

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

**№ 4 (16)
2011**

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL
№ 4(16) 2011



EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

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
№ 4(16) 2011



ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

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

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

ВИДАВЦІ

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

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

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

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39

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

www.mbt.onu.edu.ua

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- M.M. Chaban, V.O. Ivanytsia**
ANAMMOX BACTERIA – UNIQUE MICROORGANISMS
OF NITROGEN CYCLE 6

EXPERIMENTAL WORKS

- I.O. Maliarchik, B.M. Galkin, T.O. Filipova**
INFLUENCE OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-BENZENSULFONAMIDE
DERIVATIVES ON THE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*
GROWTH, BIOFILM FORMATION AND TUMORIGENIC ACTIVITY.. 17

- L.V. Avdeeva, A.I. Osadchaya, M.A. Kharkhota**
LYTIC ACTIVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH CELLULOLYTIC
AND ANTAGONIST ACTIVITY OF BACILLI..... 27

- S.V. Serga, I.A. Kozeretska**
WOLBACHIA FROM NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA*
MELANOGASTER FROM UKRAINE 35

- D.R. Abdulina, L.G. Asaulenko, L.M. Purish**
GROWTH DYNAMICS OF THE SULFIDOGENIC MICROBIAL
COMMUNITY POPULATIONS..... 43

- K.G. Dreval, K.V. Kuznetsova, A.V. Yudina, M.I. Boyko**
DYNAMICS OF CELLULASE SYNTHESIS BY HIGHER
WOOD-DEGRADING BASIDIOMYCETES..... 52

- I.M. Malynovska**
COMPOSITION OF MICROBIAL COMMUNITIES OF ROOT ZONE
OF THE PLANT COMMUNITIES OF DIFFERENT TYPES 60

- T.E. Voloshko, O.V. Fedotov**
SCREENING OF ANTIOXIDANT OXIDOREDUCTASES
OF STRAINS OF BASIDIOMYCETES 69

- M.B. Gorishniy, S.P. Gudz, S.O. Hnatush**
FORMATION OF SULPHUR COMPOUNDS WITH DIFFERENT
OXIDATION BACTERIAL CELLS *CHLOROBBIUM LIMICOLA* IMB K-8 ..82

PAGES OF HISTORY

- V.O. Ivanytsia, N.G. Yurgelaitis, T.V. Burlaka**
DANYLO KYRYLOVYCH ZABOLOTNY. LIFE IN SCIENCE..... 90

- ALPHABETIC INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL
«MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY» IN 2011 YEAR 102
INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 111

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

М.М. Чабан, В.О. Іваниця

АНАММОКС БАКТЕРІЇ – УНІКАЛЬНІ МІКРООРГАНІЗМИ
КРУГООБІГУ АЗОТУ 6

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

І.О. Малярчик, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

ВПЛИВ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ ТА ЙОГО
ПОХІДНИХ НА РІСТ, УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ТА ТУМОРОГЕННУ
АКТИВНІСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* 17

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

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЛІТИЧНОЇ, ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНОЇ
ТА АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАЦИЛ 27

С.В. Серга, І.А. Козерецька

WOLBACHIA В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER УКРАЇНИ 35

Д.Р. Абдуліна, Л.Г. Асауленко, Л.М. Пуріш

ДИНАМІКА РОСТУ ПОПУЛЯЦІЇ СУЛЬФІДОГЕННОГО
МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ 43

К.Г. Древаль, К.В. Кузнецова, А.В. Юдіна, М.І. Бойко

ДИНАМІКА СИНТЕЗУ ЦЕЛЮЛАЗ ВИЩИМИ
ДЕРЕВОРУЙНІВНИМИ БАЗИДІАЛЬНИМИ ГРИБАМИ 52

І.М. Малиновська

СКЛАД МІКРОБНИХ УГРУПОВАНЬ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ
ФІТОЦЕНОЗІВ РІЗНОГО ТИПУ 60

Т.Є. Волошко, О.В. Федотов

СКРИНІНГ ШТАМІВ БАЗИДІОМІЦЕТІВ ЗА АКТИВНІСТЮ
АНТИОКСИДАНТНИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ 69

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

УТВОРЕННЯ СПЛУК СІРКИ З РІЗНИМ СТУПЕНЕМ ОКИСНЕННЯ
БАКТЕРІЯМИ *CHLOROBIVUM LIMICOLA* ІМВ К-8 82

С Т О Р І Н К И І С Т О Р І Ї

В.О. Іваниця, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Бурлака

ДАНИЛО КИРИЛОВИЧ ЗАБОЛОТНИЙ. ЖИТТЯ В НАУЦІ 90

АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ
У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2011 РОЦІ ... 102

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 107

УДК 579.266.2

М.М. Чабан, В.О. Іваниця

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

АНАММОКС БАКТЕРІЇ – УНІКАЛЬНІ МІКРООРГАНІЗМИ КРУГООБІГУ АЗОТУ

Наведено дані щодо мікроорганізмів із здатністю до ANAMMOX процесу, які беруть участь у циклі кругообігу азоту в природі. Ці унікальні мікроорганізми є представниками філіуму Planctomycetes. Описано будову клітини анаммокс бактерій, що здатні в анаеробних умовах використовувати амоній і нітрит для генерації енергії завдяки наявності у них специфічної органели – анаммоксосоми. Розглянуто біохімічний цикл перетворень амонію і нітриту з виділенням молекулярного азоту завдяки наявності в мембрані анаммоксосоми ладдеран ліпідів. Відображено значення анаммокс організмів у кругообігу азоту в природі та значення цих організмів для біотехнології очистки стічних вод від великих концентрацій амонію при незначних енергозатратах.

Ключові слова: анаммокс бактерії, систематика, будова, анаммоксосома, метаболізм, очистка стічних вод.

Аміак, нітрит і нітрат є головними проміжними сполуками у великому циклі азоту в біосфері. Вони утворюються та перетворюються через процеси фіксації азоту, нітрифікації, амоніфікації і денітрифікації [13]. У кінці 70-х років минулого століття Е. Брода зробив припущення про існування анаеробного окиснення аміаку до молекулярного азоту (N_2) за допомогою хемолітоавтотрофних мікроорганізмів [2].

У 1995 році на пілотній установці з очищення стічних вод в Нідерландах було виявлено значне зменшення амонію та виділення великої кількості газу N_2 [12]. Біологічний процес анаеробного окиснення амонію з подальшим виділенням молекулярного азоту було названо Анаммох (ANaerobic AMMonium OXidation). При цьому амоній виступає донором, а нітрит акцептором електронів. Подальші більш глибокі дослідження показали, що за анаммокс процес відповідають хемоавтолітотрофні мікроорганізми, існування яких передбачав Е. Брода ще у 1977 році, ґрунтуючись на зроблених ним термодинамічних обчисленнях [22, 23].



Після тривалих експериментів з накопичення біомаси було отримано культуру, що росте експоненціально, в якій частка анаммокс бактерій склала 70% [19]. Це дало можливість виділити у анаммокс бактерій 16S рРНК та у подальшому визначити їх систематичне положення серед прокаритних мікроорганізмів. Після розшифровки послідовностей і підбору праймерів було встановлено, що анаммокс бактерії відносяться до філіуму Planctomycetes. Відкриті мікроорганізми були названі *Candidatus Brocadia anammoxidans* [20].

Після підтвердження існування анаммокс бактерій, їх почали виділяти з різноманітних систем очищення води і морських екосистем. У результаті дослідження генів 16S рРНК анаммокс бактерій було виявлено та ідентифіковано інших представників: “*Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*”, “*Candidatus Scalindua sorokinii*”, “*Candidatus Scalindua brodae*” і “*Candidatus Scalindua wagneri*” [9, 14, 15]. Філогенетичний аналіз послідовностей 16S рРНК відкритих анаммокс бактерій показав, що вони формують монофілетичний порядок у межах філіуму Planctomycetes, який включає три роди (рис. 1) з 90-відсотковою подібністю генів 16S рРНК між ними [14].

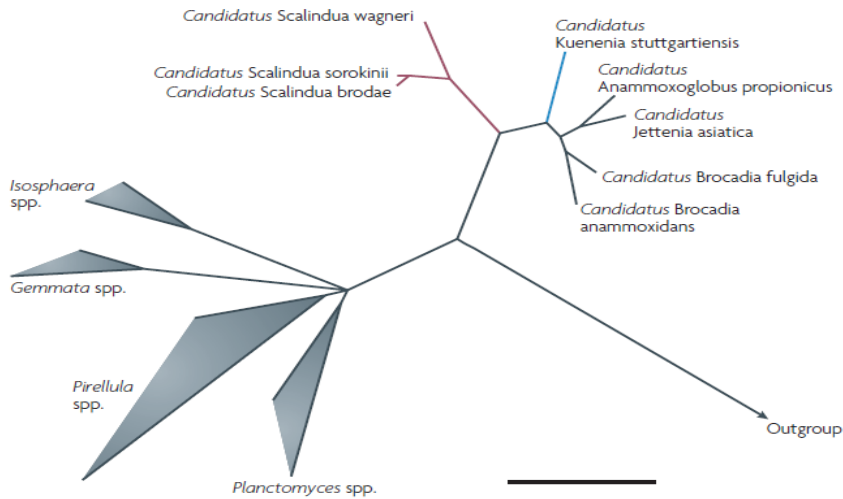


Рис. 1. Філогенетичне дерево анаммокс бактерій, побудоване на основі аналізу генів рибосомної 16S РНК.

Рисунок показує подібність різних родів анаммокс бактерій серед Planctomycetes. Дивергенція послідовності Planctomycetes від інших Bacteria (на рисунку показані як «outgroup») є високою. Риска масштабування означає 10%-у дивергенцію послідовності (Рисунок виконаний М. Jetten і колегами, університет Radboud, Nijmegen, The Netherlands) [4]

Fig. 1. A 16S ribosomal RNA-gene-based phylogenetic tree of anammox bacteria. The figure illustrates the relationships of the different families of anaerobic ammonium oxidation (anammox) bacteria among the Planctomycetes. The sequence divergence of the Planctomycetes from other Bacteria (indicated as outgroup) is high. The scale bar represents 10% sequence divergence. (Figure courtesy of M. Jetten and colleagues, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands) [4]

Порівняльний аналіз послідовностей генів 16S рРНК анаммокс бактерій з родами *Gemmata*, *Isosphaera*, *Planctomyces* і *Pirellula* з філіуму *Planctomycetes*, показав їх низьку схожість — нижче 80%. На підставі цих даних анаммокс бактерії ймовірно можуть стати другим порядком у філіумі *Planctomycetes* [29].

Клітини анаммокс бактерій мають форму коків з діаметром менше ніж 1 мкм та фізіологічно відрізняються від усіх інших представників *Planctomycetes*. Вони є облігатними анаеробними хемолітоавтотрофами, їх час генерації складає 10–30 днів. У накопичувальних культурах анаммокс бактерії утворюють навколо твердих часток чи на волокнах різного походження колонії з червоним забарвленням (рис. 2).

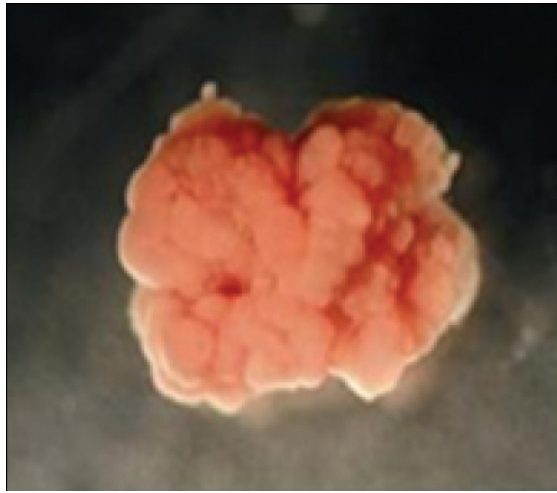


Рис. 2. Типова анаммокс колонія [4]

Fig. 2. Typical anammox granular sludge [4]

Концентрація кисню в середовищі, що перевищує 0,5%, гальмує ріст анаммокс бактерій [19].

Цитоплазма бактеріальної клітини розділена двошаровими мембранами на три відсіки (рис. 3), що було з'ясовано під час дослідження *Candidatus Brocadia anammoxidans* методом електронної мікроскопії [10]. Цитоплазма центрального відсіку оточена двошаровою анаммоксосомною мембраною, утворюючи специфічну органелу — анаммоксосому, що відповідає за генерацію енергії внаслідок окиснення амонію з утворенням молекулярного азоту [10, 27]. Цитоплазма, що знаходиться за анаммоксосомою — рибоплазма, оточена внутрішньою цитоплазматичною мембраною. У ній розташовується нуклеоїд і рибосоми. Третій відсік, що знаходиться на периферії клітини — паріфоплазма, оточений по периферії цитоплазматичною мембраною. За межами цитоплазматичної мембрани всю клітину анаммокс бактерії оточує клітинна стінка з пептидоглікану [10].

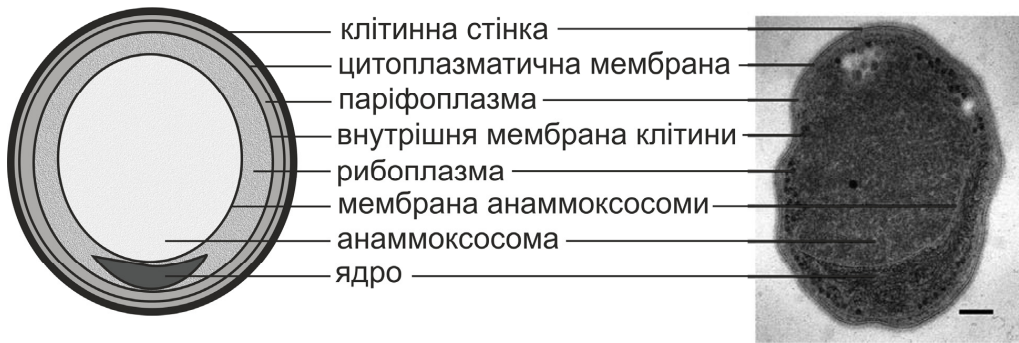


Рис. 3. Будова клітини анаммокс бактерії *Candidatus Brocadia anammoxidans*. Схематичне зображення (рисунок), ліворуч; фото тонкого зрізу *Candidatus Brocadia anammoxidans*, зроблене за допомогою електронної мікроскопії, праворуч. Риска – 100 нм. [27]

Fig. 3. The structure of the cell of anammox bacteria *Candidatus Brocadia anammoxidans*.

Schematic drawing (picture), left; thin section of cryosubstituted *Candidatus Brocadia anammoxidans* seen via transmission electron microscopy, right. Bar – 100 nm. [27]

Слід зауважити, що детальну будову зовнішньої оболонки анаммокс клітини і наявності паріфоплазми залишається все ще недостатньо вивчено. Недавні дослідження з розшифровки метаболізму анаммокс бактерій на основі сумарного генома, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, надали достовірні дані, що свідчать про наявність паріфоплазми та грамнегативноподібної клітинної стінки [21].

За унікальну можливість анаммокс бактерій анаеробно окиснювати амоній відповідає центральна органела – анаммоксосома. За допомогою мічених атомів з'ясовано, що ця органела має спеціальний фермент, який окиснює гідрозин (проміжна токсична сполука) до молекулярного азоту (N_2) [10].

При поділі клітини бактерії анаммоксосома передається вертикально від материнської до дочірньої клітини [28].

Сама анаммоксосома у складі своєї подвійної мембрани містить багато різних ліпідів, серед яких зустрічаються унікальні, властиві тільки цим бактеріям ладдеран ліпіди [18]. Визначено три типи ладдеран ліпідів (рис. 4), представлених: 1 – кільцевою системою Y та жирною кислотою; 2 – моноалкільованою кільцевою системою X та гліцерину зв'язаного з ефіром; 3 – об'єднанням кінця жирної кислоти системи Y з кінцем системою X через гліцерин зв'язаний ефір [5].

Під час досліджень ліпідного складу мембран *Candidatus Brocadia anammoxidans* виявилось, що третій тип ладдеран ліпідів широко представлений у мембранах анаммокс бактерій. Вони складають 34% від

загальної кількості ліпідів анаммокс клітини [17]. Після вивчення структури мембранних ліпідів анаммокс бактерій за допомогою газової мас-спектрометричної хроматографії і ядерно-магнітного резонансу з'явилася можливість пояснити значення ладдеран ліпідів у мембрані анаммоксосоми. Зроблено висновок, що вони забезпечують міцність мембрани анаммоксосоми, створюючи захист клітини від токсичного гідразину та беруть участь в утворенні різниці концентрації іонів і метаболітів [17, 18].

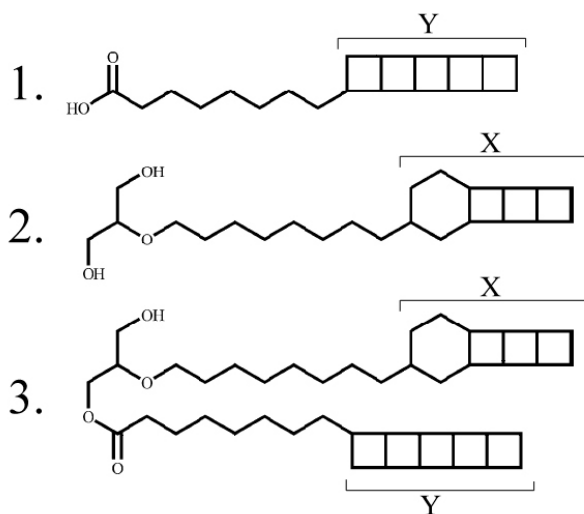
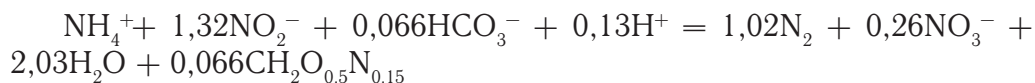


Рис. 4. Схематична будова трьох видів ладдеран ліпідів [5]

Fig. 4. Schematic structure of three types of ladderan lipids [5]

Анаммокс бактерії єдині відомі організми, які в анаеробних умовах окиснюють амоній і відновлюють нітрит з виділенням N_2 . При цьому вони генерують енергію, яка використовується для фіксації вуглекислоти. Анаммокс бактерії використовують нітрит не лише як акцептор, але і як донор електронів для фіксації діоксиду вуглецю [19].



Ця біохімічна реакція була виявлена завдяки використанню мічених атомів азоту амонію ($^{15}NH_4^+$) та нітриту ($^{14}NO_2^-$). У результаті цих досліджень були визначені такі проміжні речовини як гідроксиламін (NH_2OH) та гідразин (N_2H_4) [24]. Припускається, що гідроксиламін може утворюватися з окису азоту або нітриту, а об'єднання гідроксиламіну та амонію призводить до утворення гідразину. Реакцію об'єднання гідроксиламіну з амонієм каталізує гідразин гідролаза (НН) [4]. Після виявлення генів, відповідальних за кодування нітрит редуктази та гідрозин

оксидоредуктази, з'явилася повна картина енергетичного обміну та утворення гідразину в анаммоксосомі [21].

Таким чином, є дві біохімічні реакції енергетичного обміну та утворення гідразину, основані на нітритному та нітрит-нітратному окисненні. Гідразин, утворений у результаті об'єднання окису азоту та амонію з використанням трьох електронів гідразин гідролазою, під дією гідразин оксидоредуктази передає чотири електрони на ферредоксин та відновлює його з виділенням молекулярного азоту. Ферредоксин віддає чотири електрони на комплекс хінонів (Q) і H⁺-транслокаційний комплекс цитохрому (bc₁), для утворення протонної сили (PMF) та активації АТФ-ази з подальшим синтезом АТФ у рибоплазмі. При проході електронів по ланцюгу хінон-цитохром, електрони втрачають свою енергію та повертаються назад для утворення нового гідразину. Один електрон використовується нітрит редуктазою, а решту три електрони – гідразин гідролазою для утворення гідразину (рис. 4а).

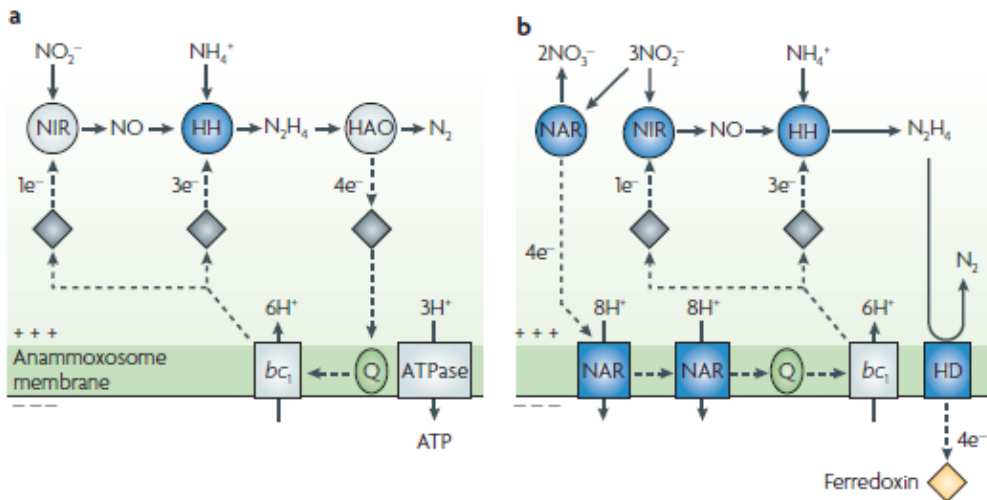


Рис. 4. Два можливих шляхи переносу електронів у мембрані анаммоксосоми [21]

NIR – нітрит редуктаза; HH – гідразин гідролаза; HAO – гідразин оксидоредуктаза; NAR – нітрат редуктаза; HD – гідразин дегідрогеназа

Fig. 4. Two possible ways to transfer electrons in membrane anammoxosome [21]

NIR – nitrite oxidoreductase; HH – hydrazine hydrolase; HAO – hydrazine oxidoreductase; NAR – nitrate reductase; HD – hydrazine dehydrogenase

Для фіксації діоксиду вуглецю відновлений ферредоксин передає чотири електрони у ацетил-СоА шлях. В результаті цієї передачі електронів виникає нехватка електронів у системі анаеробного окиснення амонію. Нехватка електронів заповнюється в результаті нітрит-нітратної окисної реакції нітрат редуктазою (NAR) двох молекул нітриту. Отримані в результаті окиснення електрони, енергетично дуже слабкі, проте після того як вони проходять через групу нітрат редуктаз у мембрані

анаммоксосоми, набирають енергію і, проходячи через хінон до цитохрому, повертаються до циклу утворення гідразину. При проходженні електронів через редуктази мембран та хінон, утворюється протонна сила (PMF), яка використовується для синтезу АТФ (рис. 4b) [21].

Додаткові біохімічні дослідження показали, що анаммокс організми, будучи автотрофами, можуть окиснювати ацетат, форміат і пропіонат до діоксиду вуглецю [3]. Дослідження з органічними речовинами, в яких були присутні мічені атома вуглецю ^{14}C , показали, що вони не асимілюються в клітинах анаммокс бактерій [6]. Окиснення ацетату, форміату і пропіонату до діоксиду вуглецю анаммокс організмами, відбувається при дефіциті вуглецю у навколишньому середовищі, а утворений діоксид вуглецю фіксується у біомасу [7].

З моменту відкриття анаммокс процесу, стало зрозуміло, що у цього процесу є велике майбутнє, пов'язане зі значними масштабами очищення води від небажаних концентрацій сполук амонію. Незважаючи на досить невеликий час, який минув з моменту відкриття анаммокс бактерій, у світі вже існують установки очищення води від амонію, в основу яких покладено анаммокс процес. Після налагодження методики отримання культур анаммокс бактерій, було розроблено проект під назвою SHARON (Single reactor system for High activity Ammonium Removal Over Nitrite – установка для високошвидкісного видалення амонію за наявності нітриту) [26]. В основі цієї установки лежить конверсія високих концентрацій амонію в стічній воді в N_2 за участі збагаченої культури анаммокс бактерій. У Роттердамі (Нідерланди) вже функціонує промислова установка, об'ємом 80 м^3 , що обробляє стічні води станції Dokhaven-Sluisjesdijk. Установка перетворює приблизно $8\text{--}10 \text{ кг}\cdot\text{м}^3$ азоту N_2 на добу [25].

Незважаючи на те, що дослідники вже пристосували анаммокс організми до очищення стічної води на очисних станціях від аміаку, залишається ще безліч відкритих питань. У даний момент сили наукових дослідницьких груп спрямовані на більш глибоке вивчення анаммокс бактерій. Залишається незрозумілим механізм, який є відповідальним за підвищення електрохімічного градієнта, що діє через анаммоксосому. Труднощі в цих дослідженнях пов'язані з виділенням очищених інтактних анаммоксосом [27]. Також, до цих пір залишається невідомим, як об'єднані і регулюються в анаммокс організмі два типи живлення – автотрофний і органотрофний, та як організм синтезує власні кільця циклобутану для ладдеран ліпідів [1].

Цікавим питанням залишається взаємодія анаммокс бактерій з денітрифікувальними бактеріями та роль органічних сполук у цих відносинах. Дослідження в Чорному морі показали, що у товщі води деякі бактерії і кренархео нітрифікатори утворюють нітрит, який далі може використовуватися анаммокс бактеріями [8, 11].



ЛІТЕРАТУРА

1. Boumann H.A., Hopmans E.C., van de Leemput I., Op den Camp H.J., van de Vossenberg J., Strous M., Jetten M.S., Sinninghe Damsté J.S., Schouten S. Ladderane phospholipids in anammox bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – 258. – P. 297–304.
2. Broda E. Two Kinds of Lithotrophs Missing in Nature // *Allg. Mikrobiol.* – 1977. – 17. – P. 491–493.
3. Guven D., Dapena A., Kartal B., Schmid M.C., Maas B., Katinka van de Pas-Schoonen, Sozen S., Mendez R., Huub J.M. Op den Camp, Mike S.M. Jetten, Strous M., Schmidt I. Propionate oxidation by and methanol inhibition of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – 71. – P. 1066–1071.
4. Jetten M.S.M., Strous M., van de Pas-Schoonen K.T., Schalk J., van Dongen U.G.J.M., van de Graaf A.A., Logemann S., Muyzer G., van Loosdrecht M.C.M. and Kuenen J.G. The anaerobic oxidation of ammonium // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1998. – 22. – P. 421–437.
5. Jetten M.S.M., Sliemers O., Kuypers M., Dalsgaard T., van Niftrik L., Cirpus I., van de Pas-Schoonen K., Lavik G., Thamdrup B., Le Paslier D., Op den Camp H.J.M., Hulth S., Nielsen L.P., Abma W., Third K., Engstrom P., Kuenen J.G., Jurgensen B.B., Canfield D.E., Sinninghe Damsté J.S., Revsbech N.P., Fuerst J., Weissenbach J., Wagner M., Schmidt I., Schmid M. and Strous M. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – 63. – P. 107–114.
6. Kartal B., Kuypers M.M.M., Lavik G., Schalk J., Huub J.M. Op Den Camp, Jetten M.S.M., Strous M. Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium // *Environ. Microbiol.* – 2007. – 9. – P. 635–642.
7. Kartal B., Rattray J., van Niftrik L.A., van de Vossenberg J., Schmid M.C., Webb R.I., Schouten S., Fuerst J.A., Damsté J.S., Jetten M.S., Strous M. *Candidatus* “Anammoxoglobus propionicus” a new propionate oxidizing species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria // *Syst. Appl. Microbiol.* – 2007. – 30. – P. 39–49.
8. Koenneke M., Bernhard A.E., de la Torre J.R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon // *Nature* – 2005. – 437. – P. 543–546.
9. Kuypers M.M.M., Sliemers A.O., Lavik G., M. Schmid B.B., Jurgensen J.G., Kuenen J.S., Sinninghe Damsté, Strous M., Jetten M.S.M. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea // *Nature* – 2003. – 422. – P. 608–611.
10. Lindsay M.R., Webb R.I., Strous M., Jetten M.S.M., Butler M.K., Forde R.J., Fuerst J.A. Cell compartmentalisation in planctomycetes: novel



types of structural organisation for the bacterial cell // Arch. Microbiol. — 2001. — 175. — P. 413–429.

11. Lam P., Jensen M.M., Lavik G., McGinnis D.F., Muller B., Schubert C.J., Amann R., Thamdrup B., Kuypers M.M.M. Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2007. — 104. — P. 7104–7109.

12. Mulder A., A.A. van de Graaf, Robertson L.A., Kuenen J.G. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor // FEMS Microbiol. Ecol. — 1995. — 16. — P. 177–184.

13. Rosswall T. The Biogeochemical Nitrogen Cycle, ed. G. Likens. *Some Perspectives of the Major Biogeochemical Cycles*, SCOPE (Scientific Committee on Problems of the Environment) 17, (New York: John Wiley & Sons, 1981), 25–49.

14. Schmid M., Twachtmann U., Klein M., Strous M., Juretschko S., Jetten M.S.M., Metzger J., Schleifer K.-H., Wagner M. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation // Syst. Appl. Microbiol. — 2000. — 23. — P. 93–106.

15. Schmid M., Walsh K., Webb R., Rijpstra W.I.C., K.T. van de Pas-Schoonen, Verbruggen M.J., Hill T., Moffett B., Fuerst J., Schouten S., J.S. Sinninghe Damster, Harris J., Shaw P., Jetten M.S.M., Strous M. Candidatus “*Scalindua brodae*,” sp. nov., Candidatus “*Scalindua wagneri*,” sp. nov.: two new species of anaerobic ammonium oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. — 2003. — 26. — P. 529–538.

16. Schouten S., Strous M., Kuypers M.M.M., Rijpstra W. Irene C., Baas M., Schubert Carsten J., Jetten M.S.M., Damstü Jaap S. Sinninghe Stable carbon isotopic fractionations associated with inorganic carbon fixation by anaerobic ammonium-oxidizing bacteria // Appl. Environ. Microbiol. — 2004. — 70. — P. 3785–3788.

17. Sinninghe Damste J.S., Strous M., Rijpstra W.I.C., Hopmans E. C., Geenevasen J.A.J., van Duin A.C.T., van Niftrik L.A., Jetten M.S.M. Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane // Nature. — 2002. — 419. — P. 708–712.

18. Sinninghe Damste J.S., Rijpstra W.I., Strous M., Jetten M.S.M., David O.R.P., Geenevasen J.A.J., van Maarseveen J.H. A mixed ladderane/n-alkyl glycerol diether membrane lipid in an anaerobic ammonium-oxidizing bacterium // Chem Commun. — 2004. — P. 2590–2591.

19. Strous M., Heijnen J.J., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1998. — 50. — P. 589–596.

20. Strous M., Fuerst J.A., Kramer E. H. M., Logemann S., Muyzer G., van de Pas-Schoonen K.T., Webb R., Kuenen J.G., Jetten M.S.M. Missing lithotroph identified as new planctomycete // Nature. — 1999. — 400. — P. 446–449.



21. Strous M., Pelletier E.S., Mangenot T., Rattei A., Lehner M.W., Taylor M., Horn H., Daims D., Bartol-Mavel P., Wincker V., Barbe N., Fonknechten D., Vallenet B., Segurens C., Schenowitz-Truong C., Merdigue A., Collingro B., Snel B.E., Dutilh H.J.M. *Op den Camp, van der Drift C., Cirpus I., van de Pas-Schoonen K.T., Harhangi H.R., van Niftrik L., Schmid M., Keltjens J., van de Vossenberg J., Kartal B., Meier H., Frishman D., Huynen M.A., Mewes H.-W., Weissenbach J., Jetten M.S.M., Wagner M., Le Paslier D.* Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome // *Nature*. – 2006 – 440. – P. 790–794.

22. Van de Graaf A., Mulder A., de Bruijn P., Jetten M.S.M., Roberston L.A., Kuenen J.G. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process // *Appl Environ Microbiol.* – 1995. – 61. – P. 1246–1251.

23. Van de Graaf A., de Bruijn P., Roberston L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. Autotrophic growth anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor // *Microbiology*. – 1996. – 142. – P. 2187–2196.

24. Van de Graaf A., de Bruijn P., Roberston L.A., Jetten M.S.M., Kuenen J.G. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ^{15}N studies in a fluidized bed reactor // *Microbiology*. – 1997. – 143. – P. 2415–2421.

25. Van der Star W.R.L., Abma W. R., Blommers D., Mulder J.W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C., Van Loosdrecht M.C.M., Startup of reaction for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale Anammox reactor in Rotterdam // *Wat. Res.* – 2007. – 41. – P. 4149–4163.

26. Van Dongen U., Jetten M.S.M., Van Loosdrecht M.C.M., The SHARON-Anammox process for treatment of ammonium rich wastewater // *Water Sci. Technol.* – 2001. – 44. – 1. – P. 153–160.

27. Van Niftrik L.A., Fuerst J.A., Sinnighe Damstü J.S., Kuenen J.G., Jetten M.S., Strous M. The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria // *FEMS Microbiol. Lett.*, – 2004. – 233. – P. 7–13.

28. Van Niftrik L.A., Geerts W.J.C., Van Donselaar E.G., Humbel B.M., Webb R.I., Fuerst J.A., Verkleij Arie J., Jetten M.S.M., Strous M. Linking ultrastructure and function in four genera of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: cell plan, glycogen storage and localization of cytochrome *c* proteins // *J. Bacteriol.*, – 2007. – 190. – P. 708–717.

29. Ward N.L., Rainey F.A., Hedlund B.P., Staley J.T., Ludwig W., Stackebrandt E. Comparative phylogenetic analyses of members of the order *Planctomycetales* and the division *Verrucomicrobia*: 23S rRNA gene sequence analysis supports the 16S rRNA gene sequence-derived phylogeny // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, – 2000. – 50. – P. 1965–1972.



Н.Н. Чабан, В.А. Іваниця

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

**АНАММОКС БАКТЕРИИ – УНИКАЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ
КРУГОВОРОТА АЗОТА**

Реферат

Представлены данные о микроорганизмах со способностью к АНАММОХ процессу, которые принимают участие в круговороте азота в природе. Эти уникальные микроорганизмы являются представителями типа *Planctomycetes*. Описано строение анаммокс бактерий, которые способны в анаэробных условиях использовать аммоний и нитрит для генерации энергии благодаря наличию у них специфической органеллы – анаммоксосомы. Рассмотрен биохимический цикл превращений аммония и нитрита с выделением молекулярного азота благодаря наличию в мембране анаммоксосомы ладдеран липидов. Отображено значение анаммокс организмов в круговороте азота в природе и значение этих организмов для биотехнологии очистки сточных вод от больших концентраций аммония при небольших затратах энергии.

Ключевые слова: анаммокс бактерии, систематика, строение, анаммоксосома, метаболизм, очистка сточных вод.

M.M. Chaban, V.O. Ivanytsia

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

**ANAMMOX BACTERIA – UNIQUE MICROORGANISMS
OF NITROGEN CYCLE**

Summary

There were presented the data on the microorganisms with the ability to ANAMMOX process taken part in the nitrogen cycle in nature. These unique organisms are the representatives members of the type *Planctomycetes*. The were described the structure of anammox bacteria, capable to use anaerobic ammonium and nitrite for power generation due to the presence of specific organella in them – anammoxosome. The biochemical cycle of transformations of ammonium and nitrite with the release of molecular nitrogen due to the presence of membrane anammoxosome ladderan lipids was studied. In the review there were displayed the value of anammox organisms in the nitrogen cycle in nature and significance of these organisms for biotechnology of sewage purification from large concentrations of ammonium at low energy consumption.

Key words: anammox bacteria, taxonomy, structure, anammoxosome, metabolism, wastewater treatment.

Одержано 16.11.2011.



УДК 547.831.7

І.О. Малярчик, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел. (0482) 63 57 61

ВПЛИВ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ- БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ НА РІСТ, УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ ТА ТУМОРОГЕННУ АКТИВНІСТЬ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Показано, що похідні N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів ефективно пригнічують ріст агробактерій та утворення ними біоплівки. За присутності 40 і 80 мкМ N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів (сполука I) та його аналогів з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV) ріст *A. tumefaciens* пригнічується на 25–30%, 80–85%, 50–68% та 30–40%, відповідно. Найбільш активна сполука – N-бензотіазол-2-іл-4-хлор-бензенсульфонамід, в концентрації 80 мкМ на 83% пригнічує формування біоплівки. Вирощування впродовж доби в присутності 40 мкМ цього похідного знижує здатність *A. tumefaciens* до індукції пухлин на тест-рослинах: кількість дисків моркви з пухлинами була у 6 разів меншою порівняно з контролем. Сполуки I, III і IV зменшують число зразків з новоутвореннями в 2, 3,6 і 3 рази.

Ключові слова: *Agrobacterium tumefaciens*, туморогенна активність, ріст та утворення біоплівки, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід, похідні з нуклеофільними замісниками.

Грамнегативна ґрунтова бактерія *Agrobacterium tumefaciens* викликає утворення злоякісних пухлин – корончатих галів, у численних видів рослин. Пухлиноутворення є результатом переносу онкогенних фрагментів Ті-плазмід агробактерій в рослинні клітини, де вони інтегруються в ядерний геном. Ефективність інфікування залежить від числа копій Ті-плазмід та її горизонтального переносу при кон'югації [11]. Процеси ампліфікації і переносу плазмід позитивно регулюються аутоіндуктором системи *quorum sensing* (QS) *A. tumefaciens* – 3-оксо-октаноїлгомосерин лактоном [8]. Такі ознаки ураження тест-рослин як кількість пухлин та їх маса корелюють з рівнем синтезу цієї сигнальної молекули. Тому мож-



на припустити, що інгібітори системи міжклітинної комунікації будуть зменшувати онкогенний потенціал агробактерій.

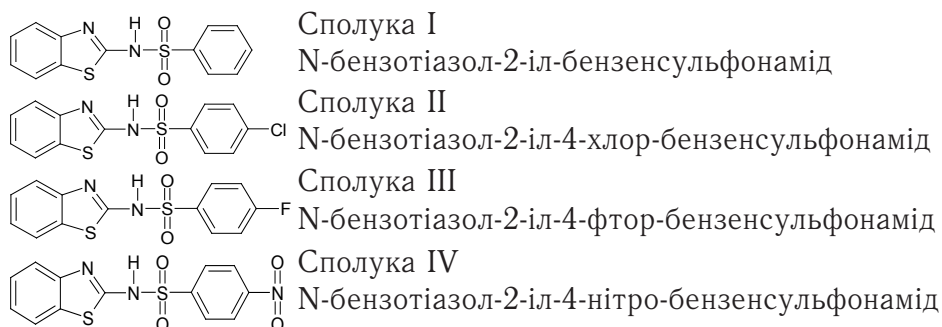
Раніше нами була встановлена здатність N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду та його похідних з нуклеофільними замісниками у фенольному кільці пригнічувати ріст і формування біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* та синтез псевдо-монадою сигнальних гомосерин лактонів [2]. Було доведено, що антимікробна дія цих сполук пов'язана з впливом на систему *quorum sensing*, яка контролює множинні фактори патогенності, міжклітинну комунікацію, утворення біоплівки тощо [3].

Метою даної роботи було дослідження впливу похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду на ріст, формування біоплівки та онкогенні властивості *Agrobacterium tumefaciens*.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізми використовували колекційні штами *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8628 та *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8534.

Досліджувані сполуки були синтезовані в Проблемній науково-дослідній лабораторії № 5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова:



Кінцеві концентрації досліджуваних сполук у середовищі становили 0,4; 4; 40 та 80 мкМ.

Вплив досліджуваних речовин на ріст агробактерій оцінювали за різницею оптичної густини контрольних та дослідних варіантів. *A. tumefaciens* вирощували в пробірках у рідкому середовищі LB при 28 °C 24 год, після чого вимірювали оптичну густину культур на спектрофотометрі SmartSpec Plus (Bio-Rad) при довжині хвилі 540 нм.

При вивченні впливу на утворення біоплівки інкубацію культур проводили у 48-лункових планшетах для культури тканин фірми "Nunclon". У кожну лунку додавали по 1 мл суспензії клітин, яка містила 10³ КУО/мл. Через 24 години з кожної лунки ретельно відбирали середовище з неприкріпленими клітинами. Біоплівки на дні лунок відмивали фізіологіч-

ним розчином та фіксували 96% етанолом впродовж 10 хв. Біоплівки забарвлювали водним розчином кристалічного фіолетового протягом 5 хв при кімнатній температурі. Планшети із забарвленою біоплівкою підсушували 24 год за кімнатної температури і у кожен лунку додавали по 1 мл 1% розчину додецилсульфату натрію у 0,1 N NaOH. Планшети витримували за кімнатної температури 1,5–2 години до повного лізису біоплівки. Інтенсивність формування біоплівки визначали шляхом вимірювання оптичної густини дослідних та контрольних зразків при довжині хвилі 592 нм [4].

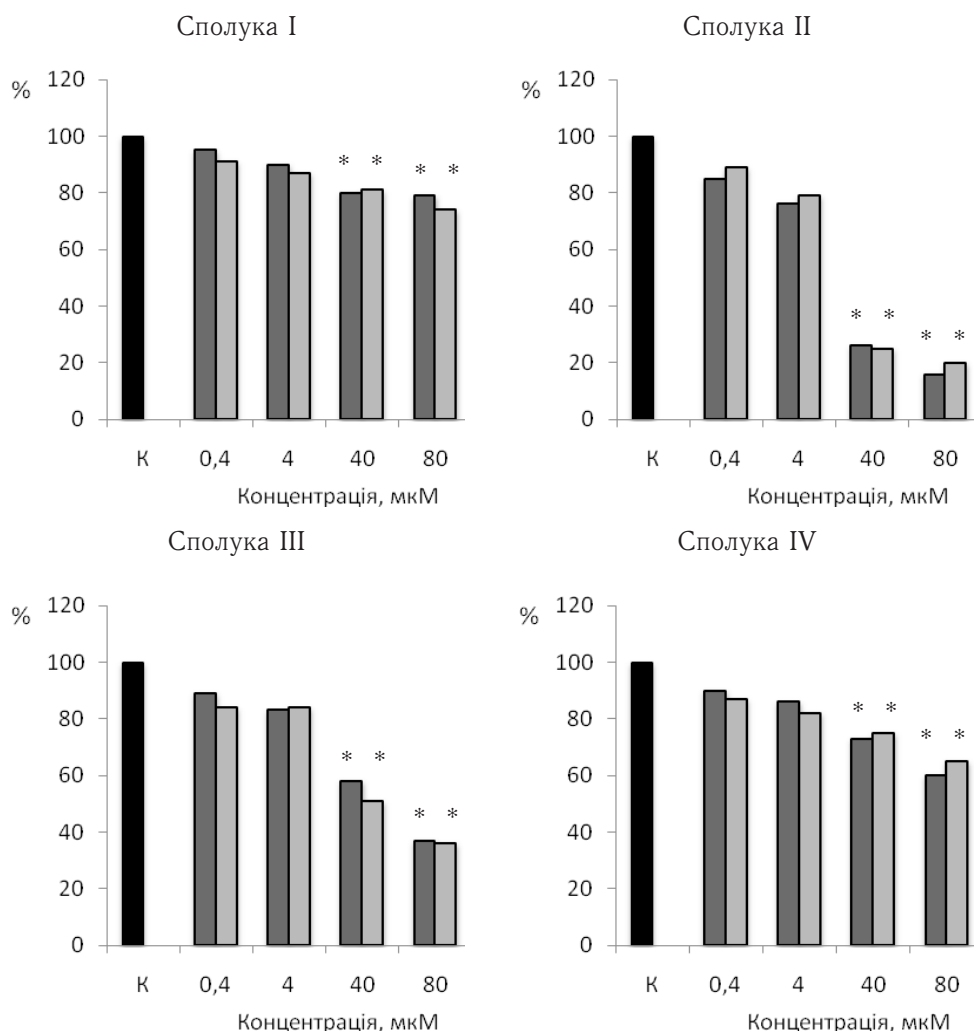
Туморогенну активність *A. tumefaciens* оцінювали з використанням дисків моркви [7]. Моркву ретельно мили водогінною водою і 15 хвилин витримували у 20% розчині хлор-місткого вибілюючого засобу «Білізна». Потім відмивали 6 разів стерильною дистильованою водою, підсушували і нарізали диски висотою приблизно 1 см. Агробактерії вирощували 24 год у присутності досліджуваних сполук у кінцевій концентрації 40 мкМ. Потім осаджували клітини центрифугуванням при 1200 об/хв впродовж 10 хв і двічі відмивали стерильним фізіологічним розчином. Контрольні і дослідні зразки стандартизували за оптичною густиною до концентрації $1 \cdot 10^8$ кл/мл і наносили по 100 мкл суспензії на диски моркви, які розташовували на поверхні стерильного агару у чашках Петрі. Перші сім діб чашки витримували у термостаті при 28 °С, а потім два тижні при кімнатній температурі (22±2 °С). Через три тижні після інокуляції підраховували кількість дисків з пухлинами та фотографували їх для оцінки розмірів пухлин. Для контролю стерильності дисків моркви за тих самих умов інкубували зразки, на які агробактерії не наносили.

Усі експерименти повторювали 3 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 6-и. Для обробки та аналізу даних використовували методи варіаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Достовірність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Математичне опрацювання отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [1].

Результати та їх обговорення

Дослідження впливу похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на ріст в рідкій культурі *Agrobacterium tumefaciens* показало однакову чутливість обох штамів до цих сполук. При цьому вищу антимікробну дію виявили галоген-місткі аналоги (сполуки II і III). Наведені на рис. 1 дані свідчать про залежне від їх концентрації пригнічення росту бактерій. За менших з використаних концентрацій: 0,4 та 4 мкМ, накопичення біомаси знижувалося на 10–20%. За 40 та 80 мкМ досліджуваних сполук пригнічення росту становило: 25–30%, 80–85%, 50–68% та 30–40% для сполук I, II, III і IV, відповідно. Таким чином, найефективнішим виявився пригнічувальний вплив N-бензотіазол-2-іл-4-хлор-бензенсульфонамідів.





Agrobacterium tumefaciens ATCC 8628; *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8534

Рис. 1. Ріст *Agrobacterium tumefaciens* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

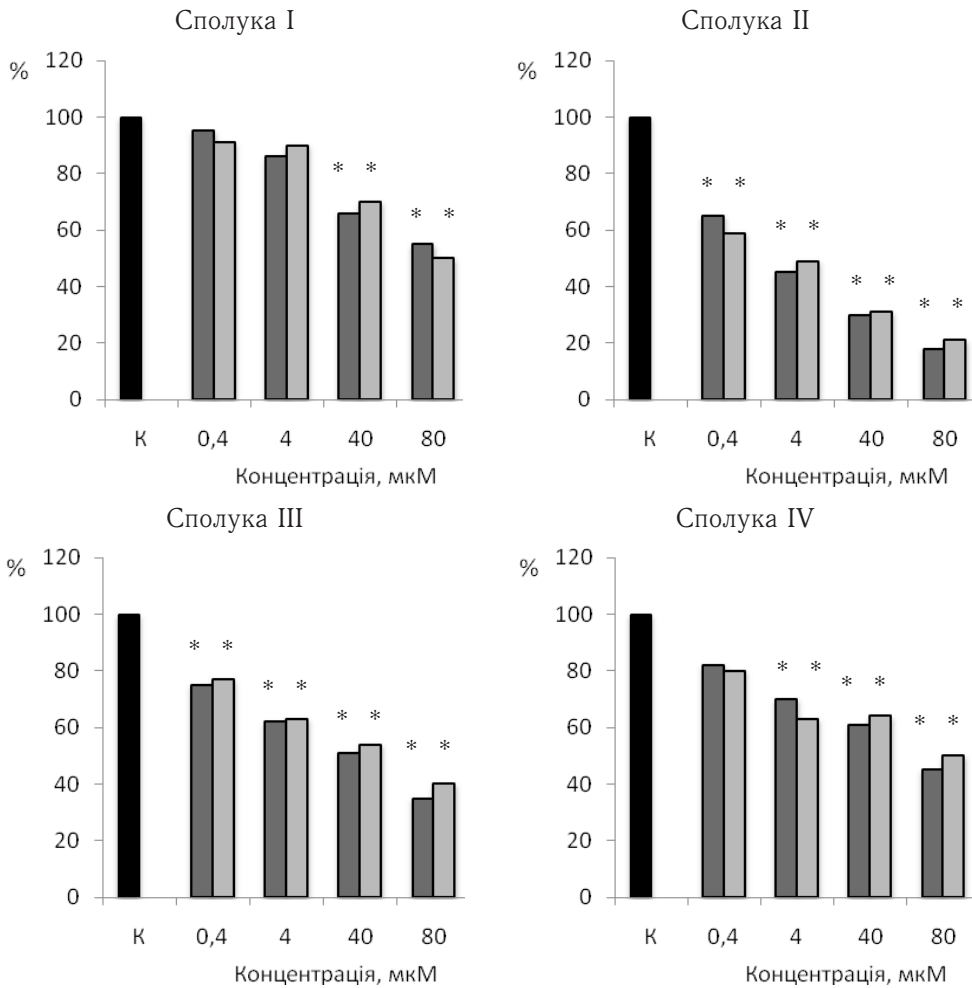
Примітка: К – контроль; * – різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Growth of *Agrobacterium tumefaciens* in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K – control; * – significant different from control

Як свідчать отримані результати (рис. 2) утворення біоплівки агробактеріями пригнічується досліджуваними сполуками більш суттєво ніж їх ріст. Вже за меншої концентрації галоген-місткі похідні вірогідно зменшують формування біоплівки. Кількісні зміни становлять 40–43% у разі сполуки II та 30% за дії сполуки III.





Agrobacterium tumefaciens ATCC 8628; *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8534

Рис. 2. Утворення біоплівки *Agrobacterium tumefaciens* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Примітка: К — контроль; * — різниця достовірна у порівнянні з контролем

Fig. 2. *Agrobacterium tumefaciens* biofilm formation in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K — control; * — significant different from control

Підвищення вмісту N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його аналогів призводить до сповільнення процесу формування біоплівки і починаючи з концентрації сполук 4 мкМ результати вірогідно відрізняються від показників контролю. Максимальний ефект кожної із сполук реєструється при концентрації 80 мкМ. Для похідних I та IV він дорівнює 50%, а для сполук II та III — 80–83% і 60–65%, відповідно. Дворазове пригнічення утворення біоплівки найбільш активними аналогами II і III досягається при їх концентраціях 4 та 40 мкМ. Таким чином, хлор-

містке похідне виявилось активнішим і при визначенні впливу на процес формування біоплівки, який відображує функціональний стан системи міжклітинної комунікації у бактерій.

Враховуючи отримані результати, було доцільним дослідити чи змінюється патогенність агробактерій за дії на них досліджуваних сполук. Для цього оцінювали здатність агробактерій, які попередньо вирощувалися 24 год у присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду, викликати утворення пухлин на рослинних тест-об'єктах. Дані, наведені у таблиці, свідчать про виражене зниження туморогенного потенціалу *A. tumefaciens* ATCC 8628 за дії усіх сполук. Навіть сполука I, яка у концентрації 40 мкМ пригнучує утворення біоплівки цим штамом на 30%, майже удвічі зменшує кількість дисків з пухлинами. Похідні з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV) знижують число уражених зразків у 6, 3,6 та 3 рази, відповідно. Крім того, змінюється зовнішній вигляд пухлин та їх розміри. Як видно на фотографіях, пухлини на дисках, інфікованих контрольною культурою агробактерій мають вигляд суцільної білуватої маси, яка повністю покриває центральний циліндр і підіймається над поверхнею диску на 5–7 мм. Крім того численні невеличкі пухлини розташовані по усій поверхні диску. Пухлини, що утворені агробактеріями, які вирощували за присутності досліджуваних сполук, мають суттєво меншу масу і розташовані у вигляді кільця по периферії центрального циліндру. Їх висота не перевищує 1–2 мм у разі сполук II–IV, і 3–4 мм у разі сполуки I.

На жодному з неінфікованих дисків не було відмічено спонтанного утворення пухлин або ознак росту яких-небудь мікроорганізмів.

Таким чином, одержані результати підтверджують припущення про те, що можливою мішенню бактеріальних клітин, на яку діють досліджувані сполуки, є система міжклітинної комунікації [6]. Завдяки планарній будові бензотіазольного фрагменту молекули вони можуть інтеркалювати у ДНК Ті-плазміді і попереджати її ампліфікацію і горизонтальний перенос. Крім того, похідні N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду можуть пригнічувати синтез 3-оксо-октаноїлгомосерин лактону — сигнальної молекули агробактерій. На користь цього припущення свідчать отримані раніше результати про пригнічення синтезу гомосерин лактонів *P. aeruginosa*.











Як і у випадку *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* [2,3], більш високу здатність пригнічувати ріст *Agrobacterium tumefaciens* і процеси, пов'язані з системою комунікації, виявили похідні з нуклеофільними замісниками. Але на відміну від умовно-патогенних бактерій, які більш виражено пригнічуються фтор- та нітромісткими сполуками, агробактерії є більш чутливими до хлормісткого аналога. Відомі природні і синтетичні інгібітори системи *quorum sensing* також містять у своєму складі галогени або нітро-групу. Прикладами таких сполук є галогеновані фуранони, що синтезуються червоною морською водорістю *Delisea pulchra* [5,10], та 4-нітро-піридин-N-оксид [9].



Вплив похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на туморогенну активність *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8628

Table

Influence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives on *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 8628 tumorigenic activity

Варіант	Ступінь розвитку пухлин		Кількість зразків з пухлинами / загальна кількість зразків
	мінімальний	максимальний	
Контроль			18/18
Сполука I			10/18
Сполука II			3/18
Сполука III			5/18
Сполука IV			6/18

Отримані результати обґрунтовують можливість застосування N-бензотіазол-2-іл-4-хлор-бензенсульфонамідів для позбавлення садивного матеріалу від агробактерій, зокрема, для обробки прищеп або при вирощуванні рослин у культурі тканин *in vitro*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.

2. Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М. Утворення біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 3 — С. 32–40.

3. Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Вострова Л.М., Гренадъорова М.В. Антимікробні властивості N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів і його аналогів з нуклеофільними замісниками // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 3. — С. 40–49.

4. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // J. Clin. Microbiol. — 1985. — V. 22. — № 6. — P. 996–1006.

5. Givskov M., de Nys R., Manefield M., Gram L., Maxirnilien R., Eberl L., Molin S., Steinberg P.D., Kjelleberg S. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signaling // J. Bacteriol. — 1996. — V. 178. — P. 6618–6622.

6. Hentzer M., Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections // J. Clin. Invest. — 2003. — V. 112. — P. 1300–1307.

7. Jen G.C., Chilton M.D. Activity of T-DNA borders in plant cell transformation by Mini-T Plasmids // J. Bacteriol. — 1986. — V. 166, № 2. — P. 491–499.

8. Pappas K.M., Winans S.C. A LuxR-type regulator from *Agrobacterium tumefaciens* elevates Ti plasmid copy number by activating transcription of plasmid replication genes // Mol. Microbiol. — 2003. — V. 48. — P. 1059–1073.

9. Rasmussen T.B., Bjarnsholt T., Skindersoe M.E., Hentzer M., Kristoffersen P., Kute M., Nielsen J., Eberl L., Givskov M. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI Selector // J. Bacteriol. — 2005. — V. 187, № 5. — P. 1799–1814.

10. Rasmussen T.B., Manefield M., Andersen R., Eberl L., Anthoni U., Christophersen C., Steinberg P., Kjelleberg S., Givskov M. How *Delisea*



pulchra furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1 // *Microbiology*. — 2000. — V. 146. — P. 3237–3244.

11. White C.E., Winans S.K. Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* — 2007. — V. 362. — P. 1135–1148.

И.О. Малярчик, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел. (0482) 63 57 61

**ВЛИЯНИЕ N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМИДА
И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ НА РОСТ, ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ
И ТУМОРОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ
*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Реферат

Показано, что производные N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида эффективно угнетают рост агробактерий и образование ими биопленки. В присутствии 40 и 80 мкМ N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида (соединение I) и его аналогов с нуклеофильными заместителями (соединения II, III и IV) рост *A. tumefaciens* угнетается на 25–30%, 80–85%, 50–68% та 30–40%, соответственно. Наиболее активное соединение — N-бензотиазол-2-ил-4-хлор-бензен-сульфонамид, в концентрации 80 мкМ на 83% подавляет формирование биопленки. Выращивание в течение суток в присутствии 40 мкМ этого производного снижает способность *A. tumefaciens* индуцировать опухоли на тест-растениях: количество дисков моркови с опухолями было в 6 раз меньшим по сравнению с контролем. Соединения I, III и IV уменьшали число образцов с новообразованиями в 2, 3,6 и 3 раза.

Ключевые слова: *Agrobacterium tumefaciens*, опухоленная активность, рост и образование биопленки, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид, производные с нуклеофильными заместителями.



I.O. Maliarchik, B.M. Galkin, T.O. Filipova

Odesa Mechnykov National University
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel. (0482) 63 57 61

**INFLUENCE OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-
BENZENSULFONAMIDE DERIVATIVES ON THE
AGROBACTERIUM TUMEFACIENS GROWTH, BIOFILM
FORMATION AND TUMORIGENIC ACTIVITY**

Summary

It was shown that the growth and biofilm formation of agrobacteria effectively decreased in the presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide and its derivatives. In the presence of 40 i 80 μM of the N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide and its analogs with nucleophylic derivatives (compound II, III and IV) *A. tumefaciens* growth inhibited on 25–30%, 80–85%, 50–68% and 30–40%. Derivative with the highest activity – N-benzotiazol-2-yl-4-chlorine-benzensulfonamide, in concentration 80 μM inhibits *A. tumefaciens* biofilm formation for 83%. The growth of *A. tumefaciens* cells with 40 μM of this compound for 24 hours shows the results in decreasing of the tumor-formation ability of this bacteria on the test-plants. The numbers of carrot disks afflicted with tumors, were 6 times lower after exposition with N-benzotiazol-2-yl-4-chlorine-benzensulfonamide in compare with control. The compounds I, III and IV decreased a number of samples with tumors for 2, 3.6 and 3 times.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, tumorigenic activity, growth and biofilm formation biofilm, plankton biomass, N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide, derivatives with nucleophylic radicals.

Одержано 02.12.2011.



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

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

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЛИТИЧЕСКОЙ, ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКОЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАЦИЛЛ

*Показано взаимосвязь между антимикробной активностью пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140, их способностью продуцировать литические и целлюлозолитические ферменты. Пребиотики лактит и лактулоза положительно влияют на эти активности и усиливают процесс лизиса бациллами клеток условно-патогенных микроорганизмов.*

*Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, антимикробная активность, литические и целлюлозолитические ферменты, пребиотики.*

Аэробные спорообразующие бактерии характеризуются продукцией различных по природе биологически активных веществ, в том числе антибиотиков, литических и гидролитических ферментов [11].

Бактерии рода *Bacillus* широко известны как антагонисты многих условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Однако роль их литических ферментов, в том числе и различных гидролаз, в антагонистической активности остается не ясной. По имеющимся данным, литические ферменты *B. subtilis* в отличие от лизоцима яичного белка, с которым они имеют сходный спектр действия, представляют собой комплекс, который может включать глюканиазу, манназу, протеазу, амидазу, ацетилгексозаминидазу и другие ферменты с различной субстратной специфичностью [4, 11].

По данным одних исследователей, антимикробная активность бактерий рода *Bacillus* обусловлена лишь действием антибиотиков, а их способность продуцировать внеклеточные литические ферменты связана с их конкурентоспособностью в среде обитания за счет расширения доступных источников питания [6, 8]. В других работах синтез внеклеточных литических ферментов и гидролаз в комплексе рассматривается как один из механизмов антагонистического действия бацилл [3, 8, 9].

На сегодняшний день актуальной остается проблема изучения механизма антимикробного действия создаваемых синбиотиков с учетом



биологических свойств микроорганизмов, составляющих их основу. Эти исследования считают существенным этапом при разработке препаратов на основе живых микробных культур.

Цель настоящей работы состояла в изучении связи между литической, целлюлазной и антагонистической активностями пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140 и влияния на них пребиотиков лактата и лактулозы.

Материалы и методы

Объектом исследования служили пробиотические штаммы *Bacillus subtilis* УКМ 5139 и *Bacillus subtilis* УКМ 5140 из коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, входящие в состав препарата эндоспорин [12].

В качестве тест-культур для определения литической и антагонистической активности бацилл использовали штаммы *Staphylococcus aureus* УКМ В-4001, *Escherichia coli* УКМ В-930, *Candida albicans* УКМ У-690, *Pseudomonas aeruginosa* УКМ В-329, *Salmonella enterica* УКМ В-926, *S. thyphimurium* УКМ В-928.

Для изучения литической и антимикробной активностей бактерии выращивали при 37 °С в течение 24 ч в условиях глубинной культуры на качалке при 200 об/мин на глюкозо-минеральной синтетической среде следующего состава (г/л): глюкоза — 10,0—15,0; натрия цитрат — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, pH 7,0±0,2. Для изучения целлюлозолитической активности бактерии выращивали в тех же условиях на среде с 0,5% целлюлозы без глюкозы [1]. В ряде опытов в качестве дополнительного источника углеродного питания использовали лактит или лактулозу (по 15%).

Литическую и целлюлозолитическую активности определяли известными методами [1, 6, 9]. Литическую активность выражали в процентах снижения оптической плотности (% ΔОП), что отражает процент лизиса клеток тест-культуры. Расчет проводили по формуле [6]: $(D_0 - D) \cdot 100 / D_0$, где D_0 и D — ОП пробы соответственно до и после реакции. ОП реакционной смеси и контрольных проб измеряли с помощью ФЭК 56 при длине волны 540 нм до и после одного часа инкубирования при 41 °С в кювете толщиной 5 мм.

Результаты оценивали по данным 5 повторностей и считали достоверными при $p < 0,05$. Достоверность различия между средними значениями экспериментальных данных оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Проведенными исследованиями установлено, что штаммы бацилл проявляли выраженное ингибирующее рост действие как на грамотрицательные (*S. enterica*, *S. thyphimurium*, *E. coli*, *P. aerugi-*



nosa), так и на грамположительные бактерии (*S. aureus*), а также грибы (*C. albicans*). В опытах по отсроченному антагонизму зоны задержки роста составили $16,0 \pm 1,0$ и $9,0 \pm 1,0$ мм для штаммов *S. enterica*, *S. thyphimurium*, *E. coli*, $22,0 \pm 1,0$ и $16,0 \pm 1,0$ мм для *S. aureus* и *C. Albicans*, соответственно, штаммами *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140. *B. subtilis* УКМ 5140 проявлял более выраженное антагонистическое действие на *P. aeruginosa*, чем *B. subtilis* УКМ 5139, у которого зоны задержки роста составляли соответственно $3,0 \pm 1,0$ и $10,0 \pm 0,5$ мм (таблица).

Таблица

Антимикробные свойства штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140

Table

The antimicrobial properties of strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140

Тест-культура	<i>B. subtilis</i> УКМ 5139		<i>B. subtilis</i> УКМ 5140	
	Зона задержки роста, мм	Лизис тест-культуры, %	Зона задержки роста, мм	Лизис тест-культуры, %
<i>S. enterica</i> УКМ В-926	$16,0 \pm 1,0$	$13,3 \pm 1,0$	$8,0 \pm 1,5$	$16,7 \pm 20$
<i>S. thyphimurium</i> УКМ В-928	$17,0 \pm 2,0$	$14,2 \pm 2,0$	$10,0 \pm 1,0$	$25,7 \pm 1,0$
<i>E. coli</i> УКМ В-930	$15,0 \pm 1,0$	$2,5 \pm 1,0$	$8,0 \pm 1,0$	$2,5 \pm 0,75$
<i>P. aeruginosa</i> УКМ В-329	$3,0 \pm 1,0$	$10,0 \pm 0,5$	$10,0 \pm 0,5$	$10,0 \pm 1,0$
<i>S. aureus</i> УКМ В-4001	$23,0 \pm 2,0$	$2,5 \pm 1,0$	$15,0 \pm 1,0$	$5,3 \pm 1,0$
<i>C. albicans</i> УКМ Y-690	$22,0 \pm 1,0$	$16,6 \pm 2,0$	$18,0 \pm 1,0$	$16,6 \pm 1,0$

Как видно из рис. 1, изучаемые штаммы бацилл способны лизировать те же микроорганизмы, в отношении которых они проявляют антимикробный эффект. При этом процент лизиса живых клеток *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* составил в среднем до 15%. Сальмонеллы и *C. albicans* более чувствительны к литическому действию (выше 15%). По нашим данным, изучаемые штаммы *B. subtilis* имеют одинаковую литическую активность относительно *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, однако к сальмонеллам и *S. aureus* штамм *B. subtilis* УКМ 5140 был более активным. По-видимому, культуральная жидкость бацилл наряду с веществами антибиотической природы содержит литические ферменты, вызывающие лизис клеток тест-микроорганизмов, а антагонистическая активность бацилл зависит не только от антибиотических веществ, синтезируемых пробиотическими штаммами *B. subtilis*, но и от литических ферментов, продуцируемых ими. Очевидно, полученные результаты являются свидетельством роли литических ферментов в проявлении ан-

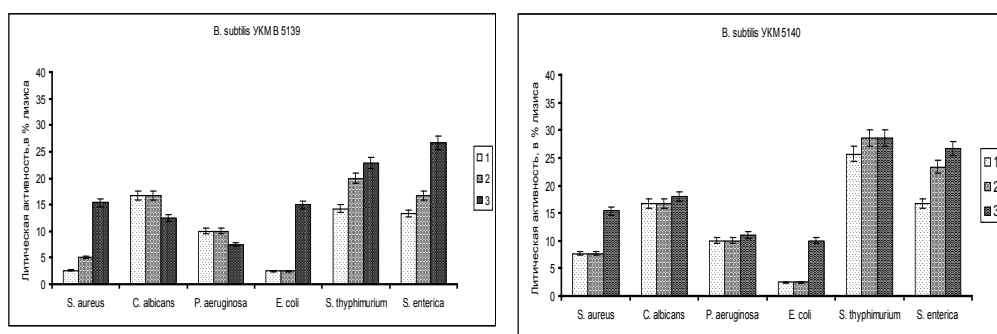


тагонистической активности бацилл, на что указывают и данные других исследователей [3, 8, 13].

Ранее нами показано, что изучаемые пробиотические штаммы *B. subtilis* способны также синтезировать и экскретировать в культуральную жидкость комплекс целлюлаз (C_x -, C_1 -, C_2 -ферменты и целлобиазы) [1], что стало основанием предположить участие экзоцеллюлаз в антагонистической активности бацилл.

Для этого нами были определены литическая и антагонистическая активности культуральных жидкостей, полученных в условиях глубинного выращивания пробиотических штаммов на среде без целлюлозы и при выращивании их на той же среде с целлюлозой.

А



Б

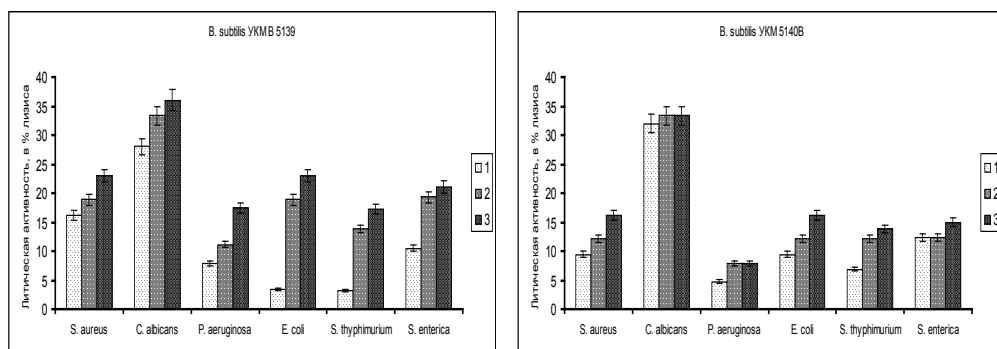


Рис 1. Литическая активность культуральных жидкостей штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 на среде с лактитом и лактулозой

Обозначения: А — среда без целлюлозы, Б — среда с целлюлозой.

1 — *B. subtilis* на среде без добавок; 2 — *B. subtilis* на среде с лактитом;

3 — *B. subtilis* на среде с лактулозой.

Fig. 1. Lytic activity of strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140 at cultivation on medium in presence of lactitol and lactuloses

Notations: А — medium without cellulose, Б — medium with cellulose.

1 — *B. subtilis* on the medium without any additives; 2 — *B. subtilis* on the medium

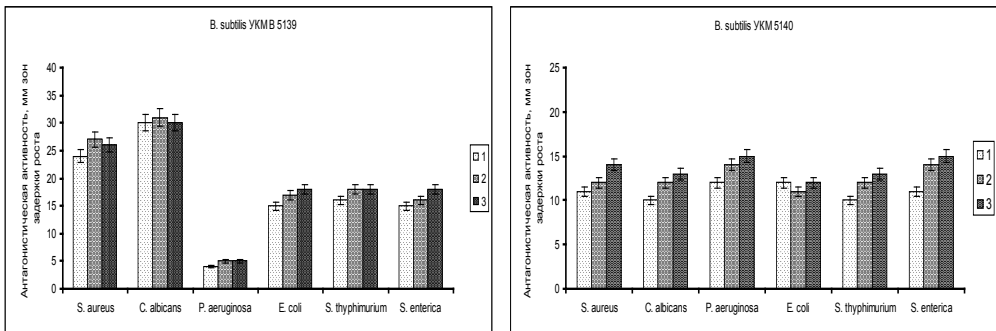
with lactitol; 3 — *B. subtilis* on the medium with lactulose .



Анализ полученных результатов показал, что культуральная жидкость исследуемых штаммов, содержащая целлюлазы, оказывает более выраженное литическое действие на клетки *C. albicans*, *S. aureus* и *E. coli*. При этом глубина лизиса указанных тест-культур была выше (27, 17 и 5%, соответственно) в культуральной жидкости, содержащей целлюлазы, чем в культуральной жидкости без них (17, 3, 3%, соответственно) (рис. 1).

Наряду с этим, антимикробная активность культуральной жидкости, содержащей целлюлазы, была выше относительно всех исследуемых тест-культур, чем культуральной жидкости, не содержащей целлюлазы (рис. 2). При этом штамм *B. subtilis* УКМ 5139 обладал антагонистической активностью, более выраженной, чем штамм *B. subtilis* УКМ 5140.

А



Б

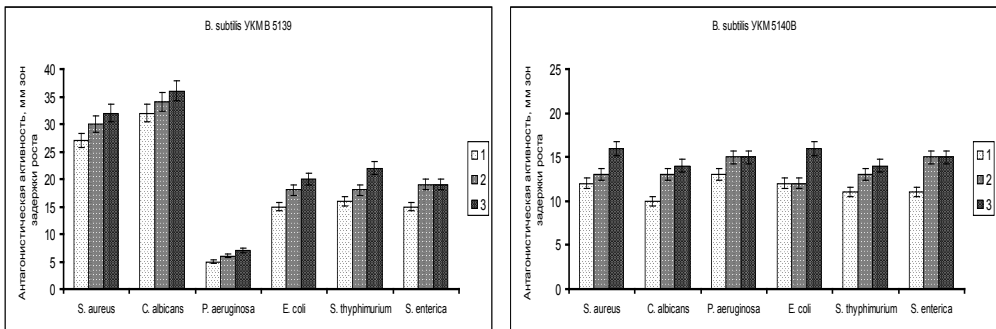


Рис 2. Антагонистическая активность культуральных жидкостей *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140 на среде с лактитом и лактулозой

Обозначения: те же, что на рис. 1.

Fig 2. Antagonistic activity of probiotic strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140 at cultivation on medium in presence of lactitol and lactuloses

Notations: the same as in fig. 1.



Хотя степень антагонистического воздействия культуральной жидкости пробиотических штаммов на исследуемые тест-микроорганизмы была разной, наблюдалась тенденция его усиления при наличии в культуральной жидкости целлюлаз. Так, если зоны задержки роста *S. aureus*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *S. thyphimurium* под действием культуральной жидкости *B. subtilis* УКМ 5139 без целлюлаз были 24, 30, 4, 15, 16, 16 мм, то под действием культуральной жидкости с целлюлазами они уже составили 27, 33, 6, 16, 17, 17 мм, соответственно. Культуральная жидкость с целлюлазами штамма *B. subtilis* УКМ 5140 отличалась несколько менее выраженным антагонистическим действием. При этом зоны задержки роста составили 13 мм для *S. aureus* и *P. aeruginosa*, 12 мм — для *E. coli* и 11 мм — для остальных тест-культур, что превышало лишь на 9–10% таковые под действием культуральной жидкости, не содержащей целлюлазы.

Общеизвестно, что активность ферментов, в том числе и литических, продуцируемых микроорганизмами, значительно может варьировать в зависимости от состава среды культивирования, в частности от источника углерода [5].

Ранее нами было показано, что введение в среду для культивирования пребиотиков лактита или лактулозы в качестве дополнительного источника углеродного питания, интенсифицирует биосинтез внеклеточных целлюлаз бацилл [2].

Добавление в среду лактита в разной степени влияет и на литическую активность бацилл по отношению к условно-патогенным тест-микроорганизмам. Этот пребиотик не влияет на литическую активность культуральной жидкости без целлюлаз относительно клеток *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*. Но в то же время, его присутствие в той же среде усиливает степень лизиса клеток сальмонелл и стафилококка (рис. 1).

Наличие лактулозы в среде оказывает более выраженное действие на уровень лизиса штаммами *B. subtilis* клеток *E. coli*, *S. aureus* и сальмонелл по сравнению с *P. aeruginosa* и *C. albicans*.

Полученные нами результаты дают основание предположить участие комплекса экзометаболитов в проявлении антагонистической активности пробиотических штаммов *B. subtilis*. Однако строгой взаимосвязи и прямой корреляции между определяемыми активностями не установлено. Оба пробиотические штаммы проявляли антимикробный эффект, имея при этом различную литическую и целлюлозолитическую активности. Добавление в питательную среду дисахаридов-пребиотиков приводит к усилению как литической, так и антагонистической активности культуральной жидкости штаммов *B. subtilis* УКМ 5139 и *B. subtilis* УКМ 5140. В случае присутствия в среде также целлюлаз их антимикробное действие усиливается и более выражено.



Таким образом, обобщая полученные результаты и литературные данные, можно заключить, что явление антагонизма бацилл как сложный многофакторный процесс, обуславливается комплексом их биологических свойств и основывается на совместном действии различных групп вторичных метаболитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Л.В., Осадча А.И., Сафронова Л.А., Иляш В.М., Хархота М.А. Вплив рН поживного середовища на біосинтез гідролітичних ферментів у бацилл // Мікробіологічний журнал. — 2010. — Т. 72. № 5. — С. 3–7.
2. Авдеева Л.В., Осадчая А.И., Хархота М.А. Биосинтез целлюлаз пробиотическими штаммами *Vacillus subtilis* при совместном выращивании // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 4. — С. 80–89.
3. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Внеклеточные гидролазы штамма *Vacillus spp* 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов // Микробиология. — 2007. — Т. 76, № 4. — С. 471–479.
4. Бизюлявичус Г.С. Антибактериальный спектр лизосубтилина Г10х// Антибиотики и химиотерапия. —1989. —Т. 34, № 8. — С. 579–581.
5. Боровикова В.П., Аксеновская В.Е., Лавренова Г.И. Выделение и характеристика литического фермента из *Vacillus spp. 797* // Биохимия. — 1980. — Т. 45, № 8. — С. 1524–1533.
6. Есикова Т.З., Темирнов Ю.В, Соколов С.Л., Алахов Ю.Б. Вторичные метаболиты антимикробного действия, продуцируемые термофильными штаммами *Vacillus spp* VK2 и VK21 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 261–267.
7. Кислухина О.В., Бизюлявичус Г.С. Изучение свойств препарата литических ферментов из культуры *Vacillus subtilis* // Прикладная биохимия и микробиология. — 1977. — Т. 13, № 1. — С. 55–60.
8. Павлова И.Н., Тиньянова Н.З., Жолкер Л.Г. Антимикробные свойства некоторых термофильных бацилл // Микробиологический журнал. — 1991. — Т. 53, № 1. — С. 84–89.
9. Смирнова И.Э. Целлюлолитические бактерии в защите сельскохозяйственных растений от фитопатогенных грибов // Микробиология и фитопатология. — 2004. —Т. 38, № 2. — С. 89–93.
10. Смирнов В.В., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И., Сафронова Л.А. Литическая активность аэробных спорообразующих бактерий // Микробиологический журнал. — 2004. — Т. 66, № 2. — С. 35–46.
11. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ. — Киев: Наукова думка, 1982. — 280 с.
12. Пат. Украина №76669 А61К35/74 Биопрепарат для лечения и профилактики кишечных инфекций у животных. / Сафронова Л.А., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И. Оpubл. 15. 08. 2006 Б. № 8.



13. Пат. 5374747 США, МКИ⁵ C₁₂ N9/00, C₁₂ N9/20, Cell wall lytic enzymes from *Bacillus pabuli* /Liu Chi-di, Overholt J., Novo N. Заявл. 01.07.93; Опубл. 20.12.94.

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

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

LYTIC ACTIVITY AND ITS RELATIONSHIP WITH CELLULOSELYTIC AND ANTAGONIST ACTIVITY OF BACILLI

Summary

The relationship between the antimicrobial activity of probiotic strains *Bacillus subtilis* УКМ 5139 and *Bacillus subtilis* УКМ 5140, their ability to produce the lytic and cellulolytic enzymes was studied. Prebiotics lactitol and lactulose influence positively on this activity and enhance the process of lysis by bacilli of conditional pathogenic microorganism's cells.

Key words: *Bacillus subtilis*, antimicrobial activity, lytic and cellulolytic enzymes, prebiotics.

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

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

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЛІТИЧНОЇ, ЦЕЛЮЛОЗОЛІТИЧНОЇ ТА АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ БАЦИЛ

Реферат

Показано взаємозв'язок антимікробної активності пробіотичних штамів *Bacillus subtilis* УКМ 5139 і *Bacillus subtilis* УКМ 5140 та їх здатністю продукувати літичні і целюлозолітичні ферменти. Пребіотики лактит та лактулоза позитивно впливають на ці активності та підсилюють процес лізису бацилами клітин умовно-патогенних мікроорганізмів.

Ключові слова: *Bacillus subtilis*, антимікробна активність, літичні і целюлозолітичні ферменти, пребіотики.

Одержано 21.06.2011.



С.В. Серга, И.А. Козерецкая

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, 01601, Киев, Украина,
тел. +38 (044) 522 39 95, e-mail: luchiksveta05@gmail.com

WOLBACHIA В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ DROSOPHILA MELANOGASTER УКРАИНЫ

Проведено выявление и идентификация бактерий рода Wolbachia в природных популяциях Drosophila melanogaster Украины методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров к фрагментам генов 16S рРНК и wsp, с последующим анализом прочтенных последовательностей. Эти бактерии обнаружены в 14 природных популяциях D. melanogaster Украины и относятся к штамму wMel.

Ключевые слова: Wolbachia, эндосимбионт, Drosophila melanogaster, ген 16S рРНК, ген wsp.

Drosophila melanogaster является видом-космополитом, который широко распространен на территории Украины [2]. В природе на плодую мушку действует комплекс факторов, которые могут тем или иным образом оказывать влияние на процессы изменчивости в природной популяции [1]. Одним из таких факторов являются широко распространенные бактерии-эндосимбионты, наиболее изученными из которых следует признать бактерии рода *Wolbachia* [14]. Данные бактерии обнаружены в природных популяциях *D. melanogaster* всего мира [9]. Они в пределах вида передаются преимущественно трансвариально и не вызывают типичных модификаций полового размножения, описанных для других насекомых (андроцид, переход к партеногенезу, феминизация и цитоплазматическая несовместимость) [14], кроме низкого уровня цитоплазматической несовместимости [7]. Вместе с тем у многих видов беспозвоночных именно манипулирование половым размножением позволяет бактерии повысить количество инфицированных особей [14]. Следовательно, причины широкого распространения *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* остаются загадкой.

Ранее нами на основе выявления последовательности гена 16S рРНК была показана широкая распространенность бактерии *Wolbachia* в природных популяциях *D. melanogaster* Украины [4]. Но так как уровень инфицированности популяции дрозофил бактерией может колебаться и в период диапаузы популяции каждый год подвергаются



эффекту «горлышка бутылки», остается открытым вопрос, всегда ли сохраняется инфицированность определенного уровня в таких условиях. В работе Илинского Ю.Ю. и Захарова И.К. была проведена идентификация бактерий из популяций *D. melanogaster* Евразии. Однако, природные популяции дрозофил Украины в работах этих авторов представлены в основном выборками сборов более чем пятилетней давности, которые содержались на протяжении многих поколений в лаборатории [2]. Этот факт не дает возможности ответить на вопрос, где были эти особи инфицированы — в природе, или в лаборатории, поскольку известно, что возможен горизонтальный перенос инфекции в системе клещ—дрозофила [6, 8]. С учетом сказанного и в связи с возможным влиянием инфицирования на генетические процессы у исследуемых организмов, детальное ежегодное исследование бактерий из природных популяций *D. melanogaster* Украины является крайне необходимым.

Целью работы было выявление *Wolbachia* в выборках из природных популяций *D. melanogaster* Украины, а также идентификация обнаруженных бактерий по последовательности варибельного фрагмента гена поверхностного белка *wsp* (*Wolbachia surface protein*) этого симбионта.

Материалы и методы

Выборки из природных популяций *D. melanogaster* собраны в летние сезоны (август—сентябрь) 2007, 2008, 2009 и 2010 годов в различных регионах Украины, а именно в Умани, Варве, Лубнах, Пирятине, Магараче (Ялте), Киеве, Одессе, Харькове, Дрогобыче, Мотовиловке и в Чернобыльской зоне.

ДНК выделяли из 25 самок каждой исследуемой природной популяции *D. melanogaster*. Для выделения брались самки, выловленные непосредственно в природе. Выделение ДНК проводили с использованием набора QIAamp DNA Micro Kit (“Qiagen”, США).

Бактериальную ДНК в суммарной ДНК самок определяли с использованием праймеров, которые специфичны к высоко консервативному фрагменту гена 16S рРНК *Wolbachia* длиной 438 п. о. (5'-CAT ACC TAT TCG AAG GGA TAG, 5'-AGC TTC GAG TGA AAC CAA TTC) [13]. ПЦР проводили по схеме: 3 минуты при температуре 94 °С, 30 циклов, состоящих из 30 с при 94 °С, 45 с при 55 °С, 60 с при 72 °С, и 4 минуты при 72 °С. Реакция проводилась в смеси объемом 20 мкл (2 мкл ДНК, 2 мкл 10 x ПЦР буфера (100 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 500 мМ КСl, 0,8% (o/o) Nonidet P40), 2 мкл 25 мМ MgCl₂, 2 мкл 2,5 мМ dNTP («Fermentas»), 2 мкл 20 мМ праймеров, 0,25 мкл Taq-полимеразы (5 ед./мкл, «Fermentas»), 8 мкл дистиллированной воды). В качестве положительного контроля использовали ДНК из природной популяций *D. melanogaster* г. Киева сбора 2006 года, где диагностировано присутствие этих бактерий [4]. Для негативного контроля использовалась



ДНК лабораторной линии дикого типа *Drosophila virilis*, не содержащей представителей этого эндосимбионта.

Для наработки фрагмента гена поверхностного белка *wsp* были использованы праймеры *wsp81f*-5'TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA и *wsp691r*-5'AAA AAT TAA ACG STA CTC CA [15]. ПЦР проводили по схеме: 3 минуты при температуре 94 °С, 30 циклов, которые состоят из 30 с при 94 °С, 45 с при 55 °С, 60 с при 72 °С, и 4 минуты при 72 °С. Реакция проводилась в смеси объемом 50 мкл (5 мкл ДНК, 5 мкл 10 х ПЦР буфера (мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25 °С), 500 мМ КСl, 0,8% (о/о) Nonidet P40), 5 мкл 25 мМ MgCl₂, 5 мкл 2 мМ dNTP («Fermentas»), 5 мкл 20 мМ праймеров, 0,75 Таq-полимеразы (5 Ед./мкл, «Fermentas»), 20 мкл дистиллированной воды). Фрагмент гена, который амплифицировался, имел длину 610 п.о. (позиции 81–691) и включал гипервариабельный регион [15].

Фрагменты генов 16S рРНК и *wsp* были наработаны в достаточном количестве и очищены с использованием Gel Extraction Kit («Qiagen», США). Секвенирование было проведено в лаборатории университета Южной Каролины, США. Для секвенирования был использован автоматический секвенатор Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Для идентификации экспериментальных последовательностей использовался инструмент BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) [5]. Сравнительный анализ секвенированных последовательностей проводился с помощью программы ClustalW [12].

Результаты и их обсуждение

Результаты анализа выборок природных популяций *D. melanogaster* Украины представлены в таблице.

Из 37 проанализированных выборок 16S рДНК бактерии были выявлены в 35 (рис. 1). Отсутствие ДНК *Wolbachia* зафиксировано только в выборке популяции вблизи водоема-охладителя ЧАЭС. Данное явление может объясняться как низкой плотностью популяции дрозофилид, так и низким уровнем инфицированности мух бактерией, так как в сборах 2005 года бактерии там присутствовали. Сравнение полученных результатов с данными сборов 2005 и 2006 годов [3, 4] показывает, что в остальных популяциях *Wolbachia* сохранялась на протяжении 6 лет.

Фрагменты гена 16S рРНК *Wolbachia* из всех исследуемых выборок природных популяций были секвенированы (номера полученных последовательностей в GenBank НМ627277, НМ627278, НМ627279, НМ627280, НМ627281, НМ627282, НМ627283). Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал 100% идентичность фрагментов из всех исследуемых популяций. Полученные экспериментально фрагменты идентичны фрагменту гена 16S рРНК *Wolbachia*, выделенной из *D. melanogaster*, и содержащемуся в GenBank (DQ412083).



Таблица

Результаты анализа выборок природных популяций *D. melanogaster* Украины на наличие гена 16S рДНК *Wolbachia*

Table

Presence of *Wolbachia* 16S rDNA gene in samples of *D. melanogaster* populations from Ukraine

Место сбора	Координаты точек сбора		Год сбора			
	Широта	Долгота	2007	2008	2009	2010
Одесса	46°30'	30°46'	+	+	+	+
Киев	50°35'	30°48'	+	+	+	+
Пирятин	50°14'	32°30'	+	+	н/п	+
Умань	48°45'	30°10'	+	+	+	+
Лубны	50°01'	32°59'	+	+	н/п	н/п
Варва	50°29'	32°43'	+	+	+	+
ЧАЭС	51°37'	30°14'	-	-	+	+
Полесское	51°23'	29°39'	+	н/п	+	+
Чернобыль	51°27'	30°14'	+	+	+	+
Ялта	44°30'	34°90'	+	+	+	+
Харьков	49°49'	36°03'	н/п	н/п	+	н/п
Опушка Рыжего леса	51° 22'	30° 02'	н/п	н/п	н/п	+
Мотовиловка	50°08'	30°05'	н/п	н/п	н/п	+
Дрогобыч	49°21'	23°30'	н/п	н/п	н/п	+

Примечание: «—» отсутствие 16S рДНК бактерии в выборке; «+» присутствие 16S рДНК бактерии в выборке; «н/п» — сборы не проводились.

Для определения штамма *Wolbachia* из природных популяций *D. melanogaster* Украины было использовано сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена поверхностного белка *wsp*, который содержит так называемый вариабельный регион длиной 41 п.н. (позиция 519 –559) [15].



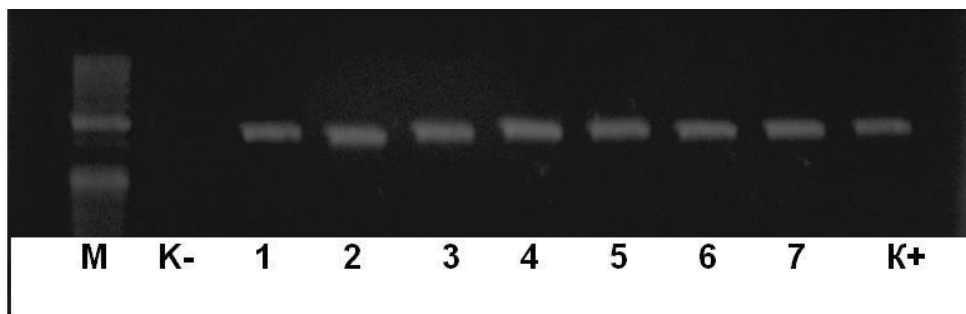


Рис. 1. Результаты идентификации гена 16S рДНК в препаратах ДНК из выборок природных популяций *D. melanogaster* Украины сбора 2007 года
 М — маркер молекулярного веса (50bp, «Fermentas»), К- — отрицательный контроль, препарат ДНК выборки природной популяции (1 — Одесса, 2 — Лубны, 3 — Пирятин, 4 — Умань, 5 — Варва, 6 — Полесское, 7 — Ялта), К+ — положительный контроль.

Fig. 1. Identification of *Wolbachia* 16S rDNA gene in natural populations of *D. melanogaster* from Ukraine sampled in 2007

М — molecular weight marker (50 bp, “Fermentas”), К- — negative control; genomic DNA from natural populations: 1 — Odesa, 2 — Lubny, 3 — Pyryatyn, 4 — Uman, 5 — Varva, 6 — Poliske, 7 — Yalta, К+ — positive control.

Результаты показали наличие в выборках популяций из всех исследуемых регионов штамма *wMel* (номера некоторых полученных последовательностей в GenBank HM775086, HM775087, HM775088, HM775089, HM775090, HM775091, HM775092). Данный штамм был описан для бактерии, которая инфицирует *D. melanogaster* [15]. Проведение такого анализа было необходимо, поскольку известен вирулентный штамм *popcorn*, инфицирующий лабораторные линии *D. melanogaster* и вызывающий у дрозофил дегенерацию нервных и мышечных тканей [10], что приводит к их ранней гибели. В природных популяциях дрозофилид данный штамм до сих пор идентифицирован не был. Нельзя также исключать возможности наличия в исследуемых популяциях *D. melanogaster* других штаммов бактерии или вариантов штамма *wMel*.

Сравнительный анализ фрагмента гена *wsp* из всех исследованных природных популяций показал 100% идентичность участку гена поверхностного белка *Wolbachia*, а также с таковым из имеющихся в GenBank (FJ403330). Следовательно, так называемый варибельный регион, который считается таковым в силу различий последовательности нуклеотидов у эндосимбионтов разных видов насекомых, не является варибельным в природных популяциях *D. melanogaster* Украины. Таким образом, данный фрагмент гена не может использоваться как маркерная последовательность для сравнения бактерий из разных популяций *D. melanogaster* Украины в силу отсутствия варибельности в пределах их геномов, которые инфицируют данный вид на этой территории.

В результате проведенных исследований идентифицированы внутриклеточные бактерии *Wolbachia* в 35 выборках (из 37 исследованных) природных популяциях *D. melanogaster* Украины, что свидетельствует о значительном распространении этих эндосимбионтов на исследуемой территории. Изученные бактерии относятся к штамму *wMel*. В большинстве случаев инфекция наблюдается в одной и той же популяции *D. melanogaster* из года в год, что свидетельствует о низкой вероятности потери *Wolbachia* во время периода диапаузы.

Автори благодарны проф. Милиневському Г.П., с.н.с. Чижевському І.А., співробітникам біологічного факультета Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, співробітникам Інститута виноградарства і вина «Магарач» за допомогу в зборі дрозофілід, проф. Мюссе Т. за допомогу в сиквенуванні, с.н.с. Ілинському Ю. за обговорення результатів.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров І.К., Ваулін О.В., Ілинський Ю.Ю. і др. Істочники генетическої змінчівості в природних популяціях *Drosophila melanogaster* // Вестник ВОГиС. — 2008. — Т. 12, № 1. — С. 112–126.
2. Ілинський Ю.Ю., Захаров І.К. Ендосимбіонт *Wolbachia* в Євразійських популяціях *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 2007. — Т. 43, № 7. — С. 905–915.
3. Проценко А.В., Жук О.В., Козерецька І.А. Соотношения полов в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. — 2006. — Т. 4. — № 2. — С. 193–199.
4. Серга С.В., Проценко А.В., Жук О.В., Козерецька І.А. *Wolbachia* sp. І соотношение полов в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр./ Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. — К.: Логос, 2007. — Т. 1. — С. 304–308.
5. Altschul S.F., Gish W., Miller W., et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. — 1990. — Vol. 215. — P. 403–410.
6. Білоусов О.О., Колодочка Л.О., Заблудовська С.О., Козерецька І.А. Горизонтальне перенесення внутрішньоклітинних бактерій роду *Wolbachia* від коменсальних кліщів *Tyrophagus putrescentiae* до *Drosophila melanogaster* // Доповіді Національної академії наук України. — 2011. — № 4. — С. 139–142.
7. Hoffmann A.A., Hercus M., Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster* // Genetics. — 1998. — Vol. 148, № 1. — P. 221–231.



8. Houck M.A., Clark J.B., Peterson K.R., Kidwell M.G. Possible horizontal transfer of *Drosophila* genes by the mite *Proctolaelaps regalis* // Science. — 1991. — Vol. 253, № 5024. — P. 1125–1128.

9. Mateos M., Castrezana S.J., Nankivell B.J., Estes A.M., Markow T.A., Moran N.A. Heritable Endosymbionts of *Drosophila* // Genetics. — 2006. — Vol. 174, № 1. — P. 363–376.

10. Min K.-T., Benzer S. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 10792–10796.

11. Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Biol. — 2008. — Vol. 6, № 12. — e1000002. doi:10.1371/journal.pbio.1000002.

12. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Research. — 1994. — Vol. 22. — № 22. — P. 4673–4680.

13. O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M.E., Karr T.L., Robertson H.M. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 2699–2702.

14. Werren J.H. Biology of *Wolbachia* // Annu. Rev. Entomol. — 1997. — Vol. 42. — P. 587–609

15. Zhou W., Rousset F., O'Neil S. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences // Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences. — 1998. — Vol. 265. — P. 509–515.



С.В. Серга, І.А. Козерецька

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01601, Київ, Україна,
тел.: +38 (044) 522 39 95, e-mail: luchiksveta05@gmail.com

WOLBACHIA В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Реферат

Проведено виявлення та ідентифікацію бактерій роду *Wolbachia* в природних популяціях *Drosophila melanogaster* України методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням специфічних праймерів до фрагментів генів 16S рРНК та *wsp* з подальшим аналізом прочитаної послідовності. Наявність бактерій встановлено в 14 природних популяціях *D. melanogaster* України і належать вони до штаму *wMel*.

Ключові слова: *Wolbachia*, ендосимбіонт, *Drosophila melanogaster*, ген 16S рРНК, ген *wsp*.

S.V. Serga, I.A. Kozeretska

Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64, Volodymyrska str., Kyiv, 01601,
Ukraine, tel.: +38 (044) 522 39 95, e-mail: luchiksveta05@gmail.com

WOLBACHIA FROM NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* FROM UKRAINE

Summary

Determination and identification of the intracellular bacterium *Wolbachia* were done for 14 natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine in which typing of the bacterium had not been done before. Identification was performed using PCR, and typing was done by aligning the sequences of 16S rRNA and *wsp* gene fragments. Presence of bacteria was determined in all investigated natural populations of *D. melanogaster* from Ukraine. They belong to strain *wMel*.

Key words: *Wolbachia*, endosymbiont, *Drosophila melanogaster*, 16S rRNA gene, the *wsp* gene.

Одержано 27.10.2011.



Д.Р. Абдуліна, Л.Г. Асауленко, Л.М. Пуріш

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, МСП Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

ДИНАМІКА РОСТУ ПОПУЛЯЦІЙ СУЛЬФІДОГЕННОГО МІКРОБНОГО УГРУПОВАННЯ

*Визначено ростові характеристики окремих мікробних популяцій сульфідогенного угруповання, сформованого у біоплівці на сталі, до якого входять сульфатвідновлювальні бактерії та їх бактерії-супутники. Асоціативні бактерії *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 характеризуються високими питомими швидкостями росту ($0,300 \text{ год}^{-1}$ та $0,149 \text{ год}^{-1}$, відповідно), які перевищують швидкість поділу клітин сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp. 10 у 7–14 разів. Висловлено припущення, що різниця у швидкостях росту може слугувати однією з умов для сукцесії при формуванні корозійно-агресивного мікробного угруповання.*

Ключові слова: сульфідогенне мікробне угруповання, сульфатвідновлювальні бактерії, асоціативні бактерії, параметри росту.

Взаємодія ґрунтових мікроорганізмів з підземними металевими конструкціями є складним біоелектрохімічним процесом, який у більшості випадків призводить до пошкоджень [1]. Дослідження реакції ґрунтових мікроорганізмів на зміни, особливо антропогенного та техногенного походження, у навколишньому середовищі є надзвичайно важливими для пізнання закономірностей формування корозійно-агресивних мікробних угруповань.

Бактерії корозійно-агресивного сульфідогенного угруповання можуть бути використані як модельні мікроорганізми для дослідження корозійних процесів на сталі, вивчення механізмів взаємодії бактерій з металом. Актуальним є аналіз основних факторів, що впливають на кінетику росту окремих компонентів угруповань такого типу.

Відомо, що мікробне угруповання як цілісна система повинне задовольняти вимогам термодинаміки та за даних умов існування забезпечувати необхідною енергією всі свої компоненти. Організація угруповання спрямована на максимальне повне використання наявних субстратів, що забезпечується спеціалізацією організмів за субстратами живлення та метаболітами [4, 11]. Як показали наші дослідження, склад сульфідогенного



корозійного мікробного угруповання, сформованого у біоплівці на сталі, здебільшого є сталим, домінуючими компонентами якого є сульфатвідновлювальні, залізівідновлювальні, денітрифікувальні та амоніфікувальні бактерії [12]. Кожна складова угруповання має певні кінетичні характеристики, які відіграють важливу роль у заселенні поверхонь металевих конструкцій і у подальшому формуванні біоплівки.

Проте, даних щодо порівняльної характеристики динаміки росту мікробних популяцій сульфідогенних мікробних угруповань недостатньо.

Метою наших досліджень було вивчення популяційної динаміки та кінетичних параметрів росту складових сульфідогенного мікробного угруповання: сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* та їх супутників — бактерій родів *Pseudomonas* та *Bacillus*.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були штами бактерій, виділені з сульфідогенного мікробного угруповання, сформованого у біоплівці на сталі: *Desulfovibrio* sp. 10, *Pseudomonas aeruginosa* 27 та *Bacillus subtilis* 36.

Для визначення кінетичних параметрів росту кожен з досліджуваних штамів культивували на відповідних середовищах. Для інокуляції поживних середовищ використовували культури у логарифмічній фазі росту. Сульфатвідновлювальні бактерії культивували у 50 мл флаконах протягом 14 діб за температури 28 °С на середовищі Постгейта «В» [2]. Середовище інокулювали культурою *Desulfovibrio* sp. 10 (10% від об'єму), щільно закривали гумовими пробками та культивували у стаціонарному режимі. Через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 14 діб відбирали культуральну рідину та визначали показники: титр життєздатних клітин методом граничних розведень [2, 6]; накопичення сірководню методом йодометричного титрування [5]; накопичення білка в клітинах методом Лоурі [12].

Асоціативні бактерії культивували на м'ясо-пептонному бульйоні у 500 мл флаконах за температури 28 °С. У 50 мл середовища вносили 5% об. інокуляту та культивували протягом 24 годин. Через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24 годин культуральну рідину відбирали і визначали суху біомасу клітин гравіметрично [6] та накопичення білка клітинами.

За визначеними показниками будували логарифмічні криві росту та визначали параметри росту [14]: константу швидкості поділу (ν), питому швидкість росту культур (μ), час генерації (g), час подвоєння клітин (T_d). Отримані дані опрацьовували статистично за допомогою пакету програм Excel.

Результати досліджень та їх обговорення

З біоплівки, сформованої на металі сульфідогенним мікробним угрупованням, нами були виділені та ідентифіковані бактерії різних фізіологічних груп, що мають певні індивідуальні ростові характеристики



і вносять свій внесок у розвиток усього угруповання [12]. До сульфідогенного мікробного угруповання входили штами сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio* sp. 10 та їх супутників – *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 [3].

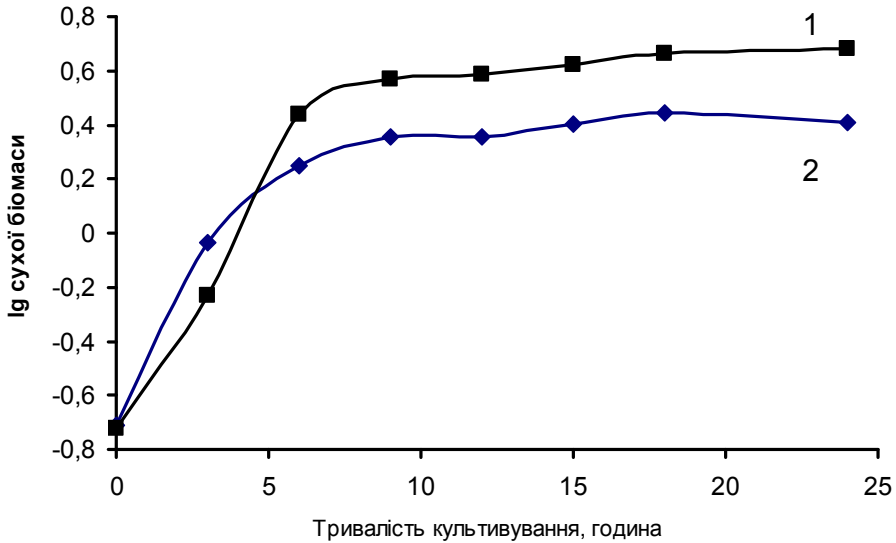


Рис. 1. Криві росту *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1) і *Bacillus subtilis* 36 (2)

Fig. 1. The growth curves *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1), *Bacillus subtilis* 36 (2)

Отримані криві росту гетеротрофних супутників сульфатвідновлювальних бактерій відповідали загальним закономірностям, описаним для бактерій цих видів у літературі [7, 8].

Для штаму *P. aeruginosa* 27 внесення інокуляту у об'ємі 5% забезпечило вихід у фазу експоненційного росту у першу ж годину культивування (рис. 1). Експоненційна фаза росту тривала 5 год, вихід на стаціонарну фазу росту припав на 8–9-у год. Для штаму *B. subtilis* 36 крива росту характеризувалася певними відмінностями (рис.1). Фаза експоненційного росту тривала 3 год, фаза сповільненого росту, яка тривала з 4-ої до 9-ої години культивування, після якої культура переходила у фазу стаціонарного росту.

Для обох культур бактерій-супутників відмічено відсутність лаг-фази, що свідчить про швидке пристосування клітин до умов середовища та їхній активний фізіологічний стан.

Сульфатвідновлювальні бактерії продукують значну кількість сірководню, який вступаючи у взаємодію з наявними у середовищі іонами Fe^{2+} , утворює нерозчинні компоненти, що можуть заважати визначенню біомаси. Тому фази росту цих бактерій визначали за кількістю клітин.

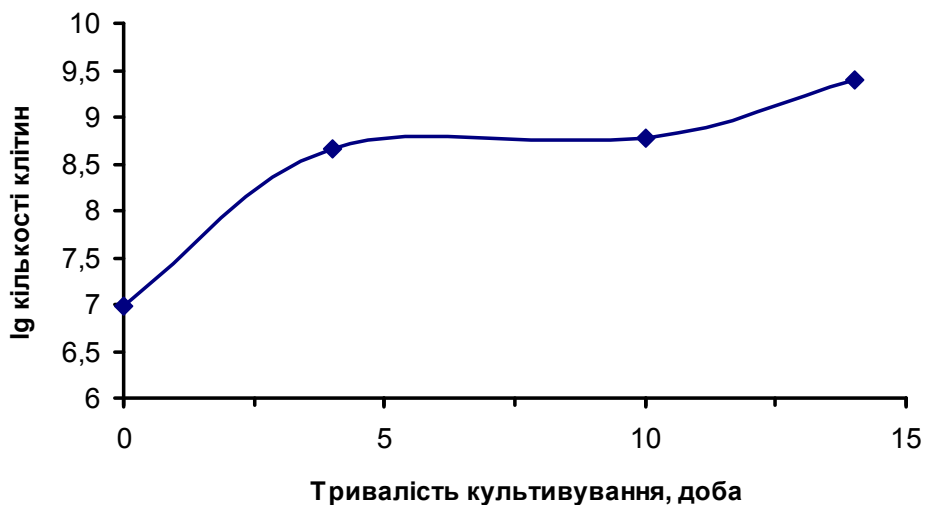


Рис. 2 Крива росту сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio sp. 10*.

Fig. 2 The growth curve of the sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio sp. 10*

Ріст сульфатвідновлювальних бактерій *Desulfovibrio sp. 10* характеризувався наявністю трьох фаз росту (рис. 2). Відмічено відсутність лаг-фази, а фаза експоненційного росту тривала протягом 4-ох діб. На 5-у добу спостерігали сповільнення росту та вихід на стаціонарну фазу росту. Втім на 14-у добу знову було помітно збільшення кількості клітин на 7%.

Отже, за отриманими кривими росту були визначені основні фази розвитку окремих популяцій сульфідогенного мікробного угруповання. Оцінку та порівняння ростових параметрів складових угруповання проводили за накопиченням білка цими штамми, як це було показано для інших штамів мікроорганізмів [13, 10].

На середовищі Постгейта «В» штам *Desulfovibrio sp. 10* продукував доволі високу кількість білка (рис. 3). За перші 3 доби культивування кількість білка збільшилася з 280 до 910 мкг/мл, а на 10-у добу до 1090 мкг/мл. Накопичення сірководню у культуральній рідині деякою мірою співпало з ростом сульфатвідновлювальних бактерій. Протягом 7 діб встановлено поступове накопичення сірководню від $102 \pm 4,59$ мг/л до $230 \pm 10,3$ мг/л. Проте, на 10-у добу культивування помічено значне збільшення продукування сірководню, яке сягнуло $334 \pm 14,03$ мг/л (рис. 3), що за часом співпало з максимальним накопиченням білка у клітинах, і з максимальною кількістю клітин у стаціонарній фазі росту. Подальший ріст культури сульфатвідновлювальних бактерій супроводжувався зменшенням накопичення сірководню і білка, що можливо пов'язано із зниженням життєздатності клітин, зумовленим вичерпанням поживних речовин.

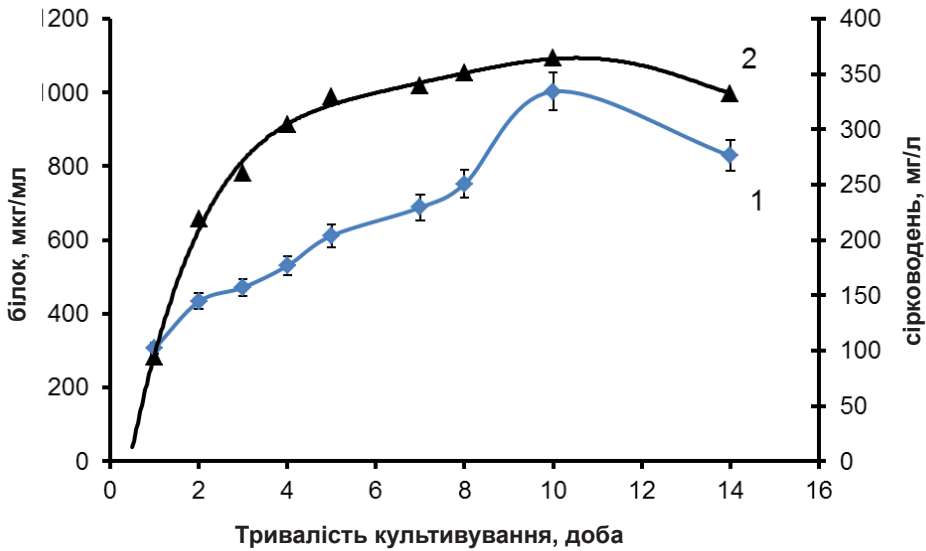


Рис. 3 Динаміка накопичення білка і сірководню клітинами *Desulfovibrio sp.* 10
1 — сірководень, 2 — білок.

Fig 3. Dynamics of the protein productivity and the hydrogen sulfide accumulation by the *Desulfovibrio sp.* 10 cells
1 — hydrogen sulfide, 2 — protein

Утворення сірководню, внаслідок процесів сульфатредукції, є невід'ємною метаболічною властивістю сульфатвідновлювальних бактерій. Сірководень є одним із корозійних метаболітів і має пригнічувальну дію на розвиток мікроорганізмів більшості функціональних груп [9]. Тому в природних умовах, за розвитку мікробного угруповання, як цілісної системи, у ньому функціонують види мікроорганізмів, стійкі до дії сірководню, як наприклад ацидофобні тіонові бактерії. Крім того, розвиток бактерій, чутливих до дії сірководню, може припадати на перші доби функціонування угруповання, коли останній ще не накопичується [4].

Отже, виділені нами супутники сульфатвідновлювальних бактерій здатні пристосовуватися до функціонування у даному сульфідогенному угрупованні.

Найбільшу кількість білка, що накопичували клітини бактерій *P. aeruginosa* 27 (до 1700 мкг/мл) відмічено на 10–12 години культивування (рис. 4). Клітини штаму *B. subtilis* 36 повільніше накопичували білок. Максимальні значення (1020 мкг/мл) спостерігали на 15–18 години культивування. Якщо порівняти накопичення білка у стаціонарній фазі росту сульфатвідновлювальними бактеріями та їх супутниками (рис. 3, 4), то перші продукували білок на рівні зі своїми супутниками. Максимальне значення складало 1090 мкг/мл.

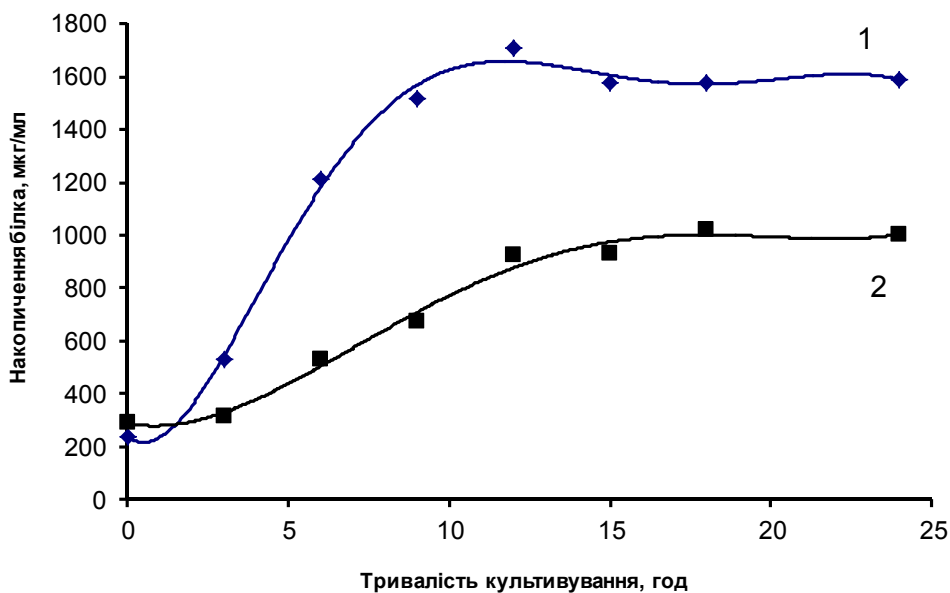


Рис. 4. Динаміка накопичення білка штамми *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1) і *Bacillus subtilis* 36 (2)

Fig 4. Dynamics of the protein productivity by strain *Pseudomonas aeruginosa* 27 (1), *Bacillus subtilis* 36 (2)

Висока продуктивність білка пояснюється тим, що бактерії культивували на оптимальних для них середовищах, якими є м'ясо-пептонний бульйон та середовище Постгейта «В». Вибір оптимальних середовищ для культивування досліджуваних штамів дав змогу оцінити за цих умов ростові характеристики членів сульфідогенного угруповання (табл. 1).

Таблиця 1

Параметри росту компонентів сульфідогенного мікробного угруповання

Table 1

Growth parameters of the sulfidogenic microbial community compounds

Штам	Константа швидкості поділу ν , год ⁻¹	Швидкість росту μ , год ⁻¹ за білком	Час подвоєння Td, год
<i>Desulfovibrio sp. 10</i>	0,069	0,0212	14,49
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	-	0,300	2,31
<i>Bacillus subtilis</i> 36	-	0,149	4,65

Примітка: «-» не визначали

При порівнянні питомих швидкостей росту за накопиченням білка компонентів сульфідогенного мікробного угруповання встановлено, що питоми швидкості росту гетеротрофних супутників *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 є на порядок вищими порівняно з клітинами *Desulfovibrio sp.* 10. Тому бактерії-супутники можуть бути піонерами у заселенні металевих поверхонь. Сульфатвідновлювальні бактерії, яким властива нижча питома швидкість росту, очікувано будуть переважати на наступних стадіях розвитку сульфідогенного мікробного угруповання.

Отже, ростові характеристики окремих популяцій сульфідогенного мікробного угруповання вказують, що асоціативні супутники сульфатвідновлювальних бактерій *P. aeruginosa* 27 та *B. subtilis* 36 характеризуються високими питомими швидкостями росту (0,300 год⁻¹ та 0,149 год⁻¹, відповідно), які перевищують швидкість поділу клітин штаму *Desulfovibrio sp.* 10 у 7–14 разів. Нами висловлено припущення, що різниця у швидкостях росту може слугувати умовою для сукцесії при формуванні корозійно-агресивного мікробного угруповання.

Ці припущення узгоджуються з даними попередніх досліджень, де нами показано, що домінування гетеротрофних бактерій в сульфідогенному угрупованні сформованому у біоплівці на сталі припадало на 3–9 години. Розвиток сульфатвідновлювальних бактерій відмічено лише на 24 годину, а максимальна їх кількість була зафіксована на 10-у добу культивування асоціації [12].

Втім, у природі оптимальних умов для окремого виду бактерій досягти неможливо. В угрупованні бактерії, взаємодіючи між собою, мають широкі адаптивні можливості, більш високу життєздатність, і тому легко пристосовуються до несприятливих умов існування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андreyuk K.I., Kozlova I.P., Kopteva Zh.P., Pilyshenko-Novokhatnyy A.I., Zanima V.V., Purih L.M. Мікробна корозія підземних споруд. - Київ: Наук. Думка. — 2005. — 258 с.
2. Антипчук А.Ф. Кіреєва І.Ю. Водна мікробіологія: навч. посібник — Київ: Кондор. — 2005. — 256 с.
3. Асауленко Л.Г., Пуріш Л.М., Абдуліна Д.Р. Таксономічне положення окремих представників сульфідогенного корозійно-агресивного мікробного угруповання // Мікробіол. журн. — 2010. — 72, № 4. — С. 3–10.
4. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. — М: Книжный дом «Университет», 2001. — 256 с.
5. Лурье Ю.Ю. Унифицированные методы анализа вод. — М.: Химия. — 1971. — 194 с.
6. 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.



7. Милько Е.С., Хабибуллин С.С., Николаев Ю.А., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Динамика роста и состава популяций смешанных культур R-, S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. — 2005. — 74, № 4. — С. 475–482.

8. Могильная О.А., Крылова Т.Ю., Попова Л.Ю. Морфологическая характеристика и динамика развития биопленок трансгенного штамма *Bacillus subtilis* // Микробиология. — 2003. — 72, № 4. — С. 569–570.

9. Павлова Ю.О. Морфолого-фізіологічні властивості бактерій родів *Chromatium* і *Thiocystis* виділених з водойм збагачених сірководнем: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Львів, 2008. — 21 с.

10. Петрова О.Е., Давыдова М.Н., Тарасова Н.Б., Мухитова Ф.К. Сульфатредуцирующие бактерии в биологической переработке промышленных отходов, содержащих нитроцеллюлозу // Вестник Моск. Ун-та. Серия 2. Химия. -2003. — 44, № 1. — С. 43–45.

11. Печуркин Н.С. Популяционная микробиология. / под ред. И.И. Гительзон — Новосибирск: Наука, 1978. — 277 с.

12. Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г. Динаміка сукцесійних змін у сульфидогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // Микробиол. журн. — 2007. - 69, № 6. — С. 19–25.

13. Франк Ю.А. Выделение и изучение сульфатредуцирующих бактерий из экосистем, подверженных влиянию металлургических предприятий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Томск, 2006. — 23 с.

14. Шлегель Г. Общая микробиология. пер с нем. - М.: Мир, 1987. - 567 с.

Д.Р. Абдуліна, Л.Г. Асауленко, Л.М. Пуриш

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

ДИНАМИКА РОСТА ПОПУЛЯЦИЙ СУЛЬФИДОГЕННОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА

Реферат

Определены ростовые характеристики отдельных микробных популяций сульфидогенного микробного сообщества, сформированного в биопленке на стали, в состав которого входят сульфатвосстанавливающие бактерии, а также их бактерии-спутники. Спутники сульфатвосстанавливающих бактерий *P. aeruginosa* 27 и *B. subtilis* 36 характеризуются высокими удельными скоростями роста (0,300 час⁻¹ и 0,149 час⁻¹, со-



ответственно), превышающими скорость роста штамма сульфатвосстанавливающих бактерий *Desulfovibrio sp.* 10 в 7–14 раз. Высказано предположение о том, что разница в скоростях роста может быть одним из условий для сукцессии при формировании коррозионно-агрессивного микробного сообщества.

Ключевые слова: сульфидогенное микробное сообщество, сульфатвосстанавливающие бактерии, ассоциативные бактерии, параметры роста.

D.R. Abdulina, L.G. Asaulenko, L.M. Purish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny Str., Kyiv, D03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 34 79, e-mail: adara@ukr.net

GROWTH DYNAMICS OF THE SULFIDOGENIC MICROBIAL COMMUNITY POPULATIONS

Summary

It has obtained the growth characteristics of the separate microbial populations of a sulfidogenic microbial community, which was formed in a biofilm on the steel surface, and consists of sulfate-reducing-bacteria and their associative satellites. Associative bacteria *P. aeruginosa* 27 and *B. subtilis* 36 are characterized by the high growth rates ($0,300\text{h}^{-1}$ and $0,149\text{h}^{-1}$, consequently). They are having higher growth rates in 7–14 times more than *Desulfovibrio sp.* 10 cells have. It has been expressed the opinion that the difference in the growths rates could be one of a factor for succession during the formation of the corrosive-aggressive microbial community.

Key words: sulfidogenic microbial community, sulfate-reducing bacteria, associative bacteria, growth parameters.

Одержано 28.07.2011.



К.Г. Древаль, К.В. Кузнецова, А.В. Юдіна, М.І. Бойко

Донецький національний університет,
вул. Щорса, 46, Донецьк, 83050, Україна,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

ДИНАМІКА СИНТЕЗУ ЦЕЛЮЛАЗ ВИЩИМИ ДЕРЕВОРУЙНІВНИМИ БАЗИДІАЛЬНИМИ ГРИБАМИ

*Встановлено, що динаміка синтезу ензимів целюлозолітичного комплексу відрізняється у штамів як одного виду, так і різних видів базидіоміцетів. Для штамів *Irpex lacteus* K-1, А-Дон-02, Д-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 максимальна загальна активність целюлозолітичного комплексу встановлена на 7 добу культивування.*

Ключові слова: целюлази, ендоглюканази, целобіази, базидіоміцети, динаміка целюлозолітичної активності.

Целюлозолітичні ензими, що продукуються багатьма мікроорганізмами та грибами [1, 7, 17], останнім часом знаходять застосування у все більш різноманітних галузях науки, сільського господарства та інших видах діяльності людини [18]. Подальша розробка технологій використання целюлаз може привести до розвитку “екологічно дружних” засобів виробництва, зменшивши таким чином антропогенне навантаження на середовище. Однією з найбільш багатообіцяючих технологій використання целюлаз [6, 8] є переробка рослинної сировини (в т.ч. відходів) з отриманням екологічно чистого біопалива, що особливо актуально у сучасних умовах України. Серед низки найважливіших біотехнологічних параметрів будь-якого організма-продуцента є час максимального виходу ензиму [1, 2]. Відповідно до літературних даних, час максимального синтезу целюлозолітичних ензимів для мікроорганізмів не співпадає з максимальним накопиченням біомаси, білку та іншими показниками [11]. Час максимального накопичення целюлаз у культуральних фільтратах для різних організмів коливається в широких межах, тому для кожного окремого продуцента необхідно визначати цей показник. Раніше [4] нами були визначені активні продуценти целюлаз серед вищих базидіоміцетів. Для визначення перспективності їх для біотехнології целюлозолітичних ензимів необхідно встановити терміни активного накопичення ними целюлаз у живильному середовищі.

Метою роботи було дослідження динаміки синтезу целюлозолітичних ензимів вищими дереворуйнівними грибами — активними продуцентами целюлаз.



Матеріали і методи

Об'єктом досліджень було визначення динаміки продукції базидіоміцетами в живильне середовище ензимів целюлозолітичного комплексу — ендоглюканази (КФ 3.2.1.4), целобіогідролази (КФ 3.2.1.91) та целобіази (КФ 3.2.1.21). Дослідження проводили зі штамми вищих базидіальних грибів: *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. К-1, А-Дон-02 та Д-1; *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* (Bolton) J. Schröt AnSc-1. Плодові тіла грибів зібрано з деревних рослин, що ростуть на території м. Донецька та Донецької області. Виділення чистих культур проводили відповідно до загальноприйнятих методик [1].

Для дослідження целюлозолітичної активності штамми культивували в стаціонарному стані на рідкому середовищі Чапека такого складу, (г/л): NaNO_3 — 2, K_2HPO_4 — 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, KCl — 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 [1]. В якості єдиного джерела вуглецю використовували фільтрувальний папір Whatman №1 в кількості 8 г/л. Кислотність живильного середовища доводили до рН 7 за допомогою 10% розчину HCl , використовуючи аналізатор іонів AI-123 (Україна). Культивування проводили у термостатах ТС-80 та ТС-80-М2 (Росія) протягом 31 доби за температур: 28 °С — штам *S. hirsutum* Sh-1, 32 °С — штам *D. confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 та 34 °С — штамми *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02 та Д-1.

Активність ензимів целюлозолітичного комплексу у культуральних фільтратах (КФ) базидіоміцетів визначали по відношенню до фільтрувального паперу (Whatman №1, щільність 80 г/м²) — загальна целюлозолітична активність (ЗЦА), Na-карбоксиметилцелюлози (Sigma, Німеччина), гідроксиетилцелюлози (Sigma, Німеччина) та целобіози (Sigma, Німеччина). Склад реакційних сумішей при визначенні ензиматичної активності та умови проведення реакцій були у строгій відповідності до рекомендацій IUPAC [13] та загальноприйнятих методик [9, 16]. При обчисленні результатів за одиницю активності (IU) приймали таку кількість ензиму, яка утворювала 1 мкМ редукуючих цукрів (для полімерних субстратів) або 1 мкМ глюкози (для целобіози) протягом 1 хв в умовах досліду. Редукуючі цукри визначали методом Шомодї-Нельсона (калібрувальний графік будували за глюкозою) [9]. Глюкозу визначали глюкозооксидазно-пероксидазним методом із застосуванням набору реактивів для визначення глюкози у біологічних рідинах за методикою виробника (Дніпропетровськ, Україна). Вміст білка у КФ визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 (Росія) [3].

Всі дослідження проводили у трикратній повторності. Статистичну обробку проводили методом дисперсійного аналізу, порівняння середніх арифметичних величин — методом Дункана [10].



Результати та їх обговорення

На рис. 1 показана динаміка загальної целюлозолітичної активності штамів вищих дереворуйнівних базидіоміцетів з 1 по 31 добу. Для всіх культур спостерігається певна періодичність активності целюлозолітичних ензимів. У всіх штамів, крім *S. hirsutum* Sh-1, ЗЦА поступово зростала з 1 доби. Різке збільшення синтезу целюлаз встановлено з 5 по 7 добу культивування, коли і визначено максимум ЗЦА для цих штамів, що збігається з літературними даними щодо динаміки синтезу целюлаз іншими грибами [11]. Для штаму *S. hirsutum* Sh-1 ЗЦА була незначною до 9 доби експерименту, коли почалося поступове її зростання з максимумом на 14 добу. При подальшому культивуванні штамів відзначалися незначні періодичні піки ЗЦА. Різке зниження загальної целюлозолітичної активності штамів після досягнення максимальних значень можна пояснити інактивациєю ензимів продуктами реакції — редукуючими цукрами, які утворюються при гідролізі фільтрувального паперу у живильному середовищі.

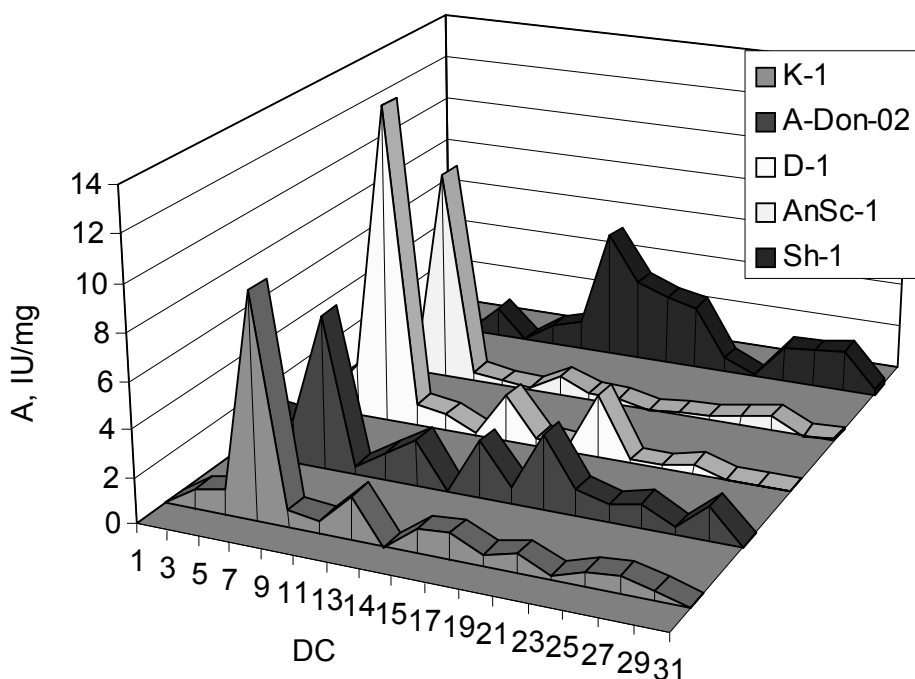


Рис. 1. Динаміка синтезу целюлаз штамами *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність).

Fig. 1. Dynamics of cellulase synthesis by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Динаміку ендоглюканазної активності штамів базидіоміцетів по відношенню до Na-карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ) показано на рис. 2. На відміну від ЗЦА, Na-КМЦ активність КФ нарізно змінювалась у досліджуваних штамів. Для штаму *I. lacteus* К-1 максимум встановлено на 17 добу експерименту, штаму *I. lacteus* А-Дон-02 — на 3 добу, штаму *I. lacteus* Д-1 — на 19 добу, штаму *D. confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 — на 5 добу та для штаму *S. hirsutum* Sh-1 — на 7 добу культивування. Після досягнення максимальних значень ендоглюканазна активність по відношенню до Na-КМЦ також зменшувалась, найімовірніше внаслідок інактивзації ензиму продуктами реакції.

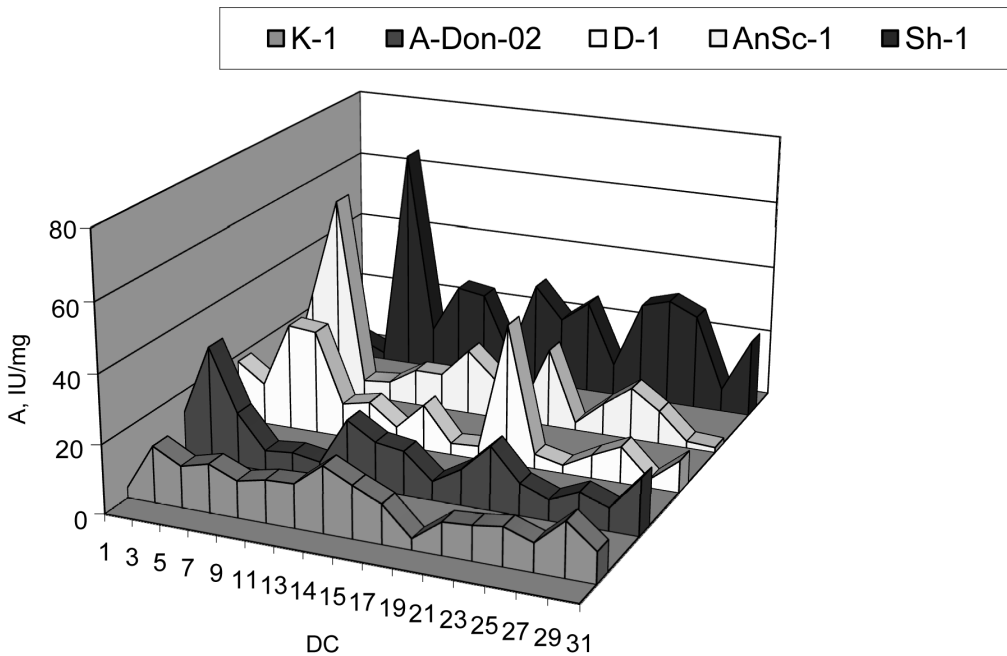


Рис. 2. Динаміка синтезу ендоглюканаз з активністю по відношенню до Na-карбоксиметилцелюлози штамами *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02, Д-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність).

Fig. 2. Dynamics of endoglucanase synthesis with activity towards Na-carboxymethylcellulose by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Як видно з рисунку 3, динаміка ендоглюканазної активності культуральних фільтратів по відношенню до гідроксиетилцелюлози (ГЕЦ) відрізняється від динаміки активності по відношенню до Na-КМЦ, що можна пояснити тим, що ГЕЦ легше гідролізується ензимами [12, 14, 15], вкладом до гідролізу цих сполук не істинно целюлозолітичних ферментів

[9], а також впливом структури замісників у молекулі целюлози [14, 15]. На відміну від целюлозолітичної активності по відношенню до інших субстратів, найвищу ГЕЦ-активність встановлено для штаму *S. hirsutum* Sh-1, що можна пояснити відмінностями у специфічності дії ендоглюканаз різних базидіоміцетів.

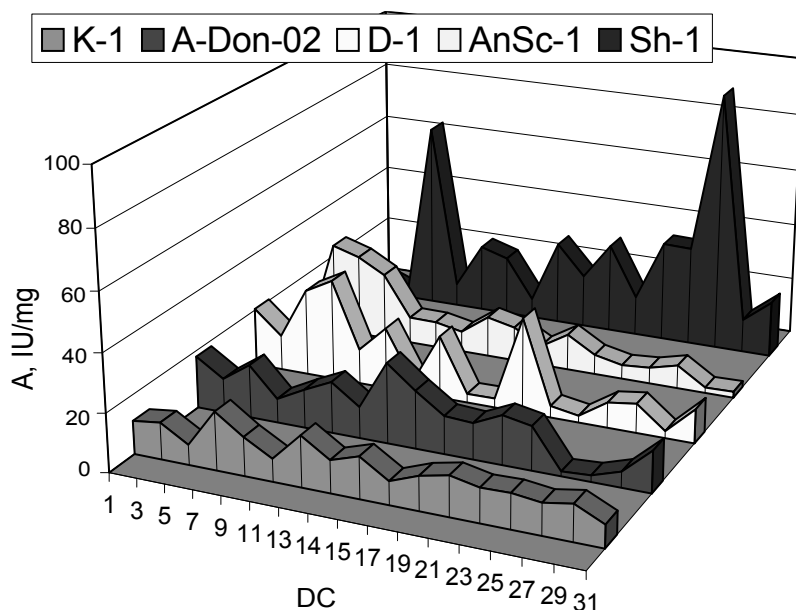


Рис. 3. Динаміка синтезу ендоглюканаз з активністю по відношенню до гідроксиетилцелюлози штамами *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02, Д-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність)

Fig. 3. Dynamics of endoglucanase synthesis with activity towards hydroxyethylcellulose by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Найвищу целобіазну активність встановлено для штаму *I. lacteus* K-1 з максимумом вже на 3 добу експерименту (рис. 4). Пікові значення целобіазної активності штамів *I. lacteus* A-Дон-02, Д-1 та *D. confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 майже співпадають з піковими значеннями ЗЦА, що свідчить про взаємозв'язок цих ферментних систем у розщепленні молекул целюлози. Відсутність такого взаємозв'язку для активностей штамів *I. lacteus* K-1 та *S. hirsutum* Sh-1 найімовірніше обумовлена певною специфічністю їх целобіазних ензимів. Зважаючи на те, що по відношенню до целобіози активність цих штамів вища порівняно із активністю інших штамів, целобіази штамів *I. lacteus* K-1 та *S. hirsutum* Sh-1 скоріше за все відносяться до типу β -глюкозидаз, здатних до гідролізу дисахаридів, у яких обидві частини представлені однаковими залишками [9].

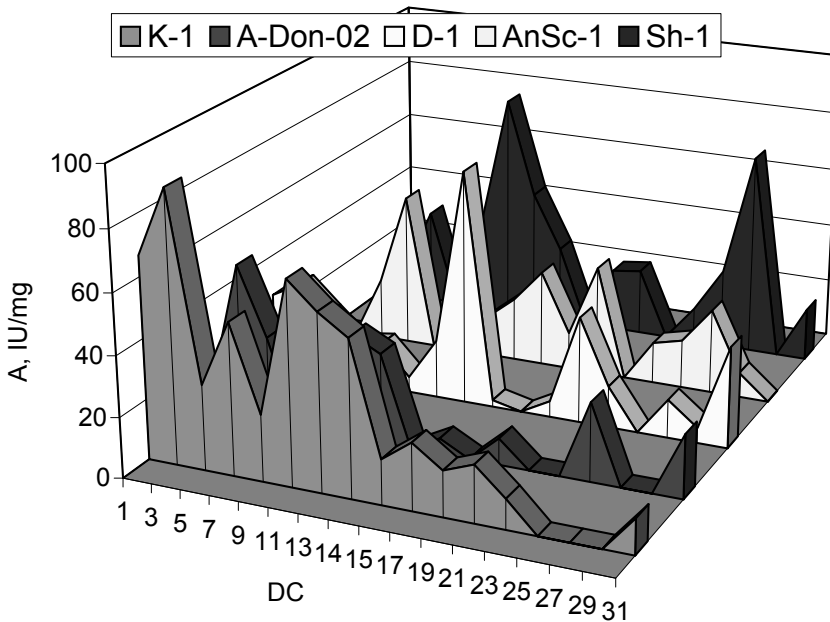


Рис. 4. Динаміка синтезу целобіаз штамами *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02, Д-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 та *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 (ДК — доба культивування, А — активність).

Fig. 4. Dynamics of cellobiase synthesis by *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02, D-1; *Stereum hirsutum* Sh-1 and *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 strains (DC — day of cultivation, A — activity).

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено, що максимальне накопичення ферментів целюлозолітичного комплексу у культуральному фільтраті штамів *Irpex lacteus* K-1, A-Дон-02 та Д-1; *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 відбувається на 7 добу культивування.

Роботу виконано за спонсорської підтримки громадської організації «Развитие» (м. Москва, Росія).

ЛІТЕРАТУРА

1. Билай В.И. Методы экспериментальной микологии. — К.: Наук. думка, 1973. — 243 с.
2. Волова Т.Г. Биотехнология — Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Рос. Ак. Наук, 1999 — 252 с.
3. Дарбре А. Практическая химия белка: Пер. с англ. — М.: Мир, 1989. — 623 с.
4. Древаль К.Г., Бойко М.І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 87–92.

5. *Жданова Н.М., Олішевська С.В., Василевська А.І. та ін.* Скрінінг штамів мікроміцетів, що здатні рости та руйнувати целюлозовмісний субстрат // *Мікробіологія і біотехнологія.* — 2008. — № 3. — С. 58–64.
6. *Кухар В.П.* Біоресурси — потенційна сировина для промислового органічного синтезу // *Біотехнологія.* — 2008. — Т. 1, № 1. — С. 12–27.
7. *Рабинович М.Л., Мельник М.С.* Прогресс в изучении целлюлозолитических ферментов и механизм биodeградации высокоупорядоченных форм целлюлозы // *Успехи биологической химии.* — 2000. — Т. 40. — С. 205–266.
8. *Сибірний А.* Біопаливний етанол з лігноцелюлози (рослинної біомаси): досягнення, проблеми, перспективи // *Вісник НАН України.* — 2006. — № 3. — С. 32–48.
9. *Синицын А.П., Черноглазов В.М., Гусаков А.В.* Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология* — 1993. — Т. 25. — 152 с.
10. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібник — Донецьк: Кассіопея, 1999. — 210 с.
11. *Ферментные системы высших базидиомицетов* / под ред. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г. и др. — К.: Наукова думка, 1989. — 280 с.
12. *Child J.J., Eveleigh D.E., Sieben A.S.* Determination of cellulase activity using hydroxyethylcellulose as substrate. // *Canadian Journal of Biochemistry,* — 1973. — Vol. 51, № 1. — P. 39–43.
13. *Ghose T.K.* Measurement of cellulase activity // *Pure & Appl. Chem.* — 1987. — Vol. 59, № 2. — P. 257–268.
14. *Goyal A., Ghosh B., Eveleigh D.* Characteristic of fungal cellulases. // *Bioresource technology.* — 1991. — Vol. 36, № 1. — P. 37–50.
15. *Keilich G., Bailey P.J., Afting E.G. et al.* Cellulase (β -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* Fr. Part II. Characterization. // *Biochimica et Biophysica Acta — Enzymology.* — 1969. — Vol. 185, № 2. — P. 392–401.
16. *Mullings R.* Measurement of saccharification by cellulases // *Enzyme Microb. Technol.* — 1985. — Vol. 7, № 12. — P. 586–591.
17. *Wood T.M., Garcia-Campayo V.* Enzymology of cellulose degradation. // *Biodegradation.* — 1990. — 1. — P. 147–161.
18. *Xing-hua L., Hua-jun Y., Bhaskar R. et al.* The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization // *African Journal of Biotechnology.* — 2009. — Vol. 8 (11). — P. 2418–2422.



К.Г. Древаль, Е.В. Кузнецова, А.В. Юдина, М.И. Бойко

Донецкий национальный университет,
ул. Шорса, 46, Донецк, 83050, Украина,
тел.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

ДИНАМИКА СИНТЕЗА ЦЕЛЛЮЛАЗ ВЫСШИМИ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИМИ БАЗИДИАЛЬНЫМИ ГРИБАМИ

Реферат

Установлено, что динамика синтеза энзимов целлюлозолитического комплекса отличается у штаммов как одного вида, так и разных видов базидиомицетов. Для штаммов *Irpex lacteus* К-1, А-Дон-02, Д-1 и *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 максимальная общая активность целлюлозолитического комплекса установлена на 7 сутки культивирования.

Ключевые слова: целлюлазы, эндоглюканызы, целлобиазы, базидиомицеты, динамика целлюлозолитической активности.

K.G. Dreval, K.V. Kuznetsova, A.V. Yudina, M.I. Boyko

Donetsk National University, 46, Schorsa str., Donetsk, 83050, Ukraine,
tel.: +38 (062) 304 61 84, e-mail: k.dreval@gmail.com

DYNAMICS OF CELLULASE SYNTHESIS BY HIGHER WOOD-DEGRADING BASIDIOMYCETES

Summary

The difference between the dynamics of cellulase synthesis of different strains were established, even if the strains belong to the same species. The maximal specific filter paper activity for strains *Irpex lacteus* K-1, A-Don-02 and Д-1; *Daedaleopsis confragosa* f. *confragosa* AnSc-1 was established on the 7th day of cultivation.

Key words: cellulases, endoglucanases, cellobiases, basidiomycetes, dynamic of cellulolytic activity.

Одержано 09.11.2011.



І.М. Малиновська

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

СКЛАД МІКРОБНИХ УГРУПОВАНЬ КОРЕНЕВОЇ ЗОНИ ФІТОЦЕНОЗІВ РІЗНОГО ТИПУ

Досліджували склад мікробних угруповань кореневої зони валіськокострицевого, наземнокуничникового і конюшинного фітоценозів багаторічного перелогу. Встановлено, що коренева зона конюшини характеризується найбільшою чисельністю мікроорганізмів з максимальною фізіолого-біохімічною активністю, уповільненням процесів мінералізації сполук азоту, деструкції органічної речовини і гумусу, мінімальним накопиченням фітотоксинів порівняно із іншими фітоценозами.

К л ю ч о в і с л о в а : мікробіоценоз, фітоценоз, сірий лісовий ґрунт, переліг, еколого-трофічні групи, мінералізація, гумус, токсичність.

Посилене розмноження мікроорганізмів у ризосфері рослин зумовлене надходженням у прикореневу зону корневих виділень, що містять різні органічні і мінеральні речовини, і відмерлих часточок з поверхні коренів. Кореневі виділення і опад становлять близько третини загальної кількості синтезованого рослинами за вегетаційний період органічного матеріалу [1]. Рослини також регулюють кислотність і рівень вологості ризосферного ґрунту, чим створюють сприятливіші умови для росту мікроорганізмів. Кількість і склад корневих виділень залежить від дії біотичних і абіотичних стресорів, наявності мінеральних елементів живлення рослин, температури, вологості, реакції ґрунту, умов аерації, виду, сорту та віку рослини [1]. При зміні параметрів кореневої екскреції рослин структура мікробних угруповань ризосфери також суттєво змінюється [2].

Склад корневих виділень різних культур, видів рослин суттєво різниться [3]. Так, у складі корневих виділень кукурудзи виявлені вуглеводи (глюкоза, фруктоза, сахароза), амінокислоти (аспарагінова, глютамінова); в корневих виділеннях бобових превалюють амінокислоти та аміни; злаків — органічні кислоти (щавлева, яблучна, бурштинна) і фенольні сполуки (кумаринова, ферулова, сирінгова кислоти).

Зважаючи на вище приведене, можна припустити, що склад корневих виділень рослин поряд з фізико-хімічними показниками ґрунту, визначає



напруженість та спрямованість мікробіологічних процесів у ризосфері фітоценозу. Тому метою дослідження було вивчення особливостей мікробного угруповання кореневої зони різного типу фітоценозів багаторічного перелогу.

Матеріали і методи

Дослідження проведені на прикладі сірого лісового ґрунту, виведеного із сільськогосподарського використання у 1987 р., на просторово близьких ділянках: валіськокострицевий і наземнокуничниковий фітоценози, та конюшина з елементами різнотрав'я. Відбір ґрунтових зразків проводили з постпірогенних ділянок (протягом квітня 2007—2009 рр. на перелогах відбувалася пожежа середньої інтенсивності, в результаті якої на 90% площі вигоріло мохове покриття, лишайники, підстилка, підріст дерев). Ґрунт кореневої зони рослин, які є складовою фітоценозів різного типу, відбирали за стандартною методикою [4]. Мікробіологічний посів проводився протягом двох годин після відбору проб. Чисельність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп оцінювали методом висіву ґрунтової суспензії на відповідні поживні середовища [4]. Показник інтенсивності процесів мінералізації сполук азоту розраховували за Є.Н. Мішустіним і Е.В. Руновим [5], індекс педотрофності — за Д.І. Нікітіним та В.С. Нікітіною [6], активність мінералізації гумусу — за І.С. Демкіною та Б.Н. Золотарьовою [7]. Кількість колоній підраховували впродовж 21 доби в залежності від швидкості росту і фізіологічних особливостей мікроорганізмів певної еколого—трофічної групи. Вірогідність формування бактеріальних колоній (ВФК) визначали за методом S. Ishikugi and T. Hattori, який описано П.А. Кожевіним та ін. [8]. Фітотоксичні властивості ґрунту визначали з використанням рослинних біотестів (пшениця озима) за Н.А. Красильниковим [9].

Результати та їх обговорення

Дослідження впливу типу фітоценозу на стан мікробного угруповання ризосфери проводяться на прикладі багаторічного перелогу з 2006 р. [10]. Встановлено існування суттєвого впливу компонентів фітоценозу на склад мікробних угруповань у перелоговому ґрунті. Зокрема було встановлено, що найбільшою чисельністю та фізіолого-біохімічною активністю мікроорганізмів характеризувався ґрунт кореневої зони різнотравно-високорайграсового фітоценозу порівняно з наземнокуничниковим і валіськокострицево-високорайграсовим фітоценозами. Вони відрізнялися також за активністю освоєння органічної речовини, гумусу, мінералізації сполук азоту і фітотоксичністю ризосферного ґрунту.

У ході сукцесії різнотравно-високорайграсовий фітоценоз елімінувався із фітоценозів багаторічного перелогу і відокремилися великі куртини конюшини, коренева зона якої відрізняється більшою чисельністю мікроорганізмів порівняно з іншими дослідженими фітоценозами



(табл. 1). У ризосфері конюшини міститься більше, ніж у ризосфері валіськокострицевого фітоценозу амоніфікаторів — на 122,0%, імобілізаторів мінерального азоту — 14,1 денітрифікаторів — 26,1, нітрифікаторів — 42,0, педотрофів — 12,1, полісахаридсинтезувальних бактерій — на 98,4%. Разом з тим, у ризосфері конюшини міститься менше азотобактера, целюлозоруйнівних і автохтонних мікроорганізмів. За чисельністю мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп до мікробного угруповання конюшини наближається мікробіоценоз ризосфери наземнокуничникового фітоценозу (табл. 1).

Попередніми дослідженнями встановлено, що вирощування бобових у монокультурі і бобово-злакових травосумішей супроводжується інтенсифікацією денітрифікаційного процесу у їхній ризосфері [11]. Результати представлених досліджень є підтвердженням цієї закономірності: чисельність денітрифікаторів у кореневій зоні конюшини перевищує аналогічний показник кореневої зони валіськокострицевого фітоценозу на 26,1% (табл. 1). Фізіолого-біохімічна активність денітрифікаторів у кореневій зоні конюшини також максимальна (табл. 2), що свідчить про активність процесу денітрифікації. Передумовами цьому може бути високий вміст сполук азоту, які синтезуються у процесі симбіотичної та асоціативної азотфіксації у ризосфері бобових, і які є субстратом для нітрифікаційного і денітрифікаційного процесів. Зокрема, ґрунт кореневої зони конюшини містить нітратного і амонійного азоту на 131,6 і 13,5% відповідно більше, ніж ґрунт кореневої зони валіськокострицевого фітоценозу (табл. 3).

Згідно проведених раніше досліджень, у ризосфері бобових рослин пригнічується розвиток мікроміцетів [11, 12], що підтверджується даними про вміст мікроскопічних грибів у кореневій зоні конюшини: він менший за аналогічні показники валіськокострицевого і наземнокуничникового фітоценозів на 23,5 і 47,1% відповідно (табл. 1). Отже, бобові рослини екскретують виділення такого складу, що формують мікробне угруповання з антагоністичними властивостями щодо мікроскопічних грибів, які є збудниками фітозахворювань і продуцентами токсинів. Так, фітотоксичність ґрунту кореневої зони конюшини є набагато меншою від цього показника кореневої зони наземнокуничникового (на 14,2%) і валіськокострицевого (на 7,3%) фітоценозів (табл. 4).

Незважаючи на те, що чисельність мобілізаторів фосфатів у кореневій зоні конюшини не перевищує їхню кількість у кореневих зонах двох інших фітоценозів, питома фосформобілізівна активність ґрунту кореневої зони конюшини перевищує аналогічний показник ґрунту валіськокострицевого фітоценозу в 1,67 рази, наземнокуничникового — в 2,78 рази, що свідчить про активніше розчинення фосфатів у ризосфері конюшини (табл. 1). Це підтверджується даними агрохімічного аналізу ґрунту: ступінь рухомості фосфору у кореневій зоні конюшини перевищує аналогічні показники ґрунту двох інших фітоценозів на 30% (табл. 3).



Таблиця 1
Вплив типу фітоценозу на чисельність мікроорганізмів у сірому лісовому ґрунті багаторічного перелогу, млн. КУО*/ г абсолютноно сухого ґрунту, дані 2010 р.

Table 1
Influence of the type area on the number of bacteria in the grey forest soil of long fallow, million CFU**/g absolutely dry soil, 2010 data

Тип фітоценозу	Амоніфікатори	Імобілізатори мінерального азоту	Олігонітрофіли	Азотобактер, % обростання грудочок ґрунту	Нітрифікатори	Денітрифікатори	Педрофи	Целюлозоруйнівні бактерії	Полісахаридсинтезувальні	Автохтонні	Стрептоміцети	Мікроміцети	Мобілізатори мінеральних фосфатів	Кг
Валіськокострицевий	362,5	54,0	38,5	90,0	0,69	119,9	499,9	74,8	2,54	19,3	14,9	0,21	7,99	0,783
Наземнокуничниковий	643,0	85,0	52,6	95,3	0,91	151,2	444,6	87,1	4,32	20,2	27,4	0,25	14,8	0,470
Конюшиний	804,5	61,6	41,0	2,70	0,98	151,2	560,6	63,9	5,04	16,5	13,0	0,17	7,56	1,307
НІР ₀₅	14,3	5,04	3,20	5,00	0,06	15,6	12,5	7,14	0,68	1,02	1,05	0,03	0,40	

Примітка: КУО* - колонієутворююча одиниця, CFU** — colony forming unit



Таблиця 2

Вірогідність формування колоній мікроорганізмів у темно-сірому опідзоленому ґрунті з різним типом фітоценозу, λ , год⁻¹ · 10⁻², дані 2010 р.

Table 2

The probability of forming colonies of microorganisms (λ , h⁻¹ · 10⁻²) in dark grey podzolic soil of different types of phytocenosis, 2010 data

Тип фітоценозу	Амоні-фікатори	Іммобілізатори мінерального азоту	Оліго-нітрофіли	Нітрифі-катори	Денітрифі-катори	Педо-трофи	Автохтонні	Целюлозо-руйнівні	Мікро-міцети	Мобілізатори мінеральних фосфатів
Валіськокострицевий	2,33	0,99	5,85	0,034	0,61	1,20	4,01	1,53	2,89	3,31
Наземнокунічний	0,64	0,63	6,20	0,028	0,47	1,17	4,11	1,30	2,65	2,33
Конюшинний	0,46	0,56	4,80	0,038	5,64	1,16	3,52	4,04	1,62	2,80

Таблиця 3

Агрохімічні показники сірого лісового ґрунту з різним типом фітоценозу, 2010 р.

Table 3

Agrochemical characteristics of grey forest soil of different types of phytocenosis, 2010 data

Тип фітоценозу	N лужногідро-лізований, мг/кг	N-NO ₃ ⁻ , мг/кг	N-NH ₄ ⁺ , мг/кг	P ₂ O ₅ ⁻ , мг/100г	Ступінь рухомості, P ₂ O ₅ , мг/100г	K ₂ O, мг/100г
Валіськокострицевий	95,2	1,90	14,8	24,0	0,21	13,7
Наземнокунічний	78,4	4,11	15,0	21,0	0,20	11,2
Конюшинний	72,8	4,40	16,8	20,0	0,26	9,55
НІР ₀₅	2,05	0,21	0,12	1,23	0,04	1,08

Таблиця 4

Показники інтенсивності мінералізаційних процесів і фітотоксичні властивості сірого лісового ґрунту з різним типом фітоценозу, 2010 р.

Table 4

The indicators of intensity of mineralization processes and phytotoxic properties of the grey forest soil of different types of phytocenosis, 2010 data

Тип фітоценозу	Індекс педотрофності	Коефіцієнт опідзоленості	Коефіцієнт мінералізації азоту	Активність мінералізації гумусу, %	Маса 100 рослин тест-культури – пшениці озимої, г		
					стебло	коріння	загальна маса
Валіськострицевий	1,38	0,11	0,15	3,86	8,13	6,86	15,0
Наземнокуничниковий	0,69	0,08	0,13	4,54	8,36	5,75	14,1
Конюшинний	0,69	0,08	0,08	2,95	8,63	7,47	16,1
НІР ⁰⁵					0,30	0,74	0,78

До пожежі (2006 р.) наземнокуничниковий і валіськокострицевий фітоценози характеризувалися невисоким умістом азотобактера (14–15%) [10]. Пожежа призвела до елімінації азотобактера з постпірогенних ділянок, і тільки через два роки азотобактер знову активізувався у ґрунті, а його чисельність досягла максимальної величини. На 23 рік перелогового стану і на третій рік після пожежі азотобактер виявився у значній кількості тільки в кореневій зоні наземнокуничникового (95,3%) і валіськокострицевого (90,0%) фітоценозів. Відсутність азотобактера у кореневій зоні конюшини є проявом антагоністичного впливу з боку асоціативних і симбіотичних азотофіксаторів у сапрофітному стані, що раніше було показано для інших бобових і зерно-бобових культур [12,13]. Різний рівень розвитку азотобактера в кореневій зоні наземнокуничникового, валіськокострицевого і конюшинного фітоценозів підтверджують наші попередні висновки про значний вплив типу рослинного угруповання на його розвиток.

Чисельність автохтонних мікроорганізмів, їхня фізіолого-біохімічна активність були найнижчими у кореневій зоні конюшини (табл. 1, 2). Це знайшло відображення у тому, що активність мінералізації гумусу в кореневій зоні конюшини на 30,8% нижча за відповідний показник кореневої зони валіськокострицевого і на 53,9% — наземнокуничникового фітоценозів (табл. 4). Таким чином, підтверджуються багаторічні спостереження щодо зниження активності мінералізації гумусу в ризосфері бобових рослин у монокультурі і у складі бобово-злакових травосумішей [11,13]. Попередніми дослідженнями встановлено, що валіськокострицевий фітоценоз характеризується на 58% меншою активністю мінералізації гумусу порівняно з наземнокуничниковим фітоценозом [10]. Різниця в активності мінералізації гумусу між цими фітоценозами збереглася, але стала не такою суттєвою (табл. 4). Треба відмітити, що ґрунт кореневої зони конюшини характеризується найнижчими коефіцієнтами опідзоленості і педотрофності, що свідчить про уповільнення мінералізації органічної речовини в кореневій зоні цього фітоценозу .

Таким чином, у кореневій зоні різних фітоценозів чисельність та фізіолого-біохімічну активність мікроорганізмів, спрямованість та інтенсивність мінералізаційних процесів суттєво розрізняються. Практичним висновком отриманих результатів є те, що найефективнішим способом відтворення господарсько цінних фітоценозів на сірих лісових ґрунтах є висів насіння бобових культур, які забезпечують формування найбільш збалансованих і відтворюючих потенційну родючість ґрунту мікробних угруповань.



ЛІТЕРАТУРА

1. Азарова Т.С. Корневые выделения злаковых и бобовых культур и их влияние на состав модельного микробиоценоза ризосферы / Автореф. дис....канд. биол. наук: 03.00.07 // ВНИИСХМ. — Ленинград, 1986. — 18 с.
2. Steer J., Harris J.A. Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera* // *Soil Biology & Biochemistry*. — 2000. — v. 32. — P. 869–878.
3. Самцевич С.А. Корневые выделения растений и их значение // *Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур*. — Вильнюс, 1986. — С. 301–303.
4. Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. — М.: Дрофа. — 2004. — 256 с.
5. Мишустин Е.Н, Рунов Е.В.. Успехи разработки принципов микробиологического диагностирования состояния почв // *Успехи современной биологии*. — М.: АН СССР, 1957. — Т. 44. — С. 256–267.
6. Никитин Д.И., Никитина В.С. Процессы самоочищения окружающей среды и паразиты растений . — М.: Наука. — 1978. — 205 с.
7. Демкина Т.С, Золотарева Б.Н. Микробиологические процессы в почвах при различных уровнях интенсификации земледелия // *Микробиологические процессы в почвах и урожайность сельскохозяйственных культур*. — Вильнюс. — 1986. — С. 101–103.
8. Кожевин П.А., Кожевина Л.С., Болотина И.Н. Определение состояния бактерий в почве // *Доклады АН СССР*. — 1987. — Т. 297., № 5. — С. 183–214.
9. *Методы изучения почвенных микроорганизмов и их метаболитов* / Под ред. Н.А. Красильникова. — М.: МГУ. — 1966. — 162 с.
10. Малиновська І.М. Вплив типу фітоценозу на спрямованість та інтенсивність мікробіологічних процесів у ґрунті багаторічного перелугу // *Вісник Прикарпатського націон. унів-ту. Сер. Біологія*. — 2008. — Вип. 11. — С. 68–75.
11. Малиновська І.М., Шумська Г.І. Вплив типу рослинного угруповання на стан мікробіоценозу дворічного перелугу // *Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету*. — Умань. — 2009. — Вип. 72. — С. 169–175.
12. Малиновська І.М. Стан мікробіоценозу ризосфери сої за комплексного оброблення насіння фосфатмобілізуючими мікроорганізмами і *Bradyrhizobium japonicum 71T* // *Агроекологічний журнал*. — 2007. — № 3. — С. 79–83.
13. Малиновська І.М., Боговін А.В., Пташнік М.М. Формування мікробіоценозів ґрунту за різних способів відтворення рослинних угруповань // *Землеробство*. — К.: ВД ЕКМО. — 2009. — Вип. 81. — С. 105–118.



И.М. Малиновская

ННЦ «Институт земледелия НААН»,
ул. Машиностроителей, 2Б, п.г.т. Чабаны, Киевская обл., Украина,
тел.: +38 (045) 526 13 28, e-mail: selectio@ukr.net

СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ КОРНЕВОЙ ЗОНЫ ФИТОЦЕНОЗОВ РАЗНОГО ТИПА

Реферат

Исследовали состав микробных сообществ корневой зоны валискоовсяницевого, наземновейникового и клеверного фитоценозов многолетней залежи. Установлено, что корневая зона клевера характеризуется наибольшим содержанием микроорганизмов с максимальной физиолого-биохимической активностью, замедлением процессов минерализации соединений азота, почвенного органического вещества и гумуса, минимальным накоплением фитотоксинов.

Ключевые слова: микробиоценоз, фитоценоз, серая лесная почва, залежь, эколого-трофические группы, минерализация, гумус, токсичность.

I.M. Malynovska

NRC "Institute of Agriculture of the UAAS", 26, Mashynobudivnykiv Str., township Chabany, Kyiv region, Ukraine, tel.: +38 (045) 526 13 28, e-mail: selectio@ukr.net

COMPOSITION OF MICROBIAL COMMUNITIES OF ROOT ZONE OF THE PLANT COMMUNITIES OF DIFFERENT TYPES

Summary

The composition of microbial groups of root zone of *Festuca valesiaca*, *Calamagrostis epigelos* and clover phytocoenoses has been investigated. The root zone of clover is characterized the most number of microorganisms with maximum of physiological and biochemical activity, deceleration of process mineralization of nitrogen compounds and decomposition of soil organic matter and humus. The process of accumulation of phytotoxic compounds was minimum too.

Key words: microbiocoenosis, phytocoenoses, ecologo-trophic groups, mineralization, humus, toxicity, phytotoxicity, soil.

Одержано 10.05.2011.



Т.Є. Волошко, О.В. Федотов

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

СКРИНІНГ ШТАМІВ БАЗИДІОМІЦЕТІВ ЗА АКТИВНІСТЮ АНТИОКСИДАНТНИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ

Досліджено динаміку росту та каталазної, пероксидазної і супероксиддисмутазної активності 14 штамів 10 видів базидіоміцетів при культивуванні на глюкозо-пептонному середовищі. Відібрані штами – активні продуценти антиоксидантних ферментів, які після додаткових досліджень з оптимізації умов культивування можуть бути використані в біотехнології ферментних препаратів.

Ключові слова: базидіоміцети; антиоксидантні оксидоредуктази; каталазна, пероксидазна і супероксиддисмутазна активність.

Промислове виробництво більшості біологічно активних речовин, а саме антибіотиків, вітамінів, полісахаридів, ферментів тощо, здійснюється організмами-продуцентами мікробіологічного або мікологічного походження [3, 4]. Переваги грибів перед мікроорганізмами полягають у тому, що вони здатні рости на відносно дешевих живильних середовищах в умовах поверхневого і глибинного культивування, не дають спорношення на стадії вегетативного росту, що знижує небезпеку професійних захворювань людей у біотехнологічному виробництві; отримання екзометаболітів не вимагає значних витрат; грибні метаболіти за низкою властивостей (оптимум рН і температури дії) більш близькі до тваринних [3, 13, 18].

Встановлено, що ксилотрофні базидіоміцети мають добре розвинений ферментативний апарат. Ензими грибів досліджуються в таких напрямках: при вивченні молекулярних основ фізіології і процесів росту; у зв'язку з інтенсифікацією метаболічних процесів продуцентів для підвищення виходу продуктів у біотехнології; з метою отримання біоенергії або деяких хімічних речовин. Здатність до деструкції складних полімерів, в т.ч. політантів відкриває новий напрям їх використання у екобіотехнології [1, 14, 18]. Всі ці процеси супроводжуються утворенням активних форм кисню (АФК) – оксидативним стресом [8, 15, 16].

Оксидативний стрес – це реакція клітини на підвищення рівня активних форм кисню внаслідок порушення рівноваги між процесами їх



генерації та детоксикації. Протистоїть цим процесам антиоксидантна система, що представлена п'ятьма рівнями, два з яких — ферментативне знешкодження супероксидного аніон-радикалу і перекису водню та відновлення гідроперексидів поліненасичених жирних кислот [6, 15].

Ферменти антиоксидантного захисту (АОЗ) — це високомолекулярні сполуки, до яких належать пероксидази (КФ 1.11.1.7), каталаза (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) тощо. Ці ферменти знайшли широке застосування у медицині та різних галузях промисловості, зокрема: пероксидаза — як діагностичний реагент або маркерний фермент в імуноферментному аналізі, як консервант у харчовій промисловості; каталаза — як компонент сорбенту для стабілізації препаратів крові, для холодної стерилізації харчових продуктів, у процесах органічного синтезу і полімеризації каучуку; супероксиддисмутаза — як компонент лікарських протизапальних препаратів, а також у харчовій промисловості [2, 10, 12].

Традиційними джерелами промислового отримання пероксидаз є рослини *Armoracia rusticana* і *Nicotiana tabacum* та базидіоміцет *Coprinus cinereus*, каталази — тваринні тканини, мікроміцети родів *Penicillium* та *Aspergillus*, супероксиддисмутази — тваринні тканини та мікроорганізми — *Pseudomonas putida*, *Nocardopsis*, *Gluconobacter*, *Saccharomyces cerevisiae*, рекомбінантні штами *Escherichia coli* та *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*. Промислові ферменти є коштовними та у ряді випадків токсичними, що обмежує їх використання і обумовлює актуальність пошуку нових організмів-продуцентів цих речовин, в т.ч. серед базидіоміцетів [2, 10, 12, 16].

Метою даної роботи був скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження були 14 штамів, що належать до 10 видів класу *Basidiomycetes*. Загальні відомості щодо досліджених штамів базидіальних грибів представлено в таблиці 1, де зазначено: загальний список штамів, їх систематичне положення (розглядається згідно сучасних літературних джерел [17]); джерело надходження: місце збору дикорослих у природі плодових тіл (ДПТ), з яких інтродуковані відповідні культури; рік збору, отримання відповідного штаму.

Всі штами виділені в чисту культуру з дикорослих плодових тіл грибів, зібраних в різних місцевостях Донецької області (примітка). Інтродуковані штами зберігаються у Колекції культур базидіоміцетів кафедри фізіології рослин ДонНУ та передані до Колекції культур шапінкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (ІВК). Штами підтримуються при 5 ± 1 °С на агаризованому незахміленому пивному суслі (4° за Баллінгом) і пересіваються з перевіркою чистоти кожні 5–6 місяців.



Таблиця 1

Штами базидіоміцетів, що використані в роботі

Table 1

Strains of basidiomycetes used in the study

Вид	Штам	Джерело надходження*	Рік отримання
<i>Schizophyllum commune</i> Fr.: Fr.	Sc-10	Дн	2010
<i>Fistulina hepatica</i> Schff. ex Fr.	Fh-08	КЛ	2008
<i>Irpex lacteus</i> Fr.	П-4к	Дн	2008
<i>Fomes fomentarius</i> (L. ex Fr.) Gill.	T-10	Дн	2010
<i>Daedalea quercina</i> Fr.	Dq-08	КЛ	2008
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.: Fr.) Murrill	Ls-08	Дн	2008
<i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.: Fr.) P. Karst.	G1-2	Сн	2009
<i>Agrocybe aegerita</i> (Brig.) Singer	167	ІВК	2009
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-2	Дн	2009
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-104	НПП «СГ»	2004
<i>Flammulina velutipes</i> (Curt.: Fr.) Sing.	F-vv	Дн	2002
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-088	ДБС	1998
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-089	ДБС	1998
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.: Fr.) P. Kumm.	P-105	СЛ	2004

Примітка: «*» — вказані скорочені назви місць збору ДПТ, з яких інтродуковані відповідні культури:

ДБС — Донецький ботанічний сад НАН України, Дн — м. Донецьк, ІВК — шифр Колекції культур шапинкових грибів Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України, КЛ — Красноліманське лісництво, НПП «СГ» — національний природний парк «Святі гори», СЛ — Слов'янське лісництво, Сн — м. Сніжне.

Дослідні штами культивували поверхнево в колбах Ерленмейера ємністю 250 мл на глюкозо-пептонному живильному середовищі (ГПС, рН₀ = 6,32) об'ємом 50 мл такого складу, г/л: глюкоза — 10,0; пептон — 3,0; КН₂РО₄ — 0,6; К₂НРО₄ — 0,4; MgSO₄ · 7H₂O — 0,5; CaCl₂ — 0,05; ZnSO₄ · 7H₂O — 0,001. Інокулюмом слугували 10-ти денні міцеліальні культури штамів на сусли-агарі. Температура культивування 27,5 °С. Строк ферментації у 12 діб було обрано виходячи з результатів попередніх досліджень, у яких виявлені максимуми активності досліджуваних ферментів саме у період експоненціального росту, та пояснюється



недоцільністю довгострокового культивування продуцентів [4, 18, 20]. Визначення ферментативної активності у міцелії (на одиницю маси, г) та культуральному фільтраті (на одиницю об'єму, мл) проводили на 6-у, 9-у та 12-у добу культивування. Матеріалами для досліджень були гомогенізований міцелій (МГ) та культуральний фільтрат (КФ). МГ та КФ готували таким чином. Міцелій при 5 ± 1 °С відділяли від культуральної рідини шляхом фільтрування. Біомасу міцелію визначали ваговим методом [7]. Отриманий міцелій додатково підсушували на фільтрувальному папері і охолоджували до $1\pm 0,5$ °С. Підготовлений міцелій гомогенізували шляхом розтирання у стерильній ступці. Досліджувану ферментативну активність оцінювали спектрофотометричними методами: пероксидазну (ПА) — за інтенсивністю забарвлення продукту окиснювання о-діанізидину перекисом водню [7]; каталазну — за забарвленням продукту реакції перекису водню з молібдатом амонію [20]; супероксиддисмутазну — за її здатністю пригнічувати реакцію аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі [19].

Досліди проводили у трикратній повторності. Отримані експериментальні дані обробляли з використанням програм для проведення статистичного опрацювання результатів біологічних експериментів. З метою визначення впливу терміну культивування на активність досліджуваних ферментів був проведений однофакторний дисперсійний аналіз, порівняння дат здійснювалося за методом Дункана. Достовірною вважалася різниця за рівня вірогідності $P > 0,95$. З метою встановлення ступеня спряженості між ознаками, які варіюють, та для визначення спрямованості існуючого між ними зв'язку проводили кореляційний аналіз [11].

Результати та обговорення

Доцільність проведення скринінгових досліджень з біосинтетичних і ростових показників ксилотрофів на глюкозо-пептонному середовищі показана у ряді робіт [7, 5, 9, 18]. Отже, на першому етапі аналізу експериментальних даних оцінювали динаміку накопичення біомаси досліджуваними штамми базидіоміцетів при їх поверхневому рості на ГПС. Ці дані представлені у таблиці 2.

Її дані (табл. 2.) свідчать про те, що всі вивчені штами досягають максимального значення накопичення біомаси наприкінці терміну культивування — 12-у добу росту. Тобто спостерігається прямопропорційна залежність між терміном культивування та накопиченням біомаси міцелієм в інтервалі спостережень. Найвищі показники накопичення біомаси зафіксовано для шт. *S. commune* Sc-10, *P. ostreatus* P-088, *F. velutipes* F-vv, а найнижчі — для шт. *F. fomentarius* T-10, *L. sulphureus* Ls-08, *I. lacteus* II-4К.

Наступним етапом роботи було визначення активності оксидоредуктаз в мікологічному матеріалі.



Таблиця 2

Динаміка накопичення біомаси (г/л) штамами базидіоміцетів в залежності від часу культивування

Table 2

Dynamics of accumulation of biomass (g/l) by some basidiomycetes strains depending on time of cultivation

Штам	Біомаса		
	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	0,95 ± 0,05	2,85 ± 0,04	3,22 ± 0,09
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	1,20 ± 0,10	2,02 ± 0,23	2,56 ± 0,15
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	0,65 ± 0,03	1,32 ± 0,02	3,25 ± 0,11
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	0,21 ± 0,04	1,42 ± 0,20	2,67 ± 0,18
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	0,19 ± 0,07	1,83 ± 0,13	2,97 ± 0,17
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	0,67 ± 0,25	3,02 ± 0,02	3,31 ± 0,02
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	0,74 ± 0,01	0,85 ± 0,02	1,96 ± 0,02
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	0,74 ± 0,21	1,98 ± 0,18	2,69 ± 0,07
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	1,25 ± 0,11	2,08 ± 0,27	2,21 ± 0,12
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	0,23 ± 0,01	1,01 ± 0,07	2,02 ± 0,09
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	0,48 ± 0,01	0,84 ± 0,06	3,41 ± 0,17
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	0,60 ± 0,04	0,93 ± 0,10	3,29 ± 0,13
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	0,64 ± 0,01	1,04 ± 0,02	3,21 ± 0,01
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	1,47 ± 0,21	2,25 ± 0,14	3,49 ± 0,08

Примітка: $p \leq 0,05$

Як показали результати дослідження, всі вивчені штами базидіоміцетів здатні до синтезу антиоксидантних ферментів — пероксидази, каталази і супероксиддисмутази.

Динаміка пероксидазної активності міцелію та культурального фільтрату вивчених штамів базидіоміцетів надана у таблиці 3.

За даними таблиці 3, максимальні значення ПА міцелію більшості штамів спостерігаються на 12-у добу культивування. Для штамів *F. velutipes* F-104 і *L. sulphureus* Ls-08, значення ПА на 9-ту добу вірогідно не відрізняється від цієї величини на 12-у добу росту. Винятком є штами *F. velutipes* F-2 та *F. hepatica* Fh-08, максимума ПА міцелію яких відповідають 9-й добі культивування. Максимальний рівень ПА міцелію серед досліджених культур зафіксований у штамів *A. aegerita* 167, *F. hepatica* Fh-08 та *F. velutipes* F-vv, мінімальне — у штаму *L. sulphureus* Ls-08.



Таблиця 3

Динаміка пероксидазної активності (10^{-3} , у.о. *) штамів базидіоміцетів в залежності від часу культивування

Table 3

Dynamics of peroxidase activity (10^{-3} , a.e.) of some basidiomycetes strains depending on time of cultivation

Штам	Мицелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	2,37 ±0,12	4,81 ±0,10	9,44 ±0,12	1,88 ±0,14	4,65 ±0,21	7,82 ±0,46
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	0,10 ±0,03	0,70 ±0,09	0,89 ±0,09	0,06 ±0,01	0,47 ±0,10	0,47 ±0,10
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	1,13 ±0,10	1,26 ±0,11	1,09 ±0,08	1,09 ±0,07	0,94 ±0,12	0,94 ±0,05
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	0,08 ±0,02	0,63 ±0,07	0,63 ±0,01	0,07 ±0,01	0,63 ±0,02	0,63 ±0,03
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	0,15 ±0,01	0,94 ±0,12	0,47 ±0,07	0,07 ±0,01	0,43 ±0,08	1,56 ±0,21
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	0,10 ±0,02	0,63 ±0,08	2,35 ±0,31	0,07 ±0,03	0,31 ±0,09	0,94 ±0,14
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	0,63 ±0,10	0,31 ±0,06	0,75 ±0,12	0,11 ±0,09	0,63 ±0,06	0,59 ±0,09
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	0,08 ±0,01	0,63 ±0,12	0,93 ±0,32	0,06 ±0,01	0,63 ±0,09	0,73 ±0,12
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	0,07 ±0,02	0,25 ±0,07	0,48 ±0,11	0,06 ±0,02	0,07 ±0,02	0,22 ±0,09
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	0,06 ±0,02	0,47 ±0,12	0,43 ±0,21	0,05 ±0,02	0,07 ±0,01	0,09 ±0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	0,73 ±0,11	0,63 ±0,06	0,78 ±0,08	0,09 ±0,02	0,47 ±0,04	0,56 ±0,02
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	0,22 ±0,02	0,78 ±0,07	0,94 ±0,04	0,19 ±0,02	0,63 ±0,07	0,78 ±0,06
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	0,31 ±0,03	0,78 ±0,07	1,56 ±0,11	0,14 ±0,01	0,56 ±0,09	1,25 ±0,10
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	0,09 ±0,03	0,71 ±0,22	0,83 ±0,10	0,06 ±0,01	0,94 ±0,10	0,63 ±0,10

Примітка: «*» — у.о. пероксидазної активності відповідає кількості ферменту, що каталізує перетворення 1 мкмоль H_2O_2 за одну хвилину в оптимальних умовах (20 °C) [7]; $p \leq 0,05$.



Максимум ПА КФ також для більшості штамів припадає на 12-у добу культивування. Як виняток, найвищу ПА КФ на 9-у добу мали штами *S. commune* Sc-10 і *F. fomentarius* T-10 та *D. quercina* Dq-08 (для якого відсутня вірогідна різниця величини ПА КФ на 6-ту та 9-ту добу росту), та на 6-ту добу культивування — штам *F. hepatica* Fh-08. Найбільші значення ПА КФ серед досліджених культур в порядку убутання зафіксовані у штамів *A. aegerita* 167, *F. velutipes* F-2, *P. ostreatus* P-105, *F. hepatica* Fh-08, найменше — у штаму *L. sulphureus* Ls-08 та *I. lacteus* Il-4К.

Максимальний рівень ПА серед досліджених штамів зафіксований у міцелію для шт. *A. aegerita* 167 на 12-у добу ферментації, який становить 9,44 у.о. З метою порівняння наведемо значення ПА коренів *Armoracia rusticana* — традиційного джерела отримання ферменту пероксидази, що складає 1,6 Е/мл, де Е — одиниця ферментативної активності, яка дорівнює кількості ферменту у мг, що каталізує перетворення 1 мкмоль H_2O_2 за 1 хвилину [12].

Для всіх штамів спостерігається позитивна кореляція між показником ПА міцелію та ПА КФ, за винятком шт. *F. hepatica* Fh-08 і шт. *F. fomentarius* T-10, для яких кореляція цих показників негативна. Переважна більшість досліджених штамів показали позитивну кореляцію між рівнем ПА (як міцелію так і КФ) та терміном культивування, винятком є шт. *F. hepatica* Fh-08 з негативною кореляцією цих показників.

Отже, результати вивчення пероксидазної активності культур базидіоміцетів дозволяють рекомендувати штами *A. aegerita* 167, *F. velutipes* F-2, *P. ostreatus* P-105 та *F. hepatica* Fh-08 для подальшого дослідження з метою можливого використання як продуцентів ферменту пероксидази.

Результати вивчення динаміки каталазної активності штамів базидіоміцетів наведені у таблиці 4.

Як бачимо, найвищі значення КА у міцелії більшості штамів спостерігаються на 12-ту добу культивування. Виключенням є штам *F. velutipes* F-104 та штам *G. lucidum* Gl-2, максимум КА яких припадає на 6-у добу росту. Показники КА міцелію штаму *S. commune* Sc-10 у 6-и і 9-и добовому віці вірогідно не відрізняються. Максимум КА міцелію штаму *F. fomentarius* T-10 зафіксовано на 9-у, а штаму *P. ostreatus* P-105 — на 9-у і 12-у добу ферментації. Серед досліджених штамів, максимальну каталазну активність міцелію зафіксовано для штамів *F. velutipes* F-2, *F. velutipes* F-vv, *F. fomentarius* T-10 та *F. hepatica* Fh-08 у порядку убутання цього показника, а мінімальну — для штаму *F. velutipes* F-104.

Для штамів *P. ostreatus* P-088, P-089 і P-105, *F. hepatica* Fh-08, *D. quercina* Dq-08 та *I. lacteus* Il-4К спостерігається позитивна кореляція між рівнем КА міцелію та КА КФ, для штаму *F. velutipes* F-104 кореляція цих показників відсутня, а для решти штамів — негативна.

Таблиця 4

Динаміка каталазної активності (мкат/г (мл)) штамів базидіоміцетів
в залежності від часу культивування

Table 4

Dynamics of catalase activity (mkat/g (ml)) of some basidiomycetes strains
depending on time of cultivation

Штам	Міцелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	86,6 ±0,2	82,2 ±0,2	119,9 ±1,4	86,6 ±0,6	66,6 ±1,8	93,2 ±0,8
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	79,9 ±2,0	73,2 ±1,2	193,8 ±3,1	119,9 ±2,1	53,3 ±0,7	113,9 ±1,5
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	173,2 ±3,8	106,6 ±3,9	340,3 ±3,2	53,3 ±1,2	99,9 ±1,9	100,6 ±0,5
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	66,6 ±1,0	33,3 ±0,8	33,3 ±0,6	33,3 ±0,4	153,2 ±2,1	153,2 ±2,7
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	173,2 ±4,1	79,9 ±1,3	765,4 ±2,6	71,0 ±2,1	73,3 ±0,4	59,9 ±1,4
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	279,7 ±3,6	132,2 ±2,4	466,2 ±3,0	186,2 ±2,3	66,6 ±0,8	59,9 ±1,9
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	233,1 ±3,4	452,9 ±5,8	93,2 ±0,3	86,6 ±1,0	59,9 ±0,4	59,9 ±0,2
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	173,2 ±4,0	59,9 ±1,1	19,9 ±0,7	39,9 ±0,2	66,6 ±0,9	113,2 ±1,8
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	13,3 ±0,2	39,9 ±1,0	246,4 ±4,5	93,2 ±0,8	106,6 ±1,7	100,6 ±1,0
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	93,2 ±0,7	72,2 ±0,7	133,2 ±1,3	46,6 ±0,4	46,6 0,4	39,9 ±0,8
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	86,6 ±0,30	106,6 ±0,6	153,9 ±1,1	79,9 ±0,6	100,6 ±1,9	106,6 ±0,5
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	112,2 ±1,4	146,5 ±2,6	273,7 ±2,9	73,3 ±0,8	93,2 ±1,8	113,9 ±4,6
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	109,6 ±1,9	140,5 ±2,2	146,5 ±0,8	99,9 ±0,7	106,6 ±2,4	140,5 ±0,9
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	99,9 ±1,2	119,9 ±2,2	79,9 ±0,9	73,3 ±1,0	73,3 ±1,0	79,9 ±0,9

Примітка: $p \leq 0,05$



Також зафіксована негативна кореляція між показником КА міцелію та терміном культивування штамів *F. velutipes* F-104, *G. lucidum* Gl-2, *S. commune* Sc-10 і *F. fomentarius* T-10, та позитивна — для всіх інших штамів. Для більшості штамів встановлена позитивна кореляція між показником КА КФ та терміном культивування, за винятком штамів *F. velutipes* F-2 і F-vv, *D. quercina* Dq-08, *L. sulphureus* Ls-08 та *F. fomentarius* T-10, для яких ця кореляція є негативною.

У 12-ти денному міцелії шт. *F. velutipes* F-2 зафіксовано максимальне серед досліджених штамів значення КА — 765,4 мкат/г. Зазначимо, що КА сироватки крові тварин — одного з джерел промислового отримання ферменту каталази складає від 16,8 до 166,6 мкат/л [20].

Дані щодо супероксиддисмутази активності досліджених штамів базидіоміцетів надані у таблиці 5.

Штами видів *G. lucidum*, *D. quercina*, *I. lacteus* та *F. fomentarius* мають максимум СА міцелію у віці 9-и діб, а видів *F. velutipes*, *P. ostreatus* і *F. hepatica* — 12-и діб. Максимальний рівень СА міцелію вірогідно не відрізняється у штамів видів *S. commune* і *L. sulphureus* на 9-у та 12-у добу культивування, а штаму *A. aegerita* 167 — на 6-у та 9-у добу. Найвищий рівень СА міцелію серед досліджених штамів зареєстрований у шт. *F. hepatica* Fh-08, та дещо нижчий — шт. *P. ostreatus* P-088 і P-105, шт. *I. lacteus* Il-4K та шт. *F. fomentarius* T-10.

Максимальні значення СА КФ шт. *F. hepatica* Fh-08 та дещо нижчі — шт. *P. ostreatus* P-088 і P-105 зафіксовані на 12-у добу культивування. Штам *F. fomentarius* T-10 має найнижчий рівень активності цього ферменту.

Для штамів *P. ostreatus* P-088, P-089 і P-105 виявлена висока кореляція між показником СА міцелію та СА КФ, а для шт. *F. velutipes* F-104 і F-vv, шт. *A. aegerita* 167 та шт. *F. fomentarius* T-10 спостерігається негативна кореляція. Для всіх штамів спостерігається позитивна кореляція між показником СА міцелію та терміном культивування, винятком є шт. *I. lacteus* Il-4K та шт. *A. aegerita* 167. Також, для більшості штамів, окрім шт. *I. lacteus* Il-4K та шт. *F. velutipes* F-vv, зафіксована позитивна кореляція між показником СА КФ та терміном культивування.

Максимальне значення СА серед досліджених штамів зафіксовано для шт. *F. hepatica* Fh-08 у КФ на 12-у добу ферментації та становить 113,0 у.о. З метою порівняння наведемо значення СА еритроцитів тварин — одного з джерел промислового отримання ферменту супероксиддисмутази, що складає 65 у.о. [19].

Таким чином, скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз дозволив виявити культури — активні продуценти цих ферментів. Так, найвища пероксидазна активність виявлена у шт. *A. aegerita* 167, шт. *F. velutipes* F-2, шт. *P. ostreatus* P-105 та шт. *F. hepatica* Fh-08; каталазна активність — у шт. *F. velutipes* F-vv; СА — у шт. *F. hepatica* Fh-08 та шт. *P. ostreatus* P-088 і P-105.

Таблиця 5

Динаміка супероксиддисмутазиної активності (у.о. *) штамів базидіоміцетів залежно від часу культивування

Table 5

Dynamics of superoxide dismutase activity (a.e.) of some basidiomycetes strains depending on time of cultivation

Штам	Мицелій			Культуральний фільтрат		
	6 діб	9 діб	12 діб	6 діб	9 діб	12 діб
<i>Agrocybe aegerita</i> 167	21,7 ±0,7	22,1 ±0,6	12,5 ±0,4	18,2 ±0,1	20,6 ±0,2	33,3 ±0,1
<i>Daedalea quercina</i> Dq-08	21,9 ±1,5	37,8 ±0,5	24,3 ±1,0	18,2 ±0,3	37,8 ±0,7	20,0 ±0,8
<i>Fistulina hepatica</i> Fh-08	54,5 ±1,2	52,5 ±1,2	88,9 ±1,9	47,9 ±1,0	64,2 ±0,8	113,0 ±0,2
<i>Flammulina velutipes</i> F-104	21,1 ±0,5	15,4 ±0,7	26,8 ±0,8	18,2 ±0,2	30,8 ±1,4	28,1 ±0,8
<i>Flammulina velutipes</i> F-2	32,5 ±1,1	18,5 ±0,5	40,0 ±1,0	26,1 ±0,6	9,0 ±0,9	29,1 ±0,2
<i>Flammulina velutipes</i> F-vv	36,1 ±0,9	39,0 ±1,2	42,3 ±1,3	70,0 ±2,4	29,0 ±0,9	21,4 ±0,7
<i>Fomes fomentarius</i> T-10	20,1 ±0,8	58,3 ±1,7	37,5 ±1,0	12,5 ±0,1	12,5 ±0,2	16,7 ±0,2
<i>Ganoderma lucidum</i> Gl-2	26,7 ±0,5	36,1 ±0,8	26,8 ±0,4	22,6 ±0,4	38,5 ±0,2	23,1 ±0,3
<i>Irpex lacteus</i> Il-4K	48,2 ±1,1	55,6 ±1,4	34,9 ±0,8	45,5 ±0,9	60,0 ±0,4	34,0 ±1,1
<i>Laetiporus sulphureus</i> Ls-08	24,1 ±1,3	33,3 ±0,3	33,3 ±1,1	14,9 ±0,4	26,6 ±0,5	41,7 ±0,8
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-088	27,1 ±0,6	27,1 ±0,8	79,5 ±2,6	21,0 ±0,7	21,0 ±0,9	54,7 ±1,4
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-089	16,6 ±0,3	16,6 ±0,3	36,2 ±0,8	8,8 ±0,1	8,8 ±0,2	20,0 ±0,6
<i>Pleurotus ostreatus</i> P-105	23,1 ±0,5	23,1 ±0,6	74,0 ±2,3	18,2 ±0,4	18,2 ±0,4	49,0 ±1,0
<i>Schizophyllum commune</i> Sc-10	21,4 ±0,9	26,4 ±0,6	24,6 ±0,4	20,1 ±0,6	28,7 ±0,6	25,0 ±0,4

Примітка: «*» – у.о. супероксиддисмутази відповідає пригніченню на 1% супероксиддисмутазою швидкості аутоокиснення адреналіну; $p \leq 0,05$.



Пероксидазна та каталазна активності міцелію досліджених штамів перевищують відповідні показники у КФ у 1,5–1,7 та у 2,0–2,2 рази. Супероксиддисмутазна активність, на відміну від ПА і КА, вища у культуральному фільтраті у 0,7–1,0 рази. Скоріш за все це пов'язано з тим, що більшість ферментів, до яких, ймовірно, належить супероксиддисмутаза, є екстрацелюлярними продуктами й виділяються у культуральне середовище, а у міцелії продуцента їх залишається близько 10–15%. На відміну від СОД, пероксидаза та каталаза, що зв'язані з клітинними органелами, надходять у культуральний фільтрат лише за умови руйнування клітин.

Отже, скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз показав суттєві коливання показників ферментативної активності досліджуваних штамів і видів базидіоміцетів, що дозволило відібрати перспективні штами — продуценти цих речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабицкая В.Г. Антиоксидантная активность грибов — деструкторов лигноцеллюлозных субстратов / В.Г. Бабицкая, В.В. Щерба // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 2. — С. 169–173.
2. Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В.В. Бараненко // Цитология. — 2006. — Т. 48, № 6. — С. 465–474.
3. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов / Н.В. Белова // Микология и фитопатология. — 2004. — Т. 38, — Вып. 2. — С. 1–6.
4. Буценко Л.М. Технології мікробного синтезу лікарських засобів. Навч. посіб. / Л.М. Буценко, Ю.М. Пенчук, Т.П. Пирог. — К.: НУХТ, 2010. — 323 с.
5. Бухало А.С. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации / А.С. Бухало, Н.А. Бисько, Э.Ф. Соломко, В.Т. Билай, Н.Ю. Митропольская, Н.Л. Поединок, А.А. Гродзинская, О.Б. Михайлова. — К.: Чернобыльинтеринформ, 2004. — 128 с.
6. Гесслер Н.Н. Активность супероксиддисмутазы и каталазы у каратиноидсинтезирующих грибов *Blakeslea trispora* и *Neurospora crassa* в условиях окислительного стресса / Н.Н. Гесслер, А.В. Соколов, В.Я. Быховский, Т.А. Белозерская // Прикладная биохимия и микробиология. — 2002. — Т. 38, № 3. — С. 237–242.
7. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
8. Капич А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов / А.Н. Капич, Л.Н. Шишкина // Микология и фитопатология. — 1992. — Т. 26, № 6. — С. 486–492.



9. *Ломберг М.Л.* Лікарські макроміцети у поверхневій та глибинній культурі: дис. канд. біол. наук: 03.00.21 / НАН України; Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного. — К., 2005. — 20 с.

10. *Мирошниченко О.С.* Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы / О.С. Мирошниченко // Биополимеры и клетка. — 1992. — Т. 8, № 6. — С. 3—25.

11. *Приседський Ю.Г.* Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г. Приседський. — Донецьк: Кассиопея, 1999. — 210 с.

12. *Рогожин В.В.* Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. — СПб: ГИОРД, 2004. — 240 с.

13. *Соломко Э.Ф.* Перспективы использования лечебно-профилактических свойств культивируемых грибов в 21 веке / Э.Ф. Соломко, М.Л. Ломберг // Мат. наук.-практ. конф. «Нові технології при вирішенні медико-екологічних проблем». — К. — 2000. — С. 84—87.

14. *Терехова В.А.* Микотестирование химических воздействий / В.А.Терехова // Современная микология в России. — М. — 2008. — Т. 2. — С. 106.

15. *Byung Pal Yu.* Cellular defenses against damage from reactive oxygen species / Pal Yu. Byung // Physiological Reviews. — 1994. — Vol. 74. — P. 139—155.

16. *Jordan K. Zjawiony.* Biologically Active Compounds from *Aphyllophorales* (Polypore) Fungi // Journal of Natural Products. — 2004. — Vol. 67. — P. 300—310.

17. *Kirk P.M.* Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9th ed. / P.M. Kirk, P.F. Cannon, J.C. David, J.A. Stalpers — Wallingford, CAB International, 2001. — P. 655.

18. *Fedotov O.V.* Wood—destroying fungi as bio—sources of ferments for medicinal and nutritional purposes / O.V. Fedotov — Plant and Microbial Enzymes: isolation, characterization and biotechnology applications — Tbilisi: Muza, 2007. — P. 125—126.

19. *Патент 2144674* Российской Федерации. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений / Сирота Т.В. Заявка № 99103192/14, от 24.02.1999, кл. G01N33/52, G01N33/68, Бюл. № 1, от 20.01.2000.

20. *Патент 39243 А* України. Спосіб визначення каталазної активності базидіоміцетів / Федотов О.В., Гавриленко Г.В. Заявка № 2000116560, від 21.11.2000, кл. 7C12N9/58, Бюл. № 5, від 15.06.2001.



Т.Е. Волошко, О.В. Федотов

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

СКРИНІНГ АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ШТАММОВ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

Реферат

Изучены динамика роста и каталазной, пероксидазной, супероксиддисмутазной активностей 14 штаммов 10 видов базидиомицетов при их культивировании на глюкозопептонной среде. Отобраны штаммы — активные продуценты антиоксидантных ферментов, которые после дополнительных исследований по оптимизации условий культивирования могут быть использованы в биотехнологии ферментных препаратов.

Ключевые слова: базидиомицеты; антиоксидантные оксидоредуктазы; каталазная, пероксидазная, супероксиддисмутазная активность.

T.E. Voloshko, O.V. Fedotov

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

SCREENING OF ANTIOXIDANT OXIDOREDUCTASES OF STRAINS OF BASIDIOMYCETES

Summary

The dynamics of accumulation of biomass and dynamics of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase activity of 14 strains of basidiomycetes belonged to 10 species was investigated. Glucose-peptone medium was used to grow fungi. The dynamics of accumulation of biomass and dynamics of activity of antioxidant enzymes of some basidiomycetes strains was determined. The selected strains are the active producers of antioxidant enzymes. And they can be used in biotechnology to produce enzymes after further research.

Key words: basidiomycetes; antioxidant oxidoreductase; catalase, peroxidase and superoxide dismutase activity.

Одержано 21.09.2011.



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

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

УТВОРЕННЯ СПОЛУК СІРКИ З РІЗНИМ СТУПЕНЕМ ОКИСНЕННЯ БАКТЕРІЯМИ *CHLOROBIVUM* *LIMICOLA* ІМВ К-8

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії C. limicola ІМВ К-8 в процесі культивування на середовищі з H_2S нагромаджують позаклітинну елементну сірку. Після повного використання гідроген сульфід, вміст сірки знижується, а у середовищі спостерігається утворення сульфат іону, максимальна кількість якого нагромаджується на 13 добу. В дослідях з відмитими клітинами *C. limicola* ІМВ К-8 показано, що на двадцяту годину інкубації концентрація сульфат іону сягає максимуму, як при освітленні так і в темряві. Встановлено, що пріоритетним субстратом окиснення за умов відсутності гідроген сульфід є ендогенна глюкоза та глікоген. Джерела енергії в стресових умовах використовуються у послідовності: глюкоза – глікоген – елементна сірка.

Ключові слова: зелені сіркові бактерії, елементна сірка, сульфат іон, глюкоза, глікоген.

Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії в процесі аноксигенного фотосинтезу здатні використовувати відновлені сполуки сірки, такі як гідроген сульфід, тіосульфат, тетратіонат і молекулярну сірку як донори електронів. За природою використовуваних донорів електронів різні види суттєво відрізняються [1]. Побічним продуктом у процесі фотосинтезу цих бактерій є сірка або сульфат іон [2]. Фотосинтезувальні зелені сіркові бактерії *C. limicola* ІМВ К-8 єдиним донором електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу використовують гідроген сульфід. Інші відновлені сполуки сірки як донори електронів ці бактерії не використовують [1, 2]. При рості у середовищі з гідроген сульфідом у культуральній рідині можна виявити елементну сірку, а на пізніх стадіях розвитку культури сульфат іони. Значення цього процесу в метаболізмі фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій не з'ясоване.

Метою роботи було вивчення окремих шляхів метаболізму сполук сірки з різним ступенем окиснення у клітинах фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій.



Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був штам зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* IMB K-8 [1, 3]. Для вирощування бактерій використовували середовище GSB (green sulfur bacteria) такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 0,30, NH_4Cl — 0,34, KCl — 0,34, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,15, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5. Після автоклавування додавали окремо: 10% NaHCO_3 — 15 мл, 1 М $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ — 2,5 мл, розчин вітаміну B_{12} (2 мг/мл) — 1 мл, мікроелементи — 1 мл. Суміш мікроелементів містила на літр дистильованої води: 25% HCl — 10 мл; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 2,0 г; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 190 мг; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 100 мг; ZnCl_2 — 70 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 36 мг; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 24 мг; H_3BO_3 — 6 мг; і $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 2 мг. FeSO_4 розчиняли у HCl , інші компоненти у дистильованій воді, рН середовища 6,7–6,8.

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

Біомасу визначали колориметрично [2] на фотоелектроколориметрі КФК — 3 ($\lambda=450$ нм, кювета з оптичним шляхом 3 мм). Для розрахунків використовували формулу:

$$C, \text{ мг/мл} = (E_{450} \cdot n) / 0,131,$$

де E_{450} — екстинкція при 450 нм, n — ступінь розведення, 0,131 — коефіцієнт перерахунку, визначений експериментально.

Концентрацію гідроген сульфід у визначали фотоелектроколориметрично [2], використовуючи вісмутувий реактив такого складу ($3,4\text{г Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 230$ мл льодяної оцтової кислоти + 500мл (6%) розчину желатину, загальний об'єм доводили до одного літра дистильованою водою). До 5 мл вісмуту реактиву додавали 9,5 мл NaOH (1Н) перемішували і залишали при кімнатній температурі на 10 хв. До суміші додавали 0,5 мл культуральної рідини і визначали оптичну густину при $\lambda = 400$ нм.

Концентрацію гідроген сульфід у (мг/л) визначали за формулою:

$$C = E / R$$

де C — концентрація гідроген сульфід у (мг/л), E — екстинкція при 400 нм,

R — коефіцієнт, визначений за калібрувальною кривою.

Вміст сульфат іонів визначали турбідиметрично [1, 2]. Метод полягає в осадженні сульфат іону барій хлоридом і турбідиметричному визначенні його у вигляді барій сульфату [2, 3]. Для цього до 1 мл культуральної рідини без клітин додавали 10 мл робочого осаджуючого розчину, ретельно перемішували, витримували протягом 10 хв, струшували і фотометрували

у кюветі з оптичним шляхом 10мм при довжині хвилі 520 нм. Сірку визначали спектрофотометрично на СФ-46, при 260 нм [1].

Клітини руйнували за допомогою ультразвукового дезінтегратора УЗДН–2Т при частоті 22 кГц протягом 5 хв у скляних товстостінних пробірках, занурених у лід. Уламки клітин осаджували центрифугуванням при 15 тис об/хв протягом 45 хв. при 4 °С. Гідроліз полісахариду неклітинних екстрактів проводили 1 Н H₂SO₄. Концентрацію глюкози визначали ферментативно [2].

Результати та їх обговорення

Для виявлення сполук сірки з різним ступенем окиснення *C. limicola* ІМВ К-8 вирощували за умов освітлення і за наявності гідроген сульфід, джерелом якого служив Na₂S. За цих умов молекулярна сірка виявлялася протягом усього періоду культивування бактерій (рис. 1). Найбільш інтенсивне утворення сірки спостерігали в експоненціальній фазі росту. З переходом культури в стаціонарну фазу виділення сірки клітинами сповільнювалося і на 12 добу її кількість у середовищі зменшувалася практично до нульового показника. Одночасно в середовищі розпочиналося утворення сульфат іону.

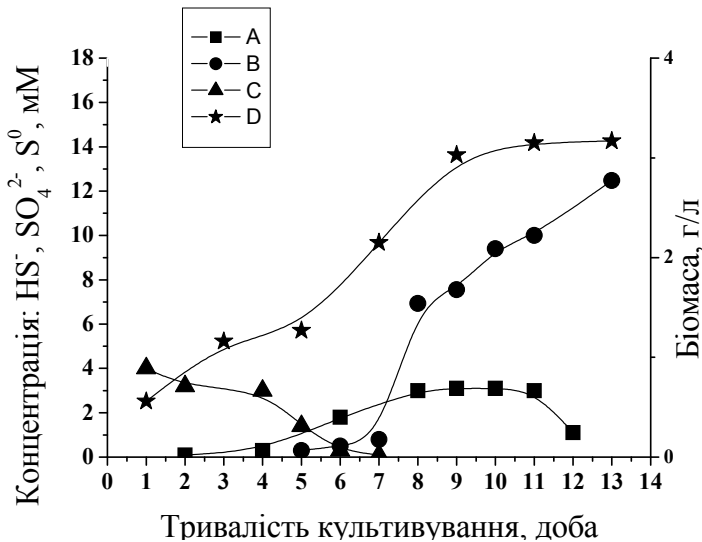


Рис. 1. Перетворення сполук сірки в процесі росту культури *C. limicola* ІМВ К-8 за наявності у середовищі:

A — елементарної сірки, B — сульфат іону, C — гідроген сульфід, D — біомаси.

Fig. 1. Transformation of sulfur compounds in the growth of culture *C. limicola* IMB K-8 in the presence in medium:

A — elemental sulfur, B — sulfate ion, C — hydrogen sulfide, D — biomass.

Використання гідроген сульфід у середовищі супроводжувалося зниженням темпів росту культури і її переходом у стаціонарну фазу. Через короткий період часу знижувався вміст сірки, однак росту клітин практично не відбувалося. При цьому характер кривої росту нагадував діауксичну криву росту [2, 3]. Можливо, у *C. limicola* IMB K-8 гідроген сульфід є пріоритетною сполукою сірки за умов катаболізму її відновлених сполук у процесі аноксигенного фотосинтезу.

Після використання гідроген сульфід, сірка нульової валентності окиснюється до сульфат іону [5, 6]. Показано, що його нагромадження починається на п'яту добу культивування клітин *C. limicola* IMB K-8 у мінеральному середовищі GSB (рис. 1). Зростання вмісту сульфат іону спостерігається протягом 8 – 13 доби культивування.

Отримані результати дають підставу вважати, що клітини *C. limicola* IMB K-8 при рості на середовищі з гідроген сульфідом окиснюють його на світлі в процесі фотосинтезу до елементної сірки, яка екскретується з клітин у культуральне середовище. За умов відсутності гідроген сульфід, коли фотосинтез припиняється, через відсутність донора електронів, елементна сірка окиснюється до сульфат іону. Однак, за цих умов помітного зростання біомаси клітин *C. limicola* IMB K-8 не спостерігалось.

Щоб з'ясувати чи використовують клітини *C. limicola* IMB K-8 виділювану ними сірку за наявності гідроген сульфід, на сьому добу коли його концентрація знижувалася до нуля (рис. 2), до середовища вносили Na_2S (джерело гідроген сульфід). Як впливає з даних рис. 3 зростання вмісту гідроген сульфід, стимулювало ріст біомаси і вміст елементної сірки в середовищі. Рівень сульфат іону при цьому помітно не змінювався. Очевидно, за умов фотосинтезу енергетичні потреби клітини забезпечуються реакціями фотофосфорильовання. Окиснення сірки служить додатковим джерелом енергії, яка забезпечує ріст клітин в стресових умовах (відсутність донора електронів).

Для дослідження закономірності утворення сульфат іону відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8 при внесенні у середовище елементної сірки (рис. 3) використовували клітини вирощені у середовищі GSB, які відмивали та інкубували в середовищі без гідроген сульфід до повного використання ендогенного глікогену та глюкози [3, 5]. Такі клітини переносили в інкубаційну суміш з елементною сіркою та інкубували за умов темряви та освітлення. В обидвох випадках спостерігали зниження концентрації сірки та нагромадження сульфат іону. Динаміка цього процесу практично не відрізнялася. Незважаючи на те, що клітини активно окиснювали сірку до сульфат іону, збільшення біомаси не спостерігали ні за освітлення, ні за темнових умов, що наводить на думку про те, що за цих умов сірка як донор електронів при аноксигенному фотосинтезі не використовувалася, а лише окиснювалася в реакціях субстратного фосфорильовання.

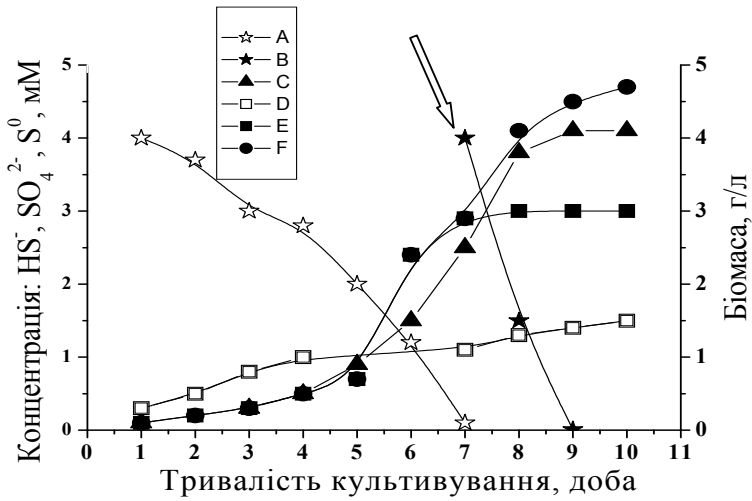


Рис. 2. Нагромадження сполук сірки з різним ступенем окиснення *C. limicola* IMB K-8 за умов додаткового внесення гідроген сульфіді. А – використання гідроген сульфіді внесеного до середовища на початку культивування, В – концентрація гідроген сульфіді внесеного додатково, С – концентрація елементарної сірки, D – концентрація сульфат іону, Е – концентрація клітин, F – концентрація клітин після додаткового внесення гідроген сульфіді.

Fig. 2. Accumulation of sulfur compounds with various degrees of oxidation *C. limicola* IMB K-8 under addition of hydrogen sulfide. A – the use of hydrogen sulfide was introduced to the medium at the beginning of cultivation, B – concentration of hydrogen sulfide was introduced additionally, C – concentration of elemental sulfur, D – the concentration of sulfate ion, E – cell concentration, F – concentration cells after addition of hydrogen sulfide.

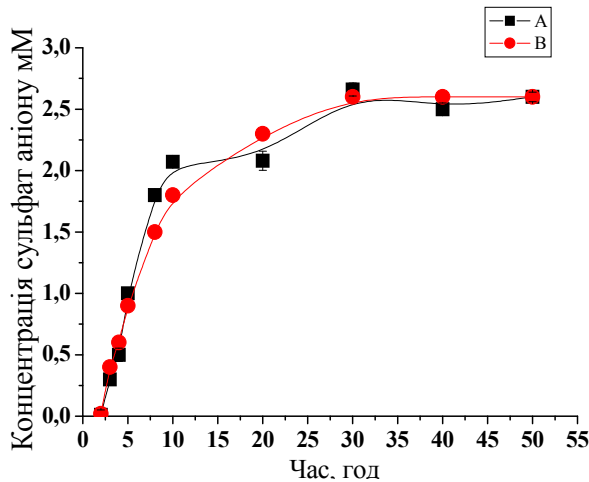


Рис. 3. Нагромадження сульфат іону відмитими клітинами зелених сіркобактерій. А – концентрація сульфат іону за умов освітлення. В – концентрація сульфат іону у темряві.

Fig. 3. Accumulation of sulfate ion washed cells of green sulfur bacteria. A – concentration of ion sulfate on the lightening conditions. B – concentration of ion sulfate in the dark.

Цікаво, що в дослідях з відмитими клітинами сірка використовувалася клітинами лише після того як з клітин вичерпувалася глюкоза і глікоген (рис. 4). Це свідчить про те, що в клітинах функціонує тонкий механізм регуляції використання енергозабезпечуючих метаболітів. Очевидно, енергії окиснення елементарної сірки до сульфат іону недостатньо для забезпечення ростових потреб клітин, однак вона може бути використана подібно як і енергія окиснення глюкози і глікогену для підтримання життєздатності клітин за екстремальних умов (темрява, відсутність донора електронів, тощо) [4, 5].

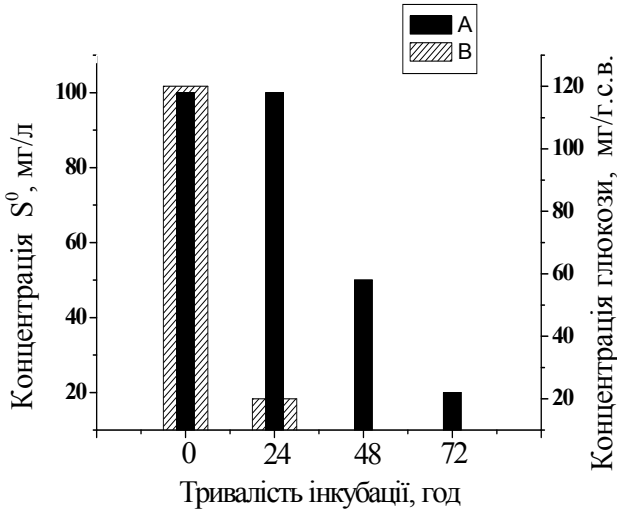


Рис. 4. Використання ендогенної глюкози та сірки відмитими клітинами *C. limicola* IMB K-8.

A — концентрація сірки, B — концентрація глюкози.

Fig. 4. The use of endogenous glucose and sulfur washed cells *C. limicola* IMB K-8.

A — concentration of sulfur, B — concentration of glucose.

Таким чином, зелені сіркові бактерії *C. limicola* IMB K-8 в процесі аноксигенного фотосинтезу використовують як донор електронів гідроген сульфід, який віддаючи електрони перетворюється до молекулярної сірки, що нагромаджується в середовищі. Однак швидке використання гідроген сульфідів веде до припинення фотосинтезу і для клітин створюються несприятливі умови. Раніше нами було показано, що досліджувані клітини *C. limicola* IMB K-8 для підтримання життєздатності, в екстремальних умовах, використовували запасні вуглеводи в першу чергу глікоген [1].

Фрігаард та співробітники [6] запропонували схему перетворень S^0 у *Chlorobium tepidum*, згідно якої сірка у цих бактерій в результаті складних перетворень під дією кінцевого ферментного комплексу АТФ-сульфурилази перетворюється у сульфат іон при цьому шляхом субстратного фосфорилування утворюється АТФ.

Отримані нами результати про перетворення гідроген сульфід у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 підтверджують участь елементної сірки в процесах забезпечення клітин енергією в стресових умовах. Встановлено, що пріоритетним субстратом окиснення *C. limicola* ІМВ К-8 за відсутності гідроген сульфід у ендогенна глюкоза. Джерела енергії в стресових умовах використовуються у послідовності глюкоза — глікоген — елементна сірка.

ЛІТЕРАТУРА

1. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. — 2008. — Вип. 46. — С. 129–136.
2. Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Метаболізм вуглеводів у клітинах зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 // Український біохімічний журнал. — 2009. — № 5. — Т. 81. — С. 26–33.
3. Левицька О.В., Горішний М. Б., Гудзь С.П. Взаємозв'язок азотно-го живлення та утворення глікогену в клітинах *Chlorobium limicola* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — Вип. 9. — С. 53–61.
4. Pffening N., Widdel F. The bacteria of sulfure cycle // Phil. Trans. R. Soc. Lond. — 1982. — Vol. 298. — P. 433–441.
5. Sireveg R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Microbiol. — 1977. — Vol. 111. — P. 239.
6. Frigaard N.U., Gomez Maqueo Chew A.H., Maresca J.A., Bryant D.A. Insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence *Chlorobium tepidum* // Photosynthesis Research. — 2003. — Vol. 78. — P. 93–117.

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

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

ОБРАЗОВАНИЕ СОЕДИНЕНИЙ СЕРЫ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ ОКИСЛЕНИЯ БАКТЕРИЯМИ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8

Реферат

Фотосинтезирующие зеленые серные бактерии *C. limicola* ІМВ К-8 в процессе культивирования на среде с H_2S накапливают внеклеточную элементную серу. После полного использования гидроген сульфид, содержание серы снижается, а в среде наблюдается образование сульфат



иона, максимальное количество которого накапливается на 13 сутки. В опытах с отмытыми клетками *C. limicola* IMB K-8 показано, что на двадцатый час инкубации концентрация сульфат иона достигает максимума, как при освещении так и в темноте. Установлено, что приоритетным субстратом окисления в условиях отсутствия гидроген сульфида есть эндогенная глюкоза и гликоген. Источники энергии в стрессовых условиях используются в следующей последовательности: глюкоза — гликоген — элементная сера.

Ключевые слова: зеленые серные бактерии, элементная сера, сульфат ион, глюкоза, гликоген.

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

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

FORMATION OF SULPHUR COMPOUNDS WITH DIFFERENT OXIDATION BACTERIAL CELLS *CHLOROBIDIUM LIMICOLA* IMB K-8

Summary

Green sulfur bacteria *C. limicola* IMB K-8 during cultivation in medium with H₂S accumulate extracellular elemental sulfur. After full use of hydrogen sulfide, sulfur content decreases, and in the medium it is observed the formation of sulfate ion, the maximum amount of which is piled up in 13 days. In experiments with washed cells *C. limicola* IMB K-8 it is shown that the concentration of sulfate ion reaches maximum, in twenty hours of incubation both in the light and in darkness. It is established that priority substrate oxidation in the absence of hydrogen sulfide is endogenous glucose and glycogen. The sources of energy under stress conditions are used in the following sequence: glucose — glycogen — elemental sulfur.

Key words: green sulfur bacteria, elemental sulfur, sulfate ion, glucose, glycogen.

Одержано 20.10.2011.

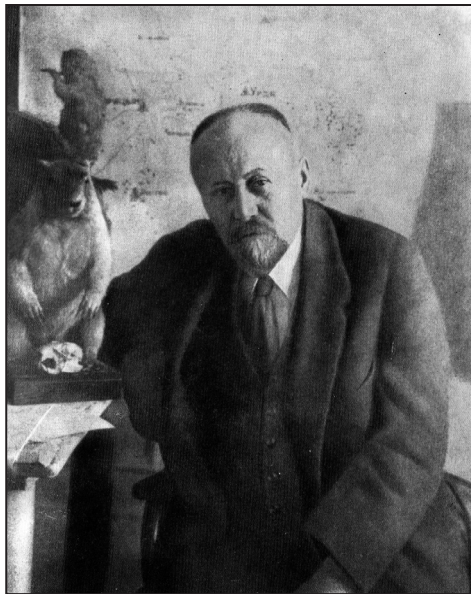


В.О. Іваниця, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Бурлака

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 731 71 51,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua

ДАНИЛО КИРИЛОВИЧ ЗАБОЛОТНИЙ. ЖИТТЯ В НАУЦІ

До 145-річчя від дня народження академіка Д.К. Заболотного



*Macte virtute**

Наведено факти, епізоди, дати з життя видатного вченого мікробіолога, епідеміолога Данила Кириловича Заболотного. Д.К. Заболотний академік АН СРСР (з 1929 р.), академік АН УРСР (з 1929 р.), президент АН УРСР з 1928 р. по 1929 р. З 1919 р. по 1923 роки Д.К. Заболотний ректор Одеського медичного інституту, де створив і очолив першу у світі кафедру епідеміології. З 1928 по 1929 роки Д.К. Заболотний директор, заснованою з його ініціативи Інституту мікробіології і епідеміології АН УРСР в Києві.

Ключові слова: історія мікробіології і епідеміології, Д.К. Заболотний.

* Macte virtute (лат.) – Хвала тобі, відважному.



В родині колишнього кріпосного Кирила та його дружини Євгенії Заболотних у селі Чоботарка (Крижопільський повіт Подільської губернії, пізніше — село Заболотне Вінницької області) у старій хаті під солом'яною стріхою, через п'ять років після скасування кріпосного права 16 грудня (за ст. стилем) 1866 року народився син Данило.



2. Загальний вигляд хати, де народився Д.К. Заболотний.

2. General view of the house, the birthplace of D.K. Zabolotny.

Дитячі роки Данила, мабуть, нічим не відрізнялися

від турбот і справ його однолітків. Разом з молодшим братом Іваном він допомагав батькові на риллі, а матері — в городництві. Однак були і характерні риси в його натурі — здатність до навчання, інтерес і любов до природи, пристрасть до спостереження за життям рослин, створення гербарію, а ще — до читання. На це звернув увагу рідний брат матері Данила — Макар Миронович Сауляк, який закінчив природничий факультет Новоросійського університету (нині Одеський національний університет імені І.І. Мечникова) і після закінчення університету викладав природознавство і географію в Ростові-на-Дону. Сауляк узяв до себе тямущого племінника, який у 1880 році успішно закінчив місцеву прогімназію і за порадою Макара Мироновича переїхав до Одеси, де жив інший дядько Данила — Василь Миронович. В Одесі Данило вступив до Рішельєвського ліцею. Звідси беруть витоки університети Д.К. Заболотного.

Можна також стверджувати, що саме подальше навчання на природничому факультеті Новоросійського університету, а пізніше — на медичному факультеті Київського університету підготували і сформували його як дослідника-природничника і лікаря-епідеміолога, чия мужня громадянська позиція визначилася в боротьбі зі страшними епідеміями холери і чуми. Та й саме місто, у якому він став студентом, зберігало пам'ять про епідемію чуми, що вразила Одесу в 1812 році, викосивши п'яту частину городян.

Тільки через п'ять років населення міста зросло до 32 тисяч, що обумовлено сприятливою економічною ситуацією. По суті справи, не маючи конкурентів на узбережжі Чорного моря, одеський порт став головним постачальником зерна в Європу та на Близький Схід.

У цьому багатомовному і багатонаціональному місті, де першу скрипку грали торговці зерном і банкіри, маклери і будівельні підрядники, була своя шкала цінностей і значимості, що різко контрастувала зі світосприйняттям юного студента. Поглиблена тиша університетських



лабораторій, які налаштовували до аналізу і міркувань над результатами дослідів; палкі суперечки на студентських сходках, непримиренні характеристики лекторам-ретроградам, — усе це, незважаючи на труднощі побуту і необхідність давати приватні уроки, тепер стали сенсом життя студента Заболотного.

Пишаючись своїм університетським минулим, Данило Кирилович з гордістю говорив, що він колишній новоросійський студент. «Час проведений на природничому факультеті Новоросійського університету є найяснішими роками моєї юності», — писав в автобіографії Д.К. Заболотний.

Однак в університетському житті студента Заболотного не все було світлим, і не все йшло гладко: «...після однієї зі сходок, що висловила протест проти масового звільнення найбільш активних студентів, довелося і мені розірвати зв'язок із університетом...», — згадував Данило Кирилович. Один із братів матері Данила Кириловича був заарештований і ув'язнений, де занедужав, а по відбутті покарання — помер; інший дядько — вже відомий нам Макар Миронович — під час навчання в Новоросійському університеті підтримував товариські стосунки з народовольцями. За участь у сходці студент Данило Заболотний у 1889 році за кілька днів до закінчення курсу не тільки був виключений з університету, але й заарештований. Він провів кілька місяців у в'язниці. Тут він занедужав, що, можливо, врятувало його від висилки з Одеси, а то й від далекого заслання.

І ще один факт, що стосується академіка Д.К. Заболотного та його зв'язків з одеськими вищими навчальними закладами. У 1890 році відбувся перший набір слухачів на медичний факультет Новоросійського університету. Три десятиліття потому, у 1920 році факультет був перетворений на Медичну академію. Її ректором у лютому 1921 року був обраний Д.К. Заболотний. Тут, роком раніше, він заснував першу в Україні та й у Росії кафедру епідеміології. Сам у минулому університетський студент, очоливши цю кафедру, Д.К. Заболотний відкрив шлях у науку і позначив головні життєві віхи як своєю лекторською майстерністю, так і прикладом усєї своєї небезпечної практичної роботи багатьом молодим епідеміологам.

Це було набагато пізніше, а поки Д.К. Заболотний був змушений залишити стіни Новоросійського університету. Ось що писав про це Данило Кирилович: «Втративши можливість наукової роботи в університетських



З. Д.К. Заболотний — студент Новоросійського університету (1885 р.) [3].

З. D.K. Zabolotny — the student of Novorossiysk University (1885) [3].



лабораторіях, я знайшов притулок у заснованій незадовго перед тим (у 1886 р.) І.І. Мечниковим бактеріологічній станції. Тут почалася моя наукова робота в галузі вивчення мікроорганізмів снігу, лиманної води (описаний новий вид інфузорій, що світяться) і згодом холери...». І.І. Мечников уважно поставився до долі Заболотного, прийняв його на посаду практиканта і доручив співробітнику станції Якову Юлійовичу Бардаху [5] ввести Данила Кириловича у світ бактеріології. Їхня спільна робота переросла надалі у справжню дружбу. Як писав поет: Дружба справжня не стариться // Смертю одного з двох кінчається. (Яків Юлійович Бардах помер у липні 1929 року, Данило Кирилович Заболотний — у грудні).

У 1891 році Данило Кирилович усе-таки отримав дозвіл на здачу екстерном держіспитів у Новоросійському університеті, склав їх блискуче й одержав науковий ступінь кандидата природничих наук. Так була оцінена перша наукова праця Д.К. Заболотного «Про мікроби снігу», виконана в 1890 році на Одеській бактеріологічній станції під керівництвом Я.Ю. Бардаха.

Відразу ж після одержання свого першого наукового ступеню в 1891 році, як кажуть, не переводячи подиху, Д.К. Заболотний вступив до третього курсу медичного факультету Київського університету та й з перших же днів включився в дослідження з бактеріології на кафедрі загальної патології професора В.В. Подвисоцького (1857—1913). Свій другий, лікарський диплом Данило Кирилович одержав у 1894 році після закінчення медичного факультету Київського університету. Цікаво, що Володимир Валеріанович Подвисоцький у 1900 році взяв активну участь в організації медичного факультету Новоросійського університету, а потім — до 1905 року був першим деканом медфаку і завідував кафедрою загальної патології. З 1905 по 1913 р. В.В. Подвисоцький був директором Інституту експериментальної медицини в Петербурзі. Саме тут у відділі загальної мікробіології під керівництвом академіка Сергія Миколайовича Виноградського (1856—1953) з 1903 року приступив до роботи Данило Кирилович Заболотний. Через два роки він був затверджений на посаді помічника завідувача відділом загальної мікробіології. У листопаді 1906 року Заболотний призначається завідувачем лабораторією експериментальної сифілідології при клініці шкірних хвороб Інституту експериментальної медицини. Одночасно Данило Кирилович читає лекції з мікробіології в Жіночому медичному інституті (Петербург). Сюди він був запрошений на завідування кафедрою медичної бактеріології ще в 1898 році. (Це була перша в Росії кафедра подібного профілю. Згодом ці лекції побачили світ у 1903 році окремою книгою «Основания общей микробиологии» у двох частинах).

Всього ж список опублікованих російською та українською мовами наукових праць і доповідей, рецензій і некрологів, популярних статей з питань профілактики заразних захворювань у літературній спадщині академіка Данила Кириловича Заболотного нараховується більше двохсот.



У число наукових праць академіка Академії наук України (1922) й академіка Академії наук СРСР (1929) входять і книги Данила Кириловича «Частная бактериология», курс лекцій, прочитаних ним у Жіночому медичному інституті (СПб., 1908); «Общая бактериология», курс лекцій, прочитаний там (СПб., 1909); «Основы эпидемиологии». — М.-Л., 1927. — Т. 1 (із присвятою: «Моим дорогим ученицам и ученикам»).

Цікаво, що перші дев'ять робіт були опубліковані в період 1890—1896 рр. і, по суті справи, ще не були присвячені головній темі досліджень Данила Кириловича — особливо небезпечним інфекційним хворобам, боротьбі з епідеміями чуми та холери. Образно кажучи, перші публікації Заболотного: статті «О микробах снега» (дипломна робота на здобуття вченого ступеня кандидата природничих наук), «О свечении живых организмов (По поводу фосфоресценции одесских лиманов)», «Материалы к санитарной оценке городских полей орошения» (разом із С.Н. Діатроповим*) були лише підступом до справи всього життя вченого-натураліста та лікаря-епідеміолога. Здається, що першою в цьому ряду можна назвати роботу Д.К. Заболотного «Опыт иммунизации человека против холеры» (разом з І.Г. Савченком**). Ця робота була надрукована в журналі «Врач» у 1893 році. І.Г. Савченко народився на Полтавщині, навчався на медичному факультеті Київського університету, який закінчив у 1888 році. Він, як і Д.К. Заболотний, вважав себе учнем професора В.В. Подвисоцького. Питання імунізації холери вони також почали вивчати в лабораторії Подвисоцького. І от у березні-квітні 1893 року, виявляючи справжній героїзм в ім'я науки, Д.К. Заболотний та І.Г. Савченко поставили на собі смертельно небезпечну спробу. Вони вперше показали можливість попередньої імунізації через рот проти холери з наступним самозараженням холерою. По суті справи, Заболотний і Савченко перевірили на собі ефективність такого методу імунізації.

Після закінчення медичного факультету Київського університету (1894) Д.К. Заболотний працює лікарем на епідемії холери і дифтерії в Подільській губернії, проводить на самому собі ще одну небезпечну спробу, перевірив на собі ефективність протидифтерійної сироватки після експериментального зараження самого себе дифтерією. Він організовує бактеріологічну лабораторію в Кам'янець-Подільську, пише «Краткий отчет о применении антидифтерийной сыворотки в Подольской губернии» (опублікований у зб. «Санитарная хроника Подольской губернии», 1895) і «К вопросу о бактериологии холеры (из наблюдений над холерной

* Діатропов Петро Миколайович (1859–1934), мікробіолог, у 1892–1907 рр. (за іншими джерелами у 1892–1900 рр.) завідував Одеською бактеріологічною станцією. У 1930-х був директором Інституту експериментальної терапії і контролю сироваток і вакцин Наркомздраву СРСР.

** Савченко Іван Григорович (1862–1932), імунолог, мікробіолог. З 1895 року працює в Пастерівському інституті під керівництвом І.І. Мечникова. Професор, кілька років очолював Бактеріологічний інститут Казанського університету, заснований ним у 1901 році. З 1920 року – професор Кубанського університету в Краснодарі, одночасно директор створеного ним Краснодарського Бакінституту.



епидемией 1894 г. в Подольской губернии)» (опубліковано в «Трудах первого съезда врачей Подольской губернии». Каменец-Подольский, 1896.

З 1897 року регулярно Д.К. Заболотний публікує статті, звіти про відрядження, матеріали досліджень, пов'язані з епідеміями чуми і шляхами поширення захворювання.

Більшість наукових статей, звітів про відрядження, що належать перу Д.К. Заболотного буквально увібрали в себе безстрашність автора. А біографію їхнього автора можна, образно кажучи, вивчати і по географії осередків однієї із самих небезпечних епідемій — епідемій чуми кінця ХІХ — початку ХХ століть — чуми, на боротьбу з якою у різні райони планети, у самий епіцентр захворювання, відправлялися експедиції з неодмінною участю чи під керівництвом Данила Кириловича.

Слова про смертельну небезпеку подібних експедицій — не літературний образ, а сувора правда експедиційного побуту. Розповімо хоча б кілька епізодів.

1911 рік, Харбін.

Керівник протичумної експедиції доктор В.М. Богуцький надсилає на ім'я Д.К. Заболотного тривожну телеграму про те, що стан дуже складний. Пожежа зарази охоплює все нові китайські фанзи, численні міські та приміські райони: що робити далі?

Данило Кирилович терміново приймає рішення: допомогти експедиції не словами, а ділами, насамперед — особистою присутністю в епіцентрі захворювань. Разом із співробітниками, лікарями Чуриліною та Суражевською, він виїздить до Харбіну.

Із спогадів Марії Олександрівни Суражевської:

«Данило Кирилович Заболотний нічого не боявся і саме тому у 1911 році, коли доктор Богуцький телеграфував йому «що робити?», той ані трохи не засмутився і запросив не тільки нас, мене й доктора Чуриліну, але й двох курсисток їхати до Харбіну на чумну епідемію. Ця епідемія була, у буквальному сенсі, жахливою...».

От що згадував учасник експедиції Заболотного в Харбін, тоді ще студент-медик Л.М. Ісаєв (у 1950-х роках, коли Ісаєв описував цей епізод, він був директором Інституту медичної паразитології і тропічних хвороб у Самарканді). «...Мені вдалося брати участь в експедиції проф. Заболотного щодо боротьби з чумою в 1911 році в Маньчжурії і піймати хворого на чуму тарбагана* в околицях ст. Борзя. Спочатку я працював по боротьбі з чумою в м. Харбіні з декількома товаришами по V курсу академії, серед яких був і Ілля Мамонтов, який загинув від чуми. Влітку по закінченні епідемії я приєднався до загону Данила Кириловича, куди входили А.О. Чуриліна і доктор П.В. Крестовський. На території Мань-

* Тарбаган – монгольський бабак. Поширений у гірських і рівнинних степах Забайкалля, Монголії та в Північно-Східному Китаї. Об'єкт хутрового промислу в Монголії. Основний носій чуми. У 1911 році після наполегливих пошуків Д.К. Заболотному вдалось незаперечно підтвердити свою ранню гіпотезу щодо тарбагана як природного джерела чуми.



чжурії, де, за наявними відомостями, були встановлені перші випадки чуми у мисливців за тарбаганами, Данило Кирилович хотів встановити спонтанну захворюваність чумою серед цих гризунів. У той час хутром тарбагана, зручним для дрібних виробів, йшла велика торгівля. Одним із моїх завдань було піймати живого «очманілого» тарбагана при спостереженні за поведінкою звірків у їхніх величезних колоніях» [4].

Вже до кінця 1911 року увага Д.К. Заболотного зосередилася на пошуках джерел чуми серед гризунів в Астраханській губернії — краю дуже складному в епідемічному відношенні через ряд природних і соціальних причин. Спираючи на свій, уже багатий до цього часу, особистий досвід боротьби з чумою в Індії, Одесі (17 серпня — 12 вересня 1910 року) і Маньчжурії, Данило Кирилович говорив на одній із нарад в Астрахані: «...щодо верблюдів і гризунів, то роль їх як рознощиків зарази недостатньо ще з'ясована для Киргизького степу... Для точних висновків необхідні масові спостереження» [1]. Почалося планомірне вивчення причин ендемічності чуми у Киргизькому степу. Це була, використовуючи військову термінологію, справжня розвідка боем, а будь-який бій — несе втрати. Наприкінці літа 1912 року спалахнула чума в двох селах Астраханської губернії — Завітному і Рахинці. Сюди виїхали завідуючий Астраханською бактеріологічною лабораторією М.М. Клодницький і його помічник І.А. Демінський. Перші хворі на чуму ховрашки були виявлені І.А. Демінським у селі Рахинці, і 3 жовтня він офіційно повідомив про виявлення спонтанного захворювання ховрашка на чуму. А далі події розвивалися вкрай драматично. Під час розтинання ховрашка І.А. Демінський заразився і помер через шість днів — 9 жовтня. Через два дні занедужала на чуму студентка-медик О.М. Красильникова, яка доглядала за Демінським, та через три дні — 14 жовтня померла і вона...

Вже в грудні 1912 року Комісія з вивчення чуми запропонувала Данилові Кириловичу, який працював у ті дні в Петербурзі в Інституті експериментальної медицини, виїхати до Астраханської губернії як офіційний уповноважений.

Виконуючи це доручення, Д.К. Заболотний обстежував Астраханську губернію, Донську область і Закаспійський край (район Мерва).

До астраханської експедиції вже майже 13 (!) років під безпосереднім керівництвом Д.К. Заболотного проводилися дослідження у найнапруженіших місцях прояву епідемічної чуми в різних регіонах планети і велася боротьба з цією страшною хворобою.

Мікробіолог, академік АН СРСР Василь Леонідович Омелянський (1867—1928), який давно знав Заболотного, писав: «...важко було б підібрати для нього більш придатну спеціальність, ніж епідеміологія, яка відкривала нескінченні перспективи зіткнення з різними верствами населення. І він із захопленням віддавався цій роботі, охоче беручи на себе важкі, відповідальні і часом ризиковані доручення. І куди тільки не закидала його доля за час його епідеміологічних екскурсій! Він побував



і в Китаї, і в Індії, і в Середній Азії, і в Персії. Росію він об'їздив уздовж і впоперек, особливо її південь і південний схід».

А найперше відрядження Данила Кириловича на грізну епідемію чуми відбулися в 1897 році. Шлях стояв не близький — індійський порт Бомбей (суч. Мумбай), де вже на повну проявлявся пік винятково сильної епідемії. Ряд європейських урядів, включаючи уряд Російської імперії, побоюючись, і не без підстав, що ця страшна хвороба може проникнути на континент морським шляхом на борту будь-якого торгового судна, яке зайшло в який-небудь європейський порт (історичні приклади тому були добре відомі), направили в Індію наукові експедиції. У лютому 1897 року з Києва до Індії виїхала експедиція в складі В.К. Високовича* (керівник), Д.К. Заболотного й Є.А. Редрова.

Відрядженим до Індії бактеріологам пропонувалося накопичувати досвід по боротьбі з чумою. Експедиція з Росії прибула до Бомбею у березні. В перший же день перебування в Бомбеї Данило Кирилович відвідав лабораторію іншого одесита — видатного епідеміолога і бактеріолога Володимира Аароновича Хавкіна (1860—1930), направленого до Індії на прохання британського уряду в 1893 році для ліквідації епідемії холери безпосередньо з Пастерівського інституту, з лабораторії І.І. Мечникова, в якій Володимир Ааронович працював з 1889 року. За рік до зустрічі з Заболотним Хавкін заснував протичумну лабораторію в Бомбеї, перетворену в 1925 році за рішенням індійського уряду на інститут, чийм державним бактеріологом він був офіційно з 1893 по 1904 роки. Заболотний і його товариші по експедиції одержали від В.А. Хавкіна повну інформацію про характер епідемії, обрані методи лікування і попередження поширення хвороби, відомості про місцеві звичаї.

Робота в індійській експедиції продовжувалася до червня. Потім її учасники, крім Д.К. Заболотного, повернулися на батьківщину, а Заболотний одержав розпорядження з'ясувати причини спалаху чуми в Аравії, у місцях паломництва мусульман з Росії. Данило Кирилович відвідав Дждду, Мекку і Медину, досліджуючи санітарний стан шляхів пересування прочан. Тільки наприкінці 1897 року завершилося майже річне відрядження Заболотного і він виїхав до Парижу за запрошенням І.І. Мечникова для опрацювання в Пастерівському інституті зібраних ним в експедиції наукових матеріалів. У тому ж 1897 році Д.К. Заболотний опублікував дві наукові праці, безпосередньо пов'язані з відрядженням [7].

До Іллі Ілліча Мечникова у Заболотного було особливе ставлення. Захоплювався його науковими працями, згадував уважне ставлення до себе після виключення з Новоросійського університету і під час пере-

* Високович Володимир Костянтинович (1854—1912), бактеріолог і епідеміолог. Народився в Гайсині (зараз Вінницька область). Закінчив Харківський університет (1876). З 1895 року професор кафедри патологічної анатомії медичного факультету Київського університету. Організатор експедицій з боротьби з епідеміями холери та чуми в Україні, Росії, Індії.



бування в Пастерівському інституті після повернення з тривалого від-
рядження до Індії...

З багатой епістолярної спадщини обох обрані два листи: Д.К. Забо-
лотного до І.І. Мечникова до Парижу і відповідь Мечникова Заболотному
на цей лист.

«СПб. 4 лютого 1913 р.

Дорогий Ілля Ілліч!

*Пишу вам під враженням подій, що розігралися в інституті під
час моєї поїздки на чуму.*

*Після смерті В.В. Подвисоцького постає питання не стільки про
директора інституту, скільки про нагальну потребу загально визна-
наного наукового керівника наукових сил в Росії.*

*Нам, розкиданим по різних лабораторіях, хто несе посильну робо-
ту в глухих місцях, потрібний вождь. І таким можете бути тільки
Ви. Тому, коли Вам запропонують, не відмовляйтеся цього разу. Я
впевнений, що всі Ваші умови будуть прийняті, Вам дадуть помічника
для адміністративних справ. Ми ж усі будемо берегти Вас для кращої
справи і відгородимо від усяких непотрібних зазіхань і хвилювань.
Я говорю це, добре знаючи настрій навколишніх; Ваше повернення
було б подією в Росії і підняло б енергію науковців, контингент яких
за останні роки значно зріс. Під цими словами підпишуться багато
хто, для яких Ваш приїзд є давньою мрією.*

*Надсилаємо Вам щирий привіт і сподіваємося, що Ви не залишите
Ваших старих і нових учнів. Ваш Д. Заболотний».*

«Париж, 26 (12) березня 1913 р.

Дорогий Данило Кирилович!

*Я все чекав пропозиції, про яку Ви писали, щоб відповісти Вам.
Не одержавши її, відповідаю Вам тепер, перепрошуючи насамперед
за те, що запізнююся з відповіддю. Але весь цей час, та й тепер ще,
я буквально завалений роботою і перешкодами в роботі.*

*Прочитавши Ваш дружлюбний лист, я розчулився, і в мене
заворушилося в душі ледве не бажання повернутися до Росії. Але
після зрілого міркування я вирішив, що було б неможливо мені
взятися за нові справи. Поміркуйте самі: мені незабаром мине 68
років. Це такий вік, коли старих потрібно гнати в шию. Де ж
мені переселятися на нове місце і братися за керування великим
інститутом, яке і раніше мені було не під силу. До того ж хоча я
і ворог всякої політики, але все-таки мені було б неможливо бути
байдужим, побачивши те руйнування науки, яке тепер з таким
цинізмом робиться в Росії. Зрештою я вирішив доживати кінець моєї
наукової діяльності на старому місці, де я перебуваю майже 25 років.
Очевидно, тут мені прийдеється скласти і мої кістки. Мені треба
думати про підготування себе, щоб доставити розкішну страву*



Perfringens'у* та його родичам, а не ризикувати в новій справі, в якій я можу заплутатися.

Прийміть же мою щирю подяку за Ваші добрі побажання. Щиро відданий Вам

Іл. Іл. Мечников

Р. С. Передайте мій привіт Вашим товаришам» [6].

Іллі Іллічу, його пам'яті, науковій спадщині вченого президент Академії наук України Д. К. Заболотний присвятив десяток статей, у тому числі: Памяти Мечникова // Киевская мысль. — 1916. — № 189; Илья Ильич Мечников — насадитель микробиологии в России // Врачебное дело. — 1925; Основоположники Одесской бактериологической станции (Речь на торжественном заседании научной конференции Одесского санитарно-бактериологического института 12/IX.1926 г.) — Отчет Одесского санитарно-бактериологического института за 1925—1926 юбилейный год. — Одесса, 1927 та ін.

З плином часу, напруженого і завантаженого науковою і практичною роботою, організаційними академічними справами Данило Кирилович не забував вшанувати пам'ять своїх перших наставників у галузі бактеріології й епідеміології — професорів В.В. Подвисоцького (Русский врач, 1913; Врачебная газета, 1913), В.К. Високовича (Киевская мысль, 1912), Я.Ю. Бардаха (Українські медичні вісті, 1928; Микробиологический журнал, 1928; Врачебное дело, 1929).



4. Урочисті заходи до 145-річчя від дня народження Д.К. Заболотного в музеї-садибі (фото В. Коробко).

4. Celebrations to 145th Anniversary from the birthday of D.K. Zabolotny in the estate-museum (photo of V. Korobko).

* *Clostridium perfringens*



5. Музей-хата Данила Кириловича Заболотного, жовтень 2011 р.
(фото В. Коробко)

5. The museum-house of Danylo Kyrylovych Zabolotny, October 2011
(photo of V. Korobko)

В жовтні 2011 року в музеї-садибі Данила Кириловича Заболотного (с. Заболотне Крижопільського району Вінницької області) відбулися урочисті заходи присвячені 145-річчю від дня народження Д.К. Заболотного. Вшанувати пам'ять видатного вченого прибули делегації Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, керівники районної адміністрації та селищної ради, представники громадськості, нащадки та земляки.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Архив биологических наук*, 1922. — Т. XXII. — С. 17.
2. *Биологи*. Биографический справочник. К. «Наукова думка». 1984. — С. 814.
3. *Гиммерфарб Я.Л., Гродский К.М.* Д.К. Заболотный. Гос.изд. мед. лит. М., 1958. — С. 123.
4. *Довженко А.Р., Довженко В.В.* Тропою старих тайн. — Львов: Каменяр, 1968. — С. 42–43.
5. *Кузнецов В.О.* Професор Яків Юлійович Бардах (1857-1929) // *Мікробіологія і біотехнологія*. — 2009. — № 2. — С. 75–96.
6. *Мечников И.И.* Страницы воспоминаний. — М., 1946. — 280 с.
7. *Отчет* о командировке в Джедду. — СПб., 1897 и *Материалы* о чуме в Индии (Письма из Бомбея) // *Русский архив патологии*. — 1897. — № 3 та ряд інших.



В.А. Иваница, Н.Г. Юргелайтис, Т.В. Бурлака

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 731 71 51,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua

ДАНИИЛ КИРИЛЛОВИЧ ЗАБОЛОТНЫЙ. ЖИЗНЬ В НАУКЕ

К 145-летию со дня рождения академика Д.К. Заболотного.

Реферат

Приведены факты, эпизоды, даты из жизни выдающегося микробиолога, эпидемиолога Даниила Кирилловича Заболотного, академика АН СССР (с 1929 г.), академика АН УССР (с 1929 г.), президента АН УССР с 1928 г. по 1929 г. С 1919 г. по 1923 г. он ректор Одесского медицинского института, где создал и возглавил первую в мире кафедру эпидемиологии. С 1928 по 1929 годы Д.К. Заболотный директор основанного по его инициативе Института микробиологии и эпидемиологии АН УССР в Киеве.

Ключевые слова: история микробиологии и эпидемиологии, Д.К. Заболотный.

V.O. Ivanytsia, N.G. Yurgelaitis, T.V. Burlaka

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (048) 731 71 51, e-mail: v_ivanit@te.net.ua

DANYLO KYRYLOVYCH ZABOLOTNY. LIFE IN SCIENCE

By the 145-anniversary of Academician D.K. Zabolotny

Summary

The facts, episodes, dates from the life of the famous scientist, microbiologist, epidemiologist Danylo Kyrylovych Zabolotny were given. D.K. Zabolotny the Academician of the USSR Academy of Sciences (since 1929), President of the USSR Academy of Sciences from 1928 to 1929. From 1919 to 1923 D.K. Zabolotny was the Rector of the Odessa Medical Institute, where he established and headed the first in the world department of epidemiology. From 1928 to 1929 D.K. Zabolotny was the Director of the Institute of Microbiology and Epidemiology of the USSR Academy of Sciences in Kiev, established on his initiative.

Key words: history of Microbiology and Epidemiology, D.K. Zabolotny.

Одержано 05.12.2011



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2011 РОЦІ

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Абдуліна Д.Р., Асауленко Л.Г., Пуріш Л.М.</i> Динаміка росту популяцій сульфیدогенного мікробного угруповання	4	43
<i>Авдеева Л.В., Осадча А.І., Хархота М.А.</i> Взаємозв'язок літичної, целюлолітичної та антагоністичної активності бацил	4	27
<i>Авдеева Л.В., Осадча А.І., Хархота М.А.</i> Властивості целюлаз, продукованих бактеріями роду <i>Bacillus</i>	1	69
<i>Авдеева Л.В., Осадча А.І., Хархота М.А.</i> Целюлазна активність бактерій роду <i>Bacillus</i>	2	65
<i>Алексеевко О.М., Жерносекова І.В., Вінніков А.І.</i> Вплив екзометаболітів <i>Streptomyces reeifensis</i> var. <i>lyticus</i> на ріст гриба <i>Pleurotus ostreatus</i>	2	41
<i>Асауленко Л.Г.</i> див. <i>Абдуліна Д.Р.</i>	4	43
<i>Багаєва О.С.</i> див. <i>Мірось С.Л.</i>	2	34
<i>Барштейн В.Ю.</i> див. <i>Круподьорова Т.А.</i>	3	78
<i>Барштейн В.Ю.</i> Перші кроки вірусології в пам'ятках філателії і нумізматики	3	96
<i>Барштейн В.Ю.</i> Сторінки історії мікробіології в медальєрному мистецтві	1	86
<i>Бісов А.С.</i> див. <i>Гуляєва І.І.</i>	3	71
<i>Бісько Н.А.</i> див. <i>Круподьорова Т.А.</i>	3	78
<i>Блайда І.А., Васильєва Т.В., Слюсаренко Л.І., Хитрич В.Ф., Іваниця В.О.</i> Вилучення германію з відходів свинцево-цинкового виробництва тіоновими бактеріями	2	73
<i>Бобрешова Н.С.</i> див. <i>Мірось С.Л.</i>	2	34
<i>Бойко М.І.</i> див. <i>Древаль К.Г.</i>	4	52
<i>Броварська О.С.</i> див. <i>Грицай Р.В.</i>	2	23
<i>Бурлака Т.В.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	4	90
<i>Варбанець Л.Д.</i> див. <i>Грицай Р.В.</i>	2	23
<i>Васильєва Т.В.</i> див. <i>Блайда І.А.</i>	2	73
<i>Вільданова Р.І.</i> див. <i>Щеглова Н.С.</i>	1	48
<i>Вінніков А.І.</i> див. <i>Алексеевко О.М.</i>	2	41



Автори	№ вип.	№ стор.
Водзінська Н.С., Кондратюк О.В., Філіпова Т.О. Вплив вісмутового та олов'яного комплексів хінолінілпорфірину на активність фагів <i>Lactococcus lactis</i>	1	17
Волинець Н.М. див. Листван К.В.	3	63
Волошко Т.Є., Федотов О.В. Скринінг штамів базидіоміцетів за активністю антиоксидантних оксидоредуктаз	4	69
Галкін Б.М. див. Малярчик І.О.	4	17
Галкін Б.М. див. Русакова М.Ю.	1	34
Галкін Б.М., Іваниця В.О., Галкін М.Б. Бактеріальні синтетази оксиду азоту	3	6
Галкін М.Б. див. Галкін Б.М.	3	6
Галкін М.Б. див. Іваниця В.О.	2	8
Гнатуш С.О. див. Горішний М.Б.	4	82
Гнатуш С.О. див. Кушкевич І.В.	2	56
Горішний М.Б., Гудзь С.П., Гнатуш С.О. Утворення сполук сірки з різним ступенем окиснення бактеріями <i>Chlorobium limicola</i> ІМВ К-8	4	82
Грицай Р.В., Варбанець Л.Д., Броварська О.С., Житкевич Н.В., Олійник Т.М. Оцінка генетичної гетерогенності штамів <i>Ralstonia solanacearum</i> на основі RAPD-ПЛР аналізу	2	23
Гудзь С.П. див. Горішний М.Б.	4	82
Гуляєва І.І., Шевченко О.В., Снігур Г.О., Бісов А.С., Мілкус Б.Н. Поширення вірусу карликовості пшениці на півдні України	3	71
Декіна С.С. див. Романовська І.І.	1	26
Древаль К.Г., Кузнецова К.В., Юдіна А.В., Бойко М.І. Динаміка синтезу целюлаз вищими дереворуйнівними базидіальними грибами	4	52
Дьяченко Л.Ф. див. Мірось С.Л.	2	34
Жерносекова І.В. див. Алексеєнко О.М.	2	41
Житкевич Н.В. див. Грицай Р.В.	2	23
Замбрібориц І.С. Дослідження андрогенезу <i>in vitro</i> рису (<i>Oryza sativa</i> L.)	1	78
Зінов'єва Н.А. див. Малиновська І.М.	2	83
Іваниця В.О. див. Блайда І.А.	2	73
Іваниця В.О. див. Галкін Б.М.	3	6
Іваниця В.О. див. Ліманська Н.В.	2	48

Автори	№ вип.	№ стор.
Іваниця В.О. див. Мірось С.Л.	2	34
Іваниця В.О. див. Чабан М.М.	4	6
Іваниця В.О., Галкін М.Б. Сучасні уявлення щодо механізмів формування біоплівки	2	8
Іваниця В.О., Юргелайтіс Н.Ю., Бурлака Т.В. Данило Кирилович Заболотний. Життя в науці	4	90
Іванова Т.С. див. Круподьорова Т.А.	3	78
Ігнатова С.О. див. Корня Т.М.	1	41
Карпенко О.В. див. Щеглова Н.С.	1	48
Кваско О.Ю. див. Матвєєва Н.А.	3	37
Коваленко Н.К. див. Полтавська О.А.	1	6
Козерецька І.А. див. Серга С.В.	4	35
Кондратюк О.В. див. Водзінська Н.С.	1	17
Корня Т.М., Ігнатова С.О. Селекція <i>in vitro</i> озимої м'якої пшениці за впливу фузарієвої кислоти	1	41
Круподьорова Т.А., Барштейн В.Ю., Бісько Н.А., Іванова Т.С. Склад міцеліальної маси та культуральної рідини <i>Cordyceps sinensis</i> (Berk.) Sacc. (Ascomycetes)	3	78
Кудрявець Ю.Й. див. Матвєєва Н.А.	3	37
Кузнецова К.В. див. Древаль К.Г.	4	52
Кучук М.В. див. Листван К.В.	3	63
Кушкевич І.В., Гнатуш С.О. Фізіолого-біохімічні характеристики бактерій <i>Thiocapsa</i> sp. Ya-2003 за впливу гідроген сульфід	2	56
Листван К.В., Приходько В.О., Рибальченко Н.П., Волинець Н.М., Остапчук А.М., Кучук М.В. Антимікробна активність екстрактів калюсних культур та асептичних рослин <i>Psoralea drupacea</i> Bunge	3	63
Ліманська Н.В., Серков С.А., Сергєєва Ж.Ю., Іваниця В.О. Виявлення штамів <i>Rhizobium vitis</i> і <i>R. radiobacter</i> методом ПЛР з використанням праймерів до різних послідовностей геному	2	48
Лісова Н.Ю. див. Щеглова Н.С.	1	48
Малиновська І.М. Склад мікробних угруповань кореневої зони фітоценозів різного типу	4	60
Малиновська І.М., Зінов'єва Н.А. Мікробіологічні процеси в ризосфері рослин у забрудненому нафтопродуктами ґрунті	2	83
Малярчик І.О., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Вплив N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних на ріст, утворення біоплівки та туморогенну активність <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4	17



Автори	№ вип.	№ стор.
Матвеева Н.А., Потрохов А.О., Кудрявецъ Ю.Й., Кваско О.Ю., Шаховський А.М. Чутливість трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону альфа 2b людини до ураження вірусом тютюнової мозаїки	3	37
Мілкус Б.Н. див. Гуляєва І.І.	3	71
Мірось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Бобрешова Н.С., Багаєва О.С., Іваниця В.О. Експресивність ізоформ карбоксилестерази <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis: Fr.) P. Karst за культивування на середовищах різного складу	2	34
Міхайлова Р.В. Протеолітичні ферменти міцеліальних грибів	3	47
Ногіна Т.М. див. Щеглова Н.С.	1	48
Олійник Т.М. див. Грицай Р.В.	2	23
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	1	69
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	2	65
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	4	27
Останчук А.М. див. Листван К.В.	3	63
Підгорський В.С., Шинкаренко-Сішел Л.М., Тимошок Н.О., Чейпеш А.В., Співак М.Я. Ефект сухого ферментативного лізату Del-Immune V [®] на продукцію цитокинів в експериментальних моделях	3	23
Полтавська О.А., Коваленко Н.К., Успенський І.Г. Скринінг штамів молочнокислих бактерій та біфідобактерій за пробіотичними властивостями	1	6
Потрохов А.О. див. Матвеева Н.А.	3	37
Пристаї М.В. див. Щеглова Н.С.	1	48
Приходько В.О. див. Листван К.В.	3	63
Пуріш Л.М. див. Абдуліна Д.Р.	4	43
Рибальченко Н.П. див. Листван К.В.	3	63
Романовська І.І., Декіна С.С. Розробка текстильного ранового покриття з протеазою <i>Sacremonium chrysogenum</i>	1	26
Русакова М.Ю., Галкін Б.М., Соболева С.Г., Філіпова Т.О. Антимікробна дія фенотіазинових сполук	1	34
Серга С.В., Козерецька І.А. <i>Wolbachia</i> в природних популяціях <i>Drosophila melanogaster</i> України	4	35
Сергєєва Ж.Ю. див. Ліманська Н.В.	2	48
Серков С.А. див. Ліманська Н.В.	2	48

Автори	№ вип.	№ стор.
Слюсаренко Л.І. див. Блайда І.А.	2	73
Снігур Г.О. див. Гуляєва І.І.	3	71
Соболева С.Г. див. Русакова М.Ю.	1	34
Солоненко А.М. Бактерії-деструктори мортмаси <i>Cladophora siwaschensis</i> у рапі амфібіальних ділянок Арабатської стрілки та Бердянської коси	2	92
Співак М.Я. див. Підгорський В.С.	3	23
Тимошок Н.О. див. Підгорський В.С.	3	23
Успенський І.Г. див. Полтавська О.А.	1	6
Федотов О.В. див. Волошко Т.Є.	4	69
Федотов О.В. див. Чайка О.В.	3	88
Філіпова Т.О. див. Русакова М.Ю.	1	34
Філіпова Т.О. див. Водзінська Н.С.	1	17
Філіпова Т.О. див. Малярчик І.О.	4	17
Хархота М.А. див. Авдеева Л.В.	1	69
Хархота М.А. див. Авдеева Л.В.	2	65
Хархота М.А. див. Авдеева Л.В.	4	27
Хитрич В.Ф. див. Блайда І.А.	2	73
Чабан М.М., Іваниця В.О. Анаммокс бактерії – унікальні мікроорганізми кругообігу азоту	4	6
Чайка О.В., Федотов О.В. Ріст та інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів штаму <i>Pleurotus ostreatus</i> P-107	3	88
Чейпеш А.В. див. Підгорський В.С.	3	23
Шаховський А.М. див. Матвеева Н.А.	3	37
Шевченко О.В. див. Гуляєва І.І.	3	71
Шинкаренко-Сішел Л.М. див. Підгорський В.С.	3	23
Щеглова Н.С., Карпенко О.В., Вільданова Р.І., Пристай М.В., Лісова Н.Ю., Ногіна Т.М. Вплив біогенних поверхнево-активних речовин на формування симбіозу <i>Synorhizobium meliloti</i> з люцерною	1	48
Юдіна А.В. див. Дрезваль К.Г.	4	52
Юргелайтіс Н.Ю. див. Іваниця В.О.	4	90
Ястремська Л.С. Вплив окисно-відновного потенціалу на фізіологічний стан мікроорганізмів роду <i>Clostridium</i>	1	57



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 абрєвіатури за першого вживання обумовлюють у дужках. Наприклад: полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР).

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

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

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



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

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

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

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

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

ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

На книги

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

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

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

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

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

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

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

На журнальні статті

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

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

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



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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

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

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

Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



Наукове видання

«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**№ 4 (16)
2011**

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 27.12.2011. Формат 70x108/16.
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

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