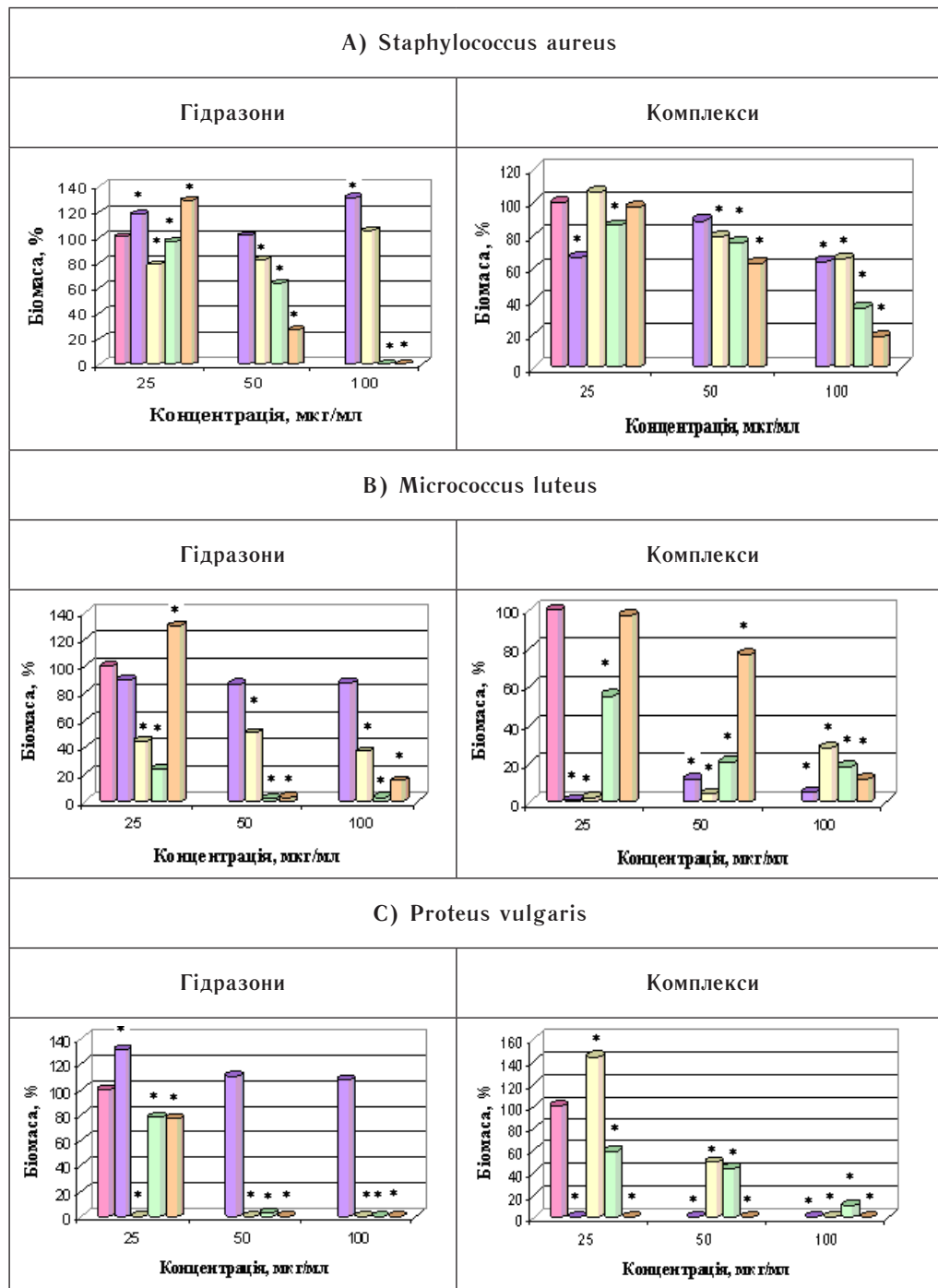
Гідразон HL² не виявив помітної пригнічувальної дії на *S. aureus* і *P. aeruginosa*, а за концентрації 100 мкг/мл уповільнював ріст *M. luteus* на 63,1% у порівнянні з контролем та повністю пригнічував ріст *P. vulgaris* за всіх концентрацій. Комплекс 2 спричинив слабку антимікробну дію на *S. aureus* і досить значну (до 55%) на культуру *P. aeruginosa*. Щодо *M. luteus* ця сполука була активнішою, ніж HL², і практично повністю пригнічувала ріст мікроорганізму. Цікаво зазначити, що, на відміну від HL², ріст *P. vulgaris* за концентрації цього комплексу 25 мкг/мл був інтенсивнішим. За вмісту сполуки 50 мкг/мл і 100 мкг/мл спостерігали пригнічувальний ефект на рівні 50,6% і 100%, відповідно.

Заміна замісника в альдегідному фрагменті ізонікотиноїлгідразону HL² (-N(CH₃)₂ на -OH) призвела до прояву у HL³ пригнічувальної дії на ріст усіх тест-штамів. Найбільш чутливою була культура *M. luteus*, в якій значне уповільнення росту спостерігалось за всіх концентраціях сполуки і складало від 76,4% до 96,9%. Ріст *P. vulgaris* пригнічувався на 97,1% в присутності 50 мкг/мл HL³ і повністю припинявся при концентрації 100 мкг/мл. *S. aureus* і *P. aeruginosa* проявляли помітну чутливість лише до максимальної концентрації цієї сполуки, при цьому ріст вказаних тест-штамів пригнічувався на 100% і 44,1% відповідно. Комплекс 3 мав більш слабку, у порівнянні з HL³, інгібувальну активність щодо *M. luteus*, *P. vulgaris*. і *S. aureus*: пригнічення росту було на рівні 81,4%, 89,4% та 63,4% відповідно. Антимікробна дія сполуки 3 на клітини *P. aeruginosa* залишалася подібною до активності вихідного гідразону.

Заміна альдегідного фрагмента в HL³ (2-гідроксибенз- на 2-гідроксинафт-) призвела до зміни активності гідразону. Так, присутність у живильному середовищі мінімальної з досліджених концентрацій HL⁴ викликала помітну стимуляцію росту всіх тест-штамів, за винятком *P. vulgaris*. Однак при підвищенні вмісту сполуки в середовищі до 50 та 100 мкг ріст *S. aureus* пригнічувався на 73,3% та 100%, *P. vulgaris* – 100%, *M. luteus* – на 96,9% і 84,3%, *P. aeruginosa* – 100% та 91,9% відповідно. Слід зазначити, що у двох останніх випадках збільшення концентрації призводило до зниження пригнічувального ефекту. Ця сполука єдина з усіх вивчених гідразонів в концентрації 50 мкг/мл повністю пригнічувала ріст бактерій *P. aeruginosa*, відомих своєю виключною природною стійкістю до антимікробних препаратів [9].

Комплекс 4, на відміну від HL⁴, в усіх концентраціях викликав уповільнення росту тест-штамів. Однак у випадку грампозитивних бактерій значний ефект виявлено за максимальної концентрації, і він був меншим у порівнянні з тим, що викликається гідразоном. Затримка росту *S. aureus* і *M. luteus* становила близько 80%. Ріст *P. vulgaris* повністю припинявся за наявності даної сполуки. Слід зазначити, що комплекс 4, єдиний з усіх досліджених комплексів, подібно до вихідного гідразону повністю пригнічував ріст *P. aeruginosa* за максимальної концентрації.





Продовження рис. див. на стор. 74.

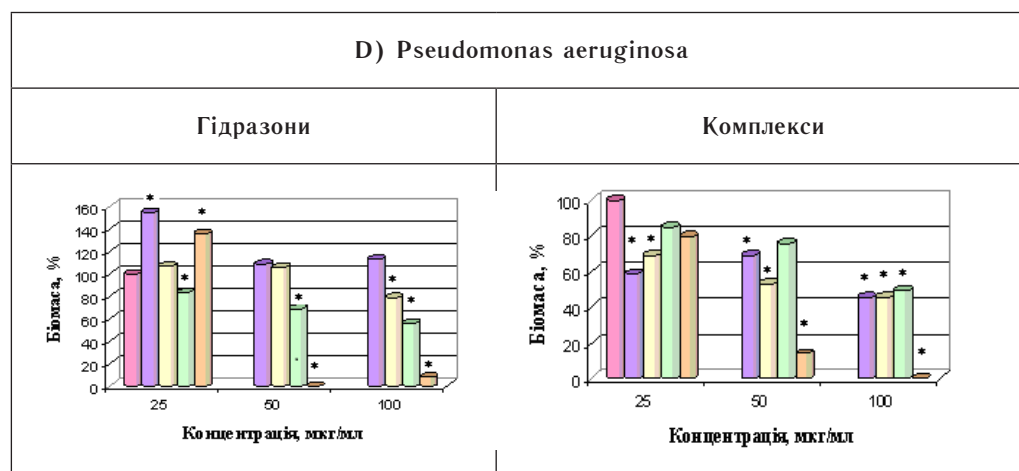


Рис. 1. Ріст тест-штамів *S. aureus*, *M. luteus*, *P. vulgaris* та *P. aeruginosa* за присутності сполук HL¹, HL², HL³, HL⁴ і комплексів 1–4

Примітка: * – різниця вірогідна ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем,

гідразони: ■ – контроль, ■ – HL¹, ■ – HL², ■ – HL³, ■ – HL⁴;

комплекси: ■ – контроль, ■ – комплекс 1, ■ – комплекс 2, ■ – комплекс 3, ■ – комплекс 4.

Fig. 1. The growth of the test-strains *S. aureus*, *M. luteus*, *P. vulgaris* and *P. aeruginosa* in the presence of HL¹, HL², HL³, HL⁴ and complexes 1–4

Note: * – the difference is reliable in comparison with control,

hydrazones: ■ – control, ■ – HL¹, ■ – HL², ■ – HL³, ■ – HL⁴;

complexes: ■ – control, ■ – complex 1, ■ – complex 2, ■ – complex 3, ■ – complex 4.

Порівнюючи активність досліджуваних сполук у відношенні окремих штамів (табл. 2), можна стверджувати, що найвищою активністю щодо клітин стафілокока вирізняються H₂L⁴ і його комплекс 4, які за максимальної концентрації викликали пригнічення росту *S. aureus* більш ніж на 80%. Ріст *M. luteus* найефективніше інгібували HL², комплекси 1 і 2. Представляє інтерес те, що ріст *P. vulgaris* – мікроорганізму, відомого своєю резистентністю до широкого кола антимікробних засобів [12], – повністю пригнічували усі досліджені сполуки, крім HL¹. До того ж HL² та комплекс 4 виявляли цей ефект за мінімальної концентрації. У цілому, зазначений мікроорганізм проявив найбільшу чутливість до досліджених речовин серед досліджуваних тест-штамів. Сполуки H₂L⁴ та 4 ефективно пригнічували ріст штаму бактерій *P. aeruginosa*, які також характеризуються високим рівнем антибіотикорезистентності.



Таблиця 2

Концентрації досліджуваних сполук (мкг/мл), які викликають максимальне інгібування росту (%) тест-штамів

Table 2

The concentrations of the studied compounds ($\mu\text{g/ml}$) causing maximum inhibitory effect (%) on test-strain growth

Гідразон і сполука	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>
HL¹	*	13,2/50**	*	*
1	35,9/100	99,4/25	100/25	54,3/100
HL²	21,6/25	63,1/100	100/25	63,6/100
2	34,2/100	97,8/25	100/100	54,6/100
H₂L³	100/100	96,9/50	100/50	44,1/50
3	63,9/100	81,5/100	89,4/100	50,5/100
H₂L⁴	100/100	97/50	100/50	100/50
4	81,6/100	87,8/100	100/25	100/100

Примітка: * — стимуляція росту мікроорганізму при додаванні досліджуваної сполуки в середовище, ** — максимальне пригнічення росту (%)/концентрація (мкг/мл)

Аналіз антимікробного спектра кожної сполуки показав, що найактивнішими щодо всіх тест-штамів були H₂L⁴ та його комплекс 4. При цьому інгібувальний ефект H₂L⁴ був вищим. Таким чином, показано, що специфіку впливу на ріст умовно-патогенних бактерій визначають особливості складу і будови гідразонів та комплексів.

Отримані дані дозволяють розглядати досліджені сполуки як перспективні для створення на їх основі синтетичних антимікробних препаратів. Особливо привертає увагу антимікробна активність щодо *P. aeruginosa* з огляду на обмежену кількість сполук, здатних ефективно інгібувати ріст цього мікроорганізму [9].

ЛІТЕРАТУРА

1. Зеленин К.Н., Хорсеева Л.А., Алексеев В.В. Физиологически активные комплексы гидразонов // Хим.-фарм. журн. — 1992. — Т. 26, № 5. — С. 30–36.
2. Зінченко О.Ю., Шматкова Н.В., Філіпова Т.О., Сейфулліна І.Й., Подуст В.С. Антибактеріальна активність нікотиніолгідразону саліци-



лового альдегіду та його комплексів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — №1(5). — С. 44–55.

3. Китаев Ю.П., Бузыкин Б.И. Гидразоны. — М.: Наука, 1974. — 416 с.

4. Крисс Е.Е., Волченкова И.И., Григорьева А.С. Координационные соединения металлов в медицине. — Киев: Наук. думка, 1986. — 216 с.

5. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Шматкова Н.В. Вивчення впливу комплексів германію (IV) з саліцилальгідрозонами хлорбензойної та гідроксибензойної кислоти на ексудативне запалення, яке викликано різними флогогенними агентами // Biomedical and Biosocial Anthropology. — 2004. — № 3. — С. 81–83.

6. Самусь К.М., Цапков В.И., Бурденко Т.А., Бурачева С.А., Тонгай М.М., Сохан Ш.И. Синтез и противомикробная активность координационных соединений 3d-элементов с бензоилгидразоном салицилового альдегида // Проблемы фармакологии. — 1990. — № 3. — С. 41–45.

7. Сейфулліна І.Й., Нікітін О.В., Галкін Б.М., Шматкова Н.В. та ін. Протизапальна активність комплексів германію з саліцилальгідрозонами нітробензойної кислоти // Одеськ. мед. журнал. — 2003. — № 3 (77). — С. 21–23.

8. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175–177.

9. Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Стецюк О.У., Андреева А.С., Щербников А.Г. Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии России // Журнал КМАХ. — 2003. — № 5. — С. 35–46.

10. Vacchi A., Bonarti A., Carcelli M. Organotin complexes pyrrole-2,5-dikarboxaldehyde bis (acylhydrazones). Synthesis, structure antimicrobial activity and genotoxicity // J. Inorg. Biochem. — 1998. — Vol. 69. — P. 101–112.

11. Jadon Gunjan, Bhadauria R.S., Diwaker A.k. Synthesis, spectral and biological evaluation of some hydrazone derivatives // IJARPB. — 2012. — Vol. 1, № 1. — P. 25–38.

12. Yang Y.J., Livermore D.M. Chromosomal beta-lactamase expression and resistance to beta-lactam antibiotics in *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii* // Antimicrob. Agents Chemother. — 1988. — Vol. 32, № 9. — P. 1385–1391.

Стаття надійшла до редакції 17.05.2012 р.



**О.Ю. Зинченко, Н.В. Шматкова, И.И. Сейфуллина, Б.Н. Галкин,
Т.О. Филиппова**

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

**АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ
ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И КОМПЛЕКСОВ ОЛОВА(IV)
НА ИХ ОСНОВЕ**

Реферат

Исследовано влияние гидразида изоникотиновой кислоты (HL^1), изоникотиноилгидразонов 4-диметиламинобенз- (HL^2), 2-гидроксибенз- (H_2L^3), 2-гидрокси-1-нафталальдегидов (H_2L^4) и новых комплексов $[SnCl_4(L \cdot H^1)]$ (1), $[SnCl_4(L \cdot H^2)]$ (2) $[SnCl_3(HL \cdot H^3)]$ (3), $[SnCl_3(HL \cdot H^4)]$ (4) на рост тест-штаммов условно-патогенных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, что исследованные соединения в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл способны значительно подавлять рост тест-штаммов. Наиболее активным в отношении большинства микроорганизмов оказались соединения (H_2L^4) и его комплекс 4: при концентрации 50 мкг/мл (H_2L^4) и 100 мкг/мл (комплекс 4) практически полностью подавлялось накопление биомассы всех тест-штаммов. Наиболее чувствительным к исследованным веществам среди всех тест-штаммов оказался *Proteus vulgaris*.

Ключевые слова: гидразид, изоникотиноилгидразон, комплексы олова(IV), условно-патогенные бактерии, антимикробный эффект.



**O. Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.I. Seifullina, B.M. Galkin,
T.O. Philipova**

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

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF IZONICOTINIC ACID
DERIVATIVES AND STANNUM (IV) COMPLEXES
ON THEIR BASIS**

Summary

It has been studied the influence of izonicotinic acid hydrazide (HL^1), izonicotinhydrazones 4-dimethylaminobenz (HL^2), 2-hydroxybenz- (H_2L^3), 2-hydroxy-1-naphthaldehydes (H_2L^4) and new complexes $[SnCl_4(L \cdot H^1)]$ (1), $[SnCl_4(L \cdot H^2)]$ (2) $[SnCl_3(HL \cdot H^3)]$ (3), $[SnCl_3(HL \cdot H^4)]$ (4) on the opportunistic bacterial strain *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* growth. It has been shown, that studied compounds at the concentrations 25, 50 и 100 $\mu\text{g/ml}$ are able to inhibit significantly the test-strain biomass increase. The most active were compounds (H_2L^4) and its complex 4: at the concentration 50 $\mu\text{g/ml}$ (H_2L^4) and 100 $\mu\text{g/ml}$ (complex 4) it was observed almost complete inhibition of all test-strain growth. The most sensible to studied compounds among all test-microorganisms was *Proteus vulgaris*.

Key words: hydrazide, izonycotinoylhydrazone, stannum(IV) complexes, opportunistic bacteria, antimicrobial effect.



М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

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

ОСОБЛИВОСТІ КОНСТРУКТИВНОГО АНАБОЛІЗМУ ВУГЛЕВОДІВ У КЛІТИНАХ ЗЕЛЕНИХ СІРКОВИХ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8

Зелені сіркові бактерії Chlorobium limicola ІМВ К-8 в процесі аноксигенного фотосинтезу нагромаджують в клітинах глікоген. Зростання рівня глікогену в клітинах спостерігали за умов внесення до середовища культивування органічних донорів карбону при одночасному мінеральному голодуванні. За цих умов 20% зменшення концентрації діоксиду карбону та внесення нітрат іону в інкубаційну суміш супроводжувалось зниженням рівня біомаси та зростанням інтенсивності конструктивного анаболізму вуглеводів в клітинах *C. limicola* ІМВ К-8. Подальше зниження концентрації діоксиду карбону та мінеральних компонентів середовища GSB веде до пригнічення інтенсивності фотосинтезу у клітинах зелених сіркові бактерії.

Ключові слова: зелені сіркові бактерії, глюкоза, глікоген.

Зелені фотосинтезувальні сіркові бактерії (родина *Chlorobiaceae*) — облігатні фотолітоавтотрофи [1]. Подібно до представників родини *Chloroflexaceae* та *Chromatiaceae*, вони не можуть використовувати воду як донор електронів і не утворюють молекулярний кисень у процесі фотосинтезу [2, 3]. Натомість донорами електронів, які потрібні для асиміляційної редукції CO₂, є відновлені сполуки сірки, здебільшого гідроген сульфід. При культивуванні зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 у мінеральному середовищі GSB [5] за наявності донора електронів і CO₂ на світлі в клітинах може нагромаджуватись глюкоза і продукт її полімеризації — глікоген [3]. Умови синтезу та роль цих інтермедіатів у метаболізмі зелених сіркових бактерій за різних умов культивування остаточно не з'ясовані.

У цій роботі наведені результати досліджень деяких особливостей конструктивного анаболізму вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8.

Матеріали і методи

Дослідження були проведені з використанням культури зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 [3].



Бактерії культивували у рідкому середовищі GSB [1, 3] протягом 8–10 діб при температурі 24–25 °С. Біомасу бактерій визначали фотоелектроколориметрично [7]. Як контроль в експериментах використовували культури, що розвивались у повноцінному поживному мінеральному середовищі GSB без внесення додаткових сполук.

Клітини бактерій руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН–2Т частотою 22 кГц протягом 5 хв у скляних товстостінних пробірках, занурених у лід. Уламки клітин відділяли центрифугуванням при 15 тис. об/хв протягом 45 хв при 4 °С. Отримані безклітинні екстракти відразу використовували для визначення вмісту глюкози. Вміст глюкози у безклітинних екстрактах визначали ферментативно, за допомогою аналітичного набору «Діаглюк-2» [6]. Концентрацію глікогену розраховували по глюкозі після проведення кислотного гідролізу. Гідроліз глікогену проводили кип'ятінням в присутності 1Н H₂SO₄ протягом трьох годин [4]. Визначення вмісту амінного азоту поводили використовуючи нінгідриновий реактив [6].

Результати є статистично достовірні, розбіжності подані ідентично величині кожної окремої точки, згідно величини символу. Кількість повторів була десятикратною у кожній паралелі.

Результати та їх обговорення

На відміну від пурпурових сіркових бактерій, описані в літературі штами зелених сіркових бактерій ростуть виключно фотолітоавтотрофно [3, 6]. Діоксид карбону у них редукується у відновному циклі трикарбонових кислот [2], ключовими ферментами якого є 2-оксоглутарат:ферредоксин-оксидоредуктаза, фумаратредуктаза і АТФ-залежна цитрат ліаза [3]. Відновний цикл трикарбонових кислот забезпечує клітини попередниками для біосинтезу клітинних компонентів, зокрема вуглеводів [8]. Глюкоза в клітинах зелених сіркобактерій знаходиться як у вільному так і полімеризованому стані, що представлений глікогеном, вміст якого у клітинах *S. limicola* ІМВ К-8 може сягати від 5 до 12% сухої ваги клітин [1, 3]. Оскільки біотехнологічне виробництво глікогену є перспективним напрямком його промислового отримання, наступним кроком у нашій роботі було вивчення деяких особливостей конструктивного анаболізму цього полісахариду у клітинах штаму *S. limicola* ІМВ К-8 [1, 2].

Перш за все була перевірена можливість збільшення синтезу глікогену за умов одночасного нітрогенного та фосфорного голодування клітин (рис. 1).

Встановлено, що окреме нітрогенне та фосфорне голодування призводить до стимулювання глікогенолізу і спричиняє зростання кількості глікогену до 70–80 мг/г сухої ваги клітин [1, 3]. Натомість одночасне голодування по обох цих сполуках призводить до подвійного зростання кількості глікогену (рис. 1) в порівнянні із мінеральним середовищем GSB (контроль).



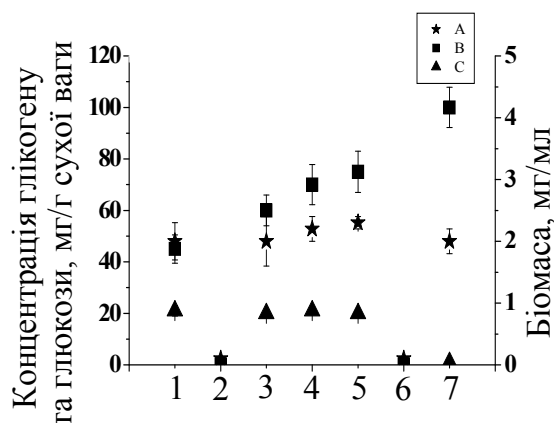


Рис. 1. Ріст (А), синтез глікогену (В) та глюкози (С) у клітинах *C. limicola* IMB K-8

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB без фосфору), 3 – (GSB 50% фосфору), 4 – (GSB без азоту), 5 – (GSB 50% азоту), 6 – (GSB без азоту і фосфору), 7 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту)

Fig. 1. Growth (A), glycogen synthesis (B) and glucose (C) in cells of *C. limicola* IMB K-8

1 – (full GSB), 2 – (GSB without phosphorus), 3 – (GSB 50% phosphorus), 4 – (GSB without nitrogen), 5 – (GSB 50% nitrogen), 6 – (GSB without nitrogen and phosphorus), 7 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen)

Раніше нами було встановлено [1, 2, 3], що з усієї різноманітності органічних низькомолекулярних інтермедіатів, лише внесення у середовище пірувату і ацетату супроводжувалось зростанням рівня глікогену в клітинах *C. limicola* IMB K-8 що, очевидно, пояснюється функціонуванням у досліджуваних бактерій циклу Арнона, в процесі роботи якого утворюється ацетат, який за участю специфічної ацетаткарбоксилази, карбоксилюється до пірувату з подальшим його перетворенням, у реакціях глікогенолізу.

Натомість за умов нітрогенного і фосфорного голодування внесення ацетату у середовище культивування стимулювало нагромадження глікогену до 150–160 мг/г сухої ваги. Слід зазначити, що за цих умов спостерігали зниження біомаси *C. limicola* IMB K-8. Характерно, що клітини з підвищеним рівнем синтезу глікогену, практично повністю використовували ендogenous молекулярну глюкозу (рис. 2).

Аналогічні дослідження були проведені, за умов нітрогенного та фосфорного голодування, із додатковим внесенням пірувату та ацетату. За цих умов спостерігали також зниження біомаси клітин *C. limicola* IMB K-8, проте рівень глікогену в порівнянні з контролем зростав майже у чотири рази (рис. 3).

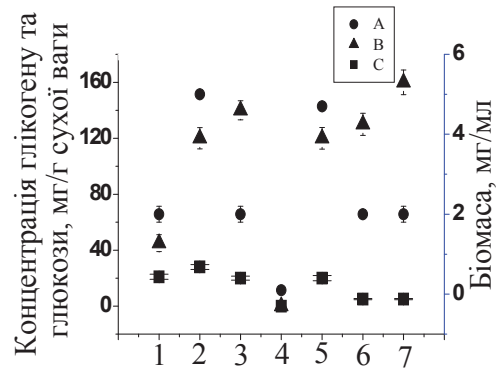


Рис. 2. Вплив ацетату на ріст (A) і синтез глікогену (B) та глюкози (C) за умов голодування по сполукам нітрогену та фосфору

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB + ацетат), 3 – (GSB з 50% фосфору + ацетат), 4 – (GSB без фосфору + ацетат), 5 – (GSB з 50% азоту + ацетат), 6 – (GSB без азоту + ацетат), 7 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат).

Fig. 2. Effect of acetate on growth (A) and glycogen synthesis (B) and glucose (C) under nitrogen starvation in the compounds and phosphorus

1 – (full GSB), 2 – (GSB + acetate), 3 – (GSB with 50% phosphorus + acetate), 4 – (GSB without phosphorus + acetate), 5 – (GSB with 50% nitrogen + acetate), 6 – (GSB without nitrogen + acetate), 7 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate).

Також слід зазначити, що за наявності органічних донорів карбону (пірувату, ацетату, ізоцитрату та α -кетоглутарату) в середовищі спостерігаються деякі відмінності у фотоасиміляції CO₂ клітинами.

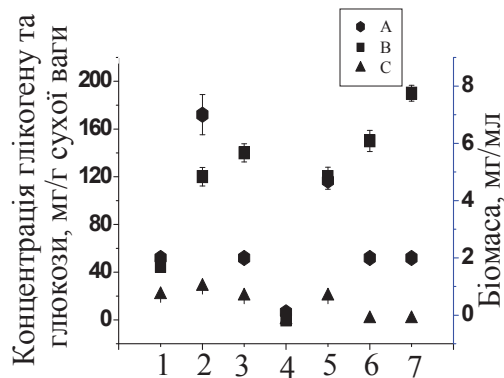


Рис. 3. Вплив ацетату та пірувату на ріст (A), синтез глікогену (B) і глюкози (C) за умов голодування по сполукам нітрогену та фосфору

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB + ацетат + піруват), 3 – (GSB з 50% фосфору + ацетат + піруват), 4 – (GSB без фосфору + ацетат + піруват), 5 – (GSB з 50% азоту + ацетат + піруват), 6 – (GSB без азоту + ацетат + піруват), 7 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват).

Fig. 3. Effect of acetate and pyruvate on growth (A), glycogen synthesis (B) and glucose (C) under nitrogen starvation in the compounds and phosphorus

1 – (full GSB), 2 – (GSB + acetate + pyruvate), 3 – (GSB with 50% phosphorus + acetate + pyruvate), 4 – (GSB without phosphorus + acetate + pyruvate), 5 – (GSB with 50% nitrogen + acetate + pyruvate), 6 – (GSB without nitrogen + acetate + pyruvate), 7 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate).



Так при концентрації CO_2 у середовищі на рівні 60мМ спостерігали максимальний ріст клітин і підвищений у три рази рівень глікогену у них (рис. 4). Натомість нами встановлено, що за умов нітрогенного і фосфорного голодування та внесення органічних донорів карбону, зменшення рівня CO_2 в середовищі на 20% супроводжувалось зниженням рівня біомаси, при одночасному зростанні рівня глікогену в клітинах приблизно до 200–220 мг/г сухої ваги (рис. 4). Подальше зменшення вмісту CO_2 супроводжувалось зниженням інтенсивності фотосинтезу. Зростання рівня глікогену в клітинах при незначному дефіциті діоксиду карбону в середовищі, очевидно, можна пояснити пригніченням реакції карбоксилування фосфоенолпірувату в оксалоацетат і його використання у конструктивному анаболізмі вуглеводів [2, 3].

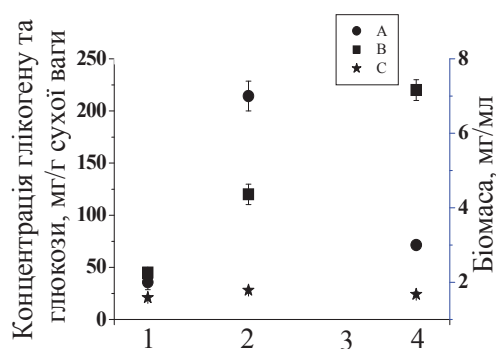


Рис. 4. Вплив органічних джерел карбону на ріст (A) і синтез глікогену (B) та глюкози (C) за умов зниження концентрації CO_2 в середовищі та голодуванні по сполуках нітрогену та фосфору

1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + а – кетоглутарат + ізоцитрат + 100 % CO_2), 3 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + а – кетоглутарат + ізоцитрат + 80 % CO_2).

Fig. 4. Effect of organic carbon sources on growth (A) and glycogen synthesis (B) and glucose (C) under reducing CO_2 concentration in the atmosphere, and starvation on nitrogen and phosphorus compounds

1 – (full GSB), 2 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + a – ketoglutarate + isocitrate + 100% CO_2), 3 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + a – ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2).

Після встановлення вищевказаних закономірностей наступним кроком у роботі було з'ясування можливості зростання синтезу глікогену за умов внесення нітрат іону у середовище культивування відмитих клітин зелених сіркових бактерій. З цією метою було проведено забір клітин з експоненціальної фази росту та проведено їх інкубації у суміші, що містила NO_3^- , HS^- , CO_2 , за умов освітлення.

Згідно робіт [9, 10, 11] внесення нітрат іону в середовище культивування *C. limicola* IMB K-8 призводить до блокування протеїногенезу і як

наслідок переключення конструктивного анаболізму на глюко- і глікогено-геноліз. Слід зазначити, що за цих умов стимулюючий вплив на анаболізм вуглеводів виявляє зменшення концентрації мінеральних компонентів інкубаційної суміші, оскільки вони виступають інтермедіатами синтезу інших макромолекул у клітинах досліджуваних прокариот. З цією метою було також проведено зниження концентрації на 50% у інкубаційній суміші таких сполук (KCl , $CaCl_2$, $MgSO_4$). Забір клітин для вищевказаного експерименту проводився за умов максимального надсинтезу глікогену (рис. 4). Слід зазначити, що внесення клітин в інкубаційну суміш проводилось паралельно з контролем (мінеральне середовище GSB) (рис. 5). Після 48 годин інкубації за умов освітлення нами було встановлено, що вміст глікогену у клітинах *C. limicola* IMB K-8 становив 250 мг/г сухої ваги, що в п'ять разів перевищувало контрольні зразки.

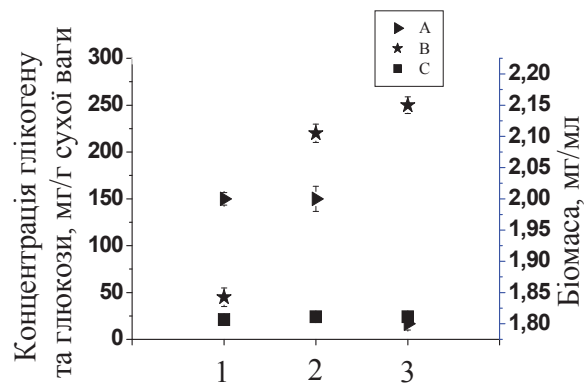


Рис. 5. Вплив різних компонентів інкубаційної суміші на біомасу (А), синтез глікогену (В) та глюкози (С) у клітинах *C. limicola* IMB K-8.

Час інкубації 48 годин: 1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + α -кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2), 3 – (GSB з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + α -кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% мінеральне голодування).

Fig. 5. Effect of different incubation mixture components on biomass (A), glycogen synthesis (B) and glucose (C) in cells of *C. limicola* IMB K-8.

Incubation time 48 hours: 1 – (full GSB), 2 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + α -ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2), 3 – (GSB with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + α -ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% mineral starvation).

Згідно літературних даних [12, 13, 14] конструктивний анаболізм фотореакційних молекул в середовищі культивування аноксигенних фотосинтетиків, повністю інгібується за відсутності солей магнію. За цих умов, частково, основні енергетичні ресурси клітини спрямовуються на біосинтез ендогенних вуглеводів. Нами була перевірена можливість



інкубації відмитих клітин з максимальним вмістом глікогену за умов відсутності магній хлориду в інкубаційній суміші та за умов його 20% наявності, слід зазначити, що таку концентрації $MgSO_4$ ми встановили раніше експериментально [3] (рис. 6). Слід зазначити, що за цих умов різкого зростання концентрації глікогену не спостерігалось.

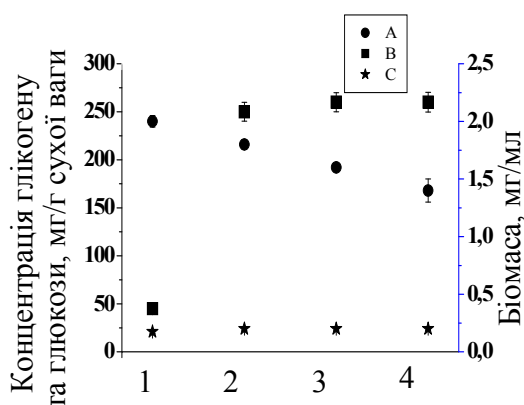


Рис. 6. Вплив факторів середовища GSB на біомасу (A) і синтез глікогену (B) та глюкози (C) за умов зниження концентрації $MgSO_4$.

Час інкубації 48 годин: 1 – (повноцінне GSB), 2 – (GSB 1 (з 50% фосфору і 50% азоту + ацетат + піруват + α -кетоглутарат + ізоцитрат + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% мінеральне голодування)), 3 – (GSB 1 + 20% $MgSO_4$), 4 – (GSB 1 + 0% $MgSO_4$).

Fig. 6. Influence of environmental factors on GSB biomass (A) and glycogen synthesis (B) and glucose (C) under reducing concentrations $MgSO_4$.

Incubation time 48 hours: 1 – (full GSB), 2 – (GSB 1 (with 50% phosphorus and 50% nitrogen + acetate + pyruvate + α -ketoglutarate + isocitrate + 80% CO_2 + NO_3^- + 50% mineral starvation)), 3 – (GSB 1 + 20% $MgSO_4$), 4 – (GSB 1 + 0% $MgSO_4$).

Наступним кроком у нашій роботі було дослідження, закономірностей одночасного нагромадження глікогену та амінного нітрогену у клітинах зелених сіркових бактерій. З цією метою клітини одночасно вирощували за умов зростання синтезу ендогенних вуглеводів (без внесення NO_3^-) з подальшим визначенням концентрації ендогенних вуглеводів та аміної форми нітрогену (рис. 7). Слід зазначити, що зростання концентрації глікогену супроводжувалось нагромадженням амінного нітрогену в кількості 230 мг/г сухої ваги. Натомість у контрольних зразках (мінеральне середовище GSB) вміст ендогенних вуглеводів становив 50 мг/г сухої ваги, а концентрація амінного нітрогену 180–200 мг/г сухої ваги.

Таким чином нами встановлені деякі закономірності нагромадження ендогенних вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій.

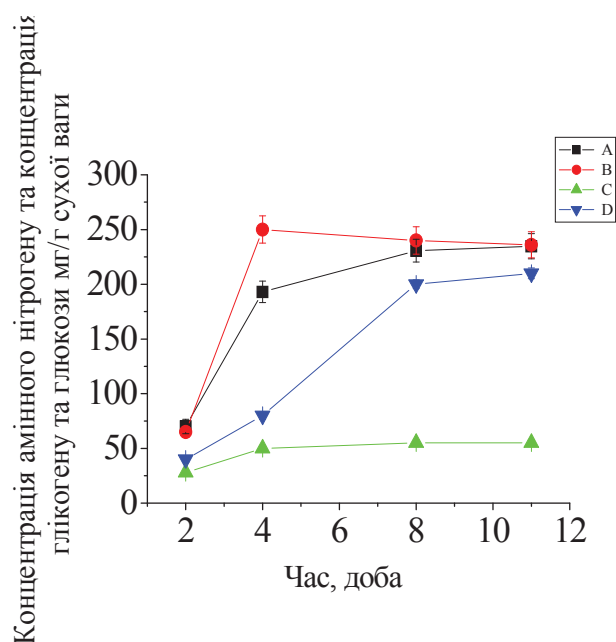


Рис. 7. Нагромадження аміної форми нітрогену клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 за різних умов культивування

A — дослідний зразок (концентрація амінного нітрогену за умов стимуляції синтезу глікогену при відсутності NO_3^-). B — дослідний зразок (зростання синтезу глікогену за умов відсутності NO_3^-). C — контроль, нагромадження ендогенних вуглеводів клітинами на повноцінному середовищі GSB. D — контроль, нагромадження амінного нітрогену клітинами у повноцінному середовищі GSB.

Fig. 7. Accumulation amine nitrogen form by cells *C. limicola* ІМВ К-8 under various conditions of cultivation

A — prototype (the concentration of amino nitrogen under the stimulation of glycogen synthesis in the absence of NO_3^-). B — prototype (glycogen synthesis increase in the absence of NO_3^-). C — control, accumulation of endogenous carbohydrate cells in full medium GSB. D — control, accumulation of amino nitrogen cells in full medium GSB.

Слід зазначити, що за умов мінерального голодування, зниження концентрації діоксиду карбону в середовищі, наявності різних джерел органічного карбону та внесення нітрат іону метаболізм зелених сіркових бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 зміщується в сторону конструктивного анаболізму вуглеводів. Однак, зміщення метаболізму в сторону анаболізму вуглеводів, спричиняє зниження біомаси клітин досліджуваного штаму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 "Український біохімічний журнал" — 2009. — N. 5, Т. 81. — С. 26—33.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Мікробіологія — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2009. — 306 с.
3. Гудзь С.П., Горішний М.Б., Гнатуш С.О. Бактеріальний фотосинтез — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2011. — 180с.
4. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии. — М.: Изд. Моск. ун-та, 1989. — С. 107.
5. Современная микробиология / Под. ред. Й. Ленгера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля — М.: Наука, 2005. — 449 с.
6. Blankenship M.T. Madigan C.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. — Boston: Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 1997. — P. 49—89.
7. Castenholz R.W., Pierson B.K. The prokaryotes. — New York: Springer, 1978. — P. 290—298.
8. Cork D., Carunas R., Sajjad A. *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum* biocatalyst in the production of sulfur and organic carbon from gas stream containing H₂S and CO₂ // Appl. And Envir. Microbiol. — 1983. — Vol. 45. — P. 913—918.
9. Sireveg R., Buchanan B. Mechanisms of CO₂ fixation in bacterial photosynthesis studied by carbon isotope fractionation technique // Arch. Microbiol. — 1977. — Vol. 16, N 112. — P. 35—38.
10. Sireveg R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. 1977. — Vol. 111. — P. 239.
11. Hanson T.E., Tabita F.R. A ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase / oxygenase (Rubisco)-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. — 2001. — P. 4397—4402
12. Herter S., Farfsing J., Gad'On N. et al. Autotrophic CO₂ fixation by *Chloroflexus aurantiacus*: study of glyoxylate formation and assimilation via the 3-hydroxypropionate cycle // J. Biol. Chem. — 2001. — Vol. 267. — P. 20256—20273.
13. Mas J., Gernerden H. Storage products in purple and green sulfur bacteria. In: Anoxygenic photosynthetic — D.: Kluwer Acad. Pub. (Netherlands), 1995. — P. 973—990.
14. Ugolkova N.V., Ivanovsky R.N. On the mechanism of autotrophic fixation of CO₂ by *Chloroflexus aurantiacus* // Microbiology. — 2000. — Vol. 5. — P. 139—142.

Стаття надійшла до редакції 06.06.2012 р.



М.Б. Горишний, С.П. Гудзь

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

**ОСОБЕННОСТИ КОНСТРУКТИВНОГО АНАБОЛИЗМА
УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКАХ ЗЕЛЕННЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ
CHLOROBIVM LIMICOLA IMB K-8**

Реферат

Зеленые серные бактерии *Chlorobium limicola* IMB K-8 в процессе аноксигенного фотосинтеза накапливают в клетках гликоген. Рост уровня гликогена в клетках наблюдали при условии внесения в среду культивирования органических доноров углерода при одновременном минеральном голодании. В этих условиях 20% уменьшение концентрации диоксида углерода и внесение нитрат иона в инкубационную смесь сопровождалось снижением уровня биомассы и ростом интенсивности конструктивного анаболизма углеводов в клетках *C. limicola* IMB K-8. Снижение концентрации диоксида углерода и минеральных компонентов среды GSB ведет к снижению интенсивности фотосинтеза в клетках зеленых серных бактерий.

Ключевые слова: зеленые серные бактерии, глюкоза, гликоген.

M.B. Gorishniy, S.P. Gudz

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

**FEATURES OF CONSTRUCTIVE ANABOLISM
OF CARBOHYDRATES IN THE CELLS OF GREEN SULFUR
BACTERIA *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMB K-8**

Summary

Green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* IMB K-8 accumulate glycogen in the cells during the process of anoxyphotosynthesis. There were observed increasing of glycogen levels in the cells under conditions of adding organic carbon donor into the culture medium while mineral starvation. Under these conditions, 20% reduction in carbon dioxide concentration and introducing nitrate ion in the incubation mixture was accompanied by reduction of biomass and increasing the intensity of anabolic structural carbohydrates in the cells *C. limicola* IMB K-8. Further reducing of the concentration of carbon dioxide and mineral components of the environment GSB leads to intensity decreasing of photosynthesis in the cells of green sulfur bacteria.

Key words: green sulfur bacteria, glucose, glycogen.



М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, А.А. Косюга

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

АНТИФУЗАРІОЗНА АКТИВНІСТЬ ЕКЗОМЕТАБОЛІТІВ ДЕЯКИХ ШТАМІВ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Проведено вивчення впливу бактерій роду Pseudomonas на ріст дейтеромицетів роду Fusarium. Показано, що антифузаріозна активність залежить від виду та штаму мікроорганізму. Найвищий рівень антагоністичної активності спостерігався на четверту добу культивування бактерій та був більш вираженим для штамів P. aeruginosa. Продукти метаболізму, отримані при вирощуванні штамів P. aeruginosa ONU 302 та P. aureofaciens ONU 304, виявилися ефективними для захисту насіння огірка від ураження фітопатогенними фузаріями. Екзометаболіти P. aureofaciens ONU 304 інгібували ріст грибів роду Fusarium як навколо насіння огірка Cucumis sativus L. сорт Трой F1, так і на його поверхні.

Ключові слова: P. aureofaciens, P. fluorescens, P. aeruginosa, продукти метаболізму, антифузаріозна активність, Fusarium spp.

Серед мікроорганізмів, що найінтенсивніше використовуються для створення біопрепаратів, окреме місце займають представники роду *Pseudomonas*. Вони є продуцентами значної кількості (понад 200) сполук: регуляторів росту рослин (у тому числі індоліл-3-оцтової кислоти, що стимулює розвиток кореневої системи) [2, 7], сидерофорів, які виконують функцію захоплення і транспорту феруму [5]; антибіотиків (феназинів, флуороглюцину, піолотеорину, піролнітрину, ооміцину А та ін.) [6]; а також численних гідролітичних ферментів (фосфатаз, целюлаз, протеаз) [11], що покращують живлення рослин та впливають на ріст ґрунтових патогенів.

На основі псевдомонад сьогодні створено понад два десятки препаратів, що застосовують для підвищення врожайності сільськогосподарських культур, зменшення терміну проростання насіння та його захисту від фітопатогенів [10].

У зв'язку з цим, найактуальнішим для боротьби із фітозахворюваннями, зокрема, фузаріозами, та створення інтегрованої системи захисту рослин, стає розробка та використання альтернативних засобів, наприклад, біопрепаратів [11]. Так, обробка посівного матеріалу, а також самих

рослин, бактеріями деяких видів ґрунтових мікроорганізмів, у тому числі, непатогенними для людини штамми псевдомонад, може істотно знизити ураженість рослин фітопатогенами [9].

Метою даної роботи було вивчення антагоністичної активності бактерій роду *Pseudomonas* щодо грибів *F. oxysporum*, *F. graminearum* та *F. sporotrichiella*.

Матеріали і методи

В роботі використовувалися штами псевдомонад *P. aureofaciens* ONU 304, *P. aureofaciens* ONU 305, *P. fluorescens* ONU 303, *P. aeruginosa* ONU 300, *P. aeruginosa* ONU 301, *P. aeruginosa* ONU 302 та недосконалих грибів *F. oxysporum* BSEC 101, *F. graminearum* BSEC 102, *F. sporotrichiella* BSEC 103. Визначення антагоністичної активності *Pseudomonas spp.* щодо представників дейтероміцетів здійснювали за методом агарових блоків [1].

Бактеріальні штами *P. aureofaciens* та *P. fluorescens* попередньо вирощували на щільному середовищі Кінг А протягом 24 год при температурі 22 °С, штами *P. aeruginosa* — при 37 °С.

Для отримання робочих суспензій грибів з 5-добових культур *Fusarium spp.*, вирощених на скошеному картопляному агарі при 22 °С, робили змиви стерильним фізіологічним розчином. Оптичну щільність даних суспензій доводили до $1 \cdot 10^9$ КУО/мл за допомогою спектрофотометра "Spekol-10" (Німеччина). Підготовлену таким чином суспензію вносили по 0,5 мл у 20 мл розплавленого МПА (45 °С), після чого середовище розливали в чашки Петрі. На поверхні агару розміщували агарові блоки, що були вирізані з газону добових бактеріальних культур псевдомонад.

Величину діаметру зони відсутності росту фітопатогенів навколо бактеріальних блоків (у мм) оцінювали на 1, 2, 4, 6 та 8 добу інкубації, розраховуючи як середнє арифметичне трьох вимірів випадково обраних проєкцій [2, 3]. Для кожного варіанту кількість повторів складала 5.

Визначення протифузаріозної активності вторинних екзометаболітів *Pseudomonas spp.* проводили з використанням насіння огірка *Cucumis sativus* L. сорт Трой F1 [4]. Насіння (20–40 шт.) замочували на 24 год у культуральній рідині псевдомонад, що росли в середовищі Кінг А. Контролем слугували стерильні дистильована вода (контроль негативний, К–) та рідке поживне середовище для *Pseudomonas spp.* (контроль середовища, К_c), а також 0,5% розчин тетраметилтиурамідсульфіду (ТМТД) (контроль позитивний, К+) [5].

Перед замочуванням поверхню насіння стерилізували в 32% розчині перекису водню впродовж 30 с та промивали стерильною водою впродовж 5 хв.

На поверхні МПА, що містив *Fusarium spp.*, розміщували різні варіанти попередньо обробленого насіння та інкубували впродовж 7 діб при 22 °С.



Облік результатів відбувався на 4, 6 та 8 добу за визначенням відсутності росту дейтеромицетів навколо насіння та на його поверхні [8]. Для кожного варіанту експеримент здійснювався двічі, у кожному варіанті досліду кількість насіння була не менше 50 шт.

При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t-критерій Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при значенні показника $p \leq 0,05$. Статистичне опрацювання результатів здійснювали, застосовуючи програму Excel-2007.

Результати та їх обговорення

Порівняльний аналіз антагоністичної активності псевдомонад щодо досліджуваних грибів показав, що ступінь прояву впливу мав видо- та штамспецифічний характер (табл. 1).

Таблиця 1

Антагоністична активність бактерій роду *Pseudomonas* щодо *Fusarium spp.*

Table 1

Antagonistic activity of *Pseudomonas* strains to *Fusarium spp.*

Штам псевдомонад	Діаметр зони затримки росту*, мм		
	<i>F. oxysporum</i> BSEC 101	<i>F. graminearum</i> BSEC 102	<i>F. sporotrichiella</i> BSEC 103
<i>P. aeruginosa</i> ONU 300	62±2	54±2	84±4
<i>P. aeruginosa</i> ONU 301	28±3	44±3	34±3
<i>P. aeruginosa</i> ONU 302	48±3	60±4	75±3
<i>P. fluorescens</i> ONU 303	0	0	0
<i>P. aureofaciens</i> ONU 304	24±4	44±2	18±2
<i>P. aureofaciens</i> ONU 305	10±2	0	0

Примітка: * — діаметр зони затримки росту відповідного дейтеромицета навколо агарового блоку з бактеріальною культурою на четверту добу культивування (діаметр блоку — 4 мм).

Для більшості штамів псевдомонад антифунгальний вплив зростав впродовж перших двох діб. У ході експериментів зафіксовано, що максимального значення зона затримки росту дейтеромицетів досягала на четверту добу культивування мікроорганізмів.

Так, штам *P. aeruginosa* ONU 302 викликав майже 12-кратне збільшення зони відсутності росту *F. oxysporum* BSEC 101 у порівнянні із вихідним діаметром агарового блоку культури. На відміну від цього, штам *P. aeruginosa* ONU 300 призводив до затримки росту цього гриба



(62±2 мм). При збільшенні терміну взаємодії рівень антагоністичної активності в цілому знижувався, але у випадку штамів виду *P. aureofaciens* вплив залишався практично незмінним. Bazуючись на отриманих даних, досліджувані бактеріальні штами можна розташувати в порядку зменшення антифунгальної активності таким чином: *P. aeruginosa* ONU 300 > *P. aeruginosa* ONU 302 > *P. aeruginosa* ONU 301 > *P. aureofaciens* ONU 304 > *P. aureofaciens* ONU 305. Штам *P. fluorescens* ONU 303 взагалі не виявив антагоністичної активності щодо *F. oxysporum* BSEC 101.

Рівень протифузаріозної активності штамів *P. aeruginosa* ONU 300 та ONU 302 щодо *F. graminearum* BSEC 102 був на 20–25% вищим, ніж для *P. aureofaciens* ONU 304 та *P. aeruginosa* ONU 301. Значення протифузаріозної активності для двох останніх штамів були однаковими.

Штами *P. fluorescens* ONU 303 та *P. aureofaciens* ONU 305 не виявили антагоністичних властивостей щодо *F. graminearum* BSEC 102.

На відміну від попередніх видів дейтеромицетів штам *F. sporotrichiella* BSEC 103 виявився чутливішим до дії продуктів метаболізму псевдомонад. Діаметр зони затримки росту цього фітопатогена був більше ніж 80±4 мм за дії *P. aeruginosa* ONU 300. Аналогічний рівень антифузаріозної дії був властивий для штаму *P. aeruginosa* ONU 302 (75±3 мм).

Серед інших видів псевдомонад лише *P. aureofaciens* ONU 304 виявив антифунгальну активність, яка була в 2–4 рази меншою, ніж у штамів *P. aeruginosa*.

Таким чином, в ході експерименту було встановлено, що більшість досліджуваних псевдомонад показали найвищий рівень антагонізму на четверту добу культивування, який був більш вираженим у випадку штамів *P. aeruginosa*. *P. aureofaciens* ONU 305 та *P. fluorescens* ONU 303 практично не пригнічували ріст представників дейтеромицетів.

Попередню обробку насіння огірків *Cucumis sativus* L. сорту Трой F1 культуральною рідиною псевдомонад, для захисту від ураження *Fusarium spp.* було проведено для штамів, що виявили антифунгальну активність у попередніх експериментах (табл. 2).

Екзометаболіти досліджуваних псевдомонад виявились ефективнішими у захисті посівного матеріалу від фузаріозної інфекції ніж тетраметилтиурамідсульфід (К+). Так, на 4 добу експерименту всі культури недосконалих грибів уражали насіння огірка *Cucumis sativus* L. сорт Трой F1, попередньо оброблені розчином тетраметилтиурамідсульфіда.

Найбільш виражена протифузаріозна активність культуральних фільтратів *Pseudomonas spp.* щодо дейтеромицетів була відмічена для *P. aureofaciens* ONU 304. Продукти метаболізму, що продукуються штамом цього виду псевдомонад, характеризувалися антимікробною дією щодо всіх досліджених штамів *Fusarium spp.* впродовж експерименту. У цьому випадку не було виявлено росту *F. oxysporum* BSEC 101 та *F. sporotrichiella* BSEC 103 як навколо насіння так і на його поверхні. Гриб *F. graminearum* BSEC 102 не контамінував поверхні насіння огірків.



Таблиця 2

Вплив продуктів метаболізму досліджуваних штамів псевдомонад на ураженість насіння огірків дейтеромицетами

Table 2

The influence of the studied *Pseudomonas* secondary metabolites on the cucumber seed deuteromycetes affection

Вид дейтеромицета	Час, доба	<i>P. aureofaciens</i> ONU 304	<i>P. aeruginosa</i> ONU 300	<i>P. aeruginosa</i> ONU 301	<i>P. aeruginosa</i> ONU 302	К-	К+	К _c
<i>F. oxysporum</i> BSEC 101	4	+++*	++	+++	++	-	++	-
	6	+++	++	++	++	-	+	-
	8	+++	+	++	+	-	+	-
<i>F. graminearum</i> BSEC 102	4	++	++	++	+++	-	++	-
	6	++	++	+	+++	-	+	-
	8	++	++	-	++	-	+	-
<i>F. sporotrichiella</i> BSEC 103	4	+++	++	++	++	-	+	-
	6	+++	++	+	+	-	+	-
	8	+++	+	+	+	-	-	-

Примітка: *Оцінку захисної дії продуктів метаболізму псевдомонад від ушкодження грибами здійснювали за шкалою:

- +++ – відсутність росту гриба навколо насіння та на його поверхні;
- ++ – ріст гриба навколо насіння та відсутність ознак контамінації поверхні насіння;
- +
- – суцільне заростання міцелієм гриба поживного середовища та насіння.

Ефективність застосування продуктів метаболізму досліджуваних штамів *P. aeruginosa* для захисту насіння огірка була меншою. Суттєвий рівень антифузаріозної активності виявлено лише при використанні культуральної рідини *P. aeruginosa* ONU 302 щодо *F. graminearum* BSEC 102. Для інших штамів *P. aeruginosa* антимікробна дія їх метаболітів була дещо нижчою. Мінімальний інгібуючий вплив був зафіксований за дії метаболітів *P. aeruginosa* ONU 301 на *F. graminearum* BSEC 102.

Таким чином, проведені дослідження показали наявність антимікробної дії продуктів метаболізму штамів *P. aeruginosa* ONU 300, ONU 300 та ONU 302 та *P. aureofaciens* ONU 304 на ріст недосконалих грибів *F. oxysporum* BSEC 101, *F. graminearum* BSEC 102, *F. sporotrichiella* BSEC 103 та перспективність застосування їх для захисту рослин від збудників фузаріозних інфекцій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бадалян С.М., Топчян А.В. Исследование природных противогрибковых средств растительного происхождения // Успехи медицинской микологии. — 2003. — Т. 14. — С. 88–90.
2. Акимова Е.Е., Минаева О.М., Гущина Ю.А., Евдокимов Е.В. Бактерии *Pseudomonas* sp. В-6798 как антагонисты роста фитопатогенных грибов и стимуляторы роста растений // Труды ТГУ: Серия биологическая. — 2004. — Т. 266. — С. 55–59.
3. Конурбаева М.У., Доолоткельдиева Т.Д. Антагонистические свойства бактерий рода *Pseudomonas* // Fen Bilimleri Dergisi. — 2008. — Т. 9. — С. 9–15.
4. Общая и молекулярная фитопатология / Ю.Т. Дьяков, О.Л. Озерцовская, В.Г. Джавахия, С.Ф. Багирова — М.: Изд-во Общества фитопатологов, 2001. — 302 с.
5. Сулейманова Л.Р., Четвериков С.П., Логинов О.Н. Метаболиты бактерий рода *Pseudomonas*: экологичный механизм взаимодействия с растениями // Вестник Оренбургского государственного университета. — 2007. — № 75. — С. 338–340.
6. Corbell N., Loper J.E. A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 // Bacteriol. — 1995. — 177. — P. 6230–6236.
7. Pessi G., Haas D. Dual control of hydrogen cyanide biosynthesis by the global activator GacA in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, CHAO // Microbiol. Lett. — 2001. — 200. — P. 73–78.
8. Sneh B., Dupler M., Elad Y., Baker R. Chlamyospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soils // Phytopathology. — 1994. — 74. — P. 1115–1124.
9. Tari P.H., Anderson A.J. *Fusarium* wilt suppression and agglutinability of *Pseudomonas putida* // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — 54. — P. 2037–2041.
10. Thomashow L. Biological control of plant root pathogens // Curr. Biol. — 1996. — 7. — P. 343–347.
11. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. — 2001. — 52. — P. 487–511.

Стаття надійшла до редакції 04.06.2012 р.



М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, А.А. Косюга

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65058, Украина, тел.: + 38 (0482) 63 57 61,
e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

АНТИФУЗАРИОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ РОДА *PSEUDOMONAS*

Реферат

Проведено изучение влияния бактерий рода *Pseudomonas* на рост дейтеромицетов рода *Fusarium*. Показано, что антифузариозная активность зависит от вида и штамма микроорганизма. Наиболее высокий уровень антагонистической активности наблюдался на четвертые сутки культивирования и был более выраженным для штаммов *P. aeruginosa*. Продукты метаболизма, полученные при выращивании штаммов *P. aeruginosa* ONU 302 и *P. aureofaciens* ONU 304, оказались эффективными для защиты семян огурца от поражения их фитопатогенными фузариями. Экзометаболиты *P. aureofaciens* ONU 304 ингибировали рост грибов рода *Fusarium* как вокруг семян огурца *Cucumis sativus* L. сорт Трой F1, так и на их поверхности.

Ключевые слова: *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, продукты метаболизма, антифузариозная активность, *Fusarium spp.*

М. Yu. Rusakova, B. M. Galkin, T. O. Filipova, A. A. Kosyuga

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

ANTIFUSARIUM ACTIVITY OF SOME *PSEUDOMONAS* STRAIN EXOMETABOLITES

Summary

The influence of *Pseudomonas* bacteria on deuteromycetes growth has been studied. It was noted that antifusarium activity depended on the microorganism species and strain. The highest antagonistic activity value was observed on the fourth cultivation day and was more expressed for *P. aeruginosa* strains. The metabolism products obtained during the *P. aeruginosa* ONU 302 and *P. aureofaciens* ONU 304 strain growth were effective in protection cucumber seeds from being damaged by phytopathogenic fusariums. The *P. aureofaciens* ONU 304 exometabolites inhibited the growth of *Fusarium* fungi both around the seeds of *Cucumis sativus* L. variety Troy F1 and on their surface.

Key words: *P. aureofaciens*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, metabolism products, antifusarium activity, *Fusarium spp.*



УДК: 579.811.2/3+577.12.+577.151

О.М. Мороз¹, І.Б. Русин²¹Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com²Національний університет „Львівська політехніка”,
вул. С. Бандери, 12, Львів, 79013, Україна

ВИКОРИСТАННЯ СПОЛУК НІТРОГЕНУ БАКТЕРІЯМИ ЦИКЛУ СУЛЬФУРУ ОЗЕРА ЯВОРІВСЬКЕ

Встановлено, що нітрат і нітрит негативно впливають на ріст, утворення та окиснення гідроген сульфід у бактеріями циклу сульфур. Сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* Yavor-12 і сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6 здійснюють дисиміляційну сірко- та сульфатредукцію з утворенням гідроген сульфід при використанні амонійної та амінної форм нітрогену. Сірковідновлювальні бактерії не використовують нітроген амонію та лізину у середовищі без сульфур, вони не здатні до здійснення нітрат- чи нітритредукції. Сульфатвідновлювальні бактерії не засвоюють нітроген амонію і лізину у середовищі без сульфатів та здійснюють дисиміляційну нітрат- та нітритредукцію з утворенням амонію. Зелені фототрофні сіркобактерії *Chlorobium limicola* IMB K-8 використовують амонійний та амінний нітроген і не засвоюють нітроген нітрату та нітриту. За впливу Co^{2+} , Ni^{2+} та Cd^{2+} відбувається інгібування росту бактерій та утилізації ними гідроген сульфід у середовищі з амонієм та/або лізином. За наявності металів на метаболізм бактерій менший, ніж за нітрогену нітрату чи нітриту.

Ключові слова: нітрат, нітрит, амоній, лізин, *Desulfuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Chlorobium limicola*, гідроген сульфід, нікель, кобальт, кадмій.

Техногенне забруднення водних ресурсів іонами важких металів та агресивними сполуками сульфур і нітрогену з кожним роком набуває все більш загрозливих масштабів [2, 7, 8]. Це особливо стосується водойм, які виникли на місці недіючих сірковидобувних підприємств. У верхніх водних шарах найбільш інтенсивно протікають процеси окиснення сульфур, здійснювані сіркоокиснювальними бактеріями, продуктом яких є сульфати. Сульфати і сульфур використовуються сульфат- і сірковідновлювальними бактеріями як акцептори електронів при окисненні органічних сполук, у результаті чого утворюється отруйний для живих організмів гідроген сульфід. У глибинній зоні водойм, куди ще проникає світло, детоксика-

© О.М. Мороз, І.Б. Русин, 2012



цію H_2S здійснюють фототрофні сіркобактерії, які використовують його як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [8]. Найбільш доступним джерелом нітрогену для мікроорганізмів є амоній, який утворюється внаслідок азотфіксації та відновлення нітратів. Окиснені атоми нітрогену можуть відновлювати не всі азотфіксувальні мікроорганізми, а лише ті, які синтезують нітрат- і нітритредуктазу [9].

Факультативно анаеробні бактерії здійснюють окиснення органічних субстратів або H_2 з використанням замість кисню таких акцепторів електронів як сульфат, сульфур, нітрат, нітрит, фумарат, Fe (III), диметилсульфоксид, N-оксид триметиламіну, CO_2 або органічні сполуки (анаеробне дихання). Дисиміляційне відновлення нітратів відбувається з утворенням NO_2^- , NO, N_2O та N_2 (денітрифікація) або нітриту за участю НАД(Ф)Н чи відновленого менахінону може безпосередньо відновлюватися до NH_3/NH_4^+ (амоніфікація нітрату) [9]. Описано нітратредукцію з утворенням нітриту і подальшим відновленням його до NH_4^+ у сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* та сірковідновлювальних бактерій *Wolinella succinogenes* [10, 12]. Нітрати не використовуються фототрофними зеленими сіркобактеріями *Chlorobium limicola* як джерело нітрогену, їх наявність у середовищі пригнічує транспорт амонію в клітину і засвоєння молекулярного та амінного нітрогену [6]. За умов дефіциту нітрогену цими бактеріями синтезуються підвищені кількості запасного продукту у вигляді глікогену [2, 6].

Метою роботи було дослідити вплив різних сполук нітрогену та іонів одних з найбільш токсичних для мікроорганізмів важких металів (кобальту, нікелю та кадмію [7]) на нагромадження біомаси, біогенез та утилізацію гідроген сульфідну бактеріями циклу сульфур, виділеними з водойми Яворівського сіркового родовища.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сірковідновлювальні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans* Явор-12, сульфатвідновлювальні бактерії *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6, фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії *Chlorobium limicola* ІМВ К-8. Штами виділені з води Яворівського озера, ідентифіковані і зберігаються в колекції кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [2, 10, 11].

Біомасу визначали за мутністю суспензії клітин шляхом її фотометрування на фотоелектроколориметрі КФК-3 у кюветі з оптичним шляхом 3 мм і розраховували за формулою: $C, \text{ г/л} = (E \cdot n) / K$, де n – фактор розведення; E – екстинкція при 340; 340 і 450 нм; K – коефіцієнт перерахунку, отриманий за калібрувальною кривою залежності екстинкції від маси сухих клітин, визначеної ваговим методом, рівний 0,72; 0,19 і 0,131 для сірко- та сульфатвідновлювальних і зелених сіркобактерій, відповідно.

Сірко- та сульфатвідновлювальні бактерії вирощували у середовищі Кравцова-Сорокіна [4] без сульфатів з елементним сульфуром та з



сульфатами, відповідно, упродовж 10 діб у пробірках, об'ємом 25 мл, доверху заповнених середовищем і щільно закритих гумовими корками, в анаеростатах в атмосфері аргону при 30 °С.

Для вивчення впливу сполук нітрогену на ріст та утворення гідроген сульфід у сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями їх вирощували до середини експоненційної фази росту, осаджували центрифугуванням при 4025 g впродовж 30 хв і вносили в середовище з NH_4Cl чи без, до концентрації 10^8 КУО/мл, культивували впродовж 10 діб. Сполуки нітрогену: NH_4Cl ; NaNO_3 ; NaNO_2 ; лізин ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$), вносили у середовище у вигляді окремо приготованих стерильних розчинів за масою нітрогену в сполуці, рівною вмісту нітрогену у NH_4Cl стандартного середовища (0,042 г/л або 3 мМ). Для перевірки здатності клітин здійснювати дисиміляційне відновлення нітратів чи нітритів бактерії вирощували у середовищі без сульфурі або без сульфатів і без NH_4Cl . У цьому випадку до середовища додавали сірковмісну амінокислоту цистеїн (0,15 г/л) для задоволення асиміляційних потреб бактерій у сульфурі, а також сполуки нітрогену. Для дослідження здатності сульфатвідновлювальних бактерій використовувати сульфати і нітрати їх вирощували у середовищі з однаковим вмістом цих іонів — 3,5 мМ (стандартний вміст іонів сульфату у середовищі Кравцова-Сорокіна) з NH_4Cl . Для виявлення молекулярного нітрогену в пробірці поміщали поплавки запаяним кінцем догори (середовище з нітратом чи нітритом), у культуральній рідині визначали концентрації гідроген сульфід у йодометричним [5], сульфатів турбидиметричним [1], нітратів, нітритів спектрофотометричним [13] та амонію колориметричним методом за утворенням індофенолу [14].

Клітини зелених фототрофних сіркобактерій культивували у середовищі GSB [15]. Для вивчення впливу іонів важких металів та різних сполук нітрогену на ріст і окиснення гідроген сульфід у *C. limicola* IMB K-8 клітини вирощували до середини експоненційної фази росту, осаджували центрифугуванням при 4025 g впродовж 30 хв, ресуспендували у стерильному розчині NaCl (0,9%) та інкубували за стерильних умов упродовж 1 год з стерильними розчинами NiCl_2 , CoCl_2 та CdSO_4 за концентрації 1,5 мМ (попередньо встановлена нами мінімальна концентрація важких металів, за якої виявлено значне пригнічення фотоасиміляції клітинами гідроген сульфід у процесі аноксигенного фотосинтезу [7]) і без металів (контроль). Клітини двічі відмивали дистильованою водою, осаджували центрифугуванням і вносили в пробірки (концентрація в середовищі — $5 \cdot 10^8$ КУО/мл). До середовища додавали розчини NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ за масою нітрогену в NH_4Cl (контроль), (0,09 г/л). До середовища з NH_4Cl додавали стерильні розчини NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ і не додавали додаткового джерела нітрогену (контроль) для вивчення впливу нітрату, нітриту та лізину на засвоєння клітинами амонійної форми нітрогену. Бактерії культивували впродовж 10 діб на світлі (40 лк, $\lambda=700\text{-}800$ нм) у пробірках, об'ємом 25 мл, доверху запо-



внених середовищем і щільно закритих гумовими корками, розміщених в анаеростатах в атмосфері аргону при 30 °С.

Всі експерименти проводили щонайменше тричі, результати опрацьовували статистично [3].

Результати та їх обговорення

Для вивчення впливу різних сполук нітрогену на утворення гідроген сульфіді сірковідновлювальні бактерії *D. acetoxidans* Yavor-12 культивували у середовищі Кравцова-Сорокіна без сульфатів з сульфуром з чи без NH₄Cl (табл. 1). За наявності амоній хлориду, а також нітрату чи нітриту у середовищі пригнічується засвоєння бактеріями амонійної форми нітрогену, про що свідчить низький ріст та у понад 5 разів нижчий, ніж у контрольному варіанті, рівень утвореного клітинами гідроген сульфіді. При додаванні у середовище з амоній хлоридом лізину бактерії росли та нагромаджували H₂S на рівні контролю.

Таблиця 1

Біомаса та утворення гідроген сульфіді *Desulfovibrio acetoxidans* Yavor-12 після 10 діб росту у середовищі Кравцова-Сорокіна без сульфатів з різними сполуками нітрогену**

Table 1

Biomass and hydrogen sulfide formation by *Desulfovibrio acetoxidans* Yavor-12 after 10 days growth in Kravtsov-Sorokin medium without sulfates with different nitrogen compounds**

Елементний сульфур у середовищі	Сполуки нітрогену в середовищі	Біомаса, г/л	[S ²⁻], мМ
Наявний	NH ₄ Cl (контроль)	3,60±0,05	1,09±0,05
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,05±0,01*	0,16±0,01*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,04±0,01*	0,20±0,02*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	3,91±0,09	1,05±0,02
	NaNO ₃	0,06±0,02*	0
	NaNO ₂	0,04±0,01*	0
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	3,26±0,10	1,07±0,04
Відсутній	NH ₄ Cl	0,05±0,01*	0
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,04±0,01*	0
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,04±0,01*	0
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	0,04±0,02*	0
	NaNO ₃	0,05±0,04*	0
	NaNO ₂	0,04±0,05*	0
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	0,04±0,01*	0

Примітки: * – p ≤ 0,05;

** – вихідна концентрація [S⁰] у середовищі – не менш ніж 3,5 мМ

** – initial [S⁰] concentration in medium – no less than 3.5 mM



Таким чином, встановлено, що нітрат і нітрит пригнічують засвоєння сірководновлювальними бактеріями амонійної форми нітрогену. Наявність у середовищі амонійної форми нітрогену стимулює використання його амонійної форми бактеріями. Якщо у середовищі наявні нітрат або нітрит як єдина форма нітрогену, то повністю пригнічується як ріст сірководновлювальних бактерій, так і утворення ними гідроген сульфід. При додаванні до середовища лізину без додаткового джерела нітрогену біомаса *D. acetoxidans* Yavog-12 виявилася незначно нижчою, ніж у контролі. За цих умов клітини активно утворювали H_2S . Можливо, амонійна форма нітрогену є найбільш засвоюваною для сірководновлювальних бактерій. Отже, виявлено, що нітрат і нітрит не засвоюються *D. acetoxidans* Yavog-12, оскільки спостерігали повне пригнічення як росту, так і утворення бактеріями гідроген сульфід. Вони активно здійснювали дисиміляційну сіркоредакцію при використанні як амонійної, так і амонійної форм нітрогену.

Для перевірки здатності використовувати нітроген різних сполук і здійснювати нітрат- чи нітритредукцію сірководновлювальні бактерії вирощували у середовищі без сульфур з чи без NH_4Cl та різними джерелами нітрогену (див. табл. 1). Бактерії не засвоювали нітроген амонію, лізину, нітрату та нітриту у середовищі без сульфур, оскільки у всіх варіантах досліду росту не спостерігали. Бактерії виявилися нездатними засвоювати нітроген амоній хлориду не лише у присутності нітрату або нітриту, але і лізину, якщо у середовищі був відсутній сульфур. Бактерії виявилися не здатними до здійснення нітрат- чи нітритредукції, оскільки в експериментах з NO_3^- та NO_2^- не спостерігали виділення молекулярного нітрогену, а також якісні реакції на нітрита та амоній дали негативні результати.

З метою дослідження впливу різних сполук нітрогену на утворення гідроген сульфід сульфатвідновлювальні бактерії *D. desulfuricans* IMB K-6 культивували у середовищі Кравцова-Сорокіна з сульфатами з чи без NH_4Cl (табл. 2). За наявності амоній хлориду, а також нітрату чи нітриту у середовищі з сульфатами незначно пригнічується засвоєння бактеріями амонійної форми нітрогену. Про це свідчить дещо нижчий, ніж у контролі, ріст та у 1,5 рази нижчий, ніж у контрольному варіанті, рівень утвореного клітинами гідроген сульфід. Клітини росли та нагромаджували H_2S на рівні контролю, якщо у середовище додавали лізин разом з NH_4Cl . Таким чином, встановлено, що нітрат і нітрит незначно пригнічують засвоєння сульфатвідновлювальними бактеріями амонійної форми нітрогену. Наявність у середовищі амонійної форми нітрогену стимулює використання його амонійної форми бактеріями. Якщо у середовищі з сульфатами наявні нітрат або нітрит як єдина форма нітрогену, то майже вдвічі пригнічується як ріст сульфатвідновлювальних бактерій, так і утворення ними гідроген сульфід. При додаванні до середовища лізину без додаткового джерела нітрогену спостерігали добрий ріст *D. desulfuricans* IMB K-6. Біомаса виявилася лише незначно нижчою,



ніж у контролі. За цих умов клітини активно утворювали H_2S . Можливо, амонійна та амінна форми нітрогену є найбільш засвоєваними для *D. desulfuricans* ІМВ К-6. Отже, виявлено, що нітрат і нітрит у середовищі з сульфатами (з чи без NH_4Cl) засвоюються *D. desulfuricans* ІМВ К-6, хоча спостерігається нижча біомаса і нижчий рівень утворення гідроген сульфїду, ніж у контролі. Клітини активно здійснювали дисиміляційну сульфатредукцію з утворенням гідроген сульфїду при використанні як амонійної, так і амінної форм нітрогену.

Таблиця 2

Біомаса та утворення гідроген сульфїду *Desulfovibrio desulfuricans* ІМВ К-6 після 10 діб росту у середовищі Кравцова-Сорокіна з різними сполуками нітрогену**

Table 2

Biomass and hydrogen sulfide formation by *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 after 10 days growth in Kravtsov-Sorokin medium with different nitrogen compounds**

Сульфати в середовищі	Сполуки нітрогену в середовищі	Біомаса, г/л	$[S^{2-}]$, мМ
Наявні	NH_4Cl (контроль)	$3,52 \pm 0,03$	$2,45 \pm 0,04$
	$NH_4Cl, NaNO_3$	$2,53 \pm 0,08$	$1,67 \pm 0,05$
	$NH_4Cl, NaNO_2$	$2,64 \pm 0,01$	$1,65 \pm 0,03$
	$NH_4Cl, C_6H_{14}N_2O_2$	$3,76 \pm 0,03$	$2,46 \pm 0,08$
	$NaNO_3$	$1,95 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,05$
	$NaNO_2$	$1,95 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,02$
	$C_6H_{14}N_2O_2$	$3,25 \pm 0,10$	$2,42 \pm 0,06$
Відсутні	NH_4Cl	$0,05 \pm 0,01^*$	0
	$NH_4Cl, NaNO_3$	$1,82 \pm 0,04$	0
	$NH_4Cl, NaNO_2$	$1,84 \pm 0,04$	0
	$NH_4Cl, C_6H_{14}N_2O_2$	$0,05 \pm 0,01^*$	0
	$NaNO_3$	$1,64 \pm 0,09^*$	0
	$NaNO_2$	$1,74 \pm 0,04^*$	0
	$C_6H_{14}N_2O_2$	$0,05 \pm 0,01^*$	0

Примітки: * – $p \leq 0,05$;

** – вихідна концентрація $[SO_4^{2-}]$ у середовищі – 3,5 мМ

** – initial $[SO_4^{2-}]$ concentration in medium – 3.5 mM

Для з'ясування здатності використовувати нітроген різних сполук і здійснювати дисиміляційну нітрат- чи нітритредукцію сульфатвідновлювальні бактерії вирощували у середовищі без сульфатів з чи без NH_4Cl та різними сполуками нітрогену (див. табл. 2). Бактерії виявилися не-



здатними засвоювати нітроген не тільки амоній хлориду, але і лізину, якщо у середовищі були відсутні сульфати як акцептор електронів. За наявності у середовищі нітрату та нітриту, у присутності чи без NH_4Cl , спостерігали добрий ріст бактерій, хоча біомаса виявилася майже вдвічі нижчою, ніж у середовищі з NH_4Cl та сульфатами. Під час росту бактерій у середовищі з нітратом або нітритом виділення молекулярного нітрогену не спостерігали, очевидно, у зв'язку з їх безпосереднім відновленням до амонію.

Дослідження здатності засвоювати сульфати і нітрати за їх однакової вихідної концентрації (3,5 мМ) у середовищі з амоній хлоридом (табл. 3) показало, що сульфатвідновлювальні бактерії нагромаджували найвищу біомасу під час росту у середовищі з сульфатами і впродовж 10 діб культивування використали 94,9% іонів сульфату. За росту в середовищі з нітратами клітини використали 98,9% внесених у середовище іонів нітрату. За росту в середовищі з сульфатами та нітратами бактерії використали 40,9 і 64,1% наявних у середовищі іонів сульфату і нітрату, відповідно. Отже, внесення у середовище нітрату негативно впливає на рівень редукції бактеріями іонів сульфату, крім цього, за умов культивування бактерій у присутності еквімолярної кількості сульфатів і нітратів, останні використовуються бактеріями швидше.

Таблиця 3

Використання SO_4^{2-} і NO_3^- *Desulfovibrio desulfuricans* IMB K-6 за 10 діб росту у середовищі Кравцова-Сорокіна*

Table 3

SO_4^{2-} and NO_3^- utilization by *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 after 10 days growth in Kravtsov-Sorokin medium*

Сполуки нітрогену та сульфати в середовищі	Біомаса, г/л	Залишковий вміст у культуральній рідині	
		$[\text{SO}_4^{2-}]$, мМ	$[\text{NO}_3^-]$, мМ
NH_4Cl , SO_4^{2-}	3,43±0,04	0,18±0,01	0
NH_4Cl , NaNO_3 , SO_4^{2-}	2,54±0,02	2,07±0,05	1,26±0,06
NH_4Cl , NaNO_3	1,92±0,02	0	0,04±0,01

Примітка: * – вихідна концентрація $[\text{SO}_4^{2-}]$ та $[\text{NO}_3^-]$ у середовищі – 3,5 мМ
* – initial $[\text{SO}_4^{2-}]$ and $[\text{NO}_3^-]$ concentrations in medium – 3.5 mM

Вивчення природи проміжних продуктів дисиміляційного відновлення або амоніфікації нітратів *D. desulfuricans* IMB K-6 (рис. 1) показало, що за 10 діб росту у середовищі з нітратами бактерії практично повністю використали наявні у середовищі іони нітрату (3 мМ) з нагромадженням до 2,24 мМ NH_4^+ . Впродовж перших діб росту бактерій спостерігали



нагромадження у середовищі NO_2^- , який до кінця культивування майже повністю відновлювався клітинами до амонію.

Отже, встановлено, що нітроген нітрату та нітриту використовується сульфатвідновлювальними бактеріями як акцептор електронів дисимільційної нітрат- чи нітритредукції, відновленим продуктом яких є амоній, що нагромаджується у середовищі і може використовуватися клітинами для конструктивних потреб. Сульфатвідновлювальні бактерії виявилися перспективними для їх використання з метою анаеробної детоксикації середовищ, забруднених нітратами і нітритами [10].

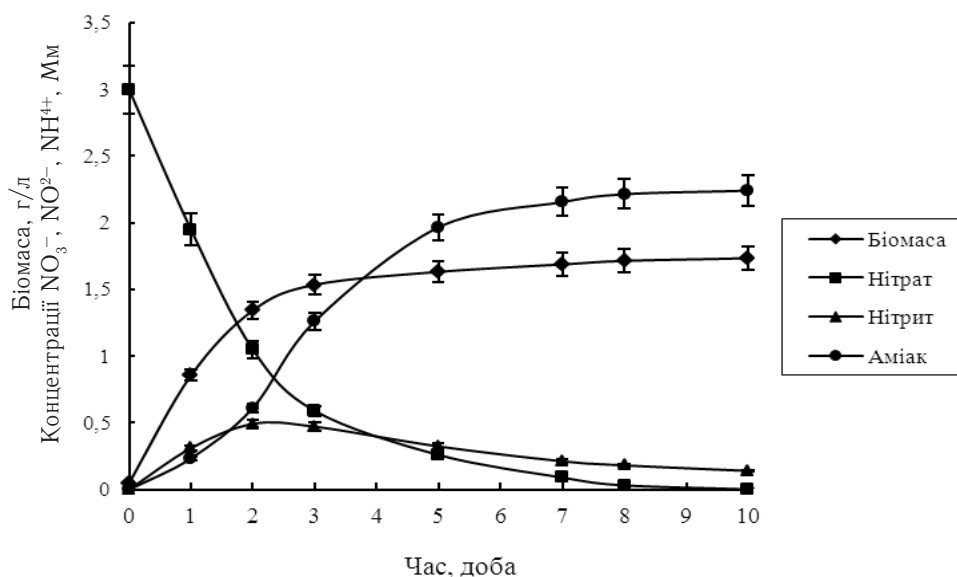


Рис. 1. Використання NO_3^- , утворення NO_2^- та NH_4^+ під час росту *D. desulfuricans* IMB K-6 у середовищі Кравцова-Сорокіна без SO_4^{2-} та NH_4Cl з NO_3^-

Fig. 1. NO_3^- utilization, NO_2^- and NH_4^+ formation during *D. desulfuricans* IMV K-6 growth in Kravtsov-Sorokin medium without SO_4^{2-} and NH_4Cl with NO_3^-

Техногенні водойми часто забруднені не лише агресивними сполуками сульфуру та нітрогену, але і іонами важких металів, вміст яких значно перевищує гранично допустимі концентрації [7, 8]. Дослідження можливості використання зеленими фотосинтезувальними сіркобактеріями *S. limicola* IMB K-8 різних сполук нітрогену, у тому числі за впливу іонів важких металів (табл. 4) показало, що ці бактерії найкраще використовують амонійний та амінний нітроген, оскільки після 10 діб росту у середовищах з NH_4Cl (контроль) або $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ виявлено високу біомасу та незначний вміст гідроген сульфід у середовищі. Наявність у середовищі одночасно лізину та амоній хлориду сприяє росту та окисненню

Таблиця 4

Вплив різних сполук нітрогену та іонів важких металів (1,5 мМ)
на ріст та утилізацію гідроген сульфіду *C. limicola* IMV К-8**

Table 4

Different nitrogen compounds and hard metal ions (1.5 mM) influence
on the growth and hydrogen sulfide utilization by *C. limicola* IMV К-8**

Солі, використані для інкубації клітин	Сполуки нітрогену в середовищі	Біомаса, г/л	[S ²⁻], мМ
Без солей металів	NH ₄ Cl (контроль)	3,31±0,06	0,17±0,05
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	1,21±0,03*	0,81±0,05*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	1,30±0,04*	0,66±0,03*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	3,45±0,05	0,12±0,03
	NaNO ₃	0,12±0,03*	2,40±0,02*
	NaNO ₂	0,13±0,04*	2,41±0,03*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,47±0,05	0,29±0,03
CoCl ₂	NH ₄ Cl (контроль)	2,31±0,01	0,70±0,01
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,96±0,07*	1,62±0,04*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,89±0,04*	1,55±0,04*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,85±0,04	0,45±0,08
	NaNO ₃	0,14± 0,01*	2,41±0,02*
	NaNO ₂	0,11± 0,01*	2,45±0,02*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,30± 0,01	0,90±0,01
NiCl ₂	NH ₄ Cl (контроль)	2,28±0,04	0,45±0,03
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,81±0,05*	1,40±0,04*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,93±0,07*	1,38±0,04*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,75±0,04	0,30±0,06
	NaNO ₃	0,10±0,01*	2,40±0,01*
	NaNO ₂	0,10±0,01*	2,43±0,04*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,19±0,04	0,60±0,06
CdSO ₄	NH ₄ Cl (контроль)	1,96±0,08	0,86±0,11
	NH ₄ Cl, NaNO ₃	0,65±0,03*	1,96±0,35*
	NH ₄ Cl, NaNO ₂	0,69±0,07*	1,93±0,09*
	NH ₄ Cl, C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,35±0,02	0,54±0,03
	NaNO ₃	0,15±0,01*	2,42±0,15*
	NaNO ₂	0,14±0,02*	2,41±0,26*
	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	2,09±0,08	0,96±0,05

Примітки: * – $p \leq 0,05$;

** – вихідна концентрація [S²⁻] у середовищі GSB – 2,5 мМ

** – initial [S²⁻] concentration in medium GSB – 2.5 mM



клітинами гідроген сульфід. Нітрат та нітрит натрію пригнічують засвоєння клітинами амонійної форми нітрогену: спостерігається значно гірший ріст і пригнічення фотоасиміляції гідроген сульфід, порівняно з контролем. Нітрат та нітрит як єдині джерела нітрогену в середовищі не засвоюються *C. limicola* ІМВ К-8. За даними літератури [2] ці сполуки виступають як стресовий фактор. В таких умовах *C. limicola* ІМВ К-8 активно нагромаджує глікоген, проте пригнічується ріст та утилізація гідроген сульфід [6].

Іони кобальту, нікелю та кадмію негативно впливають на нагромадження біомаси та утилізацію гідроген сульфід *C. limicola* ІМВ К-8 під час росту у середовищах з різними сполуками нітрогену (табл. 4). Якщо після культивування у середовищі з амоній хлоридом та лізином не інкубовані з солями важких металів бактерії утилізували 95,2% гідроген сульфід, то інкубовані з CoCl_2 , NiCl_2 та CdSO_4 — 82,0; 88,0 та 78,4%, відповідно. За наявності у середовищі амонійного нітрогену негативний вплив іонів кобальту, нікелю та кадмію на метаболізм бактерій менший, ніж заміна амонію на нітрат і нітрит. Після культивування у середовищі з амонієм та нітратом не інкубовані з солями важких металів клітини утилізували 67,6% гідроген сульфід, а клітини, інкубовані з CoCl_2 , NiCl_2 та CdSO_4 — 35,2; 44,0 та 21,6%, відповідно. Як видно з отриманих результатів, найбільш негативний вплив на метаболічну активність зелених фототрофних сіркобактерій виявили іони кадмію.

Таким чином, встановлено, що *C. limicola* ІМВ К-8 використовують амонійний та амінний нітроген і не засвоюють нітроген нітрату та нітриту. Доведено, що нітрат та нітрит пригнічують засвоєння клітинами амонійної форми нітрогену. Показано, що за впливу Co^{2+} , Ni^{2+} та Cd^{2+} відбувається інгібування росту та утилізації гідроген сульфід бактеріями у середовищі з амоній хлоридом та/або лізином. За наявності у середовищі амонійного нітрогену негативний вплив іонів важких металів на метаболізм бактерій менший, ніж заміна амонійної форми нітрогену на нітроген нітрату чи нітриту.

Отже, нітрат і нітрит негативно впливають на ріст, біогенез гідроген сульфід сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями та його фотоасиміляцію фотосинтезувальними сіркобактеріями. При асиміляції клітинами нітрогену у формі аміаку або в складі клітинних компонентів (наприклад, амінокислот) його ступінь окиснення (-3) не змінюється, тоді як при використанні бактеріями нітрогену нітратів або нітритів (ступінь окиснення +5 та +3, відповідно) він відновлюється відповідними редуказами, які синтезуються не у всіх мікроорганізмів. Єдиними серед досліджених нами бактерій, які засвоювали нітрати та нітрити, використовуючи їх як кінцевий акцептор електронів дисиміляційної нітрат- чи нітритредукції (з утворенням амонію), виявилися сульфатвідновлювальні бактерії, причому як за наявності, так і за відсутності сульфатів. Нітрат і нітрит пригнічували сульфатредукцію у цих бактерій, можливо, у зв'язку з їх

вищим, ніж у сульфату, окисно-відновним потенціалом, що дозволяло їм відновлюватися у клітинах швидше [9, 10]. З іншого боку, викликане нітратом і нітритом голодування за нітрогеном у бактерій роду *Chlorobium* сприяє нагромадженню бактеріями ендogenous глікогену, продукту, який має важливе для народного господарства значення [2, 6].

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабко А.К., П'ятницький І.В. Кількісний аналіз. — К.: Вища школа, 1974. — 352 с.
2. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: Дис. ... канд. біол. наук: 07.10.08. — К., 2008. — 202 с.
3. Деркач М.П., Гумецький Р.Я., Чабан М.Є. Курс варіаційної статистики. — К.: Вища школа, 1977. — 208 с.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. — Москва: Наука, 1972. — С. 190–221.
5. Крешков А.И. Основы аналитической химии. Теоретические основы. Качественный анализ: Книга первая, изд. 4-е, перераб. — М.: Химия, 1976. — 472 с.
6. Левицька О., Горішний М., Гудзь С. Взаємозв'язок азотного живлення та утворення глікогену в клітинах *Chlorobium limicola* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 1. — С. 53–61.
7. Мороз О.М., Клим І.Р., Подопрігора О.І. і ін. Вплив важких металів на ріст і окиснення сірководню фотосинтезувальними сіркобактеріями водойми кар'єру Яворівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія біологія. — 2010. — Вип. 28. — С. 30–34.
8. Мороз О.М., Колісник Я.І., Подопрігора О.І. і ін. Мікрофлора води озера “Яворівське” // Науковий вісник Ужгородського ун-ту. Серія біологія. — 2008. — Вип. 24. — С. 131–138.
9. Древис, Г. Шлегель ; пер. с англ. — Москва : Мир, 2005. — Т. 1. — 654 с.
10. Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Здатність сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 і *Desulfobacter* sp. використовувати нітрат як акцептор електронів // Біол. студії. — 2011. — Т. 5, № 2. — С. 51–60.
11. Чайка О., Перетятко Т., Гудзь С. Сірковідновлювальні бактерії водойм Язівського сіркового родовища // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Серія біологія. — 2010. — Вип. 28. — С. 52–55.
12. Bokranz M.J., Katz J., Schroder I. et al. Energy metabolism and biosynthesis of *Vibrio succinogenes* growing with nitrate or nitrite as terminal electron acceptor // Arch. Microbiol. 1983. — Vol. 135. — P. 36–41.



13. Granger D.L., Taintor R.R., Boockvar K.S. et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction // *Methods Enzymol.* — 1996. — Vol. 268. — P. 142–151.

14. Manabe T. New modification of Lubochinsky's indophenols method for direct microanalysis of ammonia-N in sea water // *Jap. Soc. Sci. Fish. Bull.* — 1969. — Vol. 35. — P. 897–906.

15. Overmann J. Mahoney Lake: A case study of the ecological significance of phototrophic sulfur bacteria // *Adv. Microbiol. Ecol.* — 1999. — Vol. 15. — P. 251–288.

Стаття надійшла до редакції 20.05.2012 р.

О.М. Moroz¹, І.В. Rusyn²

¹ Ivan Franko National University of Lviv,
4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com

² National University „Lviv Polytechnika”,
12, Bandera Str., Lviv, 79013, Ukraine

USE OF NITROGEN COMPOUNDS BY SULFUR CYCLE BACTERIA OF YAVORIVSKE LAKE

Summary

It was revealed that nitrate and nitrite negatively influences on the growth, hydrogen sulfide formation and oxidation by sulfur cycle bacteria. Found that sulfur reducing bacteria *Desulfuromonas acetoxidans* Yavor-12 and sulfate reducing bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* IMV K-6 carry out dyssimilatory sulfur and sulfate reduction with hydrogen sulfide formation using ammonium and amine forms of nitrogen. Sulfur reducing bacteria do not use ammonium and lysine nitrogen in the medium without sulfur; they are not capable to carry out nitrate or nitrite reduction. Sulfate reducing bacteria do not utilize ammonium and lysine nitrogen in the medium without sulfates; they carry out dissimilatory nitrate or nitrite reduction with ammonium formation. Green phototrophic sulfur bacteria *Chlorobium limicola* IMV K-8 use ammonium and amine nitrogen and they are not capable to utilize nitrate and nitrite nitrogen. It is inhibited bacterial growth and hydrogen sulfide utilization by bacteria in medium with ammonium and/or lysine upon the influence of Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺. The negative influence of heavy metal ions on the bacteria metabolism is less in the presence of ammonium nitrogen in medium than in the presence of nitrate or nitrite.

Key words: nitrogen compounds, cycle sulfur bacteria, hydrogen sulfide.



О.М. Мороз¹, И.Б. Русин²

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, e-mail: moroz_oksana@yahoo.com

²Национальный университет „Львовская политехника”,
ул. С. Бандеры, 12, Львов, 79013, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ НИТРОГЕНА БАКТЕРИЯМИ ЦИКЛА СЕРЫ ОЗЕРА ЯВОРОВСКОЕ

Реферат

Показано, что нитрат и нитрит негативно влияют на рост, образование и окисление гидроген сульфида бактериями цикла серы. Серовосстанавливающие бактерии *Desulphuromonas acetoxidans* Yavor-12 и сульфатвосстанавливающие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* ИМВ К-6 осуществляют диссимиляционную серо- и сульфатредукцию с образованием сероводорода при использовании аммонийной и аминной форм азота. Серовосстанавливающие бактерии не используют азот аммония и лизина в среде без серы, они не способны к осуществлению нитрат- или нитритредукции. Сульфатвосстанавливающие бактерии не усваивают азот аммония и лизина в среде без сульфатов, они осуществляют диссимиляционную нитрат- и нитритредукцию с образованием аммония. Зеленые фототрофные серобактерии *Chlorobium limicola* ИМВ К-8 используют аммонийный и аминный азот и не усваивают азот нитрата и нитрита. Под воздействием Co^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} происходит ингибирование роста бактерий и утилизации ими сероводорода в среде с аммонием и/или лизином. При наличии в среде аммонийного азота негативное влияние ионов тяжёлых металлов на метаболизм бактерий меньше, чем при наличии нитрата или нитрита.

Ключевые слова: нитрат, нитрит, аммоний, лизин, *Desulphuromonas acetoxidans*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Chlorobium limicola*, сероводород, никель, кобальт, кадмий.



VII ЛІТНЯ ШКОЛА З МОЛЕКУЛЯРНОЇ МІКРОБІОЛОГІЇ І БІОТЕХНОЛОГІЇ

З 5 по 20 червня 2012 року на базі кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова спільно з Інститутом мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України та за підтримки Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського відбулася VII Літня школа з молекулярної мікробіології і біотехнології.

До участі у Літній школі були запрошені молоді вчені та аспіранти з університетів та наукових закладів з Києва, Чернівців, Ужгорода, Івано-Франківська, Дрогобича, Луцька та Одеси.

Лекційний курс VII Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології був присвячений проблемам біосенсорики. Завідувач лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ, член кореспондент НАНУ, д.б.н., проф. Солдаткін О.П. прочитав лекцію «Варіанти біоселективних елементів біосенсорів», завідувач відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України д.б.н., проф. Гончар М.В. — лекції «Біосенсорика як новітня галузь аналітичної біотехнології», «Біокаталітичні сенсори для аналізу метаболітів», «Поєднання генно-інженерних технологій та нанотехнологій в біосенсорикі», проф. д.б.н. Дзядевич О.П. з Інституту молекулярної біології і генетики НАНУ — лекцію «Електрохімічні перетворювачі», ст.н.с., к.б.н. Рачков О.Е. з цього ж інституту — лекцію «Оптичні біосенсори».

Практичні заняття на школі проводили наукові співробітники кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова — доц., к.б.н. Ліманська Н.В., с.н.с., к.б.н. Васильєва Н.Ю., с.н.с., к.б.н. Іваниця Т.В., н.с., к.б.н. Сергєєва Ж.Ю., м.н.с. к.б.н. Крилова К.Д., Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН — завідувач лабораторії, к.б.н. Остапчук А.М. та представник компанії БіоРад доктор Гюла Шанаді (Угорщина).

Впродовж двох з половиною тижнів на практичних заняттях учасники VII Літньої школи ознайомилися з сучасними методами, які широко використовуються в наукових дослідженнях і в лабораторній практиці: методами титрування та препаративного отримання бактеріофагів, виділення бактеріальної та фагової ДНК, трансформації бактеріальних клітин плазмідною ДНК, методами полімеразної ланцюгової реакції, електро-

форезу в поліакриламідному та агарозному гелях, основними методами біоінформатики.

Під час перерв та у вихідні дні учасники школи відвідали Зоологічний, Мінералогічний та Палеонтологічний музеї Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

На урочистому закритті учасники VII Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології отримали посвідчення, які вручав керівник Літньої школи, проректор з наукової роботи, завідувач кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету професор, д.б.н. В.О. Іваниця.

Організатори Літньої школи з молекулярної мікробіології і біотехнології запрошують молодих учених взяти участь у VIII Літній школі, яка відбудеться у травні-червні 2013 року, і опанувати сучасні методи молекулярної мікробіології, біотехнології та біоінформатики!

Телефон: (0482) 68-79-64

Електронна адреса: sergeevazh@gmail.com

Відповідальний секретар
Літньої школи з молекулярної
мікробіології і біотехнології,
к.б.н. Сергеева Ж. Ю.



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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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



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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абревіатури 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 таблиць та рисунків подаються мовою оригіналу та англійською.

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

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

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

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения 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.

Виявлені помилки

В статье Д.М. Сытникова "Экономическая целесообразность применения ризобиальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином" (№ 1, 2012 г.) на странице 79 некорректно представлена формула расчёта рентабельности при использовании бактериальных препаратов (2).

Формула расчёта должна выглядеть так:

$$\text{Рентабельность} = \frac{\text{чистая прибыль}}{(\text{затраты на выращивание} + \text{затраты на препарат})} \times 100\%.$$

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 26.06.2012 р. Формат 70x108/16. Ум.-друк. арк. 10,25.
Гарн. Таймс. Папір офісний. Друк цифровий. Тираж 100 прим.

Видавець та виготовлювач

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