

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

**№ 1(17)
2012**

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 1(17) 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. Totzky (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.

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

PUBLISHERS

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

Publishing editor N.G. Yurgelaitis

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

A d d r e s s : Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel.: 723-28-39, e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2011

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
№ 1(17) 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. Товкач (Київ, Україна), В.М. Тоцький (Одеса, Україна), В.О. Федоренко (Київ, Україна), І.С. Щербатенко (Київ, Україна)

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

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

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

ВИДАВЦІ

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

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

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтіс

Редактори: І.М. Омельченко, Л.Б. Котлярова, І.В. Райко

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2011

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

N. Limanska PREVENTION OF GRAPE CROWN GALL	6
--	---

EXPERIMENTAL WORKS

I.I. Romanovska, Yu.A. Shesterenko, O.V. Sevastyanov PHENOL REMOVAL FROM THE SEA WATER WITH USAGE OF FREE AND IMMOBILIZED <i>AGARICUS BISPORUS</i> MUSHROOMS TYROSINASE	23
---	----

D.I. Khomyak, N.A. Grycenko, A.D. Konon, T.P. Pirog INFLUENCE OF ORGANIC ACIDS ON THE SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES UNDER THE CONDITIONS OF GROWTH OF <i>NOCARDIA VACCINII</i> K-8 ON GLYCEROL.....	31
--	----

A.A. Halushka, M.B. Gorishny, O.R. Kulachkovsky, S.P. Gudz INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF <i>CHLOROBBIUM LIMICOLA</i> IMV K-8	39
--	----

T.A. Krupodorova, V.Yu. Barshteyn ALTERNATIVE SUBSTRATES FOR MEDICINAL AND EDIBLE MUSHROOMS CULTIVATION	47
--	----

M.O. Shulyakova, T.P. Pirog, T.A. Shevchuk SOME REGULARITIES OF SURFACTANTS SYNTHESIS UNDER CULTIVATION OF <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> IMB AC-5017 ON THE MIXTURES OF GROWTH SUBSTRATES	57
---	----

O.M. Alekseenko, I.V. Zhernosekova, A.I. Vinnikov THE STUDY OF INFLUENCE OF CULTURAL LIQUID OF STREPTOMYCETE ON ACCUMULATION OF BIOMASS <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i>	66
--	----

D.M. Sytnikov ECONOMIC EFFECT AND APPLICATION OF RHIZOBIAL PREPARATIONS MODIFIED WITH HOMOLOGOUS LECTIN.....	75
---	----

S. Uzhevskia, O. Bagaeva, V. Ivanytsia MICROMYCETES AS THE OBJECTS FOR TARSONEMID (TARSONEMIDAE, HETEROSTIGMATA) MITES FEEDING	85
---	----

PAGES OF HISTORY

V.O. Kuznetsov PROFESSOR YURIY VASILIEVICH MEDVEDEV (05.09.1903 – 06.09.1969) SCIENTIFIC AND PEDAGOGICAL ACTIVITY.....	94
---	----

INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	110
----------------------------------	-----

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Н.В. Ліманська

ЗАХИСТ ВІНОГРАДУ ВІД БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ..... 6

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

І.І. Романовська, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов

ВИДАЛЕННЯ ФЕНОЛУ З МОРСЬКОЇ ВОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ
ВІЛЬНОЇ І ІММОБІЛІЗОВАНОЇ ТИРОЗИНАЗИ ГРИБІВ *AGARICUS*
BISPORUS..... 23

Д.І. Хом'як, Н.А. Гриценко, А.Д. Конон, Т.П. Пирог

ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-
АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ РОСТУ *NOCARDIA VACCINII*
K-8 НА ГЛІЦЕРИНІ..... 31

А.А. Галушка, М.Б. Горішний, О.Р. Кулачковський, С.П. Гудзь

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИЙ
АПАРАТ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVUM LIMICOLA* ІМВ K-8..... 39

Т.А. Круподьорова, В.Ю. Барштейн

АЛЬТЕРНАТИВНІ СУБСТРАТИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ
ЛІКАРСЬКИХ ТА ЇСТИВНИХ ГРИБІВ..... 47

М.О. Шулякова, Т.П. Пирог, Т.А. Шевчук

ДЕЯКІ ЗАКОНОМІРНОСТІ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ
РЕЧОВИН ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCUS*
ERYTHROPOLIS ІМВ АС-5017 НА СУМІШІ РОСТОВИХ
СУБСТРАТІВ 57

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

ВИВЧЕННЯ ДІЇ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ СТРЕПТОМІЦЕТА
НА НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ *PLEUROTUS OSTREATUS*..... 66

Д.М. Ситніков

ЕКОНОМІЧНА ДОЦІЛЬНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ РИЗОБІАЛЬНИХ
ПРЕПАРАТІВ, МОДИФІКОВАНИХ ГОМОЛОГІЧНИМ ЛЕКТИНОМ .. 75

С.П. Ужєвська, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця

МІКРОМІЦЕТИ ЯК ОБ'ЄКТИ ЖИВЛЕННЯ КЛІЩІВ
ТАРСОНЕМІД (*TARSONEMIDAE*, *HETEROSTIGMATA*)..... 85

С Т О Р І Н К И І С Т О Р І Ї

В.О. Кузнецов

НАУКОВА І ПЕДАГОГІЧНА ДІЯЛЬНІСТЬ ПРОФЕСОРА ЮРІЯ
ВАСИЛЬОВИЧА МЕДВЕДЕВА (05.09.1903 – 06.09.1969 РР.)..... 94

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 106

УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

N. Limanska

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

PREVENTION OF GRAPE CROWN GALL

Complex strategies to control crown gall are reviewed: indexing of planting material, hot water treatment, cultural practices, treatments with chemical substances and plant extracts. Special attention is paid to the biological control. The short descriptions of the most well studied antagonistic strains are listed. The main problems of grape crown gall prevention are elucidated.

Key words: crown gall, grapevine, Agrobacterium vitis, Agrobacterium tumefaciens.

Crown gall of grape is one of the most dangerous diseases in commercial nurseries of many grape-growing countries. On the young vineyards of susceptible cultivars up to 75% of the plants may die from galls surrounding the trunks and interfering the normal water and nutrients supply [14]. In adult plants crown gall strongly affects grapevine growth and makes plants less resistant to unfavorable environmental conditions. Early decline of grapes also occurs [13]. This leads the investigators to develop the effective means of crown galled plants treatment and disease spread prevention.

Crown gall of grape is caused by *Agrobacterium vitis* (*Rhizobium vitis* by recently proposed nomenclature [106]) and in some cases – by *A. tumefaciens* (*R. radiobacter*) [13, 59]. Pathogenic agrobacteria have the ability to transfer the definite segment of Ti plasmid into eukaryotic cells, where it integrates into the genome [21, 40]. Pathogens induce crown gall tumors on the representatives of 93 families of dicotyledonous plants [27], but grape, stone fruits and ornamentals are the most being suffered [13, 38, 65].

Crown gall agents survive in grapevine xylem and are transmitted by vegetative propagation [60]. If infected plants remain symptomless for a long time, they may be used by mistake as planting material, and this results in further spread of pathogens and consequent losses in viticulture [10].



Pathogenic agrobacteria penetrate into grapevines through the wounds caused due to planting, grafting, pruning, or through the wounds made by nematodes [38, 88]. *A. vitis* survives in soil in plant debris opposite to *A. tumefaciens* which is a typical soil saprophyte [13].

None of the modern control methods results in complete pathogenic agrobacteria eradication, and appropriate control of crown gall for every stage of viticulture is needed.

The first stage includes selection of pathogen-free plants for vegetative propagation, indexing and certification of propagation material. Grapevines have differences in their susceptibility to crown gall infection [37, 89, 90]. Susceptible rootstocks and cultivars may maintain populations of crown gall agents and therefore their planting is not recommended especially in the regions with spring frosts [39].

The highly specific and rapid diagnostics methods are necessary to ensure healthy planting material selection.

Polymerase chain reaction (PCR) [81] is the most widely used method for crown gall disease diagnostics, it was started to use in the end of 1980s – beginning of 1990s [30].

To detect pathogenic agrobacteria species the primers to Ti plasmid sequences have been employed, for example, FGP *tmr* 530 and FGP *tmr* 701 from the T-DNA region, FGP *vir* B₁₁₊₂₁ and FGP *vir* G15 from the intergenic region between *vir* B and *vir* G in the virulence region of the pTi [68]; VCR/VCF from the *vir* C of pTi [82]; *vir* A primers specific for the *virA* region, *6a* primers specific for *6a* gene in pTi [32]; *virC* primers specific for the *virC* region, *virE*₂ specific primer pair [92].

There are also known the primers for sequences of chromosomally localized genes, for example, *pehA* primers from hydrolase gene [32, 46], PGF/PGR primers for detection of polygalacturonase gene sequence [46, 92], primers Ab3-F3/Ab3-R4 or F63r16S/F153r16S to specific sequences of *A. vitis* 16S rDNA [1, 52, 73].

The investigators offer various primer pairs allowing not only to distinguish crown gall agents among other bacterial species but to detect various opine types of agrobacterial strains [7, 16, 76, 84, 92, 93].

PCR with *virD*₂ and *ipt* primers to the sequences of genes encoding endonuclease and isopentenyltransferase [41] were applied for the production of clean planting material of asters and roses and showed excellent results [65].

Kumagai L. and Fabritius A.-L. (2008) in comparative study of different primers showed the best results for *A. vitis* and *A. tumefaciens* detection in grapevines for primers pair VCF3/VCR3 elaborated by Suzuki et al. (2004) [58, 91].

Due to genetic variability of different agrobacterial strains, the use of multiplex PCR with mixtures of virulence-, or oncogene specific primers is



recommended for the most precise pathogen detection [8]. It was proposed to apply the internal control for effective diagnostics of crown gall [25].

There are two ways in DNA-diagnostics of crown gall agents. The first means initial isolation of bacterial cultures on semi-selective media and testing of the isolated strains in PCR (BIO-PCR) [41, 65, 83]. Immunocapture of agrobacteria followed by PCR with the DNA of retained cells was proposed [51].

The second way means isolation of total DNA and use of such DNA sample for amplification of certain sequences [24, 32, 57, 77]. During PCR-evaluation of bacterial quantity in tumour, it should be taken into consideration that the primed sequence of pathogenic agrobacteria plasmid gene is also incorporated in plant cell DNA [24].

Both ways have their advantages and disadvantages and can be used in indexing of disease-free propagation material.

Pathogenic *Agrobacteria* strains are relatively difficult to differ from certain types of tumors in which nonpathogenic agrobacteria prevail. The investigators showed that five different *A. tumefaciens* strains initially isolated from apple tumors produced up to 99% nonpathogenic mutants following their introduction into plants [5]. Other authors [62] studied tumours in apple, tomato, pepper, plum, cherry, pear and peach, and revealed much smaller amount of mutant strains (0.01 %) present only in tomato and pepper tissue. This process has not been studied on grapevines yet.

To prevent the spread of grape pathogens in propagation material nurseries apply hot water treatment (HWT) [98, 99]. HWT is highly recommended to serve as the second stage of crown gall control – the stage concerning propagation material production.

Hot water treatment, or heat treatment means submersion of plant material in hot water for a fixed period of time. HWT is widely used in many countries to eliminate pathogens and pests from dormant grapevines. HWT eradicates or reduces nematodes, phylloxera, mealybugs [43], phytoplasmas and eggs of their vectors [17] and other pests.

Elimination of endogenous pathogens such as phytoplasmas and crown gall agents requires longer duration of HWT opposite to external pests (phylloxera and nematodes) for which shorter duration treatment (52 °C – 55 °C for 5 min) is sufficient for eradication. In case of long duration HWT danger of bud mortality exists. Burr et al. (1996) [11] observed bud damage when dormant cuttings were treated at temperatures greater than 50 °C. Treatment of samples above 54 °C for 30 min revealed seasonal and cultivar variabilities in heat tolerance [101]. Therefore standart regimes of 50 °C for 30 min or 50 °C for 45 min are highly recommended for nurseries [11]. Such HWT significantly reduces the quantity of infected plants – to 2% with galls compared with 60% of non-treated [11, 70]. Other investigations also reported about eradication of *A. vitis* or reducing of its population below



the level of detection [64], but the further testing of grapevines planted in fields after HWT is needed for the final conclusions.

Agrobacteria are non heat resistant bacteria. Continuous growth at 37 °C or 42 °C triggers synthesis of heat shock proteins [3]. But the problem is that the temperature regime 50 °C is not sufficient for complete eradication of crown gall agents in the plants. Cells of *A. vitis* surviving in dormant grape cuttings are more heat-tolerant than cells grown in culture in stationary phase. Internal tissues of the cuttings reach the temperatures of water bath within 4–6 minutes, so agrobacteria survival could not be explained by difference in the temperatures [11]. Further studies of variable heat sensitivities of crown agent strains [11, 64] and efficacy of HWT in pathogens eradication are needed. But the problem is that if the wound tissue has been already transformed before heat treatment, eradication of agrobacteria will not prevent from crown gall development.

Contaminated soil, water and the instruments may result in reinfection with phytopathogens in an open field nursery [98].

The third stage of crown gall control means prevention of plant tissues from pathogen penetration, or treatment of infected grapevines to reduce the symptoms or decline, and to avoid spread of infection from the diseased plants to the healthy ones. This includes the special cultural practice with choosing non-infected plot with non-heavy soils, without excessive wet, which is not situated in low-lying lands. It also is better to use potassium fertilizers instead of nitrogen ones to improve resistance of grapevines to cold [13]. Fumigation decreased level of infection on vineyards. Combined treatments with antagonistic strain *A. radiobacter* HLB-2 and fumigant Vorlex had a synergistic effect on crown gall control [75].

Population densities of pathogenic agrobacteria declined within solarized plots, and incidence of crown gall on cherry rootstocks in solarized plots was reduced significantly [72].

There are some cultural practices, which help to destroy fresh tumors by chemicals such as 5% copper sulfate, Bordeaux mixture plus 4,6-dinitro-o-cresol or by pregrafting treatment of oxyquinoline sulphate [13]. The effects of preparation based on walnut extract, and different concentrations of cartacide were studied with positive results [56]. In general, the control of endogenous pathogens is difficult since the traditional techniques such as chemical sprays and soaking used for the control of surface pathogens do not allow to penetrate dormant grapevine cuttings sufficiently to control microorganisms inhabiting the phloem and xylem tissue [98]. The same difficulties exist also for the treatments with the plant extracts.

Extracts of *Orobanch*e inhibited the growth of crown gall agents [80]. The high antitumor activity of *Fagonia cretica* extracts was found against all the tested agrobacterial strains on a model of potato tuber discs, however, the extract did not show any lethal activity against these strains [49]. *Pothomorphe peltata* extracts showed 22% of crown gall inhibition [67],



extracts from *Ludwigia hyssophila* – 73.5 and 84.14% inhibition, and extracts from this plant also exhibited a moderate antibacterial activity [26]. Treatment with *Albizia lebbek* extracts resulted in significant decrease in tumor formation too [42].

To retard certain stages of crown gall pathogenesis, the effect of phytohormone salicylic acid was studied. *Nicotiana benthamiana* plants treated with salicylic acid showed the reduced disease symptoms [2].

Treatment with antagonistic bacterial strains is a very promising trend. As opposed to chemicals, using of antagonistic strains does not interfere the balance in biocoenoses. Antagonists colonize the plant tissues as effectively as pathogens do, and have clear stimulating effect on the plants [4]. Antagonistic strains can be easily applied in nursery practice by submersion of the roots of young grape plants and cuttings into cell suspension before planting. *A. rhizogenes* strain K84 is widely used against *A. tumefaciens*. The strain can survive in a field environment for at least two years [87]. *A. rhizogenes* K84 produces highly specific bacteriocin agrocin – the analogue of adenine nucleotide [94].

Reader et al. (2005) showed that agrocin K84 acts on leucyl-tRNA synthetase of susceptible cells, while the producer itself survives by means of the second own synthetase copy [78].

But this bacteriocin is effective only against nopaline, agrocinopine, and succinamopine strains, and therefore has no effect on crown galls on grapevine caused by octopine and vitopine *A. vitis* strains [44, 54]. In some cases the use of K84 is effective against gall formation caused even by agrocin-resistant strains [71].

A. rhizogenes K84 carries three plasmids – pAgK84 responsible for agrocin K84 synthesis [85], pAgK434 with genes of agrocin 434 [31], and pNoc encoding catabolism of nopaline [22, 66]. Strain K84 synthesizes one more antagonistic substance – siderophore ALS84 effective against agrobacteria at low-iron conditions [71].

Using of *A. rhizogenes* K84 may be problematic due to possible transfer of pAgK84 into pathogenic strains. Pathogenic strain with pAgK84 becomes insensitive to agrocin and biocontrol fails [97]. The stable Tra⁻ deletion mutant of K84 – the strain K1026 was constructed [50]. This strain is as efficient as K84 and it can control crown gall without reducing the total quantity of pathogens in the root system [97]. It would be perspective to modify other agrobacterial strains to minimize plasmid transfer possibility.

Despite of the fact that pTi i pNoc belong to one incompatibility group, spontaneous transfer of pTi to K84 cells is also possible. Such transfer can be explained by recombination between pTi and pNoc. The resulted transconjugants are at the same time pathogenic and resistant to agrocin K84 [63].



Transfer of plasmids belonging to certain incompatibility groups into *A. tumefaciens* cells results in inhibition of oncogenic properties of pathogenic strains [19, 36].

It was shown that agrobacteria can undergo natural transformation under environmental conditions and this also increases their variability [29].

Pathogenic strains can also produce bacteriocins. For instance, *A. tumefaciens* J73, biotype 2 with nopaline type pTi synthesized a bacteriocin active against *A. tumefaciens* and *A. vitis* [104]. Pathogenic strain *A. tumefaciens* D286 producing bacteriocin agrocin with wide spectrum of action, spontaneously lost its pathogenicity and therefore could be used as a biocontrol agent [45, 109].

Potential antagonists of grapevine crown gall agents are the strains from *Agrobacterium* genus and the representatives of other genera as well. Eastwell et al. (2006) studied the potential of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. isolates as biocontrol agents against crown gall *in planta*. All three bacteria reduced gall size if they has been applied 25 or 86 days before the inoculation with *R. vitis* [33].

Strains of *Pseudomonas aureofaciens* and *P. fluorescens* reduced the occurrence and symptoms of crown gall on grapevine and raspberry, and the effect was cultivar-dependent [55].

Rahnella aquatilis HX2 isolated from vineyard soil showed a significant biocontrol effect. After three years, the amount of diseased plants among those treated with the antagonist was 30.8% compared to 93.5% in non-treated plants [18].

Bell et al. (1995) among 851 isolates from xylem sap revealed 24 strains with clear inhibitory effect on *A. vitis*. These antagonists belonged to *Enterobacter agglomerans* (35%), *Rahnella aquatilis* (30%) and *Pseudomonas* spp. (35%) [6].

Rhizosphere bacteria producing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD), which degrades the immediate precursor of ethylene in the plants, are perspective in *A. tumefaciens* or *A. vitis* biological control. Treatment with ACCD-producing *Pseudomonas putida* UW4, *Burkholderia phytofirmans* PsJN and *Azospirillum brasilense* Cd1843 strains significantly reduced the mass of *A. vitis*-induced tumours on tomatoes. Transgenic test-plants expressing bacterial ACCD also showed the high resistance to crown gall [96].

Bazzi et al. (1999) [4] treated grapevine cuttings with antagonistic strains *A. vitis* F2/5 [86], *A. vitis* 1077 – agrocin-minus mutant of *A. vitis* F2/5, *A. vitis* 523 [12] and *A. radiobacter* HLB-2 [105]. After 24 hours, the cuttings were infiltrated with a virulent *A. vitis* strain. There were observed 100 times decreasing of pathogen amount in tissue at the graft point. The best results of grafting showed HLB-2 strain [4]. *A. radiobacter* HLB-2 suppresses tumors by competing for sites and nutrients and producing an



agrocin-like substance [74]. But in case of *A. vitis* F2/5 the greatest number of discarded vines occurred due to necroses, though F2/5 is the most perspective biological control agent [4]. The matter is that inhibitory activity of this strain against pathogen is not associated with agrocin production and competition for attachment cells. It is directly related to interaction with grapevine [12]. The investigators suggest that F2/5 inhibits normal healing by inducing necrosis in cambium. Callus cells formed in cambium during wound healing are susceptible to transformation by pathogen. Wounds inoculated with F2/5 prior to application of the pathogen did not develop galls due to necroses induced by biological control strain [23]. This mechanism resembles the hypersensitive response [47].

A. vitis F2/5 inhibits crown gall development only on grapevine and not on other plants. Transfer of the stable plasmid pT2TFXK encoding an antibiotic trifolitoxin from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to *A. vitis* F2/5 extended the antagonistic properties of the latter. *A. vitis* F2/5 strain became able to reduce tumour formation on *Nicotiana glauca* and to inhibit the strains resistant to it before [48].

Nonpathogenic strain *A. vitis* isolated from grapevine roots, E26, is effective against crown gall on grapevine caused by *A. vitis* and crown gall on peach and cherry caused by *A. tumefaciens* [61]. The strain produces an antibacterial substance strongly inhibits pathogenic agrobacteria and their attachment to grape cells [103, 107].

Nonpathogenic strain *A. vitis* VAR03-1 isolated from nursery stock of grapevines was tested on tomato seedlings and grapevines. The plants were treated with antagonist cell suspension for 24 hours, and after soaked for one hour in pathogen suspension. After the treatments, the test-plants were planted in the pots with infected soil. Significant reducing of gall formation on both tomato and grapevines occurred [53].

The agrocin NA5 active against the close related strains was isolated from the soil born *A. radiobacter* NA5, which was proposed by the authors for the next field trials [69].

The investigations of *A. vitis* spread in feral grapevines showed the interesting results. None of the wild vines studied in Austria were infected with pathogenic agrobacteria [95]. The same results were obtained when feral grapevines of Crimea were tested (Limanska N., Milkus B., personal communication). In Italy, over 50 strains of non-tumorigenic *A. vitis* were isolated from feral grapevines. The transfer of pTi plasmid from pathogenic agrobacteria into nonpathogenic strains from feral grapevines is inhibited [14].

All agrobacteria isolated from feral grapevines in the USA were non-tumorigenic as well, and seven strains from 26 studied inhibited pathogen *A. vitis* K306 [15]. Such investigations point out the possibility to study the strains from feral grapevines as a potential source of antagonistic agents.



There are few studies concerning agrobacterial bacteriophages and perspectives of their use in biological control of crown gall [9, 20, 28, 35, 100, 108]. Eayre C. (2003) informed about the possibility of walnut crown gall control using bacteriophages [34].

Further investigations should be carried out to study the possibilities of biocontrol strains and to search for the new isolates with useful characteristics.

LITERATURE

1. Al-Karablieh N., Khlaif H., Al-Banna L. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* strains by PCR-RFLP analysis of the 16S-rDNA // Jourdan Journ. Agricult. Sciences. — 2006. — Vol. 2, № 3. — P. 209–220.

2. Anand A., Uppalapati S.R., Ryu C.M., Allen S.N., Kang L., Tang Y., Mysore K.S. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Physiol. — 2008. — Vol. 146, № 2. — P. 703–715.

3. Balsiger S., Ragaz C., Baron C., Narberhaus F. Replicon-specific regulation of small heat shock genes in *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. — 2004. — Vol. 186, № 20. — P. 6824–6829.

4. Bazzi C., Alexandrova M., Stefani E., Anaclerio F., Burr T.J. Biological control of *Agrobacterium vitis* using non-tumorigenic agrobacteria // Vitis. — 1999. — Vol. 38, № 1. — P. 31–35.

5. Belanger C., Canfield M., Moore L.W., Dion P. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown tumors // J. Bacteriol. — 1995. — Vol. 177, № 13. — P. 3752–3757.

6. Bell C.R., Dickie G.A., Chan J.W.Y.F. Variable Response of Bacteria Isolated From Grapevine Xylem to Control Grape Crown Gall Disease *in planta* // Am. J. Enol. Vitic. — 1995. — Vol. 46, № 4. — P. 499–508.

7. Bini F., Geider K., Bazzi C. Detection of *Agrobacterium vitis* by PCR using novel *virD₂* gene-specific primers that discriminate two subgroups // Eur. J. Plant Pathol. — 2008. — Vol. 122. — P. 403–411.

8. Bini F., Kuczmog A., Putnoky P., Otten L., Bazzi C., Burr T.J., Szegedi E. Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens* // Vitis. — 2008. — Vol. 47, № 3. — P. 181–189.

9. Boyd R.J., Hilderbrandt A.C., Allen O.N. Specificity Patterns of *Agrobacterium tumefaciens* phages // Arch. Mikrobiol. — 1970. — Vol. 73. — P. 324–330.

10. Burr T.J., Katz B.H. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Dis. — 1984. — Vol. 68. — P. 976–978.

11. Burr T.J., Reid C.L., Splittstoesser D.F., Yoshimura M. Effect of heat treatment on grape bud mortality and survival of *Agrobacterium vitis*



in vitro and in dormant grape cuttings // *Am. J. Enol. Vitic.* — 1996. — Vol. 47, № 2. — P. 119–123.

12. *Burr T.J., Reid C.L., Tagliati E. et al.* Biological control of grape crown gall by strain F2/5 is not associated with agrocin production or competition for attachment sites on grape cells // *Phytopathology.* — 1997. — Vol. 87. — P. 705–711.

13. *Burr T.J., Bazzi C., Soble S., Otten L.* Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // *Plant Dis.* — 1998. — Vol. 82. — P. 1288–1297.

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

15. *Burr T.J., Reid C.L., Adams C.E., Momol E.A.* Characterization of *Agrobacterium vitis* strains isolated from feral *Vitis riparia* // *Plant Disease.* — 1999. — Vol. 83, № 2. — P. 102–107.

16. *Canaday J., Gerard J.C., Crouzet P., Otten L.* Organization and functional analysis of three T-DNAs from the vitopine Ti plasmid pTiS4 // *Mol. Ge. Genet.* — 1992. — Vol. 235. — P. 292–303.

17. *Caudwell A., Larrue J., Boudon-Padieu E., McLean G. D.* Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment // *Australian J. Grape Wine Research.* — 1997. — Vol. 3, № 1. — P. 21–25.

18. *Chen F., Guo Y.B., Wang J.H., Li J.Y., Wang H.M.* Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2 // *Plant Disease.* — 2007. — Vol. 91, № 8. — P. 957–963.

19. *Chernin L.S., Lobanok E.V., Fomicheva V.V. et al.* Crown gall-suppressive IncW R plasmids caused a decrease of auxin production in *Agrobacterium tumefaciens* // *Mol. Gen. Genet.* — 1984. — Vol. 195. — P. 195–201.

20. *Chilton M.D., Currier T.C., Farrand S.K., Bendich A.J., Gordon M.P., Nester E.W.* *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1974. — Vol. 71, № 9. — P. 3672–3676.

21. *Chilton M.-D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W.* Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis // *Cell.* — 1977. — Vol. 11. — P. 263–271.

22. *Clare B.G., Kerr A., Jones D.A.* Characteristics of the nopaline catabolic plasmid in *Agrobacterium* strains K84 and K1026 used for biological control of crown gall disease // *Plasmid.* — 1982. — № 23. — P. 126–137.

23. *Creasap J.E., Reid C.L., Giffinet M.C., Aloni R., Ullrich C., Burr T.J.* Effect of wound position, auxin, and *Agrobacterium vitis* strain F2/5 on wound healing and crown gall in grapevine // *Phytopathology.* — 2005. — Vol. 95. — P. 362–367.



24. Cubero J., Martinez M.C., Llop P., Lopez M.M. A simple and efficient PCR method for the detection of *Agrobacterium tumefaciens* in plant tumours // Journal of Applied Microbiology. — 1999. — Vol. 86. — P. 591–602.

25. Cubero J., Wolf van der J., Beckhoven van J., Lopez M.M. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR // J. of Microbiol. Methods. — 2002. — Vol. 51, № 3. — P. 387–397.

26. Das B., Kundu J., Bachar S. C., Uddin M. A., Kundu J. K. Antitumor and antibacterial activity of ethylacetate extract of *Ludwigia hyssopifolia* Linn and its active principle piperine // Pak. J. Pharm. Sci. — 2007. — Vol. 20, № 2. — P. 128–131.

27. De Cleene M., Ley J.D. The host range of crown gall // Bot. Rev. — Vol. 42. — P. 389–466.

28. De Ley J., Gillis M., Pootjes C., Kersters K., Tytgat R., Braekel M. Relationship among temperate *Agrobacterium* phage genomes and coat proteins // J. Gen. Virol. — 1972. — Vol. 16. — P. 199–214.

29. Demaneche S., Kay E., Gourbiere F., Simonet P. Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil // Appl. Environm. Microbiol. — 2001. — Vol. 67, № 6. — P. 2617–2621.

30. Dong L.C., Sun C.W., Thies K.L., Luthe D.S., Graves C.H. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium* // Phytopathol. — 1992. — Vol. 82. — P. 434–439.

31. Donner S.C., Jones D.A., McClure N.C., Rosewarne G.M., Tate M.E., Kerr A., Fajardo N.N., Clare B.G. Agrocin 434, a new plasmid-encoded agrocin from the biocontrol *Agrobacterium* strains K84 and K1026, which inhibits biovar 2 agrobacteria // Physiol. Mol. Plant Pathol. — 1993. — Vol. 42. — P. 185–194.

32. Eastwell K.C., Willis L.G., Cavileer T.D. A rapid and sensitive method to detect *Agrobacterium vitis* in grapevine cuttings using the polymerase chain reaction // Plant Disease. — 1995. — Vol. 79, № 8. — P. 822–827.

33. Eastwell K.C., Sholberg P.L., Sayler R.J. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agents of crown gall disease of grapevines // Crop protection. — 2006. — 25, № 11. — P. 1191–1200.

34. Eayre C. Bacteriophage of *Agrobacterium tumefaciens* for the control of walnut crown gall. — 2003: http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=147169.

35. Expert D., Tourneur J. ψ , a temperate phage of *Agrobacterium tumefaciens*, is mutagenic // J. Virol. — 1982. — Vol. 42. — P. 283–291.

36. Farrand S. K., Kado C. I., Ireland C. R. Suppression of tumorigenicity by the IncW R plasmid pSa in *Agrobacterium tumefaciens* // Mol. Gen. Genet. — 1981. — Vol. 181. — P. 44–51.



37. Ferreira J.H.S., Zyl F.G.H. Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // S. Afr. J. Enol. Vitic. — 1986. — Vol. 7, № 2. — P. 101–104.
38. Frutos D., Cos J., Carrillo A. Are root knot nematodes (*Meloidogyne* sp.) vector of *Agrobacterium tumefaciens* in Persian walnut seedlings. Proc. Joint Meeting of COST 873 (Murcia, Spain), 2007. — P. 16.
39. Goodman R.N., Grinm R., Frank M. The influence of grape rootstocks on the crown gall infection process and on tumor development // Am. J. Enol. Vitic. — 1993. — Vol. 44., № 1. — P. 22–26.
40. Goodner B.W., Markelz B.P., Flanagan C. et al. Combined genetic and physical map of the complex genome of *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. — 1999. — Vol. 181, № 17. — P. 5160–5166.
41. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — V. 61, № 8. — P. 2879–2884.
42. Haque N., Chowdhary S.A.R., Nutan M.T.H., Rahman G.M.S., Rahman K.M., Rashid M.A. Evaluation of antitumour activity of some medicinal plants of Bangladesh by potato disc bioassay // Fitoterapia. — 2000. — Vol. 11, № 5. — P. 547–552.
43. Havaland D.R., Bentley W.J., Daane K.M. Hot-water treatments for control of *Planococcus ficus* (*Homoptera: Pseudococcidae*) on dormant grape cuttings // J. Econom. Entomol. — 2005. — Vol. 72. — P. 1109–1115.
44. Hayman G.T., Farrand S.K. Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58 // J. Bacteriol. — 1988. — Vol. 170. — P. 1759–1777.
45. Hendson M., Askjaer L., Thomson J., Montagu M. van. Broad-host-range agrocin of *Agrobacterium tumefaciens* // Appl. Environm. Microbiol. — 1983. — Vol. 45, № 5. — P. 1526–1532.
46. Herlache T.C., Hotchkiss A.T., Burr T.J., Collmer A. Characterization of the *Agrobacterium vitis* *pehA* gene and comparison of the encoded polygalacturonase with the homologous enzymes from *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas (Burkholderia) solanacearum* // Appl. Environm. Microbiol. — 1997. — Vol. 63. — P. 338–346.
47. Herlache T.C., Zhang H.S., Ried C.L., Carle S.A., Zheng D., Basaran P., Thaker M., Burr A.T. Burr T.J. Mutations that affect *Agrobacterium vitis*-induced necrosis also alter its ability to cause a hypersensitive response on tobacco // Phytopathol. — 2001. — Vol. 91. — P. 966–972.
48. Herlache T.C., Triplett E.W. expression of a crown gall biological control phenotype in an avirulent strain of *Agrobacterium vitis* by addition of the trifolixotoxin production and resistance genes // BMC Biotechnology. — 2002. — Vol. 2: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/2/2>
49. Hussain A., Zia M., Mirza B. Cytotoxic and antitumor potential of *Fagonia cretica* L. // Turk J. Biol. — 2007. — Vol. 31. — P. 19–24.



50. Jones D.A., Ryder M.H., Clare B.G., Farrand S.K., Kerr A. Construction of a Tra- deletion mutant of pAgK84 to safeguard the biological control of crown gall // Mol. Gen. Genet. — 1988. — Vol. 212. — P. 207–214.
51. Kauffman M., Kassemeyer H.H., Otten L. Isolation of *Agrobacterium vitis* from grapevine propagating material by means of PCR after immunocapture cultivation // Vitis. — 1996. — Vol. 35. — P. 151–153.
52. Kawaguchi A., Sawada H., Inoue K., Nasu H. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains // J. Gen. Plant Pathol. — 2005. — Vol. 71. — P. 54–59.
53. Kawaguchi A., Inoue K., Nasu H. Biological control of grapevine crown gall by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* VAR03-1 // J. Gener. Plant Pathol. — 2007. — Vol. 73. — P. 133–138.
54. Kerr A., Roberts W.P. *Agrobacterium*: correlations between a transfer of pathogenicity, octopine and nopaline metabolism and bacteriocin 84 sensitivity // Physiol. Plant Pathol. — 1976. — Vol. 9. — P. 205–211.
55. Khmel I.A., Sorokina T.A., Lemanova N.B., Lipasova V.A., Metlitski O.Z. Biological control of crown gall in grapevine and raspberry by two *Pseudomonas* spp. with a wide spectrum of antagonistic activity // Biocontrol Sci. Technol. — 1998. — Vol. 8, № 1. — P. 45–57.
56. Konup L.A., Gayday A.E., Milkus B.N. Crown gall of grape in Ukraine // Odessa Nat. Univ. Herald. — 2001. — Vol. 6, № 4. — P. 181–183 (in Russian).
57. Krimi Z., Petit A., Mougel P. et al. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils // Appl. Environm. Microbiol. — 2002. — Vol. 68, № 7. — P. 3358–3365.
58. Kumagai L., A.-L. Fabritius Detection and differentiation of pathogenic *Agrobacterium vitis* and *A. tumefaciens* in grapevine using multiplex Bio-PCR // 2th Annual National Viticulture Research Conference (Davis, USA, July 9 – 11, 2008). — Davis: University of California, 2008. — P. 42–43.
59. Lastra B., Llop P., Lopez M.M. Characterization of *Agrobacterium* strains isolated from grapevine in Galicia (Spain) // Proc. Congress of the European Foundation for Plant pathology. — Taormina (Italy), 2000. — P. 178–179.
60. Lehoczky J. Spread of *Agrobacterium tumefaciens* in the vessels of the grapevine after natural infection // Phytopathol. Z. — 1968. — Vol. 63. — P. 239–246.
61. Liang Z.H., Wang H.M., Wang J.H. Preliminary study on effectiveness and the stability of E26 on controlling crown gall disease // J. China Agric. Univ. — 2001. — Vol. 6, № 1. — P. 91–95.
62. Llop P., Murrilo J., Lastra B., Lopez M. Recovery of nonpathogenic mutant bacteria from tumors caused by several *Agrobacterium tumefaciens* strains: a frequent event? // Appl. Environm. Microbiol. — 2009. — Vol. 75, № 20. — P. 6504–6514.



63. Lopez-Lopez M.J., Vicedo B., Orellana N., Piquer J., Lopez M.M. Behavior of a virulent strain derived from *Agrobacterium radiobacter* strain K84 after spontaneous Ti plasmid acquisition // *Phytopathology*. — 1999. — Vol. 89. — P. 286–292.
64. Mahmoodzadeh H., Nazemieh A., Majidi I., Paygami I., Khalighi A. Effects of thermotherapy treatments on systemic *Agrobacterium vitis* in dormant grape cuttings // *J. Phytopathology*. — 2003. — Vol. 151, № 9. — P. 481–484.
65. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., Kleitman F. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material // *Pest Manag. Science*. — 2002. — Vol. 58. — P. 1126–1131.
66. McClure N.C., Ahmadi A.R., Clare B.G. Construction of a range of derivatives of the biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84: a study of factors involved in biological control of crown gall disease // *Appl. Environm. Microbiol.* — 1998. — Vol. 64, № 10. — P. 3977–3982.
67. Mongelli E., Romano A., Desmarchelier C., Coussio J., Ciccia G. Cytotoxic 4-nerolidylcatechol from *Pothomorphe peltata* inhibits topoisomerase I activity // *Planta Med.* — 1999. — Vol. 65. — P. 376–378.
68. Nesme X., Leclerc M.C., Bardin R. PCR detection of an original endosymbiont: the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* / *Endocytobiology IV* / Nardon P., Gianinazzi-Pearson, Greines A.M., Margulis L., Smith D. — Paris: INRA, 1989. — P. 47–50.
69. Nusrat Jabeen, Sheikh A. Rasool, Samia Ahmad, Munazza Ajaz, Saeed Sadia. Isolation, identification and bacteriocin production by indigenous diseased plant and soil associated bacteria // *Pakistan J. of Biol. Sciences*. — 2004. — Vol. 7. — P. 1893–1897.
70. Ophel K., Nicholas P.R., Magarey P.A., Bass A.W. Hot water treatment of dormant grape cuttings reduces crown gall incidence in a field nursery // *Am. J. Enol. Vitic.* — 1990. — Vol. 41, № 4. — P. 325–329.
71. Penyalver R., Oger P., Lopez M.M., Farrand S.K. Iron-binding compounds from *Agrobacterium* spp.: biological control strain *Agrobacterium rhizogenes* K84 produces a hydroxamate siderophore // *Appl. Environm. Microbiol.* — 2001. — Vol. 67. — P. 654–664.
72. Pinkerton J.N., Ivors K.L., Miller M.L., Moore L.W. Effect of soil solarization and cover crops on populations of selected soilborn plant pathogens in Western Oregon // *Plant Disease*. — 2000. — Vol. 84, № 9. — P. 952–960.
73. Ponsonnet C., Nesme X. Identification of *Agrobacterium* strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions // *Archive Microbiol.* — 1994. — Vol. 6. — P. 300–309.
74. Pu X.-A., Goodman R.N. Tumour formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grapevine plants // *Am. J. Enol. Vitic.* — 1993. — Vol. 44, № 3. — P. 249–254.



75. Pu X.A., Goodman R.N. Effects of fumigation and biological control on infection of indexed crown gall free grape plants // Am. J. Enol. Vitic. — 1993. — Vol. 44, № 3. — P. 241–248.

76. Pulawska J., Willems A., Sobiczewski P. Rapid and specific identification of four *Agrobacterium* species and biovars using multiplex PCR // Syst. Appl. Microbiol. — 2006. — Vol. 29, № 6. — P. 470–479.

77. Puopolo G., Raio A., Zoina A. Early detection of *Agrobacterium tumefaciens* in symptomless artificially inoculated chrysanthemum and peach plants using PCR // J. Plant Pathol. — 2007. — Vol. 89, № 2. — P. 185–190.

78. Reader J.S., Phillip T., Ordoukhanian P.T., Jung-Gun Kim J.G., Crücy-Lagard V. de, Hwang I., Farrand S., Schimmel P. Major biocontrol of plant tumors targets tRNA synthetase // Science. — 2005. — Vol. 309, № 5740. — P. 1533.

79. Rooney S.N., Gubler W.D. Effect of hot water treatments on eradication of *Phaemoniella chlamydospora* and *Phaeacremonium inflatipes* from dormant grapevine wood // Phytopathol. Mediterr. — 2001. — Vol. 40. — P. 467–472.

80. Saadoun I., Hameed K.M., Al-Momani F., Ababneh O. Effect of three Orobanchae spp. extracts on some local phytopathogens, *Agrobacterium* and *Erwinia* // Turk J. Biol. — 2008. — Vol. 32. — P. 1–5.

81. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // Science. — 1988. — Vol. 239. — P. 487–491.

82. Sawada H., Ieki H., Matsuda I. PCR detection of Ti and Ri plasmids from phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — Vol. 61. — P. 828–831.

83. Schaad N.W., Cheong S.S., Tamaki S. et al. A combined biological and enzymatic amplification (Bio-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in bean seed extracts // Phytopathology. — 1995. — Vol. 85. — P. 243–248.

84. Schulz T.F., Lorenz D., Eichorn K.W., Otten L. Amplification of different marker sequences for identification of *Agrobacterium vitis* strains // Vitis. — 1993. — Vol. 32. — P. 179–182.

85. Slota J.E., Farrand S.K. Genetic isolation and physical characterization of pAgK84, the plasmid responsible for agrocin 84 production // Plasmid. — 1982. — № 8. — P. 175–186.

86. Staphorst J.L., van Zyl F.G.H., Strijdom B.W., Groenewold Z.E. Agrocin-producing pathogenic and nonpathogenic biotype-3 strains of *Agrobacterium tumefaciens* active against biotype-3 pathogens // Curr. Microbiol. — 1985. — Vol. 12. — P. 45–52.



87. Stockwell V.O., Moore L.W., Loper J.E. Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment // Appl. Environm. Microbiol. — 1993. — Vol. 59, № 7. — P. 2112–2120.
88. Sule S., Lehoczky J., Jenser G., Nagy P., Burr T.J. Infection of grapevine roots by *Agrobacterium vitis* and *Meloidogyne hapla* // J. Phytopathology. — 1994. — Vol. 143. — P. 169–171.
89. Sule S., Moszar J., Burr T.J. Crown gall resistance of *Vitis* spp. and grapevine rootstocks // Phytopathology. — 1994. — Vol. 84, № 6. — P. 607–611.
90. Sule S., Burr T.J. The effect of resistance of rootstocks to crown gall (*Agrobacterium* spp.) on the susceptibility of scions in grape vine cultivars // Plant Pathol. — 1998. — Vol. 47. — P. 84–88.
91. Suzuki K., Yoshida K., Sawada H. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers // J. Gen. Plant Pathol. — 2004. — Vol. 70. — P. 342–347.
92. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. — 2002. — Vol. 41, № 1. — P. 37–42.
93. Tan B.S., Yabuki J., Matsumoto S., Kageyama K., Fukui H. PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan // J. Gen. Plant Pathol. — 2003. — Vol. 69, № 4. — P. 258–266.
94. Tate M.E., Murphy P.J., Roberts W.P., Kerr A. Adenine N7-substituent of agrocin 84 determines its bacteriocin-like specificity // Nature. — 1979. — Vol. 280. — P. 797–799.
95. Tiefenbrunner W., Regner F., Mandl K., Leitner G., Gangl H. The wild vine (*Vitis vinifera* ssp. *silvestris*) in the riparian forests of Donau and March (Austria): evaluation of genetic divergence, presence of grape viruses, bacterials and soil-borne vectors // Plant Gen. Res. Newslett. — 2005. — № 141. — P. 26–32.
96. Toklikishvili N., Dandurishvili N., Vainstein A., Tediashvili M., Giorgobiani N., Lurie S., Szegedi E., Glick B.R., Chernin L. Inhibitory effect of ACC deaminase-producing bacteria on crown gall formation in tomato plants infected by *Agrobacterium tumefaciens* or *A. vitis* // Plant Pathol. — 2010. — Vol. 59, № 6. — P. 1023–1030.
97. Vicedo B., Penyalver R., Asins M.J., Lopez M.M. Biological control of *Agrobacterium tumefaciens*, colonization, and pAgK84 transfer with *Agrobacterium radiobacter* K84 and the Tra⁻ mutant strain K1026 // Appl. Environm. Microbiol. — 1993. — Vol. 59. — P. 309–315.
98. Waite H., May P. The effect of hot water treatment, hydration and order of nursery operations on cuttings of *Vitis vinifera* cultivars // Phytopathol. Mediterr. — 2005. — Vol. 44. — P. 144–152.



99. Waite H., Morton L. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grape planting material // *Phytopatol. Mediterr.* — 2007. — Vol. 46. — P. 5–12.

100. Walls P.A., Pootjes C.F. Host-phage interaction in *Agrobacterium tumefaciens* IV. Phage-directed protein synthesis // *J. Virol.* — 1975. — Vol. 15, № 2. — P. 372–378.

101. Wample R.L., Bary A., Burr T.J. Heat tolerance of dormant *Vitis vinifera* cuttings // *Am. J. Enol. Vitic.* — 1991. — Vol. 42, № 1. — P. 67–72.

102. Wample L.R. Influence of pre- and post-treatment storage on rooting of hot-water-treated cuttings of Cabernet Sauvignon // *Am. J. Enol. Vitic.* — 1997. — Vol. 48, № 2. — P. 131–136.

103. Wang H.M., Wang H.X., Ng T.B., Li J.Y. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens* // *Plant Pathol.* — 2003. — Vol. 52. — P. 134–139.

104. Webster J., Santos M., Thomson J.A. Agrocin-producing *Agrobacterium tumefaciens* strain active against grapevine isolates // *Appl. Environm. Microbiol.* — 1986. — Vol. 52, № 1. — P. 217–219.

105. Xiaoying C., Wangnian X. A strain of *Agrobacterium radiobacter* inhibits growth and gall formation by biotype III strain of *A. tumefaciens* from grapevine // *Acta Microbiol. Sin.* — 1986. — Vol. 26. — P. 193–199.

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

107. Yun L.J., Wang H.M., Wang J.H. A bacteriocin with a broad spectrum activity produced by grapevine crown gall biocontrol strain E26 // *Sci. Agric. Sin.* — 2004. — Vol. 37, № 12. — P. 1860–1865.

108. Zimmerer R.P., Hamilton R.H., Pootjes C. Isolation and morphology of temperate *Agrobacterium tumefaciens* bacteriophage // *J. Bacteriol.* — 1966. — Vol. 92, № 3. — P. 746–750.

109. Zyl van F.G.H., Strijdom B.W., Staphorst J.L. Susceptibility of *Agrobacterium tumefaciens* strains to two agrocin-producing *Agrobacterium* strains // *Appl. Environm. Microbiol.* — 1986. — Vol. 52, № 2. — P. 234–238.



УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

Н.В. Ліманська

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

ЗАХИСТ ВІНОГРАДУ ВІД БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ

Реферат

Розглянуто комплексні стратегії контролю бактеріального раку: відбір здорового садивного матеріалу, термотерапія, агротехніка, обробка хімічними речовинами та екстрактами рослин. Особливу увагу приділено біологічному контролю. Наведено короткий опис найбільш вивчених штамів-антагоністів. Висвітлено основні проблеми захисту винограду від бактеріального раку.

Ключові слова: бактеріальний рак, виноград, *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*.

УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

Н.В. Лиманская

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

ЗАЩИТА ВІНОГРАДА ОТ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА

Реферат

Рассмотрены комплексные стратегии контроля бактериального рака: отбор здорового посадочного материала, термотерапия, агротехника, обработка химическими веществами и экстрактами растений. Особенное внимание уделено биологическому контролю. Приведено краткое описание наиболее изученных штаммов-антагонистов. Освещены основные проблемы защиты винограда от бактериального рака.

Ключевые слова: бактериальный рак, виноград, *Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*.

Одержано 02.03.12



УДК 665.58.002.39 (088.8)

І.І. Романовська, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов

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

ВИДАЛЕННЯ ФЕНОЛУ З МОРСЬКОЇ ВОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ ВІЛЬНОЇ І ІММОБІЛІЗОВАНОЇ ТИРОЗИНАЗИ ГРИБІВ *AGARICUS BISPORUS*

*За допомогою виділеної вільної і іммобілізованої тирозинази грибів *Agaricus bisporus* здійснено кількісне видалення фенолу з модельних розчинів, приготованих з використанням морської води. Показано, що отримані біокатализатори ефективно каталізують процес окиснення фенолу (0,5–10 ммоль/дм³) із збереженням 85% активності порівняно з такою для буферних розчинів, що містять фенол. Олігомерні продукти окиснення фенолу видаляли з використанням неорганічних коагулянтів зі зменшеною у 2,5 рази їх концентрацією при застосуванні іммобілізованого препарату тирозинази.*

Ключові слова: тирозиназа, фенол, морська вода, іммобілізація, неорганічні коагулянти.

Тирозиназа (КФ 1.14.18.1) — фермент класу оксидоредуктаз — на цей час використовується для розробки сучасних ферментативних технологій очищення стічних вод від високотоксичних фенольних сполук [9].

У зв'язку з можливістю забруднення фенольними полютантами не тільки прісних стоків, а й морського басейну [4], необхідним є вивчення можливості використання тирозинази для елімінування фенолу з морської води.

Тирозиназа грибів *Agaricus bisporus* є широко досліджуваним ферментом порівняно з ензимами різного походження завдяки високій активності і виходу на 1 г тканини грибів, а також відсутності сезонних обмежень для придбання вихідної сировини. Фермент складається з 4 попарно ідентичних субодиниць, містить два активних центри, в яких присутні два іони міді, що координовані з 6 молекулами гістидину; молекулярна маса становить ≈ 130 кДа. Тирозиназа каталізує окиснення широкого спектру фенолів і ароматичних амінів, з утворенням нетоксичних олігомерних продуктів [7].

© І.І. Романовська, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов, 2012



Для забезпечення стабільності та можливості багаторазового використання тирозинази перспективним є її іммобілізація на полімерних носіях [6].

Метою даної роботи було дослідження видалення фенолу з морської води з використанням вільного і іммобілізованого препаратів тирозинази з грибів *Agaricus bisporus*.

Матеріали і методи дослідження

З грибів *Agaricus bisporus* виділяли частково очищений препарат тирозинази, використовуючи наведену методику: 1 кг грибів гомогенізували з 2 дм³ охолодженого екстрагенту (водного розчину, що містить 1% аскорбінової кислоти і 0,2% бензойної кислоти (рН 5,5)), перемішували протягом 1 год, після чого отриманий екстракт центрифугували при 10 000 g (10 хв).

Фермент осаджували шляхом насичення надосадової рідини сульфатом амонію до 80% і центрифугували в аналогічних умовах. Осад розчиняли в 15 см³ дистильованої води і додавали 5 г тонкого порошку полікапроаміду (М.м. 30 000), після чого суміш фільтрували, далі проводили діаліз. Процес виділення ферменту здійснювали при 0 °С. В отриманому препараті визначали вміст білку за методом Лоурі в модифікації Хартрі [8], фенолоксидазну активність за тирозином [9], вміст міді [11].

Спектроскопію препарату в УФ і видимій областях проводили в діапазоні $\lambda = 240\text{--}800$ нм, з використанням приладу Lambda-9(Perkin-Elmer).

Іммобілізацію виділеного препарату тирозинази виконували, додаючи розчин ферменту у 4% альгінаті натрію до 5% розчину хлориду кальцію [2].

Ступінь трансформації фенолу визначали спектрофотометрично 4-аміноантипіриновим методом [1].

Окиснення фенолу, що каталізується вільною і іммобілізованою тирозиназою, вивчали з використанням модельних розчинів фенолу (0,5–10,0 ммоль/дм³), які готували на відібраних пробах води Чорного моря, при температурі 25 °С, протягом 1 год.

Елімінацію продуктів ферментативного окиснення фенолу проводили за допомогою алюмокалієвих, алюмоамонійних і залізоамонійних галунів [2].

Ступінь видалення продуктів окиснення фенолу визначали спектрофотометрично за зниженням оптичної густини розчину при 510 нм [9].

Результати дослідження та їх обговорення

З грибів *Agaricus bisporus* виділений частково очищений препарат тирозинази з виходом білка 0,67 мг/г вологої маси грибів, вмістом міді 0,19% і питомою активністю 500 од/мг білка · хв (за тирозином). Запропоноване нами додавання полікапроаміду у процесі отримання ферменту



сприяло триразовому збільшенню фенолоксидазної активності [3]. Схема виділення ферменту представлена на рис. 1.

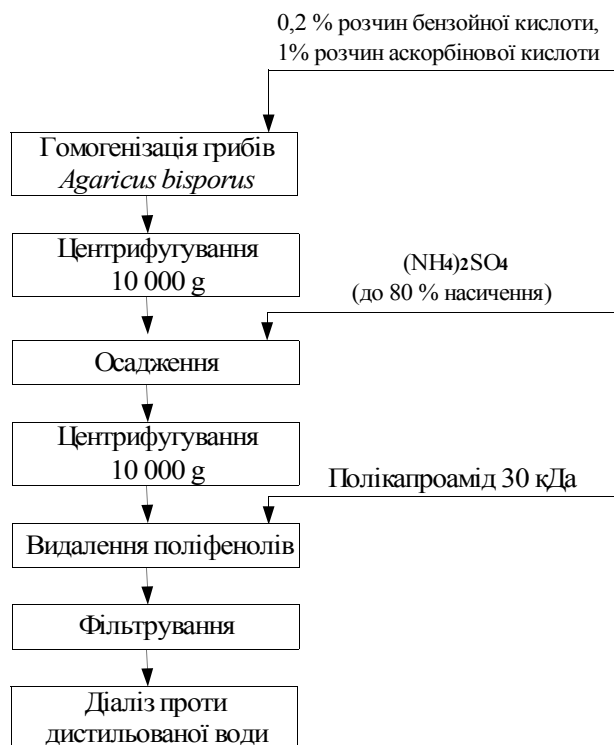


Рис. 1 Схема виділення частково очищеного препарату тирозинази грибів *Agaricus bisporus*

Fig. 1. Scheme of partially purified *Agaricus bisporus* tyrosinase preparation isolation

Оскільки відомо, що препарати тирозинази грибів можуть містити домішки інших оксидоредуктаз (лаккази, пероксидази) [10], методом спектроскопії в УФ і видимій областях було встановлено наявність максимуму поглинання при $\lambda = 280\text{--}281$ нм і широкого плеча при $\lambda = 320\text{--}360$ нм, що характерно для спектру тирозинази, і показано відсутність максимумів поглинання при $\lambda = 403$ і 600 нм, типових для пероксидази і лаккази, відповідно (рис. 2).

Дослідження окиснення розчинів фенолу ($0,5\text{--}10$ ммоль/дм³), приготованих на відібраних пробах морської води, за допомогою виділеного ферменту, показали 85% збереження активності порівняно з такою для буферних розчинів, що містять фенол. Зниження активності ферменту є наслідком підвищеної іонної сили морської води [5].

В результаті тирозиназного окиснення фенолу відмічене утворення розчинних у воді і нерозчинних у більшості органічних розчинників темнозabarвлених продуктів.

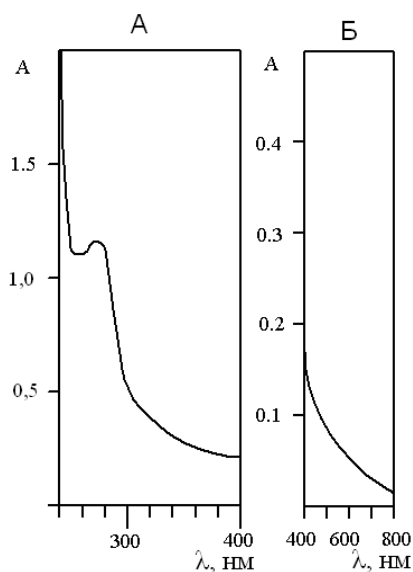


Рис. 2. Спектри поглинання виділеної тирозинази в УФ (А) і видимій областях (Б)

Fig. 2. Absorption spectra of isolated tyrosinase in UV (A) and visible (B) regions

Методом мас-спектрометрії (метод лазерної десорбції/часу іонізації в польоті) отримані дані про продукти окиснення фенолу з використанням тирозинази (рис. 3).

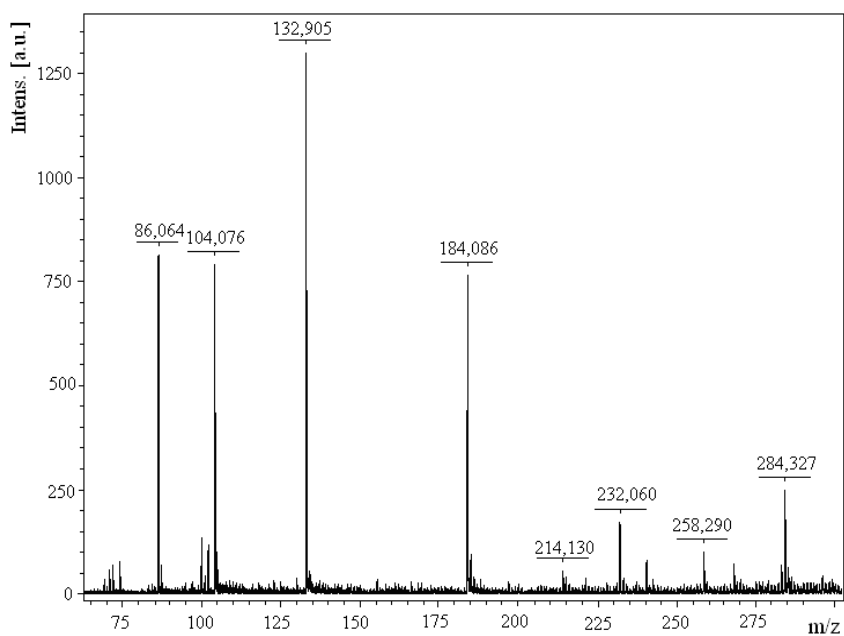


Рис. 3. Мас-спектр продуктів тирозиназного окиснення фенолу

Fig. 3. Mass-spectrum of tyrosinase-dependent phenol oxidation products

Показано, що молекулярна маса олігомерних продуктів, що утворюються, досягає 500 Да; ідентифікований один з продуктів (m/z 214,130) — дифенілендіоксид-2,3-хінон.

У результаті іммобілізації тирозинази в гель альгінату кальцію отримано біокатализатор у формі міцних сферичних гранул діаметром 2 мм, нерозчинних у воді та більшості органічних розчинників, з 50% збереженням вихідної активності ферменту. Іммобілізований препарат мав високу стабільність при підвищеній температурі і несприятливих значеннях рН [2].

Підвищена іонна сила і сольовий склад морської води не впливають на міцність гранул і не призводять до їх розчинення, однак, як і у випадку вільного ферменту, сприяють зниженню фенолоксидазної активності до 85% порівняно з активністю іммобілізованого біокатализатора у розчинах фенолу, приготованих на дистильованій воді. Тому для досягнення повної біоконверсії фенолу необхідно відповідне збільшення кількості іммобілізованого ферменту.

Показано, що отриманий біокатализатор ефективно каталізує процес окиснення фенолу ($0,5\text{--}10$ ммоль/дм³) протягом 12 циклів з кількісним ступенем біоконверсії, та зберігає високу активність ($\geq 50\%$) до 28-кратного використання (рис. 4).

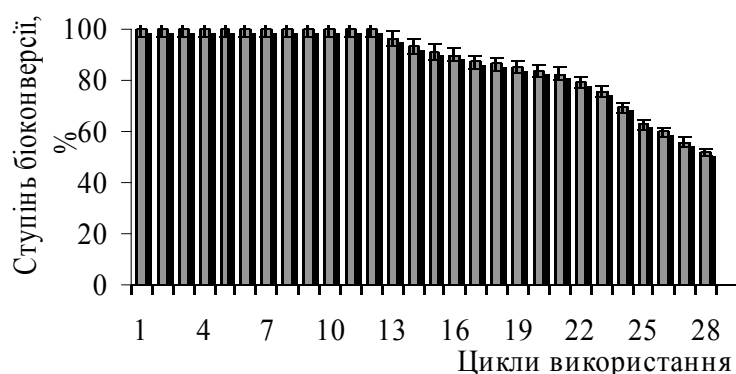


Рис. 4. Залежність ступеня трансформації фенолу в морській воді від кратності використання біокатализатора

Fig. 4. Dependence of phenol transformation degree in the sea water on biocatalyst usage multiplicity

Для видалення продуктів біоконверсії фенолу використовували неорганічні коагулянти (алюмокалієві, алюмоамонійні і залізоамонійні галуни).

Встановлено, що концентрації коагулянтів, які необхідні для видалення продуктів конверсії фенолу з використанням іммобілізованого ферменту, зменшуються у 2,5 рази порівняно з такими для вільного

біокаталізатору (рис. 5), що пов'язано з частковим накопиченням продуктів окиснення фенолу в гранулах іммобілізованого препарату, що підтверджено зниженням оптичної густини розчинів при $\lambda = 510$ нм [9] та забарвленню гранул.

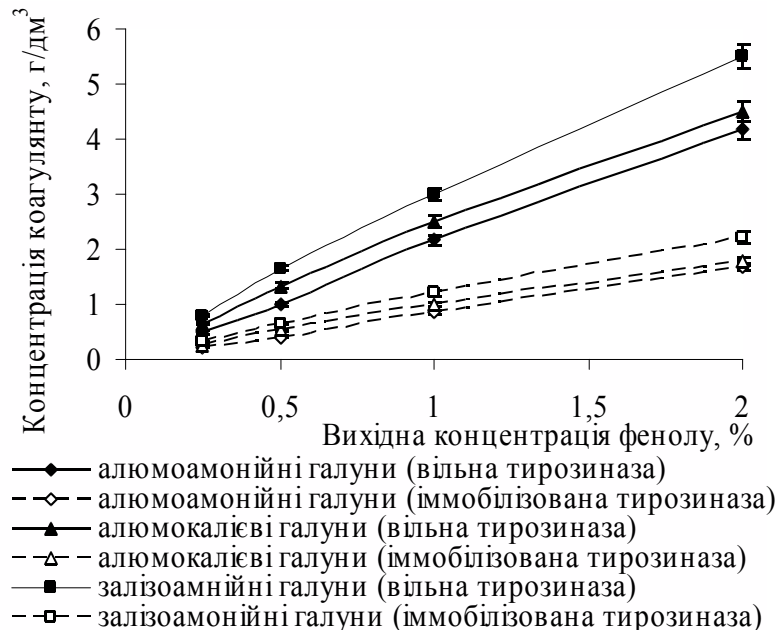


Рис. 5 Залежність концентрації коагулянту, що необхідна для кількісного видалення продуктів окиснення фенолу, отриманих з використанням вільної та іммобілізованої тирозинази, від вихідної концентрації фенолу

Fig. 5. Dependence of the coagulant concentration, necessary for quantitative removal of phenol oxidation products obtained by using free and immobilized tyrosinase, on the phenol initial concentration.

В результаті проведених досліджень розроблений метод елімінування фенолу з морської води шляхом його окиснення з використанням виділеного частково очищеного препарату тирозинази *Agaricus bisporus*. У результаті іммобілізації ферменту в альгінат кальцію отримано біокаталізатор, що ефективно каталізує процес окиснення фенолу (0,5–10 ммоль/дм³) протягом 12 циклів з кількісним ступенем біоконверсії, та зберігає високу активність ($\geq 50\%$) до 28-кратного використання. Видалення продуктів біоконверсії фенолу здійснювали з використанням неорганічних коагулянтів зі зменшеною у 2,5 рази їх концентрацією при застосуванні іммобілізованого препарату тирозинази.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Коренман И.М.* Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1975. — 368 с.
2. *Романовская И.И., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. и др.* Способ элиминации фенола с использованием тирозиназы *Agaricus bisporus*, иммобилизованной в альгинат // Химия и технология воды. — 2010. — Т. 32, № 1. — С. 107–115.
3. *Романовська І.І., Осійчук О.В., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В.* Ферментативні методи елімінації фенольних поллютантів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 1(2). — С. 72–78.
4. *Сафранов Т.А., Савусин В.П., Чугай А.В.* Особенности загрязнения органическими экотоксикантами северо-западной части Черного моря // Научно-технический сборник: Коммунальное хозяйство городов. — 2003. — № 45. — С. 110–113.
5. *Duckworth H.W., Coleman J.E.* Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase // J. Biol. Chem. — 1970. — V. 245, № 7. — P. 1613–1625.
6. *Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A. et al.* Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // Enzyme Microbial. Technol. — 2002. — V. 31. — P. 907–931.
7. *Halaoui S., Asther M., Sigoillot I.-C. et al.* Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological application // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 100. — P. 219–232.
8. *Hartree E.F.* Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — V. 48, № 1. — P. 422–427.
9. *Ikehata K., Nicell J.* Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. — 2000. — Vol. 16, № 4. — P. 533–540.
10. *Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E.* Multicopper oxidases and oxygenases // Chem. Rev. — 1996. — Vol. 96, № 6. — P. 2563–2605.
11. *Stark G.R., Dawson C.R.* Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide // Anal. Chem. — 1958. — V. 30, № 2. — P. 191–194.

УДК 665.58.002.39 (088.8)

И.И. Романовская, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов

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

УДАЛЕНИЕ ФЕНОЛА ИЗ МОРСКОЙ ВОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ТИРОЗИНАЗЫ ГРИБОВ *AGARICUS BISPORUS*

Реферат

С помощью выделенной свободной и иммобилизованной тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* осуществлено количественное удаление фенола из модельных растворов, приготовленных с использованием морской воды. Показано, что полученные биокатализаторы эффективно катализируют процесс окисления фенола (0,5–10 ммоль/дм³) с сохранением 85% активности по сравнению с таковой для буферных растворов, содержащих фенол. Олигомерные продукты окисления фенола удаляли с использованием неорганических коагулянтов с уменьшенной в 2,5 раза их концентрацией при применении иммобилизованного препарата тирозиназы.

Ключевые слова: тирозиназа, фенол, морская вода, иммобилизация, неорганические коагулянты.

UDC 665.58.002.39 (088.8)

I.I. Romanovska, Yu.A. Shesterenko, O.V. Sevastyanov

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

PHENOL REMOVAL FROM THE SEA WATER WITH USAGE OF FREE AND IMMOBILIZED *AGARICUS BISPORUS* MUSHROOMS TYROSINASE

Summary

With the help of isolated free and immobilized *Agaricus bisporus* mushrooms tyrosinase, the quantitative phenol removal from the model solutions, prepared using the sea water, was conducted. It was shown that obtained biocatalyst effectively catalyze the phenol oxidation process (0.5–10 mmol/dm³) with retaining of 85% activity, comparing with that for phenol-containing buffer solutions. The oligomeric products of phenol oxidation were removed using inorganic coagulants with 2.5-fold decreased their concentration in the case of immobilized tyrosinase application.

Key words: tyrosinase, phenol, the sea water, immobilization, inorganic coagulants.

Одержано 12.02.2011.



Д.І. Хом'як¹, Н.А. Гриценко¹, А.Д. Конон¹, Т.П. Пирог^{1,2}

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна
тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: khomdan@ukr.net, tapirog@nuft.edu.ua

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ДСП, Д03680, Україна

ВПЛИВ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ РОСТУ *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ГЛІЦЕРИНІ

Досліджено можливість інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Nocardia vaccinii* К-8 на гліцерині за присутності цитрату (регулятор синтезу ліпідів) і C_4 -дикарбонових кислот (фумарат – попередник глюконеогенезу). За спільного внесення органічних кислот на початку стаціонарної фази росту у концентрації 0,1% кількість синтезованих ПАР підвищувалася на 40–45% порівняно з культивуванням на середовищі без фумарату і цитрату. Внесення органічних кислот як у середовище для одержання посівного матеріалу, так і для біосинтезу ПАР не супроводжувалося підвищенням синтезу ПАР.

Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Nocardia vaccinii* К-8, гліцерин, цитрат, фумарат.

Поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження, до яких останнім часом прикута увага багатьох науковців, належать до класу амфіпатичних молекул, що складаються як з гідрофобної, так і гідрофільної частини і можуть взаємодіяти з поверхнями різних полярностей та знижувати поверхневий і міжфазний натяги розчинів [2, 10]. Також ПАР здатні сприяти емульгуванню, формуванню біоплівки, утворенню наночастинок, зв'язувати важкі метали, проявляти антимікробні та антиадгезивні властивості [10]. У попередніх дослідженнях було виділено штам нафтоокислювальних бактерій, ідентифікований як *Nocardia vaccinii* К-8 і показана його здатність синтезувати на гліцерині (відході виробництва біодизелю) метаболіти з поверхнево-активними і емульгувальними властивостями [2, 7]. Незважаючи на широкі перспективи використання у біотехнології представників роду *Nocardia*, у літературі недостатньо відомостей про синтез ними сполук саме з поверхнево-активними властивостями. Так, китайськими вченими було виділено штам *Nocardia* sp. L-417 – продуцент ПАР на середовищі з гексадеканом [9]. У нещодавніх роботах було встановлено можливість синтезу ПАР ліпопептидної приро-



ди *Nocardiosis alba* MSA10 [8] та гліколіпідної природи — *Nocardiosis lucentensis* MSA 04 [10]. Наші дослідження показали, що за хімічною природою ПАР *N. vaccinii* К-8 є сумішшю нейтральних, гліко- та аміноліпідів [7].

Попри різноманітні практичні властивості та переваги перед синтетичними аналогами промислове виробництво ПАР дотепер не реалізовано, а основними стримуючими факторами є високі витрати на біосинтез, виділення та очищення цільового продукту, а також недостатньо високий рівень їх синтезу, тому необхідним є пошук можливих шляхів інтенсифікації біосинтезу ПАР. Одним з таких підходів є внесення у середовище культивування екзогенних попередників, що специфічно залучаються до конструктивного метаболізму та підвищують синтез цільового продукту. Аналізуючи хімічний склад ПАР *N. vaccinii* К-8, ми припустили, що внесенням у середовище з гліцерином цитрату (регулятор синтезу ліпідів) та фумарату (попередник глюконеогенезу) можна підвищити вихід цільового продукту [4].

У зв'язку з цим мета даної роботи — дослідження можливості інтенсифікації біосинтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 на гліцерині за присутності органічних кислот.

Матеріали і методи

Культивування бактерій здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, рН 6,8–7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка) і $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001 г/л.

Як джерело вуглецю та енергії використовували гліцерин в концентрації 1,5% (об'ємна частка). Як посівний матеріал використовували культуру з експоненційної фази росту, вирощену на середовищі наведеного вище складу з 0,5% (об'ємна частка) гліцерину. Кількість посівного матеріалу (10^4 – 10^5 клітин/мл) становила 10% від об'єму середовища.

Як попередники біосинтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 використовували цитрат та фумарат натрію, які вносили у вигляді 10% розчинів у концентрації 0,01–0,5% (масова частка) на початку процесу культивування та на початку стаціонарної фази росту.

Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (300 об/хв) при 30 °С упродовж 168 год.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками:

- поверхневий натяг (σ_s) вільної від клітин культуральної рідини (КР), вимірювали на напівавтоматичному тензіометрі «Lauda TD 1C» (Німеччина);
- умовна концентрація ПАР (ПАР*, безрозмірні одиниці), визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого зростання поверхневого натягу на кривій залежності σ_s



від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину кривої відповідає значенню ПАР*;

- кількість синтезованих ПАР (г/л), визначали ваговим методом після екстракції поверхнево-активних ліпідів сумішшю Фолча (хлороформ — метанол 2:1) з супернатанту культуральної рідини. Одержаний екстракт випарювали до постійної маси на роторному випарникові ИР-1М2 (Росія) при температурі 55 °С та абсолютному тиску 0,4 атм. Для одержання супернатанту КР центрифугували при 5000 г упродовж 20 хв.

Усі досліди проводили в 3-х повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичне опрацювання експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у праці [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

У наших попередніх дослідженнях було показано, що внесення цитрату й фумарату у середовище культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 і *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 дозволило суттєво інтенсифікувати біосинтез ПАР: так за спільного внесення цитрату (0,1%) і фумарату (0,2%) спостерігали збільшення синтезу ПАР штамом ЕК-1 на 60% (до 6,5–7,0 г/л) [3, 4]. Для штаму К-4 оптимальні концентрації органічних кислот виявилися на порядок нижчими (по 0,01%). За таких умов вдалося підвищити рівень синтезу цільового продукту практично у три рази — на 195% [6].

У ході визначення оптимального моменту внесення попередників у середовище культивування *N. vassinii* К-8 було встановлено, що додавання як цитрату, так і фумарату (по 0,01–0,05%) на початку культивування не супроводжувалося інтенсифікацією біосинтезу ПАР, а навпаки, проявлявся ефект інгібування (зниження концентрації ПАР на 10–45%), пропорційний кількості внесених попередників. При додаванні цитрату і фумарату на початку стаціонарної фази росту штаму К-8 у концентраціях 0,05% синтез ПАР підвищувався на 10–15%.

На наступному етапі визначали оптимальні концентрації органічних кислот для максимальної інтенсифікації біосинтезу метаболітів з поверхнево-активними властивостями. Враховуючи встановлені раніше для *R. erythropolis* ЕК-1 і *A. calcoaceticus* К-4 концентрації фумарату і цитрату [6], було вирішено проаналізувати вплив органічних кислот у широкому діапазоні концентрацій (0,01–0,5%). Як видно із наведених у табл. 1 даних, оптимальною концентрацією цитрату для штаму К-8 є 0,1%. За таких умов синтез ПАР підвищувався на 36% (за даними вагового методу). Для фумарату найсуттєвіше підвищення синтезу (на 31%) спостерігалось у разі додавання останнього у концентрації 0,2%.

Таблиця 1

Залежність синтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 від концентрації цитрату і фумарату

Table 1

Dependence of the SAS synthesis of *N. vaccinii* К-8 on citrate and fumarate concentration

Попередник	Концентрація, %	ПАР*	ПАР*, % від контролю	Концентрація ПАР, г/л	Концентрація ПАР, % від контролю
без попередників		2,0±0,1	-	1,72±0,09	-
Цитрат	0,01	2,0±0,1	100	1,65±0,08	96
	0,03	2,1±0,1	105	1,78±0,09	104
	0,05	2,3±0,12	115	1,99±0,1	116
	0,1	2,3±0,12	115	2,35±0,12	137
	0,2	2,2±0,11	110	2,21±0,11	128
	0,3	2,5±0,13	125	2,17±0,11	124
	0,4	2,6±0,13	130	1,85±0,09	108
	0,5	2,4±0,12	120	2,01±0,1	117
Фумарат	0,01	1,9±0,1	95	1,65±0,08	96
	0,03	2,0±0,1	100	1,78±0,09	104
	0,05	2,2±0,11	110	2,00±0,1	116
	0,1	2,1±0,11	105	2,14±0,11	119
	0,2	2,1±0,11	105	2,26±0,11	131
	0,3	2,3±0,12	115	2,18±0,11	127
	0,4	2,5±0,13	125	2,12±0,11	124
	0,5	2,5±0,13	125	1,9±0,09	110
Цитрат + Фумарат	0,1 + 0,1	2,5±0,13	125	2,43±0,13	141
	0,1 + 0,2	2,5±0,13	125	2,41±0,12	140
	0,2 + 0,2	2,3±0,12	115	2,16±0,11	126

За спільного внесення цитрату (0,1%) та фумарату (0,1%) спостережали підвищення концентрації ПАР на 41% (табл. 1). Зі збільшенням концентрації фумарату (до 0,2%) кількість синтезованих ПАР практично не змінювалася (40%), а у разі підвищення концентрації цитрату до 0,2% синтез ПАР знижувався, що може свідчити про інгібування активності ферментів його надлишком.



Встановлено, що внесення органічних кислот у середовище для одержання посівного матеріалу супроводжувалося підвищенням концентрації біомаси, проте не ПАР (табл. 2.).

Стимулювальну дію цитрату натрію на синтез ПАР мікроорганізмами було встановлено ще у 80–90-х роках ХХ ст.; так при внесенні даної кислоти у середовище культивування *Bacillus subtilis* спостерігалось підвищення біосинтезу сурфактину із одночасним зниженням ізоцитрат-дегідрогеназної активності, що може свідчити про спрямованість потоку вуглецю субстрату на процеси конструктивного метаболізму, тобто на синтез ПАР. Для дріжджів *Torulopsis apicola* – продуцента поверхнево-активних гліколіпідів встановлено, що механізм дії цитрату натрію полягає у підтриманні значення рН на оптимальному для синтезу ПАР рівні за рахунок підлучення культуральної рідини в результаті транспорту цитрату симпортом з протоном, що й забезпечувало збільшення синтезу ПАР [6].

Оскільки ПАР *N. vaccinii* К-8 є комплексом нейтральних, аміно- і гліколіпідів [7], ми припустили, що як і для штаму *R. erythropolis* ЕК-1 [2] можна підвищити синтез поверхнево-активних речовин веденням у середовище фумарату і цитрату. Фумарат, як і інші С₄-дикарбонові кислоти, є попередником глюконеогенезу, що забезпечує синтез вуглеводів, а отже й гліколіпідів (трегалозоміколатів). Стимулюючий вплив пояснюють активуючим впливом цитрату на ензим ацетил-КоА-карбоксилазу, який каталізує перетворення ацетил-КоА на малоніл-КоА, що, у свою чергу, супроводжується підвищенням синтезу жирних кислот, а отже, й ПАР ліпідної природи [4].

Таблиця 2

Вплив способу одержання інокуляту на синтез поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* К-8

Table 2

Effect of inoculum preparation on the SAS synthesis of *N. vaccinii* К-8

Концентрація органічних кислот у середовищі, %		ПАР*	ПАР*, % від контролю	Концентрація ПАР, г/л	Концентрація ПАР, % від контролю	Біомаса, г/л
для одержання інокуляту	для біосинтезу					
0	0	2,0±0,1	-	1,72±0,09	-	1,0±0,05
0	цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	2,5±0,13	125	2,41±0,12	140	1,0±0,05
цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	0	1,8±0,09	90	1,65±0,08	96	1,3±0,07
цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	цитрат, 0,1 + фумарат, 0,2	2,3±0,12	115	2,10±0,11	122	1,4±0,07



Результати наших досліджень різняться також і від відомих літературних даних. По-перше, у літературі описано збільшення синтезу ПАР за наявності у середовищі тільки цитрату, який вносили на початку культивування [6]. По-друге, оптимальна концентрація цитрату при цьому становила 0,5–1,0%. За такої концентрації цитрат можна розглядати не як регулятор синтезу ліпідів, а як додатковий ростовий субстрат. По-третє, нам не вдалося знайти у літературі відомостей про підвищення синтезу ПАР за наявності як цитрату, так і C₄-дикарбонових кислот.

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що інтенсифікація біосинтезу ПАР *N. vaccinii* К-8 спостерігалася за умови внесення органічних кислот у середовище з гліцерином на початку стаціонарної фази росту. За спільного внесення 0,1% цитрату і 0,1% фумарату кількість синтезованих ПАР підвищувалася на 40–45%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
2. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 15–24.
3. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.О. Роль экзогенных поперечников в утворенні поверхнево-активных речовин під час культивування *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 на етанолі // Микробиол. журнал. — 2008. — Т. 70, № 6. — С. 11–18.
4. Пирог Т.П., Тарасенко Д.А. Влияние фумарата и цитрата на образование поверхностно-активных веществ штаммом *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 // Биотехнология. — 2008. — № 3. — С. 48–55.
5. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Грегирчак Н.М.. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т. 41, № 1. — С. 58–63.
6. Підгорський В.С. Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: «Наукова думка», 2010. — 327 с.
7. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. Оптимизация синтеза поверхностно-активных веществ *Nocardia vaccinii* К-8 при биоконверсии отходов производства биодизеля // Микробиол. журнал. — 2011. — Т. 73, № 4. — С. 15–24.
8. Gandhimathi R., Kiran G.S., Hema T.A., Selvin J. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardioopsis alba* MSA10 // Bioprocess Biosyst. Eng. — 2009. — Vol. 32. — P. 825–835.
9. Kim S.H., Lim E.J., Lee S.O., Lee J.D., Lee T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp.L-417 // Biotechnol. Appl. Biochem. — 2000. — Vol. 31. — P. 249–253.
10. Kiran G.S., Thomas T.A., Selvin J. Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardioopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation // Colloids Surf. B Biointerfaces. — 2010. — Vol. 78. — P. 8–16.



УДК 759.873.088.5:661.185

Д.И. Хомяк¹, Н.А. Гриценко¹, А.Д. Конон¹, Т.П. Пирог^{1,2}

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина,
тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: khomdan@ukr.net, tapirog@nuft.edu.ua

²Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА СИНТЕЗ ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ УСЛОВИИ РОСТА *NOCARDIA VACCINII* К-8 НА ГЛИЦЕРИНЕ

Реферат

Исследована возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Nocardia vaccinii* К-8 на глицерине в присутствии цитрата (регулятор синтеза липидов) и C₄-дикарбоновых кислот (фумарат — предшественник глюконеогенеза). При одновременном внесении органических кислот в начале стационарной фазы роста в концентрации 0,1% количество синтезированных ПАВ возрастало на 40–45% в сравнении с культивированием на среде без фумарата и цитрата. Внесение органических кислот как в среду для получения посевного материала, так и для биосинтеза ПАВ не сопровождалось увеличением синтеза ПАВ.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, *Nocardia vaccinii* К-8, глицерин, цитрат, фумарат.

UDK 759.873.088.5:661.185

D.I. Khomyak¹, N.A. Grycenko¹, A.D. Konon¹, T.P. Pirog^{1,2}

¹National University of Food Technologies,
68, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,
tel.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: khomdan@ukr.net, tapirog@nuft.edu.ua

²Institute of Microbiology and Virology NASU,
154, Academic Zabolotny str., Kyiv GSP, D 03680, Ukraine

INFLUENCE OF ORGANIC ACIDS ON THE SYNTHESIS OF SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES UNDER THE CONDITIONS OF GROWTH OF *NOCARDIA VACCINII* K-8 ON GLYCEROL

Summary

It was investigated the possibility of intensification of the synthesis of surface-active substances (SAS) of *Nocardia vaccinii* K-8 on glycerol in the presence of citrate (the lipid synthesis regulator) and C₄-bicarbonic



acids (fumarate – the precursor of gluconeogenesis). The simultaneous addition of organic acids in concentration of 0.1% at the beginning of stationary growth phase led to 40–45% increase of the SAS quantity in comparison to the growth on the medium without citrate and fumarate. The addition of **organic acids both into the medium appointed for preparing** of the inoculum and for biosynthesis of SAS didn't result in increase of SAS concentration.

Key words: surfactants, *Nocardia vaccinii* K-8, glycerol, citrate, fumarate.

Одержано 28.02.2012.



УДК 579.[22:811.41]:546.221.1

А.А. Галушка, М.Б. Горішний, О.Р. Кулачковський, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів,
79005, Україна, тел.: +38 (032) 239 43 57, e-mail: a_halushka@mail.ru

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИЙ АПАРАТ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8

*Досліджено вплив гідроген сульфїду на склад фотосинтезувальних пігментів і ультраструктуру клітин бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8. Встановлено, що підвищені концентрації H_2S спричиняють зниження вмісту бактеріохлорофілів і каротиноїдів у клітинах бактерій, втрату зв'язку хлоросом із цитоплазматичною мембраною та їхнє руйнування.*

*Ключові слова: *Chlorobium limicola*, фотосинтезувальний апарат, фотосинтезувальні пігменти, гідроген сульфїд.*

Гідроген сульфїд у великих кількостях утворюється сульфатвідновлювальними бактеріями в кар'єрних водоймах, що утворилися в місцях промислового видобування сірки, та є важливим чинником забруднення довкілля [7]. Ця сполука спричиняє різноманітні захворювання людей і тварин: запалення органів зору, порушення функціонування дихальної та нервової систем [13], а також викликає пригнічення росту та загибель мікроорганізмів [14], виявляє мутагенну та канцерогенну дію [3, 12].

Сірководокиснювальні хемолітотрофи використовують H_2S як джерело енергії [8], а фотосинтезувальні сіркові бактерії та ціанобактерії — як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [17], однак у підвищених концентраціях гідроген сульфїд пригнічує ріст цих бактерій [4].

Метою роботи було визначити зміни в пігментному складі фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* та структурі їхнього фотосинтезувального апарату за впливу підвищених концентрацій гідроген сульфїду.

Матеріали та методи

У дослідах використовували бактерії *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 [1].

Бактерії вирощували в середовищі GSB [17], до якого додавали 1 г/л натрій ацетату та 1 г/л натрій пірувату, оскільки раніше було показано, що ці речовини стимулюють ріст досліджуваних бактерій [4]. Культивування проводили в анаеробних умовах при температурі 30 °C за умов

© А.А. Галушка, М.Б. Горішний, О.Р. Кулачковський, С.П. Гудзь, 2012



постійного освітлення (червоний світлофільтр, 40 лк). Для створення анаеробних умов пробірки повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками.

Для дослідження впливу гідроген сульфід на склад пігментів у клітинах бактерій до тридобової культури, вирощеної в середовищі з оптимальною концентрацією H_2S (4 мМ) [4], додавали натрій сульфід у концентраціях 5, 6 та 7 мМ і продовжували культивування ще протягом 1 доби. Контролем слугувала чотиридобова культура, яку культивували без додаткового внесення Na_2S . Екстракцію та розділення пігментів здійснювали, як описано раніше [5]. Спектри поглинання отриманих екстрактів визначали на спектрофотометрі СФ-46.

Для дослідження ультраструктурних змін у клітинах бактерій їх вирощували протягом трьох діб і вносили натрій сульфід до концентрації 7 мМ. Через добу клітини двічі відмивали дистильованою водою, осаджували центрифугуванням при 15 000 g протягом 15 хв і фіксували в 1,5% розчині OsO_4 в какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0 °С. Фіксовані клітини зневоднювали в розчинах зі зростаючими концентраціями етанолу та пропілен оксиду й переносили в епоксидну смолу Embed-812. Ультратонкі зрізи клітин отримували на ультрамікроскопі УМТП–6 і контрастували плумбум цитратом за Рейнольдсом [18]. Перегляд і фотографування зразків здійснювали в електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Концентрацію гідроген сульфід визначали фотоелектроколориметрично [20] на КФК-3.

Усі досліди проводили в трикратній повторності. Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням програми «Origin 6.1». Результати представлені як середнє значення з поправкою на стандартну похибку ($M \pm m$). Достовірність даних та різниці між ними оцінювали за коефіцієнтом Стьюдента при рівні достовірності $P < 0,05$ [6].

Результати та їх обговорення

Відомо [4], що оптимальною концентрацією гідроген сульфід для росту бактерій *C. limicola* ІМВ-К-8 є 4 мМ. Збільшення концентрації цієї сполуки призводить до сповільнення росту, а за наявності в середовищі 6 мМ H_2S ріст бактерій інгібується повністю.

У бактерій *C. limicola* описані чотири основні фотосинтезувальні пігменти: бактеріохлорофіли *c* та *d* й каротиноїди ізоренієратин і хлоробактин [5]. У реакційному центрі та в складі пластинки, що з'єднує хлоросоми з цитоплазматичною мембраною, у невеликих кількостях виявлений бактеріохлорофіл *a* [17, 2].

Екстракти з клітин *C. limicola*, не оброблених гідроген сульфідом (контроль), мали максимуми поглинання при 421, 630, 665 та 765–767 нм (рис. 1). Перший максимум (421 нм) відповідає бактеріохлорофілу *d*, але може доповнюватися максимумами поглинання бактеріохлорофілу *c*



та хлоробактину. Другий — це один із максимумів бактеріохлорофілу *c*. 665 нм перебуває між близько розміщеними максимумами поглинання бактеріохлорофілів *c* та *d*, а 765–767 нм близький до основного максимуму поглинання бактеріохлорофілу *a* — 773 нм [10]. Цей максимум поглинання виражений слабо.

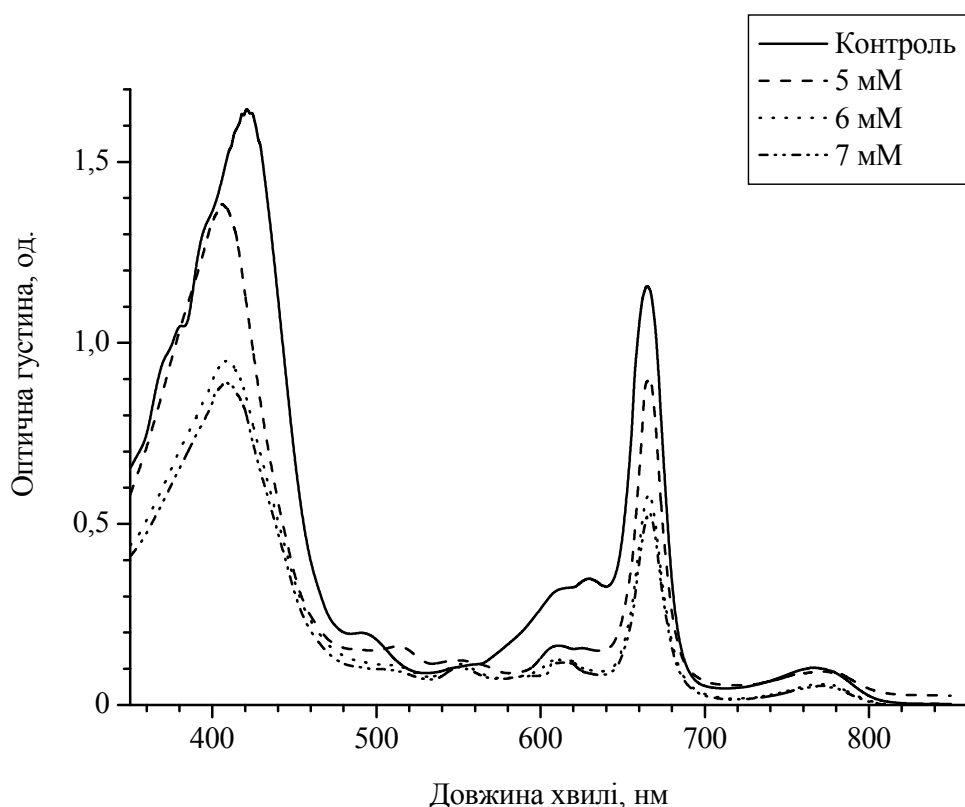


Рис. 1. Спектри поглинання світла екстрактами з клітин бактерій *C. limicola* IMV K-8 за наявності в середовищі різних концентрацій гідроген сульфїду (біомаса — 0,32 мг/мл, оптичний шлях — 1 см)

Fig. 1. Light absorption spectra by *C. limicola* IMV K-8 cells extracts (0.32 mg of cells/ml, optical length — 1 cm) at the presence of different hydrogen sulfide concentrations

Для дослідження вмісту різних пігментів за дії підвищених концентрацій гідроген сульфїду спочатку екстрагували пігменти з клітин, на яких діяли гідроген сульфїдом концентрацією 5–7 мМ протягом однієї доби. Їхні спектри поглинання світла при довжинах хвиль 350–850 нм представлені на рис. 1. Аналіз досліду показав, що гідроген сульфїд спричиняє зниження загальної оптичної густини екстрактів і зміщення максимуму поглинання в області 421 нм у більш короткохвильову зону (406–408 нм).

Таким чином, максимум поглинання при 421 нм може бути сумою максимумів поглинання щонайменше трьох пігментів, тому його зміщення під дією гідроген сульфїду може свідчити або про хїмічну модифїкацію пігментів [11], або про зміну їхнього кількісного співвідношення.

На наступному етапі роботи дослідили кількісні зміни фотосинтезувальних пігментів за умов впливу H_2S . Для цього проводили розділення пігментів методом тонкошарової хроматографії [5].

Результати аналізу кількісного складу пігментів після їхньої елюції з хроматограм показали, що гідроген сульфїд спричиняє зниження концентрації як бактеріохлорофілів, так і каротиноїдів у клітинах. При цьому концентрація бактеріохлорофілів знижується в 2,3 разу порівняно з контролем вже за концентрації H_2S 5 мМ. Подальше зростання концентрації гідроген сульфїду суттєво не впливає на вміст бактеріохлорофілів. Концентрація каротиноїдів за наявності 5–6 мМ гідроген сульфїду зменшується поступово (рис. 2).

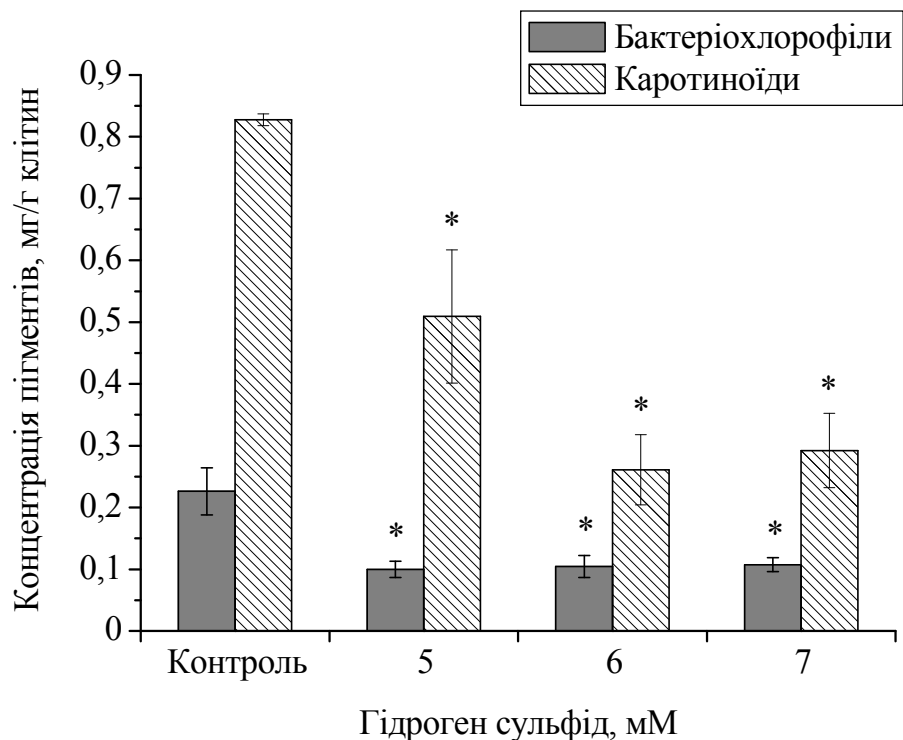


Рис. 2. Вміст бактеріохлорофілів і каротиноїдів у клітинах *C. limicola* IMV K-8 після додаткового внесення різних концентрацій гідроген сульфїду.

* — результати, достовірно відмінні від контролю

Fig. 2. Bacteriochlorophylls and carotenoids content in the cells of *C. limicola* IMV K-8 after the addition of different hydrogen sulfide concentrations.

* — reliably different from the control results

Оскільки бактеріохлорофіли містять у своєму складі атом магнію [8], зниження їхньої концентрації може бути пов'язане з безпосередньою взаємодією металу з гідроген сульфідом [9]. Відомо, що гідроген сульфід інгібує активність металовмісних ферментів [13]. Отже, зниження вмісту бактеріохлорофілів може бути пов'язане з пониженням активності порфобіліногенсинтетази (КФ 4.2.1.24), яка містить цинк і активується магнієм [15], і протохлорофілредуктази (КФ 1.3.1.33), у складі якої виявлений Ферум [17]. Зниження вмісту каротиноїдів можна пов'язати з активністю ферменту 4-гідрокси-3-метилбутил-2-енілдіфосфатредуктази (КФ 1.17.1.2), який містить ферум [19] і також, можливо, інгібується гідроген сульфідом [13].

Електронномікроскопічні дослідження клітин бактерій *C. limicola*, оброблених підвищеними концентраціями H_2S , показали, що наявність гідроген сульфід у середовищі викликає помітні зміни в структурі фотосинтезувального апарату. Зокрема, за концентрації цієї сполуки 7 мМ спостерігається відділення хлоросом від цитоплазматичної мембрани та зменшення їхньої кількості (рис. 3). Очевидно, після відділення від цитоплазматичної мембрани вони деградують.

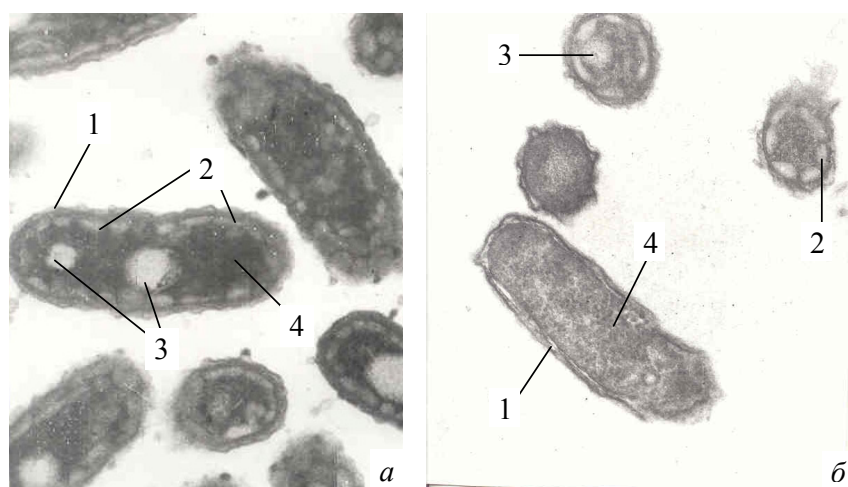


Рис. 3. Вплив гідроген сульфід на ультраструктуру клітин *C. limicola* IMV K-8:
***a* – контроль, *б* – 7 мМ ($\times 12\ 000$).**

1 – клітинна стінка, 2 – хлоросоми, 3 – включення глікогену, 4 – цитоплазма

Fig. 3. Influence of hydrogen sulfide on *C. limicola* IMV K-8 cell ultrastructure:
***a* – control, *b* – 7 mM ($\times 12\ 000$).**

1 – cell wall, 2 – chlorosomes, 3 – glycogen incorporations, 4 – cytoplasm

Таким чином, результатами досліджень показано, що гідроген сульфід пригнічує синтез фотосинтезувальних пігментів і порушує структуру й функції фотосинтезувального апарату зелених сіркових бактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баран І.М., Кім Л.Я., Коструба М.Ф., Подопрігора О.І., Клім І.Р., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Сіркобактерії водойм Яворівського родовища та Стебницького державного гірничо-хімічного підприємства «Полімінерал» // Біорізноманіття. Екологія. Еволюція. Адаптація: ювілейна наук. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, присвячена 180-річчю з дня народження Л.С. Ценковського (Одеса, березень – квітень 2003 р.): тези доп. – Одеса, 2003. – С. 11.
2. Баран І., Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Систематичне положення, фізіолого-біохімічні властивості та екологія зелених фототрофних бактерій // Вісн. Львівського ун-ту. Серія біол. – 2007. – в. 43. – С. 48–60.
3. Галушка А.А., Перетятко Т.Б., Гудзь С.П. Вплив сірководню на *Saccharomyces cerevisiae* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – № 3. – С. 49–57.
4. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: дис. на здобуття наук. ступеня кандидата біол. наук. Львів, 2008. – 130 с.
5. Горішний М., Гудзь С. Фотосинтезувальні пігменти *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Вісн. Львівського ун-ту. Серія біол. – 2009. – в. 50. – С. 95–100.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
7. Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С. Сульфатвідновлювальні бактерії Яворівського сіркового родовища // Мікробіологічний журнал. – 2006. – 68, № 5. – С. 84–91.
8. Современная микробиология. Прокариоты: в 2-х т. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля; пер. с англ. – М.: Мир, 2005. – Т. 1. – 656 с.
9. Химическая энциклопедия: в 5 т. / Под ред. Зефирова Н.С. – М.: Большая Российская энциклопедия, 1995. – Т. 4. – 639 с.
10. Хлорофиллы [Электронный ресурс] // Химик: сайт о химии. – Усл. доступа: <http://www.ximuk.ru/encyklopedia/2/5058.html>.
11. Frigaard N.-U., Larsen K.L., Cox R.P. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs // FEMS microbiol. ecol. – 1996. – v. 20. – P. 69–77.
12. Huysckе M.M., Gaskins H.R. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models // Exp. biol. med. – 2004. – v. 229. – P. 586–597.
13. Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource] / World health organization: Cicads 53. – Geneva, 2003. – Online article available at: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
14. Kuster E., Dorush F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna* // Env. toxicol.chem. – 2005. – 24, № 10. – P. 2621–2629.



15. Mitchell L.W., Jaffe E.K. Porphobilinogen synthase from *Escherichia coli* is a Zn(II) metalloenzyme stimulated by Mg(II) // Arch. biochem. biophys. — 1993. — 300, № 1. — P. 169–177.

16. Nomata J., Ogawa T., Kitashima M., Inoue K, Fujita Y. NB-protein (BchN-BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters // FEBS letters. — 2008. — 582, № 9. — P. 1346–1350.

17. Overmann J. The family *Chlorobiaceae* [Electronic resource]// The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community / M.Dworkin et al. — 3rd ed. — New York: Springer-Verlag, 2000. — Online article available at: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>

18. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // Journ.cell. biol. — 1963. — v. 17. — P. 208–212.19. Wolff M., Seemann M., Tse Sum Bui B., Frapart Y., Tritsch D., Garcia Estrabot A., Rodriguez-Concepcion M., Boronat A., Marquet A., Rohmer M. Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphatereductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein // FEBS letters. — 2003. — 541, № 1–3. — P. 115–120.

20. Pat. 6,340,596 B1 USA, Int. Cl. G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Sugiyama M.; assignee Fujirebio Inc. — № 09/248,316; fil. 02.11.1999; date of pat. 22.01.2002.

УДК 579.[22:811.41]:546.221.1

А.А. Галушка, М.Б. Горишный, О.Р. Кулачковский, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел. +38 (032) 239 43 57, e-mail: a_halushka@mail.ru

ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЙ АППАРАТ БАКТЕРИЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ИМВ К-8

Реферат

Исследовано влияние сероводорода на состав фотосинтезирующих пигментов и ультраструктуру клеток бактерий *Chlorobium limicola* ИМВ К-8. Установлено, что H₂S в концентрациях 5–7 мМ вызывает уменьшение общей оптической плотности экстрактов пигментов и смещение максимума поглощения при 421 нм в более коротковолновую зону (406–408 нм).



Результаты количественного анализа пигментов после их разделения методом тонкослойной хроматографии показали, что в концентрации 5 мМ сероводород вызывает понижение содержания бактериохлорофиллов в клетках бактерий в 2,3 раза по сравнению с контролем. При концентрациях этого соединения 5–6 мМ наблюдается постепенное уменьшение концентрации каротиноидов.

В концентрации 7 мМ H₂S вызывает отделение хлоросом от цитоплазматической мембраны и уменьшение их количества. По-видимому, после отделения от мембраны они деградируют.

Ключевые слова: *Chlorobium limicola*, фотосинтезирующий аппарат, фотосинтезирующие пигменты, сероводород.

УДК 579.[22:811.41]:546.221.1

A.A. Halushka, M.B. Gorishny, O.R. Kulachkovsky, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevsky str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +38 (032) 239 43 57, e-mail: a_halushka@mail.ru

INFLUENCE OF HYDROGEN SULFIDE ON THE PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMV K-8

Summary

Influence of hydrogen sulfide on *Chlorobium limicola* IMB K-8 photosynthetic pigments composition and cells ultrastructure is studied. H₂S at concentrations 5–7 мМ causes the decrease of pigments extracts optical density and absorption maximum at 421 nm transition to lower wavelength (406–408 nm). The results of pigments quantitative analysis after their separation by thin-layer chromatography have shown that at concentration 5 мМ hydrogen sulfide causes 2.3 times decrease of bacteriochlorophylls content in bacterial cells, compared to control. The decrease of carotenoids content at this compound concentrations 5–6 мМ is observed.

At concentration 7 мМ H₂S causes the disconnection of chlorosomes from cytoplasm membrane and the decrease of their quantity. Probably, chlorosomes degrade after the disconnection from membrane.

Key words: *Chlorobium limicola*, photosynthetic apparatus, photosynthetic pigments, hydrogen sulfide.

Одержано 26.01.2012.



Т.А. Круподьорова, В.Ю. Барштейн

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

АЛЬТЕРНАТИВНІ СУБСТРАТИ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ТА ЇСТІВНИХ ГРИБІВ

*Досліджена здатність деяких видів лікарських та їстівних грибів з різних систематичних та екологічних груп біотрансформувати відходи харчової промисловості (биту вермішель, відхід борошномельного виробництва – крупку, відхід кондитерського виробництва – какаоделу) та рослинництва – відходи CO₂-екстракції (шпроти з *Echinopsa purpurea* (L.) Moench, *Nimulus lupulus* L., *Amaranthus caudatus* L.). За показником накопичення біомаси визначені перспективні альтернативні субстрати для культивування 17 досліджених видів грибів.*

Ключові слова: гриби, культивування, відходи харчової промисловості, відходи рослинництва.

Наявність багатьох біологічно активних речовин в грибах відділу Basidiomycota та Ascomycota обумовлює виробництво, на їх основі, рядом фірм (переважно зарубіжних) нутрицевтиків, біологічно активних добавок, функціональних харчових продуктів, дієтичних добавок, профілактично-лікувальних та косметичних препаратів [14]. Основою для створення вищезазначеної продукції є плодові тіла, міцелій або культуральна рідина. Використання плодових тіл викликає деякі труднощі: обмеження збору в природі внаслідок погіршення екологічної ситуації та скорочення площ природних лісів; необхідність додаткового оброблення ґрунту та приміщення; витрати ресурсів (вода, електрична енергія), тривалість процесу вирощування (від 3 місяців). Тому, останнім часом перспективним напрямом вважається глибинне та поверхнєве культивування грибів. В той же час, наявність біологічно активних речовин у плодових тілах грибів суттєво не відрізняється від такої у міцелію грибів (при значно менших витратах ресурсів) [3].

З точки зору економіки та охорони навколишнього середовища інтерес дослідників викликає використання для вирощування міцелію грибів відходів харчової промисловості та рослинництва.

Встановлена висока ефективність застосування для промислового вирощування міцелію вищих грибів залишків переробки цукрового буря-



ку — меляси (з 32 видів вищих базидіоміцетів здатність до її засвоєння виявили 15) [3, 4, 10]. Дешевим та перспективним субстратом для росту підстилкових, сапротрофних та корпотрофних видів грибів вважають різні продукти переробки картоплі: очистки, нестандартну картоплю, клітинний сік, тощо [3, 4, 10], для деяких ксилотрофних видів — крохмальну крупку (відход виробництва крохмалю) [8]. Певні позитивні результати отримано вченими з використання відходів молочної промисловості — молочної сироватки для вирощування базидіальних ксилотрофів [3, 4, 7, 8, 10, 12]. Цікаві показники синтезу біомаси грибами отримано на виноградних, яблуневих вичавках, коньячній та післяспиртовій барді [3, 5] та на депротейнізованих екстрактах трав [3].

Для інтенсивного культивування грибів з решток сільського господарства використовувались: солома злаків, листя бананів, «шкарлупа» кокосових горіхів та шкірочка ананасів, відходи виробництва бавовни, вівсяні висівки, подрібнені стрижні кукурудзи, залишки переробки кави та цукрового очерету, відходи чаю, лушпиння соняшникового насіння [9, 11].

Зважаючи на значне видове різноманіття грибів та широкий спектр відходів харчової промисловості та рослинництва пошук нових субстратів і проведення скринінгу видів грибів здатних їх утилізувати залишається доцільним і актуальним.

Мета нашої роботи — пошук альтернативних субстратів на основі відходів харчової промисловості та рослинництва та скринінг видів лікарських та їстівних грибів з різних систематичних та екологічних груп, здатних біотрансформувати вибрані субстрати.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були штами їстівних та лікарських грибів з різних систематичних та екологічних груп з колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [6]: ксилотрофи — *Flammulina velutipes* (Curt.:Fr.) Sing. 600, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. 453, *Schizophyllum commune* Fr. 1768, *Griifola frondosa* (Dicks.) S.F. Gray 976, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1701, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. 1900, *Fomes fomentarius* (Fr.) Gill. 355, *Phellinus igniarius* (Fr.) Quel. 298, *Inonotus obliquus* (Pers.) Pilat. 1877, *Trametes versicolor* (L.) Quel. 353, *Hericiium erinaceum* (Bull.) Pers. 970, *Piptoporus betulinus* (Bull.) P. Kast. 327, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. 355, *Laetiporus sulfureus* (Bull.) Murrill 352; ентомофіли — *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 1928, *Cordyceps militaris* (L.) Link. 207; гумусовий сапротроф — *Coprinus comatus* (O.F.Myll.) Pers. 137.

Субстратами для поверхневого культивування досліджуваних видів грибів були відходи харчової промисловості України: бита вермішель та відхід борошномельного виробництва (надалі крупка) ВАТ «Київська макаронна фабрика» (надалі — «КМФ»), какаоелла та відходи рослинництва — побічні продукти CO₂-екстракції: CO₂-шрот амаранту *Amaranthus*



caudatus L. (сорт Геліос), CO₂-шрот ехінацеї *Echinacea purpurea* (L.) Moench, CO₂-шрот хмелю *Humulus lupulus* L. (дослідне виробництво Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» та ПМКФ «Ганоль» (м. Кіровоград). Субстрати використовували у кількості 60 г на 1 літр дистильованої води. Субстрат стерилізували в автоклаві у колбах об'ємом 0,25 л чи мікробіологічних матрацах 40 хв. при 1 атм.

Після стерилізації субстрат інокулювали міцелієм досліджуваних видів грибів, що був попередньо вирощений на чашках Петри з глюкозо-пептон-дріжджовим середовищем (г/л): глюкоза — 25,0; пептон — 3,0; дріжджовий екстракт — 2,0; KН₂РО₄ — 1,0; К₂НРО₄ — 1,0; MgSO₄ · 7 Н₂O — 0,25. Інокульовані субстрати інкубували у термостаті при температурі 26–28 °С 14 діб.

Ріст грибів оцінювали за абсолютно сухою масою міцелію, який відфільтровували і висушували при 105 °С до постійної ваги з подальшим зважуванням на аналітичних терезах. Критерієм первинного відбору і оцінки перспективності культивування грибів на різних субстратах обрано кількість синтезованої грибами біомаси [4].

Повторність дослідів трикратна, результати експериментів оброблено методами математичної статистики з використанням програм статистичного аналізу Microsoft Office Excel, різницю між середніми величинами вважали достовірною за $P < 0,05$ [1].

Результати та обговорення

Вдалим субстратом, сприятливим для росту грибів, виявилась біта вермішель «КМФ» (рис. 1), об'єми якої при виробництві нормальної вермішелі становлять близько 5 т на місяць. Активним деструктором бітої вермішелі був ксилотроф *S. commune*. Слід відзначити, що на цьому живильному субстраті добре росли ще 6 видів грибів з різних екологічних груп: ксилотрофи (*F. velutipes*, *F. fomentarius*, *L. edodes*), ентомофільні гриби (*C. sinensis*, *C. militaris*) та гумусовий сапротроф (*C. comatus*). Близькі види грибів — *G. lucidum* і *G. applanatum*, *C. sinensis* та *C. militaris* характеризувались подібними показниками синтезу біомаси. Особливий інтерес викликав ріст *L. edodes* (17,7 г/л), який відомий своєю примхливістю та вибагливістю до субстратів.

За результатами проведених досліджень найкращим субстратом для вирощування досліджуваних видів грибів слід вважати крупку (об'єм на виробництві «КМФ» досягає 3–5 т на місяць), на якій отримано максимальні показники росту для більшості видів грибів (рис. 1). Основну частину крупки становить крохмаль (з масовою часткою 56–70%), який є оптимальним джерелом вуглецевого живлення для багатьох видів базидіоміцетів [4, 10]. Подібність за складом двох субстратів обумовила гарний ріст деяких грибів на бітій вермішелі і активний їх ріст на крупці (рис. 1). Адже, зі зменшенням розміру частинок, збільшується питома



поверхня, яка є доступною для грибів, й швидкість засвоєння субстрату відповідно зростає.

Слід відмітити, що біомаса *H. erinaceum* виросла у 2,4 разу, біомаса *I. obliquus* — у 1,8 разу, а біомаси *C. sinensis* та *G. lucidum* — у 1,7 разу. Збільшилась також з 7 до 12 кількість видів грибів, що утворювали біомасу понад 15 г/л. Найкраще на крупці продукував біомасу *S. commune*. Майже однакову кількість міцеліальної маси синтезовано різними видами ксилотрофів — *G. lucidum* (25,6 г/л) та *F. velutipes* (25,4 г/л). Показники накопичення біомаси близьких видів грибів — *G. lucidum* і *G. applanatum*, *C. sinensis* та *C. militaris* дещо відрізнялись (рис. 1).

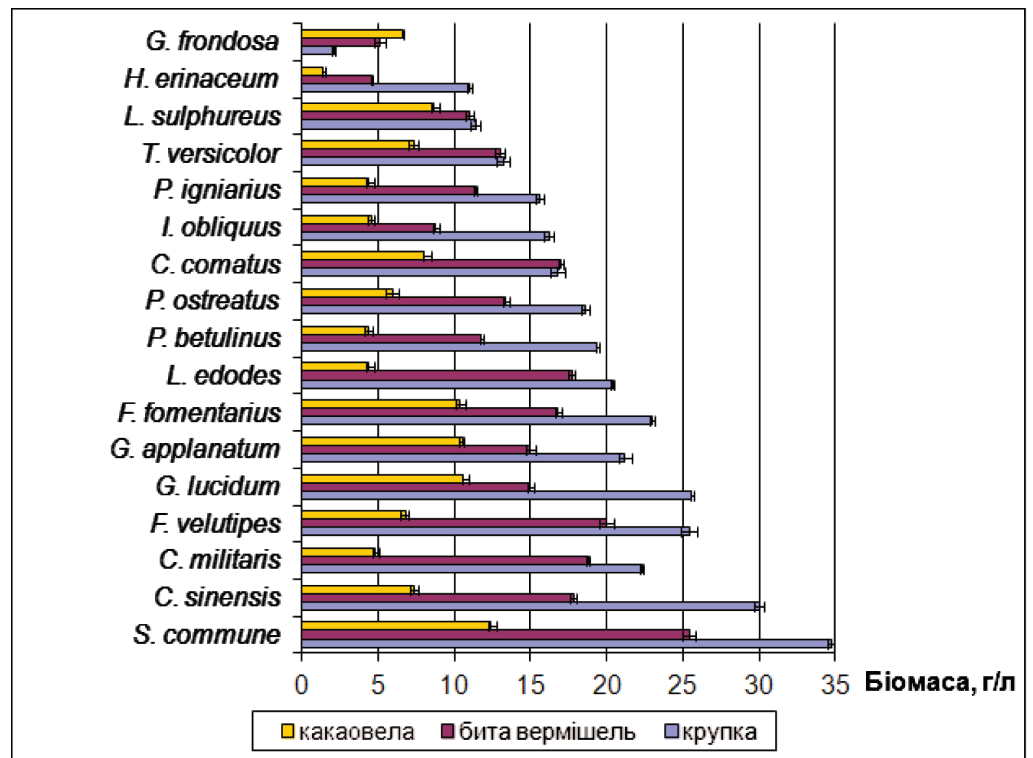


Рис. 1. Накопичення біомаси при вирощуванні грибів на відходах харчової промисловості

Fig. 1. Mushrooms biomass accumulation in the process of cultivation on the food industry waste

Гіршим субстратом для культивування досліджених видів грибів була какао-вела. На даному субстраті гриби росли досить повільно, про що свідчить кількість синтезованої ними міцеліальної маси — від 1,4 до 12,4 г/л (рис. 1). Дані показники росту можуть бути обумовлені обмеженим спектром вуглеводів (крохмалем) у складі такого субстрату. Найкраще ріс дереворуйнівний гриб *S. commune*. Майже однакову кількість біомасу продукували різні види: *G. lucidum* і *F. fomentarius*, *C. sinensis*

і *T. versicolor*, *I. obliquus*, *P. betulinus* і *P. igniarius*. Проте, близькі види грибів — *G. lucidum* і *G. applanatum*, так саме як *C. sinensis* та *C. militaris* утворювали досить різну кількість біомаси.

Значний інтерес викликає утилізація побічного продукту CO₂-екстракції — шротів, адже даний продукт є екологічно безпечним і корисним з точки зору наявності біологічно активних сполук [2]. Нашу увагу привернув CO₂-шрот ехінацеї *Echinacea purpurea* L. (Moench). За показником утворення максимальної кількості біомаси грибами, найліпшим субстратом для культивування *P. ostreatus* (19,6 г/л), виявилась *E. purpurea* (рис. 2), що обумовлено багатим складом субстрату [2]. Деякі види клисотрофних грибів утворювали однакову кількість міцелію: *G. frondosa* (14,0 г/л), *F. velutipes* (13,8 г/л), *S. commune* (13,8 г/л) та *F. fomentarius* (13,4 г/л). Дещо меншу кількість міцеліальної маси (6,6–7,4 г/л) на даному субстраті на одному кількісному рівні синтезували 7 видів грибів, з яких 2 вида — це ентомофільні гриби, 1 — гумусовий сапротроф і 4 — ксилотрофа. Близькі види грибів — *C. sinensis* та *C. militaris* на відміну від *G. lucidum* і *G. applanatum*, характеризувались подібними показниками синтезу біомаси.

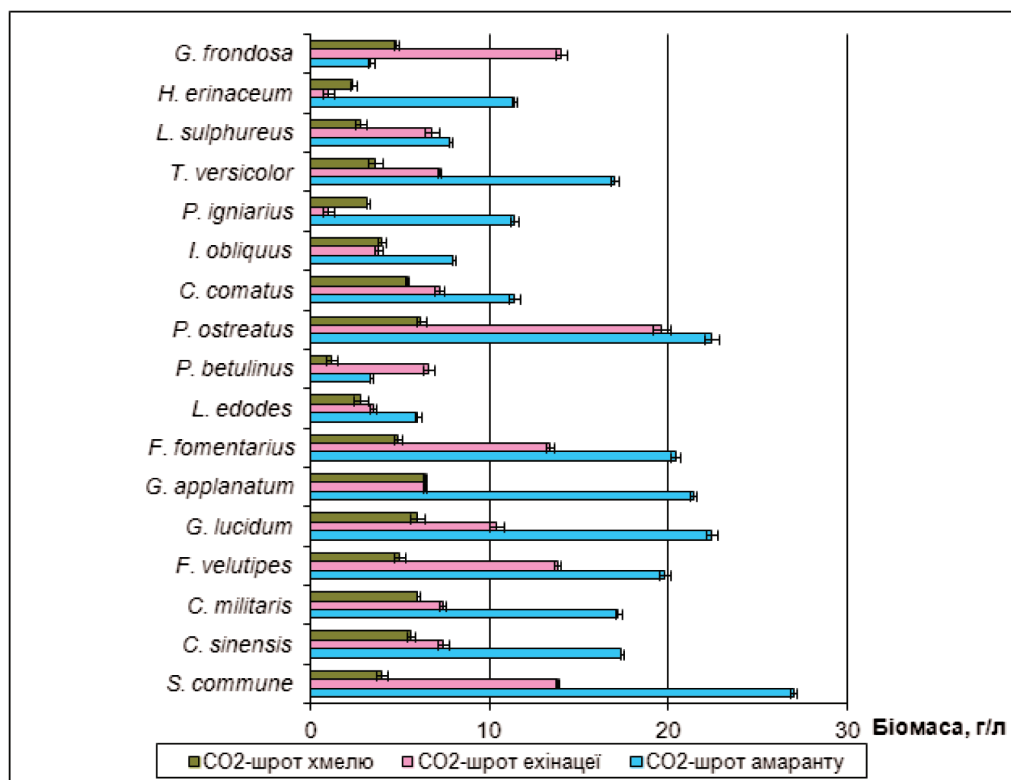


Рис. 2. Накопичення біомаси при вирощуванні грибів на відходах рослинництва
 Fig. 2. Mushrooms biomass accumulation in the process of cultivation on plant growing waste

В процесі вуглекислотної екстракції шишок хмелю вилучаються не всі біологічно активні речовини. В CO_2 -шроті залишаються поліфенольні сполуки, мінеральні речовини, органічні кислоти, а також частина гірких кислот, ефірних масел та амінокислоти [2]. Проте всі досліджені нами види грибів синтезували досить незначну кількість біомаси на CO_2 -шроті хмелю *Humulus lupulus* L. (рис. 2). Близькі види грибів — *G. lucidum* і *G. applanatum*, *C. sinensis* та *C. militaris* утворювали однакову кількість біомаси.

Потенційними субстратами для культивування грибів є продукти переробки насіння амаранта (борошно, шрот, висівки), які мають багатий хімічний склад [13]. Дослідження росту 17 видів їстівних та лікарських видів грибів на поживному середовищі з CO_2 -шроту амаранту свідчать про те, що на цьому середовищі значну кількість біомаси (понад 15 г/л) синтезували ксилотрофні види *S. commune*, *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *G. applanatum*, *F. fomentarius*, *F. velutipes*, *T. versicolor* та ентомофільні гриби *C. sinensis*, *C. militaris* (рис. 2). Однакові показники росту на рівні 11,4 г/л встановлено для гумусового сапротрофу — *C. comatus* і двох ксилотрофів — *H. erinaceum* *P. igniarius*. Близькі види грибів — *G. lucidum* і *G. applanatum*, *C. sinensis* та *C. militaris* мали аналогічні показники росту.

Ефективність використання альтернативних субстратів для культивування грибів встановлювали у порівнянні з результатами росту на найбільш вживаному для культивування більшості видів грибів комерційному субстраті — глюкозо-пептон-дріжджовому середовищі (ГПД) (рис. 3) і з урахуванням продуктивності продуцента біомаси не менше 10 г/л за умов первинного відбору при поверхневому його культивуванні.

За результатами проведених експериментів для 17 досліджених видів грибів підібрано перспективні альтернативні субстрати для їх культивування. Слід виділити два види грибів, які активно росли на 4 субстратах *F. velutipes* (тут та надалі — в порядку зменшення біомаси, або рівності цього показника: крупка>бита вермішель>шрот амаранту>шрот ехінацеї) та *P. ostreatus* (шрот амаранту>шрот ехінацеї>крупка>бита вермішель). Більшість грибів з різною інтенсивністю утилізували 3 субстрати: *C. sinensis*, *C. militaris*, *I. obliquus* (крупка > бита вермішель > шрот амаранту), *G. lucidum*, *S. commune*, *F. fomentarius* (крупка > шрот амаранту > бита вермішель), *C. comatus* (крупка = бита вермішель > шрот амаранту), *P. igniarius* (крупка > бита вермішель = шрот амаранту), *G. applanatum* (шрот амаранту = крупка > бита вермішель), *T. versicolor* (шрот амаранту > крупка = бита вермішель). Ксилотрофні види *L. edodes*, *P. betulinus*, *L. sulphureus* добре накопичували біомасу як на борошні, так і на вермішелі, а *H. erinaceum* — на борошні та шроті амаранту. Найбільш вибагливим до субстрату був вважаємо *G. frondosa*, який мав кращі показники росту лише на шроті ехінацеї ніж на глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі. Відзначимо, що для культивування більшості видів грибів бита вермішель, крупка та CO_2 -шрот амаранту є



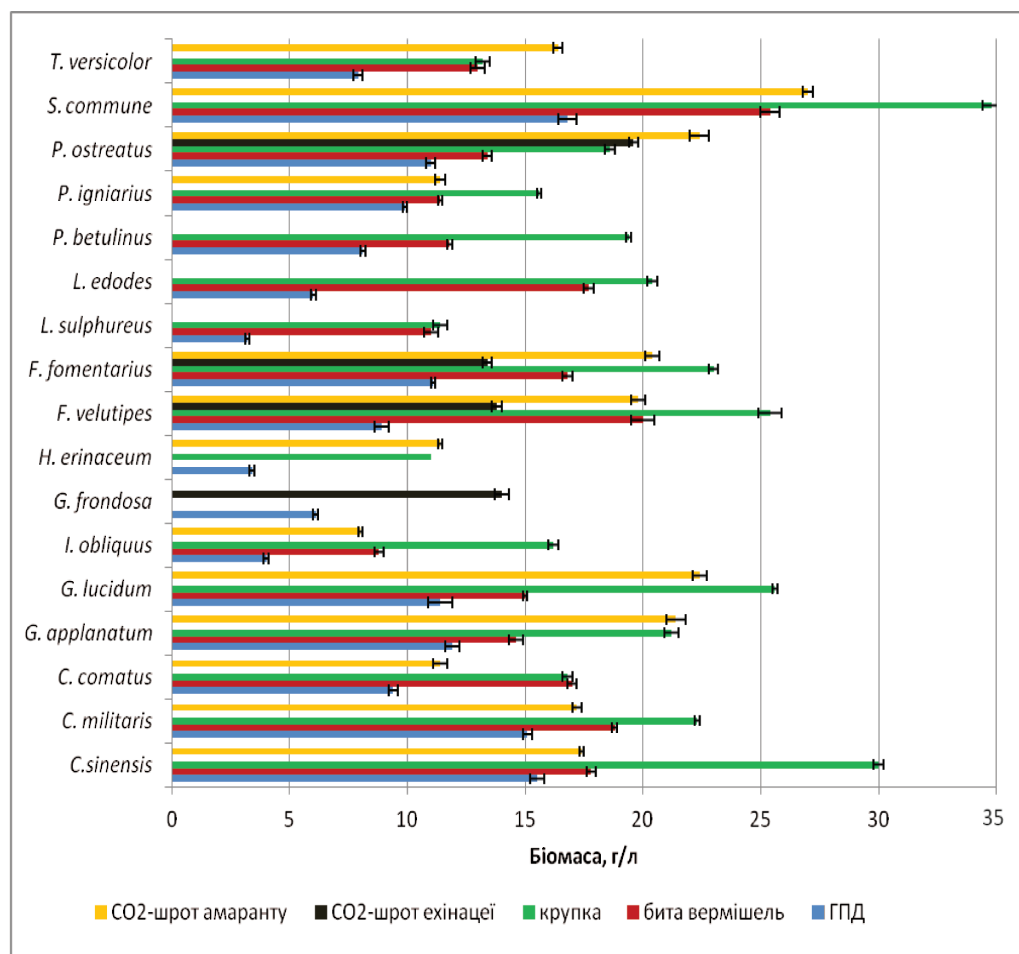


Рис. 3. Порівняльна характеристика ефективності використання субстратів різними видами грибів

Fig. 3. Comparative analysis of the efficiency of substrates use by different mushrooms species

перспективними альтернативними субстратами. За показником накопичення міцеліальної маси, на наш погляд, необхідно продовжити вивчати особливості росту та синтезу метаболітів *S. commune*, *C. sinensis*, *G. lucidum* та *F. velutipes* на крупці «КМФ» та *S. commune*, *G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. ostreatus* та *F. velutipes* на CO₂-шроті амаранту.

Таким чином, всі досліджені види грибів росли з різною інтенсивністю на обраних відходах харчової промисловості та рослинництва. Для 17 досліджених видів грибів підбрано перспективні альтернативні субстрати для їх культивування. Для вирощування більшості видів грибів доцільно використовувати відходи макаронного виробництва — бити вермішель, відхід борошномельного виробництва — крупку та відхід рослинництва — CO₂-шрот амаранту.

Найбільш невибагливими грибами, здатними добре рости на більшості досліджених субстратів слід вважати *F. velutipes* та *P. ostreatus*, найбільш вибагливим до якості субстратів — *G. frondosa*. Активним деструктором субстратів з максимальною кількістю синтезованої біомаси є ксилотрофний гриб *S. commune*. Близькі види грибів — *G. lucidum* і *G. applanatum*, *C. sinensis* та *C. militaris* мали аналогічні показники росту на битій вермішелі і CO₂-шротах.

Утилізація відходів харчової промисловості та рослинництва за допомогою грибів дозволяє вирішити два завдання: використати біологічно активні речовини, що залишаються у відходах та зменшити забруднення оточуючого середовища.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антономов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. — К.: ФМД, 2006. — 558 с.
2. Барштейн В.Ю. Современные экстракционные технологии и создание функциональных продуктов // Вісник Національного технічного університету «ХПІ». Збірник наукових праць. Тематичний випуск: Нові рішення в сучасних технологіях. — Харків: НТУ «ХПІ». — 2008. — № 43. — С. 36–42.
3. Бисько Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько, А.С. Бухало, С.П. Вассер. — К.: Наукова думка, 1983. — 312 с.
4. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. — К.: Наук. думка, 1988. — 144 с.
5. Єжов В.М. Біотехнологічні основи виробництва білка і пектину з відходів переробки плодів та винограду / В.М. Єжов, Г.Г. Валуйко, О.С. Луканін, І.Р. Клечак. — К.: Урожай, 1993. — 120 с.
6. Каталог колекції культур шапинкових грибів ІБК / А.С. Бухало, Н.Ю. Митропольская, О.Б. Михайлова. — К.: «Алтерпрес», 2011. — 100 с.
7. Капич А.Н. Глубинное культивирование дереворазрушающих базидиальных грибов на молочной сыворотке / А.Н. Капич, И.В. Стахеев, В.Г. Бабицкая // Микология и фитопатология. — 1984. — Т. 18, № 6. — С. 478–483.
8. Круподьорова Т.А. Ріст *G. applanatum* (Perst.) Pat. і *Ganoderma lucidum* (Curt.) P. Karst. та синтез екзополісахаридів в умовах глибинного культивування / Т.А. Круподьорова // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 6. — С. 60–65.
9. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / под. ред. А.С. Бухало. — К.: «Чернобыльинтеринформ», 2004. — 128 с.
10. Лобанок А.Г. Микробный синтез на основе целлюлозы: белок и другие ценные продукты / А.Г. Лобанок, В.Г. Бабицкая, Ж.Н. Богдановская. — Мн.: Наука и техника, 1988. — 261 с.



11. Ломберг М.Л. Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі [Текст]: автореф. дис. ... канд. біол. наук : 03.00.21 / М.Л. Ломберг; Інститут ботаніки НАН України — К., 2005. — 20 с.

12. Смирнов Д.А. Углеводы глубинной культуры *Ganoderma lucidum*: образование, характеристика [Текст]: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.00.07 / Д.А. Смирнов; Институт микробиологии НАН Беларуси — Минск, 2007. — 23 с.

13. Цымбал И.М. Биологическая ценность побочных продуктов CO₂-экстракции семян амаранта / И.М. Цымбал, Е.И. Битюкова, Н.А. Шмалько // Сб. статей и докладов девятой научн.-практ. конф. с междуна. уч. «Современные проблемы техники и технологии пищевых производств» (14-15 декабря 2006), Барнаул, 2006. — С. 7—9.

14. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems / S.P. Wasser // Intern. J. Med. Mushr. — 2010. — Vol. 12. — P. 1—16.

UDK 582.28:57.017.6:67.08

Т.А. Krupodorova, V.Yu. Barshteyn

Institute of Food Biotechnology and Genomics, NASU, 2a, Osipovskogo str., Kyiv, 04123, Ukraine, tel.: +38(044) 462 72 59, e-mail: yemets@list.ru

ALTERNATIVE SUBSTRATES FOR MEDICINAL AND EDIBLE MUSHROOMS CULTIVATION

Summary

The ability of medicinal and edible mushrooms species from different systematic and ecological groups for biotransformation of food industry waste (broken vermicelli, flour-grinding manufacture waste — fine wheat flour, confectionery industry waste — cacao bean shell powder) and plant growing waste — CO₂-extraction waste (*Echinбsea purpъrea* (L.) Moench, *Humulus lupulus* L., *Amaranthus caudatus* L. meal) was studied. The perspective alternative substrates for 17 mushroom species cultivation according to biomass accumulation index were determined.

Key words: mushrooms, cultivation, food industry waste, plant-growing waste.



УДК 582.28:57.017.6:67.08

Т.А. Круподерова, В.Ю. Барштейн

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

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ СУБСТРАТЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И СЪЕДОБНЫХ ГРИБОВ

Реферат

Изучена способность некоторых видов лекарственных и съедобных грибов из разных систематических и экологических групп биотрансформировать отходы пищевой промышленности (битую вермишель, отход мукомольного производства — крупку, отход кондитерской промышленности — какао-веллу) и растениеводства — отходы CO₂-экстракции (шроты из *Echinops purpurea* (L.) Moench, *Humulus lupulus* L., *Amaranthus caudatus* L. По показателю накопления биомассы определены перспективные альтернативные субстраты для культивирования 17 исследованных видов грибов.

Ключевые слова: грибы, культивирование, отходы пищевой промышленности, отходы растениеводства.

Одержано 23.01.2012.



М.О. Шулякова¹, Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук²

¹Національний університет харчових технологій,
вул. Володимирська, 68, Київ, 01601, Україна,
тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: mariejanvier@ Rambler.ru, tapirog@nuft.edu.ua

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

ДЕЯКІ ЗАКОНОМІРНОСТІ СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЗА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ІМВ АС-5017 НА СУМІШІ РОСТОВИХ СУБСТРАТІВ

*Досліджено можливість використання суміші ростових субстратів (гексадекан, гліцерин, етанол) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017. Показано, що за умов росту даного штаму на суміші енергетично надлишкового (гексадекан) і енергетично дефіцитних (етанол, гліцерин) субстратів показники синтезу ПАР були у 1,5–2 рази вищими, ніж на відповідних монособстратах. Встановлено залежність синтезу ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 від способу підготовки інокуляту і концентрації монособстратів у суміші. Одержані дані є основою для розробки технології отримання ПАР культивуванням *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів.*

*Ключові слова: поверхнево-активні речовини, *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, змішані ростові субстрати, культивування, біосинтез.*

У наших попередніх дослідженнях було встановлено можливість інтенсифікації синтезу мікробного екзополісахариду етаполану *Acinetobacter* sp. ІМВ В-7005 на суміші субстратів [5], а також метаболітів з поверхнево-активними та емульгувальними властивостями за умов росту *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на суміші енергетично надлишкового гексадекану і енергетично дефіцитних гліцерину, глюкози, етанолу [4]. У ході досліджень було показано залежність ефективності біосинтезу ПАР від природи джерела карбону в середовищі для одержання інокуляту та концентрації субстратів у суміші [4].

Дотепер у літературі є небагато повідомлень про використання змішаних субстратів для синтезу поверхнево-активних речовин [7–9]. Слід зазначити, що у цих роботах досліджували власне не культивування продуцентів на суміші субстратів, а ефект від внесення вторинного джерела карбону у середовище для інтенсифікації процесів біосинтезу

ПАР [7–9]. Так, у разі внесення додаткового гідрофобного субстрату (олеїнова кислота) у процесі вирощування продуцентів софороліпідів *Candida bombicola* на середовищі з глюкозою спостерігали підвищення синтезу цих поверхнево-активних гліколіпідів до 33 г/л [9]. Додавання 1% оливкової олії під час культивування *Brevibacterium aureum* MSA13 на мелясі супроводжувалося збільшенням показників утворення бревифактину на 33–47% порівняно з культивуванням штаму на середовищі без олії [8], а вирощування *Candida lipolytica* UCP0988 на суміші олії канолі (10%) та глюкози (10%) дало змогу підвищити концентрацію синтезованих софороліпідів до 8 г/л [7].

Штам *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, ізольований нами із забруднених нафтою зразків ґрунту, синтезує поверхнево-активні речовини за умов росту на гідрофільних (етанол, глюкоза) і гідрофобних (гексадекан) субстратах [2]. Синтезовані ПАР є комплексом гліко-, фосфо- і нейтральних ліпідів, а гліколіпіди представлені трегалозоміколатами [2].

Оптимізація умов культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 дала змогу підвищити показники синтезу ПАР у три рази [2], а дослідження особливостей метаболізму *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 [3] — класифікувати етанол як енергетично дефіцитний субстрат. Згідно енергетичної класифікації субстратів Бабеля [6] гексадекан є енергетично надлишковим, а гліцерин — енергетично дефіцитним субстратами.

Отже, метою даної роботи було дослідження можливості використання суміші енергетично нерівноцінних субстратів (етанол + гліцерин, гексадекан + гліцерин, гексадекан + етанол) для інтенсифікації синтезу поверхнево-активних речовин *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017.

Матеріали і методи

Об'єкт досліджень — штам *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, депонований у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ за номером ІМВ Ас-5017.

Культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 1,3; NaCl — 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; рН 6,8–7,0.

Як джерело карбону та енергії використовували моносубстрати (% об'ємна частка): гліцерин — 0,94–2,05; *n*-гексадекан — 0,92–1,98; етанол — 1,1–2,2; а також суміш *n*-гексадекану і гліцерину, *n*-гексадекану і етанолу, етанолу і гліцерину в концентрації 0,5–1,0. Моно- і змішані субстрати, які використані для культивування, були еквімолярні за карбоном.

Посівним матеріалом була культура *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 в експоненційній фазі росту, вирощена на рідкому середовищі наведеного вище складу. Джерелами карбону у середовищі для одержання інокуляту були моносубстрати у концентрації 0,5%, а також суміш субстратів (по



0,25% кожного з моносубстратів). Концентрація посівного матеріалу (10^4 – 10^5 клітин/мл) становила 5% від об'єму середовища. Культивування здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (220 об/хв) упродовж 120 год при +28 °С.

Здатність до синтезу ПАР оцінювали за такими показниками [2]:

1) поверхневий натяг (σ_s) визначали за допомогою напівавтоматичного тензіометра TD1C LAUDA (Німеччина);

2) для оцінки кількісного вмісту ПАР у культуральній рідині використовували показник «умовної концентрації ПАР» (ПАР*, безрозмірні одиниці). Цей показник визначали як ступінь розведення супернатанту культуральної рідини в точці різкого збільшення поверхневого натягу на графіку залежності σ_s від логарифму показника розведення. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає значенню умовної концентрації ПАР;

3) індекс емульгування (E_{24} , %). Для визначення емульгувальної здатності до 2 мл культуральної рідини додавали 2 мл субстрату для емульгування та струшували упродовж 2 хв. Вимірювання індексу емульгування проводили через 24 год як величину відношення висоти шару емульсії до загальної висоти рідини в пробірці і виражали у відсотках. Як субстрат для емульгування використовували соняшникову олію.

Усі досліди проводили у 3 повторах, кількість паралельних визначень в експериментах становила 3–5. Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за алгоритмом, описаним у праці [1]. Відмінності середніх показників вважали достовірними на рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

На першому етапі досліджували вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР під час росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на суміші енергетично нерівноцінних субстратів (табл. 1). Як основні критерії для оцінки синтезу ПАР використовували показник умовної концентрації ПАР* та індекс емульгування E_{24} , % (див. Матеріали і методи), оскільки відомо, що більшість мікроорганізмів одночасно синтезують метаболіти як з поверхнево-активними, так і емульгувальними властивостями, комплекс яких має значний практичний потенціал. Раніше було показано, що *R. erythropolis* IMB Ac-5017 також утворює метаболіти такої комплексної дії [2].

Як видно з наведених у табл. 1 даних, показники синтезу ПАР на змішаних субстратах залежать від природи джерела карбону у середовищі для одержання інокуляту, однак індекс емульгування E_{24} при цьому змінювався незначно. Так, за використання посівного матеріалу, вирощеного на гексадекані, умовна концентрація ПАР під час культивування досліджуваних бактерій на суміші гексадекану і гліцерину була у 1,6–1,8 рази вищою, ніж на відповідних моносубстратах. Водночас най-

вищі показники синтезу ПАР на суміші етанолу і гліцерину, гексадекану й етанолу (у 1,2–1,6 рази вищі порівняно з такими на моносубстратах) спостерігали у разі застосування інокуляту, вирощеного на відповідних змішаних субстратах (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив способу підготовки посівного матеріалу на синтез ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 при рості на суміші субстратів

Table 1

Effect of inoculum preparation on the SAS synthesis of *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 during the growth on the mixture of substrates

Джерело карбону у середовищі для біосинтезу ПАР	Джерело карбону у середовищі для одержання інокуляту	Показники синтезу ПАР	
		ПАР*	Е24, %
Гексадекан, 0,5% + гліцерин, 0,5%	Гексадекан, 0,5%	3,85 ± 0,19	45 ± 2
	Гліцерин, 0,5%	3,36 ± 0,17	50 ± 2
	Гексадекан, 0,25% + гліцерин, 0,25%	3,55 ± 0,18	51 ± 2
Гексадекан, 0,99%	Гексадекан, 0,5%	3,30 ± 0,17	38 ± 2
Гліцерин, 1,02%	Гліцерин, 0,5%	2,3 ± 0,11	49 ± 2
Гліцерин, 0,5% + етанол, 0,5%	Гліцерин, 0,5%	3,10 ± 0,17	49 ± 2
	Етанол, 0,5%	3,30 ± 0,16	51 ± 2
	Гліцерин, 0,25% + етанол, 0,25%	3,40 ± 0,17	51 ± 2
Гліцерин, 0,94%	Гліцерин, 0,5%	2,10 ± 0,11	49 ± 2
Етанол, 1,1%	Етанол, 0,5%	2,80 ± 0,14	48 ± 2
Гексадекан, 0,5% + етанол, 0,5%	Гексадекан, 0,5%	3,57 ± 0,18	44 ± 2
	Етанол, 0,5%	3,50 ± 0,17	46 ± 2
	Гексадекан, 0,25% + етанол, 0,25%	3,60 ± 0,18	47 ± 2
Гексадекан, 0,92%	Гексадекан, 0,5%	3,10 ± 0,16	32 ± 2
Етанол, 1,1%	Етанол, 0,5%	2,80 ± 0,14	43 ± 2



Відомо, що за використання двох енергетично дефіцитних субстратів ефект «допоміжного» субстрату може мати місце, лише якщо вони асимілюються одночасно [5]. Так, на відміну від комбінації гліцерину з етанолом, за використання суміші гліцерину та глюкози стимулювального ефекту на синтез поверхнево-активних речовин не спостерігали: показник ПАР* для усіх варіантів із сумішшю субстратів був нижчий, ніж на монособстраті — глюкозі (дані не наведено).

Загалом значення умовної концентрації поверхнево-активних речовин та індексу емульгування, одержані за умов росту *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на змішаних субстратах, свідчать про більш повне перетворення карбону обох субстратів саме у цільовий продукт.

Наступним етапом роботи було дослідження залежності синтезу ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 від концентрації монособстратів у суміші (табл. 2). У цих експериментах використовували інокулят, вирощений на середовищі зі встановленим оптимальним джерелом карбону (див. табл. 1). Використання вищих концентрацій субстратів у суміші також приводило до збільшення у 1,1–1,7 рази умовної концентрації ПАР порівняно з вирощуванням *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на відповідних монособстратах (табл. 2). Проте підвищення концентрацій монособстратів у суміші практично не впливала на значення індексу емульгування культуральної рідини (табл. 1–2).

Таблиця 2

Синтез ПАР *R. erythropolis* IMB Ac-5017 на сумішах гексадекану (1%), гліцерину (1%) і етанолу (1%)

Table 2

SAS synthesis of *R. erythropolis* IMB Ac-5017 on the mixtures of hexadecane (1%), glycerol (1%) and ethanol (1%)

Субстрат	Показники синтезу ПАР	
	ПАР*	E24, %
Гексадекан + гліцерин	4,20±0,21	53±2
Гексадекан, 1,98%	3,63±0,18	47±2
Гліцерин, 2,05%	2,45±0,12	49±2
Гліцерин + етанол	4,35±0,22	59±2
Гліцерин, 1,87%	2,40±0,12	49±2
Етанол, 2,2%	3,25±0,16	46±2
Гексадекан + етанол	4,55±0,23	48±2
Гексадекан, 1,84%	3,53±0,16	44±2
Етанол, 2,2%	3,25±0,16	46±2



У табл. 3 наведено підсумкові дані щодо відносного збільшення (порівняно з моносубстратами) показників синтезу ПАР у процесі культивування бактерій на змішаних субстратах різної концентрації. Показник ПАР* за використання вищих (по 1%) концентрацій усіх досліджуваних моносубстратів у суміші виявився на 4–21% більшим, ніж у процесі культивування бактерій на змішаних субстратах нижчої концентрації (по 0,5% моносубстратів у суміші).

Аналіз даних таблиць 1–3, свідчить про відсутність чіткої кореляції між відносною зміною показників синтезу ПАР на змішаних і відповідних моносубстратах різних концентрацій. Так, наприклад, у процесі культивування штаму ІМВ Ас-5017 на суміші гексадекану (0,5%) і гліцерину (0,5%) значення показника ПАР* становило 117% від такого на моносубстраті гексадекані, а за підвищення концентрацій субстратів у суміші до 1,0% дещо зменшилося (до 110%, табл. 3). При цьому абсолютне значення ПАР* збільшувалося за підвищення концентрацій гексадекану і гліцерину у змішаному субстраті і становило 3,85 і 4,0 відповідно. Аналогічна ситуація і з індексом емульгування E_{24} для деяких випадків (наприклад, суміші гексадекану та гліцерину).

Таблиця 3

Показники синтезу ПАР за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на моно- і змішаних субстратах

Table 3

SAS synthesis indexes of *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 under the growth on mono- and mixed substrates

Концентрація моносубстратів у суміші, %	Концентрація моносубстрату, % (контроль)	ПАР*, % від контролю	E ₂₄ , % від контролю
Гексадекан, 0,5 + гліцерин, 0,5	Гексадекан, 0,99	117±6	118±5
	Гліцерин, 1,02	167±8	92±5
Гексадекан, 1,0 + гліцерин, 1,0	Гексадекан, 1,98	110±6	113±6
	Гліцерин, 2,04	171±9	108±5
Гліцерин, 0,5 + етанол, 0,5	Гліцерин, 0,89	160±8	104±5
	Етанол, 1,14	121±6	106±5
Гліцерин, 1,0 + етанол, 1,0	Гліцерин, 1,78	181±9	120±6
	Етанол, 2,28	134±7	128±6
Гексадекан, 0,5 + етанол, 0,5	Гексадекан, 0,92	116±6	147±7
	Етанол, 1,1	129±6	109±5
Гексадекан, 1,0 + етанол, 1,0	Гексадекан, 1,84	129±6	109±5
	Етанол, 2,2	140±7	104±5



Отримані результати свідчать про необхідність проведення подальших досліджень зі встановлення оптимальних умов синтезу поверхнево-активних речовин на суміші енергетично нерівноцінних субстратів. При цьому слід враховувати кілька моментів. По-перше, можливе інгібування росту і синтезу ПАР високими концентраціями субстратів. По-друге, необхідно визначити оптимальне для синтезу ПАР молярне співвідношення субстратів у суміші, що потребує встановлення шляхів метаболізму відповідних субстратів та здійснення попередніх теоретичних розрахунків енергетичних потреб цього процесу. По-третє, за зміни концентрацій моносубстратів у суміші у середовищі змінюється співвідношення карбон/нітроген, що значно впливає на процес утворення ПАР.

Отже, у результаті проведеної роботи встановлено, що за умов росту *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на суміші енергетично нерівноцінних ростових субстратів (гексадекан + гліцерин, гліцерин + етанол, гексадекан + етанол) показники синтезу поверхнево-активних речовин підвищуються у 1,5–2 рази порівняно з культивуванням бактерій на відповідних моносубстратах. Встановлено залежність синтезу ПАР на суміші ростових субстратів від природи джерела карбону у середовищі для одержання інокуляту і концентрації субстратів у суміші.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. Образование поверхностно-активных веществ при росте штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 на гидрофильных и гидрофобных субстратах // Прикл. биохим. и микробиол. — 2004. — 40, № 5. — С. 544–550.
3. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. Особенности C_2 -метаболизма и интенсификация синтеза поверхностно-активных веществ у штамма *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1, растущего на этаноле // Микробиология. — 2008. — 77, № 6. — С. 749–757.
4. Пирог Т.П., Щербина А.В., Билец И.В. Интенсификация синтеза биосурфактантов *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 // Международная науч. конф. «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, Беларусь, 31 мая — 4 июня 2010 г.): тез. докл. — Минск, 2010 г. — С. 146–148.
5. Підгорський В.С. Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: «Наукова думка», 2010. — 327 с.
6. Babel W., Myller R.H. Mixed substrate utilization in microorganisms: biochemical aspects and energetics // J. Gen. Microbiol. — 1985. — 131, № 1. — P. 39–45.
7. Sarubbo L.A., Farias C.B., Campos-Takaki G.M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica* // Curr. Microbiol. — 2007. — 54, № 1.— P. 68–73.



8. Seghal K.G., Anto T.T, Selvin J., Sabarathnam B., Lipton A.P. Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture // Bioresour. Technol. — 2010. — 101, № 7. — P. 2389–2396.

9. Van Bogaert I.N., Saerens K., De Muynck C., Develter D., Soetaert W., Vandamme E.J. Microbial production and application of sophorolipids // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007. — 76, № 1. — P. 23–34.

УДК 759.873.088.5:661.185

М.А. Шулякова¹, Т.П. Пирог^{1,2}, Т.А. Шевчук²

¹Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01601, Украина,
тел.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: mariejanvier@ Rambler.ru , tapirog@ nuft.edu.ua

²Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАНУ,
ул. Заболотного, 154, Киев ДСП, Д03680, Украина

НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СИНТЕЗА ПОВЕРХНО- АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ИМВ АС-5017 НА СМЕСИ РОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ

Реферат

Исследована возможность использования смеси ростовых субстратов (гексадекан, глицерин, этанол) для интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017. Показано, что при росте данного штамма на смеси энергетически избыточного (гексадекан) и энергетически дефицитных (этанол, глицерин) субстратов показатели синтеза ПАВ были в 1,5–2 раза выше, чем на соответствующих моносубстратах. Установлена зависимость синтеза ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 от способа подготовки инокулята и концентрации моносубстратов в смеси. Полученные данные являются основой для разработки технологии получения ПАВ при культивировании *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 на смеси энергетически неравноценных ростовых субстратов.

Ключевые слова: поверхностно-активные вещества, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, смешанные ростовые субстраты, культивирование, биосинтез.



UDK 759.873.088.5:661.185

М.О. Shulyakova¹, Т.Р. Pirog^{1,2}, Т.А. Shevchuk²

¹National University of Food Technologies,
68, Volodymyrska str., Kyiv, 01601, Ukraine,
tel.: +38 (044) 287 96 69, e-mail: mariejanvier@rambler.ru, tapirog@nuft.edu.ua

²D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154,
Academ. Zabolotny str., Kyiv GSP, D03143, Ukraine,

**SOME REGULARITIES OF SURFACTANTS SYNTHESIS
UNDER CULTIVATION OF *RHODOCOCCUS
ERYTHROPOLIS* IMB AC-5017 ON THE MIXTURES
OF GROWTH SUBSTRATES**

Summary

It was investigated the possibility of using the mixture of growth substrates (hexadecane, glycerol, ethanol) to intensify the synthesis of surface-active substances (SAS) of *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017. It was shown that under conditions of growth of this particular strain on the mixture of energy excess (hexadecane) and energy deficient (ethanol, glycerol) substrates SAS synthesis rates increased in 1.5–2 fold as compared with bacteria growth on the corresponding monosubstrates. It was ascertained the dependence of SAS synthesis of *R. erythropolis* IMB Ac-5017 on the method of inoculum preparation and concentration of monosubstrates in the mixture. The data obtained are the basis for the development of technology of production of the SAS by cultivation of strain IMB Ac-5017 on the mixture of energy unequal growth substrates.

Key words: surfactants, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, mixed growth substrates, cultivation, biosynthesis.

Одержано 28.02.2012.



УДК 582.284:581

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

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара,
пр. Гагарина 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
тел.: +38 (056) 374 47 34, e-mail: microviro@ Rambler.ru

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ СТРЕПТОМИЦЕТА НА НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ *PLEUROTUS OSTREATUS*

*Изучено действие культуральной жидкости штамма *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на накопление биомассы съедобных грибов вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) при глубинном ее культивировании с добавлением глюкозы или аминокислотного препарата из автолизата пивных дрожжей. Было установлено, что культуральная жидкость стрептомицета в концентрации 0,01% и 0,1% способствовала более высоким показателям прироста биомассы гриба – 39%–44% в присутствии автолизата дрожжей, по сравнению с более низкими концентрациями 0,001% и 0,01% в питательной среде с добавлением глюкозы в качестве источника углерода.*

Ключевые слова: культуральная жидкость, мицелий, глубинное культивирование, стрептомицет, грибная биомасса, белково-пищевая добавка.

В настоящее время промышленное культивирование съедобных грибов является мощной индустрией, которая соединяет традиционные черты сельского хозяйства и современной биотехнологии. В связи с назревшей глобальной проблемой на планете — дефицитом белка, актуальными являются вопросы по разработке методов стимулирования роста, развития и урожайности съедобных грибов [13]. Известно, что для стимуляции растений, грибов часто используют биологически активные вещества (фитогормоны, витамины, аминокислоты) [7, 14]. Одним из продуцентов таких веществ является штамм *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 из коллекции культур кафедры микробиологии и вирусологии ДНУ, который синтезирует термостабильный регулятор роста гликопептидной природы, стимулирующий рост дрожжей и растений [15]. Представлялось целесообразным изучить возможность применения культуральной жидкости стрептомицета для повышения синтеза биомассы съедобных грибов.

Высший съедобный гриб — вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer), относится к группе сапрофитных дереворазру-

© Е.Н. Алексеенко, И.В. Жерносекова, А.И. Винников, 2012



шающих базидиомицетов и является высокотехнологичным биообъектом [12]. Благодаря наличию активных оксидаз *Pleurotus* разрушает целлюлозо-лигнинный комплекс древесины и использует для своего питания углеродные соединения различной степени сложности [1]. При выращивании в глубинных условиях на жидких комплексных средах вешенка обыкновенная образует физиологически активную белковую биомассу с приятным грибным ароматом, которая может быть использована как посевная грибница для получения плодовых тел поверхностным способом на твердофазных субстратах по интенсивной технологии или как непосредственная пищевая добавка [20]. Сухой мицелий, полученный методом глубинного культивирования вешенки на жидкой среде, является ценным источником витаминов группы В, в особенности ниоцина, по содержанию которого грибы могут быть поставлены на одно из первых мест среди продуктов питания. Этот способ получения биомассы гриба вешенки обыкновенной дает также возможность получить кроме белка много физиологически активных веществ для медицинской промышленности. Глубинное культивирование на жидких питательных средах является наиболее экономичным процессом, что позволяет путем создания полностью контролируемых условий, достичь быстрого роста биомассы в промышленных условиях [12]. В настоящее время этот гриб является серьёзным конкурентом шампиньона двуспорового (*Agaricus bisporus* (J. Lange) Imbach.) — традиционного объекта промышленного грибоводства. Выбор грибов рода *Pleurotus* обусловлен отсутствием в них токсичных метаболитов [2, 4].

Целью настоящей работы было исследование влияния экзометаболитов стрептомицета *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост мицелиальной биомассы съедобного гриба *P. ostreatus*, выращенного в глубинных условиях.

Материалы и методы

В качестве исследуемого объекта использовали чистую культуру гриба *Pleurotus ostreatus* (штамм Китайский черный) из коллекции музея культур грибов кафедры микробиологии и вирусологии ДНУ имени О. Гончара возрастом 5 суток, которая хранится на соево-агаровой среде, а также 72-часовую культуральную жидкость рифампициноустойчивого штамма 2P-15, отделенную от клеток стрептомицета центрифугированием при 5000 об/мин в течении 15 минут.

Биомассу вешенки получали путем культивирования гриба на жидкой питательной среде Гаузе с минеральными компонентами, содержащей (г/л): K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4$ 0,5; KNO_3 1,0; $NaCl$ 0,5; $FeSO_4$ 0,01, воду водопроводную [18]. В указанную среду перед автоклавированием вводили культуральную жидкость (КЖ) *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 в следующих концентрациях: 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%. После стерилизации при $P=1,5$ атм. в опытные колбы вносили раствор стерильной



глюкозы в конечной концентрации 2% либо стерильный гидролизат пивных дрожжей 0,5%, 1% и 2%. Контрольные колбы КЖ не содержали. Затем все емкости засеивали 5-суточной агаровой культурой гриба в количестве 15 мг на одну колбу.

Глубинное культивирование проводилось на протяжении 5-ти суток при температуре 26–28 °С в условиях встряхивания на микробиологических термостатированных качалках в колбах емкостью 250 мл, с объемом питательной среды 50 мл. Накопление биомассы в ходе исследования определяли весовым методом, для этого по окончании ферментации глубинный мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бумажные фильтры. Полученную биомассу гриба высушивали при температуре 105 °С до постоянного веса. Эксперименты проводили в трех повторностях для расчета достоверности использовали критерий Стьюдента на 5% уровне значимости [8].

Результаты и их обсуждение

В результате проведенных исследований были получены экспериментальные данные прироста биомассы гриба в присутствии КЖ стрептомицета на фоне углеродного питания в качестве 2% глюкозы.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что среда, в которой содержание КЖ составляло 0,01%, вызвала максимальное повышение биомассы на 32% по сравнению с контролем. Внесение КЖ в минимальной дозе 0,001% также оказало положительный эффект, который составил 19% прироста биомассы.

Таблица 1

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 2,0% глюкозы

Table 1

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P -15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 2,0% glucose

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	$\pm m$	
0,001	2,14 \pm 0,06*	119,0
0,01	2,38 \pm 0,07*	132,2
0,1	1,82 \pm 0,07	101,1
1,0	1,74 \pm 0,02	96,6
контроль	1,80 \pm 0,11	100,0

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.



Таким образом, при низких концентрациях КЖ стрептомицета в сочетании с 2% глюкозы в качестве источника углеродного питания наблюдалась стимуляция накопления биомассы вешенки. В других вариантах опыта, когда концентрация КЖ была 0,1% статистически значимых изменений не наблюдалось. Учитывая, что культуральная жидкость содержит стимулятор роста, становится ясным ее стимулирующее действие при низких концентрациях. Известно, что стимуляторы роста оказывают позитивный эффект, находясь в среде в малых концентрациях [14]. Ряд авторов показали, что под действием бактозоля — стимулятора роста из *Beijerinckia* sp. IBX — 84 в концентрациях 0,001%—0,1% увеличивалась клеточная масса бактерий рода *Rhizobium* в 1,4—1,6 раз [6].

На следующем этапе работы легко метаболизируемый источник углерода — глюкоза был заменен на автолизат пивных дрожжей, являющийся источником аминокислот, витаминов, макро- и микроэлементов, которые выступают факторами роста для микроорганизмов и грибов [3, 5, 11, 17]. В литературе большое количество публикаций посвящено изучению влияния дрожжевых экстрактов, автолизатов, гидролизатов на рост различных микроорганизмов. Так, убедительный эффект стимуляции роста продуцентов аминокислот и органических кислот был получен при внесении в питательные среды для коринебактерий и бифидобактерий дрожжевых экстрактов [19]. Также показана возможность кислотных и щелочных гидролизатов *C. guilliermondii* и *Sacch. vini* стимулировать рост молочнокислых бактерий, стрептококков и бифидобактерий [9]. Далее в работе изучали действие КЖ стрептомицета в сочетании 0,5%, 1,0% и 2,0% дрожжевого автолизата.

Таблица 2

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 0,5% автолизата пивных дрожжей

Table 2

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 0,5% autolysate of brewer's yeasts

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	±m	
0,001	1,62±0,09*	75,70
0,01	1,70 ±0,11 *	79,44
0,1	1,68±0,06 *	78,50
1,0	2,20±0,03	102,80
контроль	2,14±0,12	100,00

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.



Как видно из таблицы 2 на фоне низкой концентрации автолизата дрожжей (0,5%) ни одна из исследуемых концентраций КЖ не обеспечивала прирост биомассы вешенки. Большинство показателей биомассы не достигало контрольного уровня и было ниже на 21–24%. Можно предположить, что в питательной среде источник углерода не оптимальный.

Снижение концентрации КЖ стрептомицета до 0,001% в среде с 1,0% автолизата обеспечило достоверное стимулирование биомассы *Pleurotus* на 11,5% (табл. 3).

Таблица 3

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 1% автолизата пивных дрожжей

Table 3

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 1% autolysate of brewer's yeasts

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	±m	
0,001	2,90±0,03*	111,50
0,01	2,64±0,07	101,53
0,1	2,48±0,04	95,40
1,0	2,62 ±0,08	100,77
контроль	2,60±0,10	100,00

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.

В присутствии метаболитов стрептомицета наблюдалось достоверное повышение накопления грибной биомассы на 39,1%–44,3% на фоне дрожжевого автолизата в концентрации 2% (табл. 4). Очевидно, что подобранная концентрация КЖ прокариота (0,1%) в сочетании автолизата дрожжей (2%) является оптимальным условием для наибольшего прироста биомассы высших грибов. Полученные нами данные, относительно максимальных показателей биомассы гриба на фоне автолизата дрожжей в среде культивирования, хорошо соотносятся с исследованиями ряда авторов, где показано присутствие в среде культивирования *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 дрожжевого автолизата и микроэлементов, что позволило получить максимальные показатели (3,2) синтеза поверхностно-активных веществ (ПАВ, безразмерная величина) при использовании глицерина в качестве источника углерода и энергии. Исключение из среды дрожжевого автолизата приводило к снижению показателя условной концентрации ПАВ до 2,6 [10]. Кроме того, показатели синтеза ПАВ также



увеличивались при культивировании штамма на этаноле в присутствии дрожжевого автолизата и микроэлементов [16].

Таким образом, в условиях глубинного культивирования вешенки при добавлении КЖ стрептомицета на фоне источника углеродного питания глюкозы или дрожжевого автолизата удалось получить максимальный прирост грибной биомассы.

Таблица 4

Влияние культуральной жидкости *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на прирост биомассы *Pleurotus ostreatus* в присутствии 2% автолизата пивных дрожжей

Table 4

Influence of cultural liquid of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the increase of biomass of *Pleurotus ostreatus* in presence 2% autolysate of brewer's yeasts

Концентрация культуральной жидкости (%)	Грибная биомасса, г/л	% к контролю
	$\pm m$	
0,001	6,96 \pm 0,07*	140,32
0,01	6,90 \pm 0,20*	139,11
0,1	7,16 \pm 0,01*	144,35
1,0	6,58 \pm 0,58	132,66
контроль	4,96 \pm 0,21	100,00

Примечание:* — разница между контрольным и опытным вариантами достоверна на 0,05% уровне значимости.

Изучение механизмов стимулирующего воздействия культуральной жидкости штамма *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на накопление биомассы вешенки обыкновенной (*Pleurotus ostreatus*) в присутствии источников углерода и возможность их прикладного использования, на наш взгляд, представляет собой перспективное направление дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бисько Н.А., Бухало А.С., Вассер С.П., Дудка И.А., Кулеш М.Д., Соломко Э.Ф., Шевченко С.В. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре. — К.: Наукова думка, 1983. — 312 с.
2. Бухало А.С. Сучасні тенденції культивування грибів із роду *Pleurotus* // Укр. ботан. журн. — 1990. — Т. 47, № 2. — С. 101–104.
3. Бухало А.С., Пархоменко Л.П., Марченко М.Н. Влияние различных источников углерода и азота в синтетических средах на рост базидиомицетов // Микол. и фитопатол. — 1972. — т. 6. — вып. 3. — С. 241–244.



4. Горленко М.В. Грибы как источник пищевых белков // Микология и фитопатология.— 1983. — Т. 17, № 3. — С. 177—180.
5. Гусарова Н.А., Низковская О.П., Семушкина Т.Н., Баранова П.И., Глущенко Н.В. Выращивание и отбор высших мицелиальных грибов, продуцентов белка на гидролизованных средах // Сб. тр. ВНИИ гидролиза растительных материалов, 1982. — № 32. — С. 94—101.
6. Косенко Л.В., Мандровская Е.Д., Кругова Е.Д., Варбанец Л.Д. Действие стимулятора роста растений бактозоля на *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* 250a и его азотоустойчивый мутант М-71 в условиях различной обеспеченности азотом // Микробиология. — 2003. — Т. 72, № 1. — С. 40.
7. Кузнецова О.В. Использование природных и синтетических регуляторов в промышленной микологии и солодоращении // Весник Днепропетровского университета. Биология. Экология. — 2010. — Т. 1, № 18. — С. 86—91.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 352 с.
9. Михлина Э.Д., Радиной В.П. Активизация молочнокислых бактерий // Прикл. биохим. и микробиол. — М.:Изд-во Наука, 1981. — Т. 17, Вып. 3. — С. 348—367.
10. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. Синтез поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 в среде с глицерином // Микробиологический журнал. — 2012. — Т. 74, № 1. — С. 20—27.
11. Сергійчук М.Г., Позур В.К., Вінніков А.І., Фурзікова Т.М., Жданова Н.М., Домбровська І.В., Швець Ю.В. Мікробіологія: Підручник. — К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2005. — 375 с.
12. Середа Ю.Ю., Лебедева О.Н., Ляпустина Е.В., Зубарева И.М. Влияние состава питательных сред на рост глубинной культуры *Pleurotus ostreatus* // Хімія та сучасні технології: тези доповідей V міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (Дніпропетровськ, 20—22 квітня 2011 р.) — Дніпропетровськ, 2011. — С. 502.
13. Федорова Х.В., Лебедева О.М., Ляпустина О.В., Зубарева І.М. Підбір живильних середовищ для вирощування у глибинних умовах грибу *Pleurotus pulmonarius*. V міжнародна науково-технічна конференція студентів, аспірантів та молодих вчених. Тези доповідей. I том. Дн.: ІнКомЦентр, 2011. — С. 510.
14. Цавкелова Е.А., Климова С.Б., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, № 2. — С. 133—143.



15. Чорногор Н.П. Дослідження рiстстимулюючих властивостей лiзо-ензимного препарату *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.07. / К., 1998. — 20 с.

16. Pirog T.P., Antonuk S.I., Karpenko Y.V., Shevchuk T.A. The influence of condition of *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 strain cultivation on surface-active substances synthesis // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2009. — 45, № 3. — P. 272–278.

17. Yoshimoto T., Nakanishi T., Fukumoto J., Tsuru D. Studies on bacteriolytic enzymes. *Staphylococcus aureus* lytic enzyme from *Streptomyces* // *Agr. Biol. Chem.* — 1971. — V. 35, № 11. — P. 1775–1782.

18. Zadrzil F. Cultivation of *Pleurotus*. — In: The biology and cultivation of edible mushrooms / Eds Chang S.T., Hayes W.A. New York — San Francisco — London: Acad. press, 1978, P. 521–557.

19. А.с. 1065475 СССР, МКИ С 12N1/20 Питательная среда для культивирования коринебактерий дифтерии / И.Л. Маргулис, В.Н. Бочкова, Н.М. Головина и др. — Оpubл. 07.01.1984, Бюл. №1 // Открытия. Изобретения. — 1984. — № 23. — С. 170–171.

20. Пат. 2186851 Росія, ФРГ С12 Р21/00, С12 N1/14, С12 N1/14, С12 R1: 645. Способ получения биомассы гриба вешенки обыкновенной / Биттеева М.Б.(Росія); заявник та патентовласник Рос. наук. —дослідн. хім. та біотехн. ін. — т № - 2000120038, заявл. 31.07.01, опубл. 10.08.02, Бюл. № 6. — 4 с.

УДК 582.284:581

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

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: +38 (056) 374 47 34, e-mail: microviro@rambler.ru

ВИВЧЕННЯ ДІЇ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ СТРЕПТОМІЦЕТА НА НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ *PLEUROTUS OSTREATUS*

Реферат

Досліджено дію культуральної рідини штама *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 на накопичення біомаси їстівних грибів гливи звичайної (*Pleurotus ostreatus*) при глибинному її культивуванні з додаванням глюкози або амінокислотного препарату з автолізу пивних дріжджів. Було встановлено, що культуральна рідина стрептоміцету в концентрації 0,01% та 0,1% сприяла більш високим показникам приросту біомаси



гриба — 39%—44% у присутності автолізата дріжджів, в порівнянні з більш низькими концентраціями 0,001% та 0,01% в поживному середовищі з додаванням глюкози в якості джерела вуглецю.

Ключові слова: культуральна рідина, міцелій, глибинне культивування, стрептоміцет, грибна біомаса, білково-харчова добавка.

УДК 582.284:581

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

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine,
tel.: +38 (056) 374 47 34, e-mail: microviro@rambler.ru

**THE STUDY OF INFLUENCE OF CULTURAL LIQUID
OF STREPTOMYCETE ON ACCUMULATION OF BIOMASS
*PLEUROTUS OSTREATUS***

Summary

There were studied the effect of cultural liquid of strain *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 on the accumulation of biomass of edible mushroom *Pleurotus ostreatus* at its deep cultivation with addition of glucose or amino acid preparation from the autolysate of brewer's yeasts. It was determined that cultural liquid of streptomycete in concentration 0.01% and 0.1% promoted more instrumental in more high indexes of increase of biomass of mushroom — 39%—44% in presence the autolysate of yeasts, as compared to lower concentrations 0.001% and 0.01% in a nourishing environment with addition of glucose as a source of carbon.

Key words: cultural liquid, miceliy, deep cultivation, streptomycete, mushroom biomass, albumen food addition.

Одержано 12.03.2012.



Д.М. Сытник^{1,2}

¹Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина

²Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (068) 322 90 44, e-mail: sytnikov@list.ru

ЭКОНОМИЧЕСКАЯ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РИЗОБИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ГОМОЛОГИЧНЫМ ЛЕКТИНОМ

Произведён расчет экономической целесообразности применения различных препаративных форм клубеньковых бактерий сои (жидкие, на твердом носителе, модифицированные гомологичным лектином). Результаты многолетних исследований и экономический расчет указывают на перспективность использования бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином, как жидких, так и изготовленных на твердом носителе. Показано, что различные препаративные формы ризобий достоверно повышают эффективность симбиотической системы сои и продуктивность растений, в связи с чем могут быть рекомендованы аграрному производству.

*Ключевые слова: бобово-ризобильный симбиоз, *Bradyrhizobium japonicum*, бактериальные препараты, гомологичный лектин.*

Установление положительного влияния почвенной микрофлоры на растительные организмы привело к необходимости поиска условий практического применения отдельных ее представителей. Так, первый бактериальный препарат — нитрагин, содержащий несколько видов клубеньковых бактерий, был изготовлен в 1896 году, в Германии. В СССР, например, был широко распространен ризоторфин — торфяной субстрат с питательными добавками, содержащий определенный штамм активных клубеньковых бактерий для конкретного вида бобовых культур. В наши дни применение биологических препаратов на основе азотфиксирующих микроорганизмов является одним из основных приемов повышения продуктивности растений, а также качества их урожая. При этом естественным путём удаётся сохранять плодородие почв без ухудшения экологического состояния окружающей среды. Использование различных бактериальных препаратов позволяет регулировать численность и активность полезной микрофлоры в ризосфере возделываемых культур и



в значительной степени обеспечивать растения азотом, фиксированным из атмосферы [1, 10].

Ключевая роль в решении проблемы дефицита полноценного белка принадлежит сое, однако в почвах, на которых эта культура выращивается впервые, обычно отсутствуют специфические для нее клубеньковые бактерии, или же их количество крайне незначительно (до 20 ед./г почвы) [11]. Исследования последних лет показали, что внедрение технологий, основанных на биологической фиксации молекулярного азота, дает возможность получать качественное соевое сырье, не содержащее вредных химических соединений [10].

Изучение взаимоотношений бобовых растений и клубеньковых бактерий является одним из ключевых звеньев в решении обозначенных вопросов. В соответствии с существующими представлениями о механизмах взаимодействия растений с ризобиями полисахариды последних являются фактором, который обеспечивает "узнавание" бактериями соответствующего растения-хозяина путем комплементарного связывания с растительным лектином. Лектины — это белки, обладающие способностью обратимо и избирательно связываться с углеводами и углеводными частями биополимеров без изменения ковалентной структуры последних. Наряду с другими биологически активными веществами лектины бобовых уже при прорастании семян секретируются во внешнюю среду [7, 13]. Эти белки стимулируют размножение и активное движение к корням почвенных микроорганизмов, оказывают влияние на рост микросимбионтов и синтез ими экзогликанов [6]. Лектины растений рассматривают в качестве одного из факторов эффективного симбиоза, который предложено учитывать при разработке и внедрении новых подходов к управлению продукционным процессом у бобовых растений [7]. Известно, что обработка ризобий лектином специфического растения положительно влияет на их вирулентность и конкурентоспособность [15], а также повышает азотфиксирующую активность корневых клубеньков, что связывают с действием лектина на биосинтез нитрогеназы [2] в бактериальной клетке. Как следствие, предварительная инкубация ризобий с гомологичным лектином усиливает ростовые процессы растения и повышает продуктивность симбиоза [7].

Цель настоящей работы состояла в оценке экономической эффективности применения бактериальных препаратов для инокуляции сои при их модификации гомологичным лектином на примере проводившихся ранее испытаний.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали растения сои *Glycine max* (L.) Merr. сорта «Марьяна», совместной селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины (ИФРГ), Селекционно-генетического института и Института земледелия НААН. Для получения биопрепаратов использо-



вали клубеньковые бактерии *Bradyrhizobium japonicum* (штаммы 6346 и 646) из музейной коллекции азотфиксирующих микроорганизмов ИФРГ. В работе применяли лектин семян сои (SBA), приобретенный в НПК «Лектинотест» (Львов, Украина).

Полевые испытания проводили на агробиологической станции Уманского государственного педагогического университета (УГПУ) имени Павла Тычины (Черкасская область) и на опытном участке ИФРГ (г. Киев) [14]. Подготовка, стерилизация микробиологической посуды и питательных сред для выращивания ризобий, работа в ламинарном боксе с культурами бактерий, определение жизнеспособности и количественная оценка интенсивности роста микроорганизмов проводились по общепринятым в микробиологии правилам.

Процедура выращивания бактериальных культур, а также процесс получения жидких и твердых форм биопрепаратов были описаны ранее [14]. В соответствии со схемами опытов в суспензию клубеньковых бактерий вносили водные растворы гомологичного лектина семян сои. Конечная концентрация используемого белка в бактериальной суспензии с титром клеток $1 \cdot 10^7$ составляла 100 или 300 мкг/мл. Препараты были использованы через 10 или 30 дней после изготовления. Перед посевом семена инокулировали жидкой бактериальной суспензией или смывом с бактеризованного перлита.

Все результаты обрабатывались статистически [4], в таблицах представлены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты проведенных нами ранее исследований [14] продемонстрировали перспективность применения бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином, как жидких, так и изготовленных на твердом носителе (табл. 1).

Более высокая эффективность бактериальных препаратов на твердом носителе, очевидно, обусловлена благоприятными условиями используемой среды для ризобий и внесением питательных добавок. Можно было предположить, что в жидком препарате бактерии больше контактируют с лектином, однако известно, что после 10 мин инкубации ризобий с лектином агглютинирующая активность белка в суспензии уменьшается на 50–75% и остается постоянной в течение 20 ч независимо от вида лектина и штамма ризобий. Следовательно, в первые минуты инкубации происходит частичное связывание лектина ризобиями, которое и оказывает влияние на метаболизм бактериальной клетки, активируя ее и подготавливая к процессу кооперирования с растением-хозяином [9]. Поскольку значительная часть лектина, оставаясь несвязанной, сохраняла свою активность, последнее обстоятельство позволило нам предположить механизм положительного влияния различных концентраций лектина, вносимого в бактериальную суспензию [14].



Кроме того, установлено, что экзогенная обработка семян лектином без инокуляции способна увеличивать продуктивность сои, что позволяет рассматривать растительный лектин как биологически активное вещество, механизм действия которого направлен на повышение урожая [5]. Таким образом, лектин, вносимый в бактериальную суспензию перед инокуляцией, способен не только оказывать влияние на бактерии, путем связывания с их поверхностью, а и непосредственно стимулировать растения.

Таблица 1

Урожай семян сои при использовании различных препаративных форм клубеньковых бактерий с различными концентрациями гомологичного лектина (среднее из двух опытов, 2005 г.)

Table 1

Soybean seeds harvest with the application of various preparations forms of nodule bacteria with different homologous lectin concentrations (average from two experiments in 2005)

Препаративная форма	Концентрация лектина, мкг/мл бактериальной суспензии	Урожай семян, ц/га	Прирост урожая	
			ц/га	%
Жидкая культура	0	29,3 ± 2,7	—	—
	100	36,6 ± 1,5	7,3	24,9
	300	32,5 ± 1,8	3,2	10,9
Перлит	0	34,6 ± 1,2	—	—
	100	43,1 ± 1,1	8,5	24,5
	300	40,3 ± 1,7	5,6	16,4
НСР _{0,05}		4,6		

Нами было установлено [14], что использование данного белка дает возможность повышать эффективность симбиотической системы сои и увеличивать ее продуктивность. При этом проведенные испытания 2006 года подтвердили (табл. 2), что концентрация гомологичного лектина 100 мкг/мл бактериальной суспензии *Bradyrhizobium japonicum* является оптимальной в физиологическом и экономическом отношении дозой при изготовлении ризобияльных препаратов с использованием перлита в качестве твердого носителя. В более поздних работах [12] была установлена эффективность применения бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином, как на основе активных производственных штаммов ризобий, так и некоторых Тп5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* (штаммы Т66 и Т3-11).



Таблица 2

Продуктивность сои, инокулированной ризобияльными биопрепаратами на твердом носителе (перлит), при модификации гомологичным лектином

Table 2

Productivity of soybean inoculated with biological rhizobial preparation on the solid carrier (perlite) and modified with homologous lectin

Концентрация лектина, мкг/мл бактериальной суспензии	Урожай семян, ц/га			
	I	II	III	Среднее из трех опытов
0	36,2 ± 0,7	33,1 ± 1,8	22,5 ± 0,7	30,6 ± 1,1
100	45,1 ± 1,4	41,2 ± 0,8	25,8 ± 1,1	37,4 ± 1,1
300	41,9 ± 1,5	38,8 ± 2,0	27,3 ± 1,0	36,0 ± 1,5
НСР _{0,05}	4,2	5,1	2,5	

Примечание: полевые испытания на агробиологической станции УГПУ – I (2005 г.), III (2006 г.); на опытном участке ИФРГ – II (2005 г.)

Исходя из результатов испытаний, проведенных на протяжении ряда лет был произведен расчет ряда экономических показателей. Известно, что экономическая эффективность применения бактериальных препаратов для инокуляции семян бобовых растений перед посевом зависит от прироста урожая, его стоимости и дополнительных затрат. Расчет данных для оценки основных экономических показателей (1) и расчет показателей экономической эффективности используемых нами бактериальных препаратов (2) по отношению к контролю производили по следующим формулам [3, 8]:

- (1) Себестоимость = затраты на выращивание : урожай;
 Чистая прибыль = урожай × цена урожая – затраты на выращивание;
 Рентабельность = (чистая прибыль : затраты на выращивание) × 100%.

- (2) Себестоимость = $\frac{\text{затраты на выращивание} + \text{затраты на препарат}}{\text{урожай}}$;

Чистая прибыль = урожай × цена урожая – (затраты на выращивание + затраты на препарат);
 Рентабельность = $\frac{\text{чистая прибыль}}{\text{затраты на выращивание} + \text{затраты на препарат}} \times 100\%$.

Себестоимость одного центнера семян сои, чистый доход и рентабельность вычисляли по формулам исходя из затрат на производство по типовой технологической карте выращивания сои (контроль) без



применения бактериальных удобрений на примере одного из хозяйств Киевской области (1):

$$\begin{aligned} \text{Себестоимость} &= 2066,87 : 20,0 = 103,34 \text{ грн/ц} \\ \text{Чистая прибыль} &= 20,0 \times 120,0 - 2066,87 = 333,13 \text{ грн/га} \\ \text{Рентабельность} &= 333,13 : 2066,87 \times 100\% = 16,1\% \end{aligned}$$

Многолетними производственными испытаниями бактериальных препаратов клубеньковых бактерий сои установлено, что в среднем по Украине прибавка урожая при их использовании составляет около 12%. Расчет же экономической эффективности производства сои по типовой технологической карте в выбранном нами хозяйстве имел приблизительно следующие показатели (2):

$$\begin{aligned} \text{Себестоимость} &= (2066,87 + 18,0^* + 18,0^{**}) : 22,4 = 93,88 \text{ грн/ц} \\ \text{Чистая прибыль} &= 22,4 \times 120,0 - (2066,87 + 18,0^* + 18,0^{**}) = 585,13 \text{ грн/га} \\ \text{Рентабельность} &= 585,13 : (2066,87 + 18,0^* + 18,0^{**}) \times 100\% = 27,82\% \end{aligned}$$

* Стоимость гектарной порции препарата.

** Затраты на обработку семян препаратом.

Применение бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином в условиях наших полевых испытаний приводило к приросту урожая не менее 9,8% в сравнении с обычной инокуляцией [12, 14]. Исходя из этого экономическая оценка использования биопрепаратов с учетом затрат на производство (по типовой технологической карте выращивания сои) выглядит так (2):

$$\begin{aligned} \text{Себестоимость} &= (2066,87 + 35,0^* + 18,0^{**}) : 24,6 = 86,17 \text{ грн/ц} \\ \text{Чистая прибыль} &= 24,6 \times 120,0 - (2066,87 + 35,0^* + 18,0^{**}) = 832,13 \text{ грн/га} \\ \text{Рентабельность} &= 832,13 : (2066,87 + 35,0^* + 18,0^{**}) \times 100\% = 39,2\% \end{aligned}$$

* Стоимость гектарной порции препарата содержащего лектин.

** Затраты на обработку семян препаратом содержащим лектин.

Сравнительный анализ различных показателей экономической эффективности возделывания сои указывает на целесообразность применения бактериальных препаратов для инокуляции семян (табл. 3). Рентабельность производства при этом увеличивалась на 11,7%. Максимальная же рентабельность (39,2%) наблюдалась при использовании бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином, что указывает на перспективность их применения. Из таблицы 3 также следует, что использование бактериальных препаратов снижало себестоимость и увеличивало чистый доход. Так, при возделывании сои в условиях Лесостепи Украины на 1 гривну затрат можно было получить приблизительно 0,4 гривны чистой прибыли.



Таблица 3

Экономическая эффективность применения бактериальных препаратов, модифицированных гомологичным лектином, при производстве семян сои (по состоянию на 2006 год)

Table 3

Economic effect of bacterial preparations application while producing soybean seeds (the condition of 2006), the preparations being modified with homologous lectin

Показатель	Единица измерения	Контроль	Применение инокуляции	Биопрепарат с лектином
Урожайность семян	ц/га	20,0	22,4	24,6
Дополнительный урожай	ц/га	—	2,4	4,6
Стоимость урожая	грн/га	2400,0	2688,0	2952,0
Затраты на применение бактериальных препаратов	грн/га	—	36,0	53,0
Себестоимость производства	грн/ц	103,34	93,88	86,17
Чистая прибыль	грн/га	333,13	585,13	832,13
Рентабельность производства	%	16,1	27,8	39,2

Таким образом, расчет экономической эффективности различных препаративных форм азотфиксирующих микроорганизмов (жидкие, на твердом носителе, модифицированные гомологичным лектином) демонстрирует их эффективность, в связи с чем они могут быть рекомендованы аграрному производству. Применение бактериальных препаратов ведет к незначительному удорожанию производства продукции при этом экономический эффект применения азотфиксирующих бактерий и растительного лектина достигается за счёт стоимости дополнительного урожая, экономии минеральных удобрений и снижения других производственных энергозатрат.

Существующие биологические препараты на основе полезных микроорганизмов являются отличной альтернативой минеральным удобрениям, тем не менее, все они еще не получили достаточно широкого применения, что, естественно, не способствует решению ряда существующих экологических и экономических проблем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агроэкология* / Под ред. В.А. Черникова, А.И. Черкеса. — М.: Колос, 2000. — 536 с.
2. *Антонюк Л.П., Игнатов В.В.* О роли агглютинаина зародыша пшеницы в растительно—бактериальном взаимодействии: гипотеза и экспериментальные данные в ее поддержку // *Физиология растений*. — 2001. — 48, № 3. — С. 427—433.
3. *Букин В.П., Букин А.В., Букина-Хрунык А.В.* Научные основы интродукции красильных растений юга Украины. — К.: «РК Мастер-принт», 2008. — 208 с.
4. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). — М.: Агропромиздат, 1985. — 351 с.
5. *Кириченко Е.В., Титова Л.В., Коць С.Я. и др.* Влияние лектина из семян сои на продуктивность сои // *Агрохимия*. — 2004. — № 11. — С. 58—62.
6. *Косенко Л.В., Мандровская Н.М.* Влияние лектина гороха на рост микросимбионтов гороха и биосинтез ими экзогликанов // *Микробиология*. — 1998. — 67, № 5. — С. 626—630.
7. *Коць С.Я., Сытников Д.М.* Лектины бобовых растений как фактор эффективного симбиоза // *Физиология и биохимия культ. растений*. — 2007. — 39, № 6. — С. 463—475.
8. *Кузьменко А.С., Дем'янюк О.С., Смолка О.О. та ін.* Рекомендації по застосуванню бактеріальних препаратів: діазофіту та поліміксобактерину на нагідках лікарських в умовах лівобережного Лісостепу України. — Полтава: РВВ Полтавської державної аграрної академії, 2004. — 22 с.
9. *Маліченко С.М., Даценко В.К., Маменко П.М., Коць С.Я.* Участь лектинів специфічних і неспецифічних до бульбочкових бактерій бобових рослин у формуванні і функціонуванні азотфіксуючого симбіозу // *Наук. зап. Тернопільського пед. ун-ту*. — 2002. — № 3 (18). — С. 49—57.
10. *Патика В.П., Коць С.Я., Волкогон В.В. та ін.* Біологічний азот. — К.: Світ, 2003. — 424 с.
11. *Патика В.П., Крутило Д.В., Ковалевська Т.М.* Вплив аборигенних популяцій бульбочкових бактерій сої на симбіотичну активність інтродукованого штаму *Bradyrhizobium japonicum* 6346 // *Мікробіол. журн.* — 2004. — 66, № 3. — С. 14—21.
12. *Сытников Д.М., Воробей Н.А., Береговенко С.К.* Эффективность биопрепаратов на основе Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum*, модифицированных гомологичным лектином // *Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология*. — 2008. — № 3 (15). — С. 46—52.



13. Ситников Д.М., Коць С.Я. Участие лектинов в различных физиологических процессах растений // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 4. — С. 279–296.

14. Ситников Д.М., Коць С.Я., Даценко В.К. Эффективность биопрепаратов клубеньковых бактерий сои, модифицированных гомологичным лектином // Прикладная биохимия и микробиология. — 2007. — 43, № 3. — С. 304–310.

15. Lodeiro A.R., Lopez–Garsia S.L., Vazquez T.E.E., Favelukes G. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin // FEMS Microbiol. Lett. — 2000. — 188, № 2. — P. 177–184.

УДК 579.66:631.461.5

Д.М. Ситніков^{1,2}

¹Інститут ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, тел.: +38 (068) 322 90 44, e-mail: sytnikov@list.ru

ЕКОНОМІЧНА ДОЦІЛЬНІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ РИЗОБІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ, МОДИФІКОВАНИХ ГОМОЛОГІЧНИМ ЛЕКТИНОМ

Реферат

Виконано розрахунок економічної доцільності застосування різних препаративних форм бульбочкових бактерій сої (рідкі, на твердому носії, модифіковані гомологічним лектином). Результати багаторічних випробувань вказують на перспективність використання бактеріальних препаратів, модифікованих гомологічним лектином, як рідких, так і виготовлених на твердому носії. Показано, що різні препаративні форми ризобій достовірно підвищують ефективність симбіотичної системи сої та продуктивність рослин, у зв'язку з чим можуть бути рекомендовані аграрному виробництву.

Ключові слова: бобово-ризобіальний симбіоз, *Bradyrhizobium japonicum*, бактеріальні препарати, гомологічний лектин.



УДК 579.66:631.461.5

D.M. Sytnikov^{1,2}

¹N.G. Kholodny Institute of Botany, NASU,
2, Tereschenkovska str., Kyiv, 01601, Ukraine

²Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (068) 322 90 44, e-mail: sytnikov@list.ru

ECONOMIC EFFECT AND APPLICATION OF RHIZOBIAL PREPARATIONS MODIFIED WITH HOMOLOGOUS LECTIN

Summary

The calculations as to economic advantages of various preparation forms of nodule bacteria (liquid, on the solid carrier, modified with homologous lectin) were made. The compiled data accumulated for many years of research demonstrate the perspectiveness of bacterial preparations modified with homologous lectin, both liquid and produced on a solid carrier. Different preparation forms of rhizobia vividly increase the efficiency of soybean symbiotic system and plant productivity, thus the above mentioned rhizobial preparations can be recommended to the agrarian production.

Key words : soybean-rhizobial symbiosis, *Bradyrhizobium japonicum*, bacterial preparations, homologous lectin.

Одержано 30.11.2011.



УДК 579.64: 632.7: 635.8: 595.42

С.П. Ужевська, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця

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

МІКРОМІЦЕТИ ЯК ОБ'ЄКТИ ЖИВЛЕННЯ КЛІЩІВ ТАРСОНЕМІД (TARSONEMIDAE, HETEROSTIGMATA)

Вивчено використання міцелію 17 видів мікроміцетів в їжу кліщами видів *T. confusus* Coor., 1941, *T. myceliophagus* Hussey, 1963, *T. pennisetus* Wainst., 1979. Показано, що *Trichoderma viridae*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, ***Cladosporium resinae***, ***Penicillium funiculosum*** є преферентними об'єктами живлення для цих кліщів. Міцелій мікроміцетів *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium pullulans* та *Chaetomium globosum* не використовується для живлення кліщами *T. confusus*, *T. myceliophagus* і *T. pennisetus*. Безпосереднього живлення кліщів тарсонемід *T. confusus*, *T. myceliophagus* і *T. pennisetus* міцелієм гливи та печериць не зареєстровано. Зроблено висновок, що знаходження тарсонемід на шапинкових грибах у грибових господарствах, пов'язано з їх живленням міцелієм мікроміцетів, які виростають на субстраті при його забрудненні та недотриманні технологічних параметрів.

Ключові слова: мікроміцети, кліщі *Tarsonemidae*, міцетобіонти, живлення.

Широко розповсюджені в природі мікроміцети часто викликають хвороби рослин та культивованих їстівних грибів [1, 2]. Втрати врожаю печериць від розвитку мікроміцетів можуть доходити до 75% [3]. В господарствах, що вирощують шапинкові гриби, разом з мікроміцетами, що ушкоджують грибницю, на субстраті часто реєструють значну кількість кліщів, серед яких найпоширеніші представники родини *Tarsonemidae* (*Tarsonemina*, *Heterostigmata*) [4].

Для переважної більшості з них життєві цикли та спектр живлення не вивчені. Є інформація про біологію *T. confusus* [5, 6, 7, 8]. Цей вид зустрічається в ґрунті, на різних субстратах, а також в грибниці печериць *Agaricus bisporus* [4]. Зареєстровано його живлення на дріжджах [7], грибах роду *Penicillium* [6, 7]. Є окремі відомості про культивування *T. pennisetus* на *Penicillium* sp. [8]. Спеціальні дослідження біології *T. myceliophagus* відсутні. Лише відомо, що цей вид домінував у компостах, коли там інтенсивно розвивалися мікроміцети родів *Trichoderma* та *Penicillium*

© С.П. Ужевська, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця, 2012



[9]. Кліщі цього виду виявлені у грибниці печериць *Agaricus bisporus* [4]. З'ясування трофічних зв'язків, що існують між кліщами, мікроміцетами та шапинковими грибами має важливе практичне значення.

Метою дослідження було вивчення використання найпоширеніших у ґрунті та на шапинкових грибах мікроміцетів для живлення кліщів тарсонемід.

Матеріали і методи

Для дослідження було відібрано штами 17 видів мікроміцетів з колекції кафедри мікробіології та вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler ОНУ 1120, *Aspergillus amstelodami* (Mang.) Thom et Church ОНУ 15, *Aspergillus flavus* Link ex Fr. ОНУ 25, *Aspergillus niger* van Tieghem ОНУ 1119, *Aspergillus terreus* Thom ОНУ 1025, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud ОНУ 1116, *Chaetomium globosum* Kunze ex Fr. ОНУ 109, *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries f. *resinae* ОНУ 1701, *Fusarium moniliforme* Sheldon ОНУ 136, *Mycrothecium verrucaria* Ditm. ex Fr. ОНУ 183, *Paecilomyces varioti* Bain. ОНУ 378, *Penicillium chrysogenum* Thom ОНУ 245, *Penicillium funiculosum* Thom ОНУ 285, *Penicillium martensii* Biourge ОНУ 310, *Penicillium ochro-chloron* Biourge ОНУ 1702, *Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc.) Bain. ОНУ 406, *Trichoderma viridae* Pers. Ex S.F.Gray ОНУ 1117. Мікроміцети культивували на агаризованому середовищі Чапека-Докса [10].

Вивчали живлення найпоширеніших у ґрунтах та на шапинкових грибах Одещини тарсонемід: *T. confusus* Coog., 1941, *T. myceliophagus* Hussey, 1963 та *T. pennisetus* Wainst., 1979, які потрапляють на грибні субстрати із навколишнього середовища. Кліщі *T. confusus* та *T. myceliophagus* нами зареєстровані в грибівних господарствах, що вирощують печериці. Із них вдалося отримати чисті масові культури. Масові первинні культури кліщів *T. pennisetus* отримано на *Fusarium moniliforme* та *Trichoderma viridae*, *Tarsonemus myceliophagus* — на *Penicillium chrysogenum* та *Trichoderma viridae*, а *Tarsonemus confusus* — на паростках пшениці, що гниють. Для кліщів *T. fusarii* Coog., 1941, що реєструвалися на гливі та печерицях, отримати масову культуру не вдалося.

За основу культивування кліщів взято методики запропоновані О. Шароновим [7], Л. Сидоровою та Т. Мартиною [11]. Кліщів вилучали з ґрунту за допомогою еклекторного методу на воду, де вони зберігали життєздатність у поверхневій плівці за кімнатної температури до 3–4 діб. Досліди проводили в чашках Петрі, дно яких вкривали зволуженим фільтрувальним папером. Розмноження кліщів тарсонемід відбувається партеногенетично (аренотокією), що дозволяє отримувати чисту масову культуру кліщів. Для отримання первинної масової культури тарсонемід відкладені яйця кліщів відбирали голкою і по одному переносили на газони з поширеними в ґрунтах Одещини мікроміцетами *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* або *Trichoderma viridae*. Ідентифікацію



кліщів здійснювали після отримання масової культури і виготовлення препаратів.

Преферендуми живлення кліщів вивчали в умовах примусового та вибіркового живлення. Для вивчення примусового живлення по одній самиці кліщів наносили на газон міцелію одного виду мікроміцета. Досліди проводили впродовж 2–4 місяців за температури 20–25 °С. Відносну вологість в ексикаторах підтримували на рівні 80%. Зовнішні крайові поверхні чашок покривали вазеліном для ізоляції від випадкового потрапляння інших екземплярів тарсонемід із зовні.

Для визначення преферендумів при вибіркового живленні кліщам пропонували на вибір міцелій різних видів грибів. З цією метою на вологий фільтрувальний папір по периметру чашки Петрі розкладали фрагменти газонів різних видів (8–10) мікроміцетів розміром один квадратний сантиметр. У кожному варіанті за контроль слугував той грибок, на якому було отримано первинну масову культуру кліщів. Посередині чашки садили 10 самиць кліщів з монокультури. Щодня протягом терміну зберігання чистоти культури мікроміцетів (максимально до двох місяців) здійснювали спостереження, визначали кількість кліщів на кожному фрагменті з міцелієм одного виду гриба, та обраховували відсоток кліщів. Під час усіх дослідів спостерігали за місцем перебування кліщів, слідами живлення, що проявлялися у виїданні міцелію. Однією з провідних ознак повноцінного живлення є розмноження, тому визначали наявність яєць, личинок, відродження дорослих особин. Спостереження здійснювали за допомогою бінокулярної лупи МБС-7.

Результати та їх обговорення

Масові культури *Tarsonemus pennisetus* первинно отримали на *Fusarium moniliforme* та *Trichoderma viridae*. Встановлено, що чотири види (із 16) мікроміцетів (*Aspergillus amstelodami*, *A. flavus*, *A. terreus* і *Aureobasidium pullulans*) при примусовому живленні не використовуються кліщами для живлення (табл. 1). Ці кліщі живуть, але не дають нащадків на *Mycrothecium verrucaria*, *Paecilomyces varioti* та *Aspergillus niger*.

Великі мікропопуляції кліщів *Tarsonemus pennisetus* утворилися на культурах п'яти видів грибів *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma viridae*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrisogenum* і *Scopulariopsis brevicaulis*. На *T. viridae* чисельність кліщів на 45-у добу досягала 120 самиць. Зареєстровано швидке зростання чисельності нащадків на *P. martensii* та *P. ochro-chloron*.

При вибірковості раціону (табл. 2) кліщі *Tarsonemus pennisetus* переважно жилися та розмножувалися на триходермі. Через 15 діб на газоні триходерми зареєстровано 24 екз., що складало 23,1% від усіх кліщів на газоні. Встановлено, що як і у попередньому варіанті кліщі відсторонювалися від *A. terreus*. На *Chaetomium globosum* на відміну від примусового живлення було зареєстровано окремі екземпляри кліщів, але



слідів живлення не виявлено. Малочисельні знахідки кліщів та сліди їх живлення були на *Penicillium chrysogenum*, *P. ochro-chloron* та *A. niger*. На *A. niger* зареєстровано незначну кількість яєць та окремих личинок. Тарсонеміди *Tarsonemus pennisetus* не могли рухатися в умовах високої щільності міцелію і в цих випадках сліди живлення були відсутні. Сприятливим для відкладання яєць та живлення личинок виявився міцелій п'яти видів мікроміцетів: *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme*, *P. funiculosum*, *P. martensii*, *Trichoderma viridae*. За 15 діб на *Alternaria alternata* було виявлено максимальну кількість яєць і зареєстровано 24 дорослих особини (23 ♀♀ та 1 ♂).

Встановлено, що найсприятливішими для живлення кліщів *T. pennisetus* як за примусового, так і вибіркового живлення є *Trichoderma viridae* та *Alternaria alternata*. Кліщі можуть використовувати в їжу також міцелій 8 видів мікроміцетів з наявністю розмноження. Кліщі цього виду, вірогідно, можуть частково задовольнити потреби в їжі *Chaetomium globosum*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces varioti*, оскільки відкладання яєць на них майже не відбувалося. Непридатним для живлення виявився міцелій грибів *Aspergillus flavus*, *A. terreus* та *Aureobasidium pullulans*.

Масові культури кліщів *Tarsonemus myceliophagus* вдалося отримати на *Penicillium chrysogenum* та *Trichoderma viridae*. При примусовому живленні кліщі розмножувалися на *Alternaria alternata*, *Cladosporium resinae*, *Fusarium moniliforme*. На 11 видах грибів із 17 запропонованих кліщі гинули. На *Aspergillus niger* та *Penicillium martensii* кліщі підтримували своє існування, але не розмножувалися (табл. 1).

Вивчення вибіркової живлення *Tarsonemus myceliophagus* показало (табл. 2), що із десяти різних мікроміцетів преферентними були *Trichoderma viridae*, де через 15 діб зареєстровано 21,5% кліщів (34 екз.), *Alternaria alternata* — 31,6% (50 екз.) та *Fusarium moniliforme* — 10,1% (16 екз.). Не виявлено слідів живлення кліщів цього виду на міцелії *Aspergillus terreus* та *Chaetomium globosum*.

На відміну від умов примусового живлення за вибіркового живлення на *Cladosporium resinae*, *P. martensii*, *P. funiculosum* чисельність кліщів *Tarsonemus myceliophagus* була низькою, виявлено лише сліди живлення та незначну кількість нащадків. На *Penicillium chrysogenum* знайдено тільки одну самицю, разом з тим за примусового живлення на цьому мікроміцеті отримана масова культура. Велику кількість нащадків отримано на *Penicillium ochro-chloron* — 22,2% (35 екз.), а в умовах примусового живлення виявлено загибель кліщів.

Для *Tarsonemus myceliophagus* преферентними для живлення є *Alternaria alternata*, *Cladosporium resinae*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma viridae*. Не придатними — *Aspergillus amstelodami*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Mycrothecium verrucaria*, *Paecilomyces varioti*, *Scopulariopsis brevicaulis*.



Таблиця 1

Оцінка преферендумів при примусовому живленні кліщів тарсонемід мікроміцетами

Table 1

The preferendums estimation at Tarsonemidae mites forced feeding by micromycetes

Вид мікроміцета	<i>Tarsonemus confusus</i>		<i>Tarsonemus myceliophagus</i>	
	П	В	П	В
<i>Alternaria alternata</i>	р	р	н	р
<i>Aspergillus amstelodami</i>	-	-	н	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	н	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	ж	-
<i>Aspergillus terreus</i>	н	н	н	н
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-	-	в	-
<i>Chaetomium globosum</i>	н	н	н	ж
<i>Cladosporium resinae</i>	р	р	р	р
<i>Fusarium moniliforme</i>	р	р	р	р
<i>Mycrothecium verrucaria</i>	-	-	н	-
<i>Paecilomyces varioti</i>	-	-	н	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	р	р	р	ж
<i>Penicillium funiculosum</i>	р	р	н	р
<i>Penicillium martensii</i>	р	р	ж	р
<i>Penicillium ochro-chloron</i>	р	р	н	р
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	н	-
<i>Trichoderma viridae</i>	р	р	р	р

Примітка: П – живлення примусове; В – живлення вибіркоче; Ж – живуть; Р – розмножуються; Н – не виживають; - - не досліджували.

Первинну масову культуру *Tarsonemus confusus* отримано на паростках пшениці, що гниють. За примусового живлення цей вид кліщів дав масові культури на міцелії *Alternaria alternata*, *Cladosporium resinae*, *Fusarium moniliforme*; слабо розмножувався на *Penicillium chrysogenum*, *P. funiculosum*, *P. martensii*, *P. ochro-chloron*. На *Aspergillus terreus*, *Chaetomium globosum* живлення кліщів не відбувалося (табл. 1).

За вибіркового живлення отримано аналогічні результати. Через 15 діб (табл. 2) виявлено значне зростання кількості кліщів *Tarsonemus confusus*. Розподіл чисельності був наступний: найбільше особин (34,6%) отримано на *Alternaria alternate*; 16,9% – на *Penicillium ochro-chloron*;



14,4% — на *Fusarium moniliforme*; 13,5% — на *Trichoderma viridae*. Кліщі цього виду живилися і розмножувалися на *Cladosporium resinae*, *Penicillium chrysogenum*, *P. funiculosum*, *P. martensii*.

Таким чином, для живлення *T. confusus* преферентним є міцелій п'яти видів грибів — *Alternaria alternata*, *Cladosporium resinae*, *Fusarium moniliforme*, *Trichoderma viridae*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochro-chloron*, меншою мірою — *P. chrysogenum* та *P. martensii*, не придатним — міцелій *Aspergillus terreus*, *Chaetomium globosum*.

Таблиця 2

Чисельність кліщів тарсонемід на грибах при вибірковому живленні (15 діб)

Table 2

The number of tarsonemid mites on the fungi at selective feeding (15 days)

Мікроміцети	<i>T. confusus</i>		<i>T. myceliophagus</i>	
	Абс., екз	%	Абс., екз	%
<i>Alternaria alternata</i>	123	34,6	50	31,6
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	4	2,5
<i>Cladosporium resinae</i>	22	6,2	4	2,5
<i>Fusarium moniliforme</i>	51	14,4	16	10,1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	8	2,3	2	1,3
<i>Penicillium funiculosum</i>	34	9,6	8	5,1
<i>Penicillium martensii</i>	9	2,5	5	3,2
<i>Penicillium ochro-chloron</i>	60	16,9	35	22,2
<i>Trichoderma viridae</i>	48	13,5	34	21,5
Загалом	355	100	158	100

Безпосереднього живлення кліщів тарсонемід *T. confusus*, *T. myceliophagus* і *T. pennisetus* міцелієм гливи та печериць нами не виявлено. Встановлено, що міцелій мікроміцетів *Trichoderma viridae*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Cladosporium resinae*, *Penicillium funiculosum* є преферентним субстратом для живлення кліщів *T. confusus*, *T. myceliophagus* і *T. pennisetus*. На *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum* живлення кліщів *T. confusus*, *T. myceliophagus*, *T. pennisetus* не відбувалося.

Отже, знаходження тарсонемід на шапинкових грибах, що культивуються у грибівних господарствах, пов'язано, очевидно, з їх живленням міцелієм мікроміцетів, які виростають на субстраті при його забрудненні та



недотриманні технологічних параметрів вирощування. Таким чином кліщі тарсонеміди в свою чергу можуть сприяти розповсюдженню патогенних мікроміцетів по субстрату для культивування шапинкових грибів.

Робота виконана в рамках проекту ДЗ 485–2011, що фінансується Державним агентством з питань науки, інформації та інформатизації України.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Билай В.И.* Микромицеты почв. — Киев: Наукова думка, 1984. — 267 с.
2. *Самцевич С.А.* О сезонности и периодичности развития микроорганизмов в почве // Микробиология. — 1955. — Т. 24, В. 5. — С. 615–622.
3. *Шалашова Н.Б.* Культивирование съедобных грибов. — М.: Никола-Пресс; ЮНИОН-паблик, 2007. — 208 с.
4. *Hussey N.W.* A new species of *Tarsonemus* (Acarina; Tarsonemidae) from cultivated mushrooms // *Acarologia*. — 1963. — № 5. — P. 540–544.
5. *Schaarschmidt L.* Systematik und Okologie der Tarsonemiden // *Beitr. Syst. Okol. mitteleur. Acarina.: Abschn.*, 1959. — Vol. I. — P. 713–825.
6. *Шаронов А.А.* Биологические особенности тарсонемидных клещей (*Tarsonemidae*, *Acariformes*) // *Бюлл. Гос. Никитского бот. сада* — 1986. — № 61. — С. 62–65.
7. *Шаронов А.А.* Методика лабораторного содержания и материалы по экологии клещей-тарсонемид (*Tarsonemidae*, *Acariformes*) // *Экология*. — 1984. — № 6. — С. 31–35.
8. *Ужевская С.Ф.* Пищевая специализация клещей рода *Tarsonemus* Cap. et. Fan. (*Tarsonemidae*) — обитателей пшеницы // *Изучение грибов в биоценозах*. — Тез. докл. IV Всес. конф. — Пермь, 12–16 сент., 1988. — Свердловск, 1988. — С. 71.
9. *Чернова Н.М.* Экологические сукцессии при разложении растительных остатков. — М.: Наука, 1977. — 153 с.
10. *Сеги Й.* Методы почвенной микробиологии. — М.: Колос, 1983. — 293 с.
11. *Сидорова Л.Е., Мартынова Т.А.* Оценка микропреферендумов при питании орибатид грибами, выделенными из торфяных почв. Горький, 1983. — 5275-83 Деп. ВИНТИ. — 16 с.

УДК 579.64: 632.7: 635.8: 595.42

С.Ф. Ужевская, О.С. Багаева, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: grass_snake@ukr.net

МИКРОМИЦЕТЫ КАК ОБЪЕКТЫ ПИТАНИЯ КЛЕЩЕЙ ТАРСОНЕМИД (TARSONEMIDAE, HETEROSTIGMATA)

Реферат

Изучено использование в качестве корма клещами 17 видов микромицетов *Tarsonemus confusus* Coor., 1941, *T. myceliophagus* Hussey, 1963, *T. pennisetus* Wainst., 1979. Показано, что *Trichoderma viridae*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium resinae*, *Penicillium funiculosum* являются преферентными объектами питания для этих клещей. Мицелий микромицетов *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum* не используются для питания клещами *T. confusus*, *T. myceliophagus*, *T. pennisetus*. Непосредственного питания клещей тарсонемид *T. confusus*, *T. myceliophagus* и *T. pennisetus* мицелием вешенки и шампиньонов не зарегистрировано. Сделан вывод, что находки тарсонемид на шляпочных грибах в грибоводческих хозяйствах связаны с их питанием микромицетами, которые произрастают на субстрате при его загрязнении и нарушении технологических параметров.

Ключевые слова: микромицеты, клещи *Tarsonemidae*, мицетобионты, питание.

УДК 579.64: 632.7: 635.8: 595.42

S. Uzhevskaya, O. Bagaeva, V. Ivanytsia

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: grass_snake@ukr.net

MICROMYCETES AS THE OBJECTS FOR TARSONEMID (TARSONEMIDAE, HETEROSTIGMATA) MITES FEEDING

Summary

There were studied the usage of 17 species of micromycetes *Tarsonemus confusus* Coor., 1941, *T. myceliophagus* Hussey, 1963, *T. pennisetus* Wainst., 1979 as feeding for the mites.



There were shown that *Trichoderma viridae*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Cladosporium resinae*, *Penicillium funiculosum* were the preferable objects for feeding of *T. confusus*, *T. myceliophagus*, *T. pennisetus*. *Aspergillus terreus*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum* were not acceptable for feeding of *T. confusus*, *T. myceliophagus*, *T. pennisetus*. There was not registered the direct feeding of tarsonemid mites *T. confusus*, *T. myceliophagus* and *T. pennisetus* by oyster mushroom and champignons mycelium. There was drawn the conclusion that Tarsonemidae found on the blewits in mushroom-growing economies are connected with their feeding by micromycetes settled in the substratum being contaminated as well as technological parameters infringement.

Key words: micromycetes, mites of *Tarsonemidae*, mycetobiontes, feeding.

Одержано 04.01.2012.



УДК: 579:923 Медведєв (477.74)

В.О. Кузнецов

Центр досліджень з історії освіти, науки і техніки на півдні України
імені В.І. Липського, вул. Новаторів, 5-а, Одеса, 65049, Україна,
тел.: +38 (048) 705 10 24 , e-mail: cuznetsov@meta.ua

**НАУКОВА І ПЕДАГОГІЧНА ДІЯЛЬНІСТЬ ПРОФЕСОРА
ЮРІЯ ВАСИЛЬОВИЧА МЕДВЕДЕВА
(05.09.1903 – 06.09.1969 РР.)**



У статті висвітлено життя і науково-педагогічна діяльність відомого вченого-біохіміка Юрія Васильовича Медведєва, який у 1944–1945 рр. очолював кафедру біохімії і мікробіології в Одеському державному університеті.

Ключові слова: історія мікробіології, Ю.В. Медведєв, Одеський університет.

© В.О. Кузнецов, 2012

Життя і науково-педагогічна діяльність доктора біологічних наук, професора Медведєва Юрія (Георгія) Васильовича, на превеликий жаль, не знайшла відображення ні в одному з видань чотирьохтомного біографічного словника «Професори Одеського (Новоросійського) університету» [14, 15]. У виданнях «Вчені вузів Одеси» [13], «Історія Одеського університету (1865–2000)» [3] та «Історія біологічного факультету Ужгородського державного університету» [16] інформація вкрай обмежена і не завжди достовірна.

Спроба відновити життєвий і науково-педагогічний шлях Ю.В. Медведєва здійснена на підставі вивчення матеріалів Державного архіву Одеської області, архівів Одеського та Ужгородського національних університетів, Одеської національної академії харчових технологій, архіву Наукового національного центру виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова, особистих архівів родин колишніх викладачів і студентів, які працювали з Ю.В. Медведєвим, дослідницьких інтерв'ювань членів родини професора Ю.В. Медведєва.

Народився Ю.В. Медведєв 05.09.1903 у містечку Ленчиці Калиської губернії (у той час територія Царства Польського) в родині акцизного чиновника. Після закінчення Первомайської чоловічої гімназії (тоді Одеська обл.) у 1920 році брав участь в бойових діях у складі 14 Комармії, де виконував обов'язки секретаря Реввійськтрибуналу [24, 26].

У посвідченні, виданому Харківським сільськогосподарським інститутом (ХСПІ) Ю.В. Медведєву, читаємо: «... з квітня 1921 р. до квітня 1923 р. [навчався] у Кам'янець-Подільському СПІ, а з 1923 р. у Харківському СПІ до грудня 1923 р. прослухав курс з факультету сільськогосподарського і виконав усі вимоги чинного навчального плану задовільно, а також самостійну роботу з теми «Вплив умов перебування води у клітину на виявлення деяких факторів врожаю», тези якої захистив перед випробувальною комісією 26 березня 1925 р., і заслуговує звання агронома з нахилом у бік рослинництва» [36].

У ХСПІ в той час лекції з фізіології рослин читав видатний учений, учень і послідовник К.А. Тимірязєва, професор В.С. Буткевич, який приділяв велику увагу дослідженням з біохімії рослин. Під його впливом Ю.В. Медведєв захопився вивченням фізіології і біохімії рослин. На останньому курсі Ю.В. Медведєв проходив виробничу практику (04.1924–04.1925) на Одеській сільськогосподарській випробувальній станції під керівництвом професора-генетика А.А. Сапегіна, але захоплення фізіологією і біохімією перемогло, і після закінчення інституту у 1925 р. він вступив до аспірантури Одеського сільськогосподарського інституту на кафедру анатомії і фізіології рослин до відомого професора-фізіолога Г.А. Боровикова [1, 24]. Одеський СПІ тільки в 1923 році одержав постійне приміщення, тому матеріальна база була ще дуже бідною. Ботанічна лабораторія, яка забезпечувала навчальний процес і дослідну роботу з анатомії, фізіології рослин і сільськогосподарської мікробіології,



була недостатньо облаштована навіть для проведення практичних робіт зі студентами. «Для ведення наукової роботи, особливо з фізіології рослин, лабораторія зовсім не пристосована, і два аспіранти, які залишені для підготовки до професорського звання тов. Шумаков і тов. Медведєв, вимушені вести роботу в інших установах», — пише проректор ОСГП С.О Воробйов [1, 200].

Ю.В. Медведєв був відряджений для удосконалення до Лабораторії біохімії та фізіології рослин АН СРСР (Ленінград). Тут під керівництвом завідувача лабораторії професора С.П. Костичева (1887—1931) він вивчає біохімію процесів дихання рослин та бродіння. До 1932 р. Ю.В. Медведєв працює у цій же лабораторії науковим співробітником II-го, потім I-го розрядів, а пізніше — старшим ботаніком, і продовжує вивчення ферментативних окисно-відновних процесів у рослинних клітинах і дріжджах [24].

У 1932 р. Ю.В. Медведєва обрано доцентом Ленінградського державного університету, де він першим в СРСР розпочав викладати лекційний курс та вести практикум з вивчення ферментів, і видав друком свою монографію «Новые направления в учении о ферментах» [6].

У 1933 році Ю.В. Медведєва призначають начальником біохімічного цеху Череповецького експериментального гідролізного заводу, де протягом двох років він працював над організацією виробництва етилового спирту з деревини (йому належить низка винаходів у розробці приладів і технології безперервного бродіння вуглеводовмісних розчинів для одержання гідролізного спирту) [26, 37].

У 1936 р., на запрошення академіка М.Д. Зелінського, Ю.В. Медведєв переїхав до Москви, де працював у Хімічному секторі Всесоюзного інституту експериментальної медицини. 26 грудня того ж року на засіданні вченої Ради інституту захистив докторську дисертацію на тему: „Кинетическая теория биохимических процессов» [21].

1937 р. Ю.В. Медведєв був обраний за конкурсом завідувачем кафедри анатомії та фізіології рослин Харківського державного університету. 29 жовтня 1938 р. ВАК ВКВШ затвердив його у званні професора по кафедрі анатомії та фізіології рослин [20]. 1 липня 1941 р. «за відсутністю педагогічного навантаження» Ю.В. Медведєва звільнено з посади.

1941 р. Ю.В. Медведєва за конкурсом обрано завідувачем кафедри хімії зерна Одеського інституту інженерів борошномельної промисловості та елеваторного господарства (Одеський борошномельний інститут) [27]. Він також був прийнятий за сумісництвом до науково-дослідного Зоолого-біологічного інституту (Зообін) Одеського державного університету (ОДУ) на посаду завідувача лабораторії [40]. Після евакуації ОДУ Ю.В. Медведєв залишає Одесу і пробивається до м. Миргорода (Полтавської обл.), де його родина тимчасово перебувала у родичів дружини. Так він опинився на окупованій території.



Свою діяльність у роки війни Ю.В. Медведєв у 1949 р. скорочено описав в анкеті:

«З 23.10.1941 р. — до січня 1942 р. був у Харкові, не працював.

З 09.02. — 03.04.1942 р. знаходився у м. Полтаві, не працював.

З 03.04. — 29.06.1942 р. був директором сільськогосподарського технікуму в м. Миргороді.

З 01.07. — 13.09.1942 р. був директором сільськогосподарського технікуму в м. Полтаві. За сумісництвом працював технологом.

З 15.09.1942 р. — 10.08.1943 р. викладав на політехнічному факультеті Одеського університету» [27]. У період тимчасової окупації м. Одеси (1941—1943 рр.) румунською владою було відновлено роботу Одеського університету. Під егідою університету об'єднано всі вузи довоєнної Одеси на правах факультетів. Політехнічний інститут став політехнічним факультетом університету [4].

У вересні 1943 р. Ю.В. Медведєв знову повертається до м. Миргорода, 17.09.1943 р. перетинає лінію фронту і опиняється на радянській території [27].

Після тривалої важкої хвороби навесні 1944 р. Ю.В. Медведєв добрався до звільненого м. Києва, де одержав призначення на роботу в ОДУ на посаду завідувача кафедри біохімії і мікробіології. Очікуючи повернення з евакуації університету, з 01.08.1944 р. почав працювати завідувачем кафедри хімії зерна в Одеському борошномельному інституті [39]. З жовтня 1944 р. очолив кафедру біохімії та мікробіології в ОДУ і також був призначений директором ботанічного саду. Як директор він отримав квартиру на території ботанічного саду і перевіз сюди свою родину [34].

У травні 1945 р. в університеті була створена самостійна кафедра біохімії, яку очолив Ю.В. Медведєв, а наприкінці року його призначено ще й завідувачем сектору біохімії Зообіну ОДУ, де він обладнав біохімічну лабораторію [40]. Як свідчать літературні джерела і архівні документи, в цей період Ю.В. Медведєв зі співробітниками розпочали дослідження в декількох напрямках: вивчення кінетики гідролізу крохмального клейстеру солодовою амілазою, пошуки нових активаторів амілази, вивчення теплостійкості активаторів амілази, вплив фталевої кислоти на бродіння дріжджів та ін. (рис. 1) [8; 9; 10; 28; 38]. У зв'язку з цим він відмовився від керівництва ботанічним садом, а з 1947/48 н.р. і від сумісництва у борошномельному інституті [39].

До складу кафедри і лабораторії біохімії входили професор Ю.В. Медведєв, доцент Б.С. Дмитрієв (до серпня 1946 р.), доц. Г.О. Івановська та асистенти О.О. Ярцева і В.І. Смирнова (з 01.09.1947). Кафедра і лабораторія розташовувалися на другому поверсі головного корпусу ОДУ (вул. Дворянська, 2) з вікнами на вул. Пастера. Після відмови від керівництва ботанічним садом родина Ю.В. Медведєва переїхала до нової квартири (вул. Пастера, 19, кв. 30) [34].



В известной своей работе
 "Исследования по физиологии питания, фер-
 ментации и дыхания у грибов аспергилла"
 В.И. Смирнова (с. 200 отрывок)
 французской работы по водороду,
 окислению и ферментативным действиям
 грибов аспергилла. В этой работе
 приводятся сведения В.И. Смирновой не
 только о грибах, но и о других
 высших грибах. В французской
 работе, описанной в биохимии микробов,
 г-н Смирнова названа значительной удачи.
 Кроме известной работы
 В.И. Смирнова помогла мне в моей личной
 экстенсивной работе по "высокой ферментации"
 хлеба на дрожжах дрожжей (в. медведь).
 Экстенсивной и амплитудной дачей
 г-н Смирновой можно ~~было~~ назвать,
 как свои личны.
 г-н Смирнова отлично проявила себя и на
 работе в франко-русских условиях (в. Драмонта 202).
 Киев 2.8.54. Директор биологической
 наук, проф. Ю.В. Медведев. (Ю.В. Медведев)

Рис. 1. Відгук професора Ю.В. Медведєва про роботу В.І. Смирної
 Автограф. Фрагмент. Друкується вперше [28].

Fig. 1. Yu.V. Medvedev's comments upon V.I. Smirnova's work.
 Autograph. Fragment. First publishing [28].

На біологічному факультеті Ю.В. Медведєв читав загальний курс «Біохімія» і низку спецкурсів: «Ферментологія», «Хімія зерна», «Хімія бродіння» та ін. [22]. У 1944–1945 н.р. викладав також і загальний курс «Мікробіологія». Під його керівництвом співробітники-мікробіологи продовжили свої дослідження. Ю.В. Медведєв розширив коло проблем, над якими працювала кафедра мікробіології, крім вивчення бактеріальної флори багато уваги у цей період приділялося одноклітинним грибам. Він збагатив методику вивчення мікроорганізмів, втіливши біохімічні методи і започаткував створення біотехнологій на основі мікроорганізмів [5].

Фуркант кафедри біохімії, випускниця ОДУ 1947 р. Смирнова В.І., пригадує: «Юрій Васильович дуже гарно читав лекції, найскладніші біохімічні цикли він пояснював так артистично, що всім було все зрозуміло. Юрій Васильович був дуже вимогливим викладачем і, щоб одержати гарну оцінку на екзамені, треба було багато попрацювати протягом семестру» [34].

Свідчення високої вимогливості до студентів Ю.В. Медведєва також містяться і в матеріалах партійних зборів біологічного факультету на яких обговорювалися підсумки зимової сесії 1947/48 н.р., де викладачі дійшли висновку, що причиною неуспішності з біохімії є те, що студенти-біологи мають недостатню базову шкільну підготовку з хімії. І в своїх виступах запропонували ввести на біологічному факультеті вступний іспит з хімії, що, до речі, було зроблено з наступного навчального року [31].

«Ю.В. Медведєв організував науковий студентський гурток з біохімії. На засідання гуртка він приносив журнал «Nature» і знайомив студентів з науковими новинами, перекладав уривки зі статей іноземних авторів. Юрій Васильович вільно володів німецькою, трохи гірше англійською і французькою мовами [34].

Як грамотний біолог і справжній учений Ю.В. Медведєв відкрито протистояв «лисенківському осередку», що формувався на той час на біологічному факультеті ОДУ, тому впав у немилість у керівництва факультету. Ректором університету до серпня 1948 року був член-кореспондент АН УРСР професор М.П. Савчук, який високо цинив професора Ю.В. Медведєва, вважав його видатним ученим і не дозволяв факультетському керівництву здійснювати на нього тиск [33]. Після призначення М.П. Савчука Міністром освіти УРСР (серпень 1948 р.) керівництво факультету і університету перейшло до рук прибічників Т.Д. Лисенка і проти Ю.В. Медведєва розпочалися репресивні дії. Наукові роботи, які виконувалися під його керівництвом, ретельно розглядалися на партійних зборах [31, 32].

Йому пригадали дружбу й активний захист доцента Ю.П. Мірюти (1905–1976), який з 1944 по 1948 рік очолював кафедру селекції і насінництва Одеського сільськогосподарського інституту і за сумісництвом працював на посаді доцента ОДУ, де читав курс «Генетика». Докторська дисертація Ю.П. Мірюти «Генетична суть гетерозису» викликала шалений

опір зі сторони прихильників Т.Д. Лисенка і він був звільнений з усіх посад і мусив шукати нову роботу [2, 19]. Ю.В. Медведєв був також одним із небагатьох хто відкрито виступив на підтримку фітогормональної теорії М.Г. Холодного і, щоб позбавитися його, лисенківське керівництво ліквідувало кафедру біохімії. Згідно з наказом МВО СРСР № 901 від 18.07. 1949 р., Ю.В. Медведєва було звільнено з роботи «у зв'язку з ліквідацією кафедри біохімії» [29]. Лабораторію біохімії, яка знаходилася територіально при кафедрі, а де-юре була підпорядкована Зообіну, перевели у необладнану кімнату студентського гуртожитку (вул. Щепкіна), а у грудні 1949 р. і сектор біохімії Зообіну було ліквідовано [34]. Син професора Ю.В. Медведєва, Сергій Юрійович, пригадує: «Після звільнення батька з Одеського університету для родини настали дуже важкі часи. Батьки без роботи, всі знайомі та друзі відверталися при зустрічі. Спочатку продавали все, що могли продати (меблі, одяг), а потім вже нічого було і продавати, жили надголодь. Це справило на батька дуже негативний вплив на все подальше життя» [35].

Майже після року поневірянь Ю.В. Медведєву вдалось працевлаштуватися в Український науково-дослідний інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова, куди у березні 1951 р. його прийняли на посаду завідувача відділу виноробства [23, Наказ № 24]. Як видно з архівних документів, Ю.В. Медведєв розпочав тут активну роботу — за п'ять місяців взяв участь у Всесоюзних, Всеукраїнських нарадах і конференціях. Він ретельно вивчив технологію виготовлення вина, вніс пропозиції, які у півтора-два рази знижували втрати вина в процесі його купажування [11, 20–21]. Довів необхідність створення в інституті лабораторії енохімії (хімії вина). Адміністрація інституту підтримала ініціативу професора Ю.В. Медведєва і подала про це клопотання до Міністерства харчової промисловості УРСР. Але вже в серпні того ж року, «...на підставі відсутності штатної одиниці у поточному році, професора Медведєва Ю.В. від роботи в Інституті звільнили» [23, Наказ № 86]. Знову почалося тяжке життя безробітного професора.

Навесні 1952 р. він виїхав з Одеси разом із дружиною — Долгялло Єлизаветою Олексіївною (11.09.1914—28.12.1973) і чотирма дітьми — Тетяною (1939—2002), Сергієм (13.01.1943), Петром (15.07.1944), Михайлом (02.08.1947). «Їхали потягом у товарному вагоні разом із залишками меблів і речей кілька діб. Зупинилися на станції Берегова (Закарпатська обл.). Батько влаштувався на дослідну сільськогосподарську станцію в с. Велика Бакта, де нам виділили дві кімнати. Там ми прожили десь два місяці, а потім переїхали до м. Ужгорода (вул. Висока, 1). Він постійно був у відрядженнях, їздив по області, оскільки дослідні ділянки знаходилися в різних колгоспах» [35].

Після серпневої сесії ВАСГНІЛ 1948 р. будь-яка критика «наукових» теорій Т.Д. Лисенка і його приспівників розглядалась як виступ проти генеральної лінії партії, тому всі не згодні заносились до списків ворогів.



Ю.В. Медведєв опинився в рядах учених, праці яких було не бажано друкувати; за десять років у нього була надрукована тільки одна невелика стаття [7]. В архіві родини зберігалися більше десяти рукописів статей, підготовлених до друку в цей період, але під час термінового виїзду з м. Душанбе у 1991 році вони були втрачені [5].

У своїй автобіографії Ю.В. Медведєв пише: «За розпорядженням ЦК КПРС був направлений на наукову роботу з сільського господарства і призначений завідувачем лабораторії агрохімії і ґрунтознавства Закарпатської сільськогосподарської випробувальної станції «Велика Бакта», яка розташована у сільській місцевості [24]. Фактично це було політичне заслання опального професора. Але і тут Ю.В. Медведєв розпочав активну наукову роботу: розробляв методи створення багатовидових агрофітоценозів, методику фосфорилювання ґрунтів, засоби вирощування врожаїв озимини та вівса на торішніх люцернових полях для економії азотних добрив. На жаль, з цієї проблеми надруковано лише одну статтю [12].

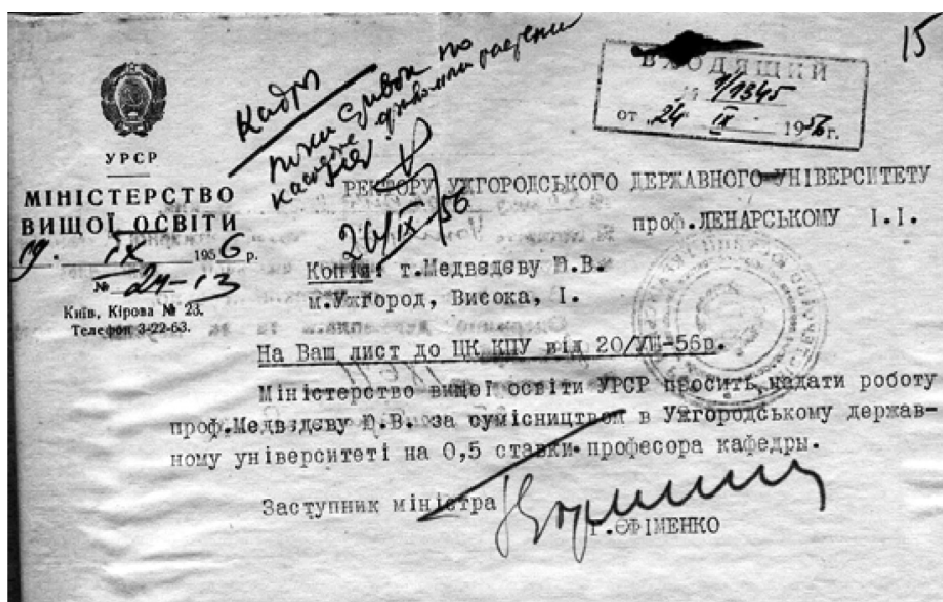


Рис. 2. Лист ректору Ужгородського держуніверситету професору Лекарському І.І. Оригінал [25].

Fig.2. The letter to professor Lekarsky I.I. the rector of Uzhgorod University. The original [25].

Науковий потенціал ученого і великі практичні досягнення в галузі сільського господарства не залишилися поза увагою керівництва області, і в 1955 році Ю.В. Медведєва призначають начальником відділу науки обласного управління сільського господарства Закарпатської області [26, 4]. Але до викладацької роботи його не допускали. Поруч з м. Ужгородом, де в новому університеті було обмаль висококваліфікованих кадрів,

працював видатний учений, але тільки в 1956 р. ректору Ужгородського державного університету ЦК КПУ було дозволено «...надати роботу професору Ю.В. Медведєву за сумісництвом (...) на 0,5 ставки професора кафедри» (рис. 2) [25]. Професора Медведєва було зараховано на кафедру фізіології рослин і дарвінізму, а в 1957 він повністю перейшов на посаду професора цієї кафедри, де працював до 1958 року.

Останній період науково-педагогічної діяльності професора Ю.В. Медведєва проходив у столиці Таджикицької РСР м. Душанбе, куди в серпні 1958 р. він переїхав на постійне місце проживання (вул. Леніна, 56, кв. 3).

Навесні 1958 року Ю.В. Медведєв подав заяву до участі в конкурсі і був обраний на посаду завідувача кафедри ботаніки агрономічного факультету Таджикицького сільськогосподарського інституту (нині Таджикицький аграрний університет) і 13.08.1958 (Наказ № 38 по ТАУ). Кафедру ботаніки Ю.В. Медведєв очолював до 25.03.1965 р., а до 25.12.1965 р. був професором цієї кафедри (Наказ № 272 по ТАУ) [30].

У липні 1965 року він був обраний на посаду завідувача кафедри фізіології і біохімії рослин біологічного факультету Таджикицького державного університету ім. Леніна (нині Таджикицький національний університет), але за станом здоров'я, влітку 1968 року вийшов на пенсію. Помер Ю.В. Медведєв 06.09.1969 р. в м. Душанбе, де похований на міському кладовищі.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Воробьев С.О.* Современное состояние научно-вспомогательных учреждений Одесского сельскохозяйственного института // *Вісті Одеського СГІ.* — 1925—1926. - Вип. 1. — С. 197—210.
2. *Голда Д.М.* Генетика. Історія. Відкриття. Персоналії. Терміни. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 128 с.
3. *Історія Одеського університету (1865—2000);* Наукове видання / Головний редактор В.А. Сминтина. — Одеса: Астропринт, 2000. — 226 с.
4. *Кузнецов В.О., Тоцький В.М.* Одеський державний університет імені І.І. Мечникова в період Великої Вітчизняної війни 1941—1945 рр. // *Вісник ОНУ.* — 2005. — Т. 10., вип. 3. — Біологія. — С. 175—199.
5. *Кузнецов В.О.* Професор Юрій Васильович Медведєв (05.09.1903—06.09.1969). // *Історія української науки на межі тисячоліть: Зб. наук. праць / Від. редактор О.Я. Пилипчук. К., 2009. — Вип. 41. — С. 111—123.*
6. *Медведєв Ю.В.* Новые направления в учении о ферментах. — Л.: Изд-во АН СССР, 1932. — 124 с.
7. *Медведєв Ю.В.* Новые данные по температурной активации физиолого-химических процессов растений // *Тезисы Всесоюзного совещания физиологов растений (г. Москва, 1940).* — М., 1940.



8. *Медведев Ю.В.* Фталева кислота — новый тип активатора биохимических процессов растительной клетки // Тез. докл. научн. сессии ОГУ (Одесса, 1947 г.). — Одесса, 1947.

9. *Медведев Ю.В.* О взаимодействии инвертазы с сахарозой: сообщение 5 серий — энзим-субстрат соединение в механизме ферментативных реакций // Труды ОГУ. — 1948. — Т. 3 (56): Сборник работ ЗООБИНа. — Т. 1, вып. 1. — С. 5—11.

10. *Медведев Ю.В.* О взаимодействии инвертазы с сахарозой // Сб. работ НИИ зоологии и биологии. — 1948. — Т. 1., вып. 1 — С. 5—13.

11. *Медведев Ю.В.* Причины потерь при купажировании // Виноделие и виноградарство СССР. — 1951. — № 10. — С. 20—21.

12. *Медведев Ю.В.* Посев озимых хлебов и овса в растущую люцерну прошлых лет без затраты азотных удобрений // Доклады и сообщ. УжГУ. Серия биол. Ужгород, 1957. — № 1. — С. 16—18.

13. *Медведев Юрій Васильович* // Вчені вузів Одеси: біобібліографічний довідник. Вип. 2. — Природничі науки (1946—1997). — Частина 5. — Біологи. Упорядник Л.О. Кольченко. — Одеса, 1999. — С. 87—88.

14. *Професори* Одеського (Новоросійського) університету: Біогр. словник. Т. 3. К-П / Відп. ред. В.А. Сминтина. Одеса: Астропринт, 2000. — 542 с.

15. *Професори* Одеського (Новоросійського) університету: Біогр. словник. Т. 3. К-П. - 2-е вид., доп. / Відп. ред. В.А. Сминтина. Одеса: Астропринт, 2005. — 600 с.

16. *Рошко В.Г.* Історія біологічного факультету Ужгородського національного університету. Ужгород: Мистецька лінія, 2004. — 140 с.

17. *Список членів Українського ботанічного товариства. Дійсні члени* // Щорічник УБТ. — № 1. — К.: Вид-во АН УРСР, 1959. — 88 с. — С. 52—83

18. *Файтельберг Р.О.* Пережитое. — Одеса: Маяк, 1991. — 176 с.

19. *Юрій Петрович Мирюта.* Цитология и генетика, 1977. Т.11. — № 2. — С. 182—183.

АРХІВНІ МАТЕРІАЛИ

20. *Аттестат* професора ПР № 001767, Москва 7 марта 1946 г. Нотаріальна копія. Архів Уж.НУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 8.

21. *Диплом* доктора наук ДТ №000390, Москва 7 марта 1946 г. Нотаріальна копія. Архів Уж.НУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 9.

22. *Зачетная книжка* студента Одесского университета Смирновой В. И. 1943—1947 у.г. Оригінал. Родинний архів Смирнової В.І. — 39 с.

23. *Книга* приказов по Украинскому научно-исследовательскому институту виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова. 2 января 1951 — 31 декабря 1952 г. Архів УНДІВіВ імені В.Є. Таїрова. — Оп. 1л. — Од. зб. 22



24. *Краткая автобиография* профессора Медведева Юрия (Георгия) Васильевича. Машинопис. Оригінал. Архів Уж.НУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 5–6.

25. *Лист* ректору Уж.ДУ проф. Лекарському І.І. від 19.09.1956 р. № 24-13 Оригінал. Архів Уж.НУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 15.

26. *Личный* листок по учету кадров Медведева Юрия Васильевича. Автограф. Оригінал. Архів Уж.НУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 3,4.

27. *Медведев Ю.В.* Анкета, 1949. Рукопис. / Рукописний фонд НБ ОНУ імені І.І. Мечникова. Біологи. — Спр. М-Я.

28. *Отзыв* профессора Ю.В. Медведева о работе Смирновой В. И. 2.10.1951. Автограф. Оригінал. Родинний архів Смирнової В.І. — 2 с.

29. *Отчет* Одесского Государственного Университета за 1949/1950 учебный год. Рукописний фонд НБ ОНУ імені І.І. Мечникова.

30. *Повідомлення* ректора ТАУ Іззатулло Сатторі від 12.02.2009. *Особистий архів автора. Машинопис.* — 1с.

31. *Протокол* № 3 Общего партийного собрания Одесского государственного университета от 12 февраля 1948 года. ДАОО.- Ф. П-90. — Оп. 1. — Од.зб. 46. — Арк. 1–3.

32. *Протокол* № 3 Общего партийного собрания Одесского государственного университета от 2 марта 1949 года. ДАОО.- Ф. П-90. — Оп. 1. — Од. зб. 54. — Арк. 48–53.

33. *Стенограмма* заседания ученого совета биологического факультета Одесского государственного университета имени И.И. Мечникова от 23 июня 1956 года. *Особистий архів автора. Оригінал. Машинопис.* — 110 арк.

34. *Стенограмма* исследовательской беседы с В.И. Смирновой 2009. *Особистий архів автора. Рукопис.*

35. *Стенограмма* исследовательской беседы с С.Ю. Медведевым 2009. *Особистий архів автора. Рукопис.*

36. *Удостоверение* Харьковского СХИ Ч 1824 от 2 мая 1925г. / Нотаріальна копія. Архів УжНУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 7.

37. *Устройство* для непрерывного сбраживания сахаросодержащих жидкостей. Авт. свид. № 44527, 1935. / Архів УжНУ. — Особиста справа Медведева Ю.В. — Арк. 7.

38. *Характеристика* на Смирнову В.И. От 31 марта 1950 г. Родинний архів В.І. Смирнової. Оригінал. Машинопис. — 1 с.

39. *Штатный* формуляр профессорско-преподавательского состава Одесского института инженеров мукомольной промышленности и элеваторного хозяйства на 1947–48 уч. г. Данные составлены по состоянию на 20 августа 1947 г. Архів ОНАХТ. — Ф. 4. — Оп. 1-Л. — 1947. — Од. зб. 160. — Арк. 6.

40. *Штатный* формуляр сотрудников Научно-исследовательского зоолого-биологического института ОГУ, 1930–1941 гг. ДАОО. — Ф Р-1481. — Опис 1. — Спр. 1.



УДК: 579:923 Медведєв (477.74)

В.А. Кузнецов

Центр досліджень історії освіти, науки і техніки на юге України
імені В.І. Липського, ул. Новаторов, 5-а, Одеса, 65049, Україна,
тел.: +38 (048) 705 10 24, e-mail: cuznetsov@meta.ua

**НАУЧНАЯ И ПЕДАГОГИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ПРОФЕССОРА
ЮРИЯ ВАСИЛЬЕВИЧА МЕДВЕДЕВА
(05.09.1903 — 06.09.1969 ГГ.)**

Реферат

Статья посвящена изучению жизни и научно-педагогической деятельности известного ученого-биохимика Юрия Васильевича Медведєва, который в 1945—1946 гг. возглавлял кафедру биохимии и микробиологии в Одесском государственном университете.

Ключевые слова: история микробиологии, Ю.В. Медведєв, Одесский университет.

УДК: 579:923 Медведєв (477.74)

V.O. Kuznetsov

South Ukrainian Education, Science and Technology History
Research Centre named after V.I. Lypsky, 5-a, Novatorov Str., Odesa, Ukraine, 65049,
tel.: +38 (048) 705 10 24, e-mail: cuznetsov@meta.ua

**PROFESSOR YURIY VASILIEVICH MEDVEDEV
(05.09.1903 — 06.09.1969) SCIENTIFIC AND PEDAGOGICAL
ACTIVITY**

Summary

This work is devoted to the life and scientific-pedagogical activity of the outstanding scientist-microbiologist Professor Yuriy Vasilievich Medvedev who headed the Chair of Biochemistry and Microbiology of Odesa State University in 1945—1969.

Key words: history, microbiology, J.V. Medvedev, Odesa University.

Одержано 23.01.2012.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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



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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



INFORMATION FOR THE AUTHORS

Scientific journal «Microbiology and biotechnology» invites you to spotlight

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

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

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

Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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

Наукове видання

«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**№ 1(17)
2012**

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 20.03.2012 р. Формат 70x108/16.
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

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