

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

**МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ**

**Microbiology & Biotechnology**

**№ 4 (12)  
2010**

# MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 4

•  
2010

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

## EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

*Accepted for publishing articles are reviewed*

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

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

## PUBLISHERS

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

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

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

A d d r e s s:

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

[www.mbt.onu.edu.ua](http://www.mbt.onu.edu.ua)

© Odesa National Mechnykov University, 2010

# МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 4



2010

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР

Т.В. Бурлака

## РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

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

**Науковий редактор випуску В.О. Іваниця**

*Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються*

*Журнал заснований*

*Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова*

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

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

## ВИДАВЦІ

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

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

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

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39, 748-11-01

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

[www.mbt.onu.edu.ua](http://www.mbt.onu.edu.ua)

## CONTENTS

### OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

**B.M. Galkin, T.O. Filipova, V.O. Ivanytsia**  
BACTERIAL CYTOCHROME P-450: II. STRUCTURE AND FUNCTIONS .. 8

**A.G. Dyachenko, A.A. Demyanova, I.M. Baluta, I.Yu. Kuchma,  
V.V. Leisin, A.Yu. Voliansky**  
THE FACTORS OF SALMONELLA VIRULENCY  
AND PATHOGENESIS OF THE SALMONELLA INFECTION ..... 26

### EXPERIMENTAL WORKS

**O.V. Moshynets, J. Brunet, S.U. Rymar, I.V. Kosakivska,  
G. Potters**  
EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA  
FROM BAMBOO PLANTS (*PHYLLOSTACHYS AND FARGESIA*) ..... 44

**T.O. Filipova, V.O. Ivanytsia, B.M. Galkin, N.S. Vodsinska,  
M.B. Galkin, O.Yu. Zinchenko, I.O. Maliarchyk, O.V. Nikitin,  
M.Yu. Rusakova**  
THE PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES CONTENTS  
IN MICE AFTER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BACTERIOPHAGE  
ADMINISTRATION ..... 58

**V.V. Pozur**  
THE EFFECT OF TEICHOIC ACID FROM *STAPHYLOCOCCUS  
AUREUS* WOOD 46 ON THE DENDRITIC CELLS MATURATION  
*IN VITRO* ..... 66

**N.V. Tkachuk, V.O. Yanchenko, A.M. Demchenko**  
SULPHATE-REDUCING AND AMMONIFYING BACTERIA  
SENSITIVITY TO THE DERIVATIVES OF  
4-AMINO-3,5-DIMETHYL-4H-1,2,4-TRIAZOLIUM ..... 72

**L.V. Avdeeva, A.I. Osadchaya, M.A. Kharkhota**  
BIOSYNTHESIS OF CELLULASES BY PROBIOTIC STRAINS  
*BACILLUS SUBTILIS* AT JOINT CULTIVATION..... 80

**Yu.S. Suharev, S.O. Guzhvinska, S.Yu. Suharev, I.V. Golovina**  
METHOD OF IMMUNOBIOSENSOR DETERMINATION  
OF ENTEROTOXINS *ESCHERICHIA COLI* ..... 90

## З М І С Т

### ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

**Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця**  
БАКТЕРІАЛЬНІ ЦИТОХРОМИ P-450: II. СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ..... 8

**А.Г. Дьяченко, А.А. Дем'янова, І.М. Балута, І.Ю. Кучма,  
В.В. Леізін, А.Ю. Волянський**  
ФАКТОРИ ВІРУЛЕНТНОСТІ САЛЬМОНЕЛ І ПАТОГЕНЕЗ  
САЛЬМОНЕЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ..... 26

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

**О.В. Мошинець, Ж. Бруне, С.Ю. Римар, І.В. Косаківська,  
Г. Потерс**  
ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ ІЗ  
РОСЛИН БАМБУКА (*PHYLLOSTACHYS I FARGESIA*) ..... 44

**Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця, Б.М. Галкін, Н.С. Водзінська,  
М.Б. Галкін, О.Ю. Зінченко, І.О. Малярчик, А.О. Нікітін,  
М.Ю. Русакова**  
ВМІСТ ПРО- И ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ В ОРГАНІЗМІ  
МИШЕЙ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ БАКТЕРІОФАГА  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ..... 58

**В.В. Позур**  
ОСОБЛИВОСТІ ДОЗРІВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ПІД  
ВПЛИВОМ ТЕЙХОЄВОЇ КИСЛОТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*  
WOOD 46 *IN VITRO* ..... 66

**Н.В. Ткачук, В.О. Янченко, А.М. Демченко**  
ЧУТЛИВІСТЬ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ ТА  
АМОНІФІКУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ ДО ПОХІДНИХ  
4-АМІНО-3,5-ДИМЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛІЮ..... 72

**Л.В. Авдеева, А.І. Осадча, М.А. Хархота**  
БІОСИНТЕЗ ЦЕЛЮЛАЗ ПРОБІОТИЧНИМИ ШТАМАМИ *BACILLUS*  
*SUBTILIS* ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ ..... 80

**Ю.С. Сухарев, С.О. Гужвинська, С.Ю. Сухарев, І.В. Головіна**  
СПОСІБ ІМУНОБІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ  
ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*..... 90

<b>V. Ivanytsia, N. Nepomiashcha, S. Uzhevskaya, O. Bagaeva, T. Kryvytska, N. Bobreshova</b>	
METHODS FOR THE STUDY OF MICROBIAL ENTOMOCIDE ACTIVITY AGAINST FUNGOUS MIDGE LARVAE ( <i>SCIARIDAE</i> ) .....	96
ALPHABETIC INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL «MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY» IN 2010 YEAR.....	109
INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	115

<b>В.О. Іваниця, Н.М. Непомяща, С.П. Ужевська, О.С. Багаєва, Т.М. Кривицька, Н.С. Бобрешова</b>	
<b>МЕТОДИ ОЦІНКИ ЕНТОМОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ЩОДО ЛИЧИНОК ГРИБНОГО КОМАРИКА (<i>SCIARIDAE</i>)</b> .....	96
<b>АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2010 РОЦІ</b> .....	109
<b>ІНФОРМАЦІЯ ДЛЯ АВТОРІВ</b> .....	115

УДК 579.017.7: 577.151.3

**Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БАКТЕРІАЛЬНІ ЦИТОХРОМИ P-450: II. СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ**

*У статті представлено огляд сучасних наукових публікацій про молекулярну структуру, механізми монооксигеназного каталізу, генетику, систематику, еволюційне походження родин бактеріальних цитохромів P-450 і їх біологічні функції. Проведено порівняльний аналіз родин бактеріальних цитохромів P-450.*

*К л ю ч о в і с л о в а : бактеріальні цитохроми P-450, монооксигенази, гени CYP, НАДФН-цитохром P-450 редуктаза, ферредоксини, НАДН-ферредоксин редуктаза.*

У попередній статті була детально проаналізована структура цитохромів P-450, сучасна систематика цих ферментів, механізми монооксигеназного каталізу, біологічні функції цієї ферментної системи та еволюційне походження [1]. Значна частина інформації в ній [1] була присвячена родинам цитохрому P-450 еукаріотних клітин, але з кожним роком кількість повідомлень про нові цитохроми P-450 зростає, особливо це стосується бактеріальних цитохромів P-450, які беруть участь в деградації лігніну [32], ксенобіотиків [12] тощо, у метаболізмі ендогенних сполук, таких, як жирні кислоти [4], вітаміни [28], холестерол [20], у формуванні механізмів резистентності до антибіотиків [27] та у біосинтезі еритроміцину, міцинаміцину [12]. З огляду на велику різноманітність та виключну важливість біологічних функцій цих молекул виникла потреба детально проаналізувати сучасну інформацію щодо родин бактеріальних цитохромів P-450.

Перші бактеріальні цитохроми були виділені з *Pseudomonas putida* та бактероїдів *Bradyrhizobium japonicum* у 60-х роках 20 сторіччя [3, 9]. До 1984 року вже було знайдено цитохром P-450 залежні системи у 41 виду бактерій. На сьогодні цитохром P-450 знайдено у 905 видів еубактерій, 22 видів архей і 2 видів мімівірусів. У таблиці 1 наведені основні бактеріальні цитохроми P-450.





Таблиця 1

Бактеріальні цитохроми P-450

Table 1

Bacterial cytochromes P-450

Тривіальна назва	Систематична назва	Бактеріальне джерело	Властивості
P-450cam	CYP 101	<i>Pseudomonas putida</i>	Гідроксилаза камфори
P-450 BM-3	CYP 102	<i>Bacillus megaterium</i>	Гідроксилаза жирних кислот
P-450 pinF1	CYP 103	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Індукується вторинними метаболітами рослини
P-450 pinF2	CYP 104	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Індукується вторинними метаболітами рослини
P-450 SU1	CYP 105A1	<i>Streptomyces griseolus</i>	Індукується гербіцидами
P-450 SU2	CYP 105B1	<i>Streptomyces griseolus</i>	Індукується гербіцидами
P-450 VD25	CYP 105A2	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	Гідроксилаза вітаміну D-3
P-450 (choP)	CYP 105C1	<i>Streptomyces sp.</i>	Метаболізм холестеролу (?)
P-450soy	CYP 105D1	<i>Streptomyces griseolus</i>	Трансформація ксенобиотиків
P-450 BM-1	CYP 106A1	<i>Bacillus megaterium</i>	Гідроксилаза жирних кислот
P-450meg	CYP 106A2	<i>Bacillus megaterium</i>	Гідроксилаза стероїдів
P-450ery F	CYP 107A1	<i>Streptomyces erythraea</i>	Біосинтез еритроміцину
P-450 (mycG)	CYP 107E1	<i>Micromonospora griseorubida</i>	Біосинтез міцинаміцину
P-450terp	CYP 108	<i>Pseudomonas sp.</i>	Окиснення терпенолів
P-450B.s.	CYP 109	<i>Bacillus subtilis</i>	Окиснення жирних кислот та метаболізм тестостерону



Тривіальна назва	Систематична назва	Бактеріальне джерело	Властивості
-	CYP 110	<i>Anabaena sp.</i>	Метаболізм алканів
P-450lin	CYP 111	<i>Pseudomonas incognita</i>	Гідроксилаза ліналіол 8-метил
P-450 VJ-1	CYP 112	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Експресується у аеробних умовах
P-450eryK	CYP 113	<i>Streptomyces erythraea</i>	Кінцева стадія біосинтезу еритроміцину
P-450 VJ-3	CYP 114	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Експресується в аеробних умовах
P-450 VJ-2	CYP 115P	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	P-450 псевдоген
-	CYP 116	<i>Rhodococcus sp. N286/21</i>	Деградація гербіцидів
P-450 VJ-4	CYP 117	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Експресується у аеробних умовах
-	CYP 51, 118 , 121,123, 124, 125, 126,128,130,132	<i>Mycobacteriaceae</i>	Окиснення жирних кислот
P-450 Арх.	CYP119	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Термостабільний P-450. Пероксидазна активність
P-450 Cyanobac.	CYP120	<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	Метаболізм ретинової кислоти
-	CYP 122	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Участь у біосинтезі рапаміцину
-	CYP127	<i>Rhizobium sp.</i>	не досліджено
-	CYP129	<i>Streptomyces peucetius</i>	C-14 гідроксилаза. Перетворення дауміцина у доксирубіцин
-	CYP131	<i>Streptomyces peucetius</i>	Участь у біосинтезі аміноглікозида дуаносаміна
-	CYP133	<i>Erwinia herbicola</i>	Перший цитохром P-450 у ентеробактерій

- інформація відсутня.



Бактеріальні цитохроми P-450 належать до 196 родин, 409 підродин. У архей відомо 12 родин, 14 підродин [<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>].

У *Escherichia coli* не знайдено ізоформ цитохрому P-450, але є система переносу електронів. Тому вона є зручним об'єктом для експорту генів цитохромів P-450 різних систематичних груп. Це дає змогу у подальшому вивчити їх молекулярну структуру. Усі бактеріальні цитохроми є розчинними сполуками, що спрощує їх виділення, очищення та вивчення гіперекспресії. Бактеріальні цитохроми P-450 вивчаються не тільки з погляду їх фізіологічних функцій, але і як можливий об'єкт для біотехнологічних процесів. Усі бактеріальні цитохроми належать до першого класу, оскільки перенос електронів здійснюється від НАД(Ф)Н до ФАД-залежної редуктази потім електрони потрапляють на залізо-сірчані білки і до цитохрому P-450 [10].

Найбільш детально вивчений бактеріальний P-450<sub>cam</sub> (CYP101) з *P. putida*. Це перший цитохром, у якого повністю розшифрована молекулярна структура [26]. Крім того, докладно вивчено компоненти цієї системи і механізм ферментативного каталізу. У CYP101 амінокислотна послідовність повністю відрізняється від амінокислотної послідовності еукаріотних цитохромів P-450.

### Цитохром P-450<sub>cam</sub> (CYP101)

Цитохром P-450<sub>cam</sub> з *P. putida* ATCC17453 було знайдено ще в 1965 році [9], а потім очищено до гомогенного стану [7]. Він каталізує, 5-екзогідроксилювання монотерпенових вуглеводнів, представником яких є D-камфора. Субстрат деградує до ацетату та ізобутирату, в подальшому ці сполуки використовуються як метаболічне паливо [20]. Ген P-450<sub>cam</sub> (camC), а також гени інших ферментів, які беруть участь у деградації камфори, розташовуються в САМ-плазміді об'ємом 230 кб. Ген camC був клонований і експресований у *E. coli*, визначена його нуклеотидна послідовність [20]. Цитохром P-450<sub>cam</sub> (CYP101) відновлюється НАДН за допомогою ФАД-залежної редуктази путідаредоксину та залізо-сірчанних білків. Вони закодовані в генах camA і camB, які відповідно розташовані до camC по 3' положенню. Ген camD, який кодує 5-екзо-гідроксикамфорну редуктазу, розташований по положенню 5' до гену camC. Ці гени складають 4 оперони camDCAB, функцією яких є кодування білків, відповідальних за перші кроки в деградації камфори. Оперон, який контролює білок репресор є геном camR. Він є попередником гену camD і записаний у протилежному напрямку від генів camDCAB. Гени camA і camB були клоновані і секвеновані, як і вся монооксигеназна система цитохрому P-450<sub>cam</sub>, і експресовані у *E. coli* [20]. Крім того, визначено нуклеотидні послідовності гену camR [20]. Кристалічна структура цитохрому P-450<sub>cam</sub> з субстратом камфорою була з'ясована в 1985 році з роздільною здатністю 2,6 ангстрем. Рентгеноструктурний аналіз кристалічної



структури P-450cam з камфорою з більш високою роздільною здатністю було проведено через два роки [26]. Просторове розташування кристалу зберігається при різних формах і сам цитохром P-450cam складається з 414 амінокислотних залишків (М.м. 45 кД). Структура наближається до трикутної призми з розміром 60 x 55 x 30 ангстрем. У молекулі присутні 12 альфа-спіралей, що приблизно складає 40% від загальної структури білка, і 10% представлено бета-складчастими структурами, розташованими антипаралельно альфа-спіралям. За відсутності субстрату в активному центрі P-450cam знаходяться 6 водневих залишків води, один з яких зв'язаний з гемом заліза [26]. Цистеїн (Cys-357) — п'ятий ліганд гему цитохрому P-450cam — також виявлено за допомоги рентгено-структурного аналізу кристалічної структури цього цитохрому. Цікаво відзначити, що п'ятий ліганд — цистеїн, який у поліпептидному ланцюгу білка знаходиться в 357 положенні, у всіх живих істот перебуває в одному і тому ж місці. Кристалічна структура цитохрому P-450cam також дозволила виявити структуру 6 ліганду, тобто місце, яке займає кисень під час каталізу, це або вода, або гідроксид йон [26]. Спектроскопічні дослідження дозволили виявити механізми монооксигеназного каталізу (рис. 1).

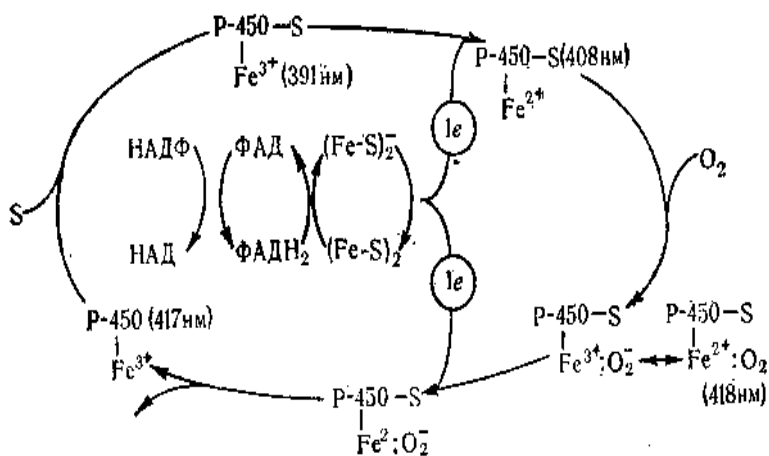


Рис 1. Механізми монооксигеназного каталізу *Pseudomonas putida*

Fig.1. The mechanisms of monooxygenase catalysis *Pseudomonas putida*

У стані спокою залізо в гемі цитохрому P-450cam знаходиться в трьохвалентному стані (Fe<sup>3+</sup>) низькоспінової форми (S = 1/2). При зв'язуванні з камфорою з активного центру фермента витісняється вода, і залізо переходить в високоспінову форму (S = 5/2). Спін-зрушення супроводжується збільшенням відновного потенціалу (-300 мВ до -170 мВ), що дозволяє одному електрону почати рух по електронтранспортній системі [26]. Залізо у гемі переходить в двовалентний стан (Fe<sup>2+</sup>) у високоспінової формі і зв'язує кисень. Утворюється супероксид-аніон (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Цей

комплекс дуже недовговічний. Далі утворюється трійчастий комплекс цитохром P-450, камфора,  $O_2^-$ . Другий електрон відновлює кисень до води, а субстрат перетворюється у гідроксильований продукт. Залізо у гемі переходить у трьохвалентний стан і гідроксильований субстрат відокремлюється від гемопротейну.

Також було досліджено роль окремих амінокислот. **Phe-350 зберігається** у інших цитохромів P-450 і за допомоги ван-дер-ваальсових зв'язків взаємодіє з гемом **P-450cam**. Його заміна на лейцин призводить до утворення апопротейнового комплексу. Все це свідчить про важливість цього амінокислотного залишку [35]. Мутація, що призводить до заміщення Cys-357 на гістидин або серин, також призводить до втрати активності цього ферменту [35]. Крім того, було показано, що амінокислотні залишки Arg-72, Arg-112, Arg-364 та Lys-344, що мають позитивний заряд, здійснюють контакти між P-450cam і путідаредоксином [25]. Мутанти, в яких здійснено заміну двох із цих амінокислотних залишків, втрачають позитивний заряд і набувають нейтрального або негативного заряду. Все це призводить до зниження асоціації P-450cam і путідаредоксину. Молекула камфори зв'язується з різними амінокислотними залишками, такими, як Phe-87, Leu-244, Val-247, Val-295 за допомоги взаємодій Ван-дер-Ваальса і сприяє регіоселективності і стереоспецифічності в монооксигеназному каталізі [36]. Камфора утворює водневий зв'язок з активним центром P-450cam тільки з Tug-96. Мутагенез цього залишку призводить до зниження активності і втрати абсолютної регіоспецифічності гідроксилювання, а також змінює спінову рівновагу заліза в гемі. Таким чином, Tug-96 грає важливу роль у забезпеченні переходу з низькоспінового стану в високоспіновий, який необхідний для перенесення електронів в P-450cam системі [36].

### Цитохром P-450 BM-3 (CYP102)

В останні роки ізоформи P-450 BM 3-6 *B. megaterium* використовуються як модель для вивчення мікосомальних цитохром P-450 залежних систем у ссавців. На даний час це єдина бактеріальна цитохром P-450 залежна система другого класу, хоч, на відміну від мікосомальних монооксигеназ, у яких ферментна система складається з двох білків, у ізоформ P-450 BM 3-6 відбулося об'єднання НАДФН цитохром P-450 редуктази і цитохрому P-450 в один білок.

Гідроксилази, які метаболізують жирні кислоти у *B. megaterium* були виявлені в середині 1970-х років двадцятого століття. Фермент, відповідальний за цей процес був визначений як цитохром P-450 (ізоформи P-450 BM-1-3, CYP102). Цитохром P-450 BM-3 був виділений та очищений до гомогенного стану. Встановлено, що він є каталізатором швидкої монооксигеназної реакції окиснення насичених жирних кислот з довжиною ланцюга від C12 до C18. Оптимальна активність цього ферменту відзначена для пентадекаенової (C15) і пальмітинової (C16)



кислот і вона сягає  $4600 \text{ моль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ , ця ферментна активність є дуже високою. Гідроксилазна система бактерії здатна гідроксилювати і інші мононенасичені жирні кислоти, жирні спирти і жирні аміді, які мають однакову довжину вуглецевого ланцюга [21]. Ефіри жирних кислот не є субстратами цієї монооксигеназної системи. Алкани є інгібіторами монооксигеназної системи ненасичених жирних кислот, але їх метаболізм також протікає завдяки НАДФН залежному окисненню [18]. Гідроксилювання жирних кислот в основному протікає по  $\omega$ -2 положенню, але в деяких випадках по  $\omega$ -1 і  $\omega$ -3 положеннях [20]. Гідроксилювання пальміната за допомоги цієї ферментної системи є початковим етапом окиснювання цього субстрату [20]. Ця гідроксилазна система також здатна утворювати епоксиди в місцях подвійних зв'язків у молекулах жирних кислот [20]. Цитохром Р-450 ВМ-3 має незвично високу молекулярну масу (119 кД), в порівнянні з іншими цитохромами Р-450, і для своєї каталітичної активності потребує кофактору НАДФН, а для більшості бактеріальних цитохромів Р-450 потрібен кофактор НАДН. У цитохром Р-450 ВМ-3 залежної системи було виявлено по одному молу ФАД, ФМН і гему на один моль ферменту, крім того, ця система здатна відновлювати цитохром *c* та інші штучні акцептори електронів [18]. Подібна властивість характерна тільки для мікосомальних цитохромів Р-450 ссавців. Обмежений протеоліз викликав розрив цитохрому Р-450 ВМ-3 на два домени. Перший домен — це поліпептид з молекулярною масою 66 кДа і він містить також флавін. Другий домен — поліпептид з молекулярною масою 55 кДа, містить гем. Перший домен зберігає редуктазну активність, другий домен здатний зв'язувати субстрат і утворює характерний СО-комплекс з максимумом поглинання 450 нм [20]. При протеолізі втрачається гідроксилазна активність по відношенню до жирних кислот. Тим не менш, протеоліз N-кінцевої частини домену, що містить гем, не впливає на ферментативну активність. Таким чином, цитохром Р-450 ВМ-3 складається з двох доменів і схожий на мікосомальні цитохроми Р-450 (цитохром Р-450 і НАДФН-цитохром Р-450 редуктази) [20]. Ген, що кодує цитохром Р-450 ВМ3 (CYP102) був клонований і експресований в *E. coli*. Очищений фермент з *E. coli* за функціональними, імунохімічними, і електрофоретичними властивостями є ідентичним ферменту з *B. megaterium*. У них виявлено подібність N-кінцевих амінокислотних послідовностей [22]. Первинна структура, яка була визначена шляхом розшифровки послідовностей нуклеотидів підтвердила наявність доменної структури у цитохрому Р-450 ВМ-3. N-термінальна ділянка гемового домену виявилась на 25% схожою з еукаріотною  $\omega$ -гідроксилазою жирних кислот у той час, як С-кінцевий фрагмент домену, що зв'язує флавін, на 33% схожий з печінковою НАДФН- цитохром Р-450 редуктазою. Ці два домени зв'язані гідрофільними пептидами. Гени, що кодують домени гему і флавіну, були виділені і експресовані в *E. coli* [17]. Кристалічна структура цитохрому



P-450 BM-3 схожа з цитохромом P-450cam. Вона є трикутною призмою і гем знаходиться між I і L спіралями. Cys-400 є п'ятим лігандом гему, шостий ліганд заміщений молекулами води [21]. Існує схожість між цитохромами P-450cam і P-450 BM-3 в будові C-кінцевої частини L-спіралі. Цитохром P-450 BM-3 складається з чотирьох основних пептидних вставок (розміром 7–17 амінокислот). Позитивно заряджені амінокислотні залишки можуть брати участь у процесах зв'язування різних поліпептидних ланцюгів. Причому, фрагмент Thr-268 і Glu-409 цитохрому P-450 BM-3 відповідає фрагменту Thr-252 і Glu-366 у цитохромі P-450cam [20]. Мутагенез Gly-570, Trp-574 і Tyr-536 в редуктазній області цитохрому P-450 BM-3 показав їх значення у зв'язуванні флавінмононуклеотиду. Були отримані і вивчені мутанти по Trp-96 [19]. Ця амінокислота відіграє важливу роль у забезпеченні переходу з низькоспінового стану в високоспіновий стан заліза у гемі, який необхідний для перенесення електронів в цитохром — P-450BM-3 залежній системі як посередника при перенесенні електронів в електронтранспортному ланцюгу, і зберігається у всіх вивчених цитохромах P-450. Заміна Trp-96 на ароматичні амінокислоти (Phe, Tyr), або на амінокислоту Ala призводять до зниження вмісту гему. Trp-96 знаходиться безпосередньо біля гему в цитохромі P-450 BM-3 і може утворювати водневий зв'язок з гемпропіонатом. Його роль в цитохромі P-450 BM-3 полягає в стабілізації гему.

Виявилося, що цитохром P-450 BM-3 здатний до індукції при введенні барбітуратів. Здатність фенобарбіталу індукувати цитохром P-450 свавців добре відома. При індукції фенобарбіталом відбувається підвищення вмісту мРНК, що може вказувати на збільшення швидкості транскрипції [24]. Тим не менш, барбітуратна індукція бактеріальних P-450 представляється дуже незвичайною. Було показано, що додавання до культури *B. megaterium* 8 мМ фенобарбіталу посилює синтез цитохрому P-450 BM-3 у 28 разів, хоча фенобарбітал не є субстратом цього цитохрому P-450 [21]. Виділення цитохрому P-450 BM-3 показало, що його кількість значно зросла після індукції [21]. Інші барбітурати теж є індукторами цього гемопротейну і визначальною властивістю для індукції є ліпофільність субстратів. Генетичні дослідження показали, що одна ділянка в гені цитохрому P-450 BM-3 в 5' положенні відповідає за індукцію барбітуратами. Встановлено високу схожість у нуклеотидній послідовності між 17 bp, які знаходяться в 5' положеннях генів цитохрому P-450BM-3 та цитохрому P-450BM-1. Ці послідовності відповідають за барбітуратну індукцію [20]. Ген, що кодує білковий репресор гену цитохрому P-450 BM-3, був також знайдений і визначена амінокислотна послідовність білка, який кодує цей ген. Він теж розташовується в 5' положенні гену. Аналогічні механізми барбітуратної індукції і у вищих організмів [34]. Цитохром P-450 BM-3, крім реакцій окиснення жирних кислот, здатний метаболізувати різні ксенобіотики (реакції о-деметилування і гідроксилування) [15].



### Цитохром P-450terp (CYP 108)

Цитохром P-450terp комплекс відноситься до першого класу. Він виділений з *Pseudomonas spp.*, які здатні рости на  $\omega$ -терпенолі. Цитохром P-450terp залежні монотерпенові гідроксилази аналогічні цитохром P-450cam залежній камфорній гідроксилазі. Ген P-450terp (cyp108) був клонований, а отриманий фермент було виділено, очищено та досліджено його структуру [8]. Цитохром P-450terp дуже схожий на цитохром P-450cam. **Тим не менш, існують і певні структурні відмінності. В основному вони стосуються деяких змін в N-поліпептидних кінцях В, F і G спіралей білка. Геометрія розташування гему в ферменті відрізняється від його розташування в цитохромі P-450cam. Один із атомів азоту порфірину з залізом утворює більш короткий дистальний зв'язок. Поліпептидна спіраль, яка знаходиться в безпосередній близькості від гему, схильна до викривлення, як і у цитохрому P-450cam. У цих двох ензимів відмічено наявність молекул води, які можуть служити джерелами протонів в процесі каталізу [8].**

### Цитохроми P-450 роду *Streptomyces*

Стрептоміцети — це родина прокаріотів, які синтезують різні антибіотики. Крім того, за допомоги цитохромів P-450 вони здатні каталізувати гідроксилювання алкалоїдів, кумаринів [31], ретіноїдів [30]. Ці властивості допомагають їм вижити у несприятливих умовах навколишнього середовища та використовувати ці сполуки як основні джерела вуглецю та енергії [23].

### Цитохром P-450eryF (CYP 107 A1)

Цитохром P-450eryF з *Saccharopolyspora erythraea* є одним із бактеріальних цитохромів P-450, який виконує біосинтетичні функції. *S. erythraea* синтезує еритроміцин. Цитохром P-450eryF каталізує гідроксилювання 6-дезоксирітроноліду В у ерітронолід В, які є попередниками цього макролідного антибіотика [33] (рис. 2). У *S. erythraea* два цитохроми P-450, які кодуються різними генами (off405 і eryF), але тільки цитохром P-450 eryF бере участь у біосинтезі еритроміцину. Топографія цитохрому P-450 eryF аналогічна топографії цитохрому P-450cam, незважаючи на те, що тільки 19% амінокислотних залишків у молекулі збігається. Основні відмінності цих гемопротейдів у тому, що відбувається зміна орієнтації в просторі спіралі В. У цитохромі P-450eryF ця спіраль розташована перпендикулярно гему, тому змінюється орієнтація активного центру ферменту. Відмічено, що ця зміна дає змогу зменшити константу зв'язування субстрату. Амінокислота треонін Thr-252, яка розташовується поблизу активного центру цитохромів, змінюється у цитохрому P-450eryF на Ala-245, а це, в свою чергу, впливає на просторове розташування активного





центру. У цитохрому P-450eryF існує "залом" у поліпептидній спіралі поблизу гему, який можливий завдяки молекулам води. Вона може замінювати треонін, як донора водневих зв'язків [6].

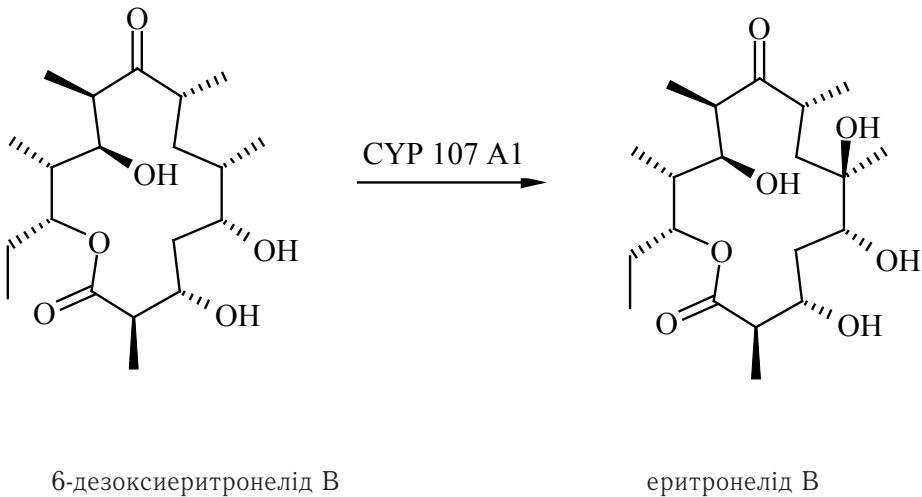


Рис. 2. Біосинтез попередника еритроміцину за допомоги CYP107 A1

Fig. 2. The biosynthetic step mediated by CYP107 A1 (eryF) in erythromycin biosynthesis

Інші представники роду *Streptomyces* синтезують близько двох третин природних антибіотиків і широкий спектр інших вторинних метаболітів. Це численні антибактеріальні препарати (наприклад, еритроміцин, тетрациклін), протипухлинні препарати (доксорубіцин), імунодепресанти (FK 506, рапаміцин), протипаразитарні агенти (авермектин, немадетин), протигрибкові препарати (амфотерицин, гризеофульвін, ністатин), серцево-судинні засоби (ловастатин). Ці природні сполуки відносяться до полікетидів, тому що їх молекули містять кілька карбонільних та/або гідроксильних груп відокремлених одна від одної метиленовим вуглицем (табл. 2).

У *Streptomyces griseolus* ATCC 11796 знайдені гени, що кодують два цитохром P-450 залежних фермента, які беруть участь у деградації похідних сульфосечовини. Ці сполуки є гербіцидами. Обидва ферменти індукуються сульфонілсечовиною та фенобарбіталом [23]. Інші цитохроми P-450 *Streptomyces* виявляють здатність до деметилювання гваяколу (*S. setonii*). *S. griseus* також за допомоги цитохрому P-450 здатні метаболізувати різні ксенобіотики [38].

Таблиця 2  
Роль цитохромів Р-450 у різних видів *Streptomyces* [14]Table 2  
The role of cytochrome P-450 in various species *Streptomyces* [14]

Вид	CYP P-450	Антибіотики	Активність
<i>S. griseus</i>	CYP105 D1, 105D2, 107F1	-	-
<i>S. griseolus</i>	CYP 105 A1, 105B1, 105C1	-	-
<i>S. carbophilus</i>	CYP105A3	-	-
<i>S. scerotialus</i>	CYP105 D3	-	-
<i>S. lividans</i>	CYP105 D4	-	-
<i>S. thermotolerans</i>	CYP107C1	-	-
<i>S. lavendulae</i>	CYP 105 F1, 107N1, 160A1	смплестатин	анти-ВІЛ препарат
<i>S. tendae</i>	CYP105 K1, 162A1	нікоміцин	інсектицидний препарат
<i>S. fradiae</i>	CYP105L1, 113B1, 154B1	тілозин	ветеринарний антибіотик
<i>S. clavuligerus</i>	CYP105 M1	-	-
<i>S. venezuelae</i>	PikC (PicK)	пикроміцин	антибіотик
<i>S. erythraea</i>	CYP107A1	еритроміцин	антибіотик
<i>S. hygroscopius</i>	CYP107G1, 122A2, 122A3	рапаміцин	антибіотик
<i>S. antibioticus</i>	CYP107D1	олеандоміцин	антибіотик
<i>S. spheroides</i>	CYP163A1	новобіоцин	антибіотик
<i>S. maritimus</i>	CYP107R1	-	-
<i>S. peuretius</i>	CYP129A2, 131A1, 131.A2	даунорубіцин	протипухлинний антибіотик
<i>S. noursei</i>	CYP105H1, 161A1	ністатин	протигрибковий антибіотик
<i>S. nodosus</i>	Orf1, Orf2	амфотерицин	протигрибковий антибіотик
<i>S. acidscabies</i>	TxtC	тахтомін	фітотоксин
<i>S. avermitilis</i>	CYP171A1	авермектин	антипаразитарний антибіотик

- інформація відсутня



### Цитохром P-450 у мікобактерій

У родин мікобактерій знайдена велика кількість цитохромів P-450. Кількість цих гемопротеїнів у різних видів мікобактерій варіює у доволі широких межах. У *Mycobacterium tuberculosis* знайдено 20 різних видів цитохромів P-450 [14]. Тільки 12 із 20 ізоформ цитохромів P-450 знайдено у *M. smegmatis*. У *M. avium*, *M. avium* ssp. *Paratuberculosis* виявлено 40 ізоформ цитохрому P-450. Мікобактеріальні гени цитохромів P-450 складають близько 1% від усього геному роду мікобактерій [14]. У *M. leprae* знайдено тільки один цитохром P-450, який відсутній у *M. tuberculosis* і він має далеку спорідненість з цитохромами P-450 *M. smegmatis*. Крім того, у бактерій родини *Mycobacteriaceae* знайдено еукаріотні цитохроми P-450. Найбільш поширеною еукаріотною ізоформою гемопротеїну у *Mycobacteriaceae* є CYP51FX, який вірогідно був присутнім у предків актиноміцетів. Подібний феномен можна пояснити лише горизонтальним переносом генів та конвергентними еволюційними процесами. У геномі *M. tuberculosis* поряд з геном CYP51FX знаходиться ген ферредоксину. Подальші еволюційні процеси призвели до злиття цих генів. Подібну систему було знайдено у грамнегативних протеобактерій і метилотрофів. Тому у *Methylococcus capsulatus* ген цитохрому P-450 (CYP51FX) злитий з геном ферредоксину. Основною функцією цього гемопротеїну є синтез стеринів. Фермент носить назву 14 $\alpha$ -деметилаза [11].

Значна кількість ізоформ цитохромів P-450 у *M. tuberculosis* дозволяє цим прокаріотам бути стійкими до дії різних антибактеріальних агентів. При вивченні резистентності клінічних штамів *M. tuberculosis* до антибактеріальних препаратів та антибіотиків було встановлено, що рівень ізоформ цитохрому P-450 у резистентних до ізоніазиду та рифампіцину штамів у два рази вищий, ніж у чутливих до цих препаратів клінічних штамів *M. tuberculosis* [27].

Одним із перспективних напрямків у пошуку нових антибактеріальних препаратів є вивчення їх взаємодії з бактеріальними цитохромами P-450. Хімічні сполуки, які у своєму складі мають імідазольний фрагмент, здатні зв'язуватись з гемом цитохрому P-450, як шостий ліганд замість молекули води і тим самим блокувати ферментний каталіз. Ці препарати є конкурентними інгібіторами цитохромів P-450. Насамперед вони доволі відомі антигрибкові препарати, такі, як кетоконазол і флуконазол. Ці хімічні сполуки є інгібіторами ізоформи цитохрому P-450 (CYP51). Ця ізоформа гемопротеїну найбільш часто зустрічається у грибів, але існує і у *Mycobacteriaceae* та у роду *Streptomyces*. Тому деякі представники роду *Mycobacterium* чутливі до цих препаратів [14].

### Цитохроми P-450 архей

Цитохроми P-450 були виявлені у деяких архей (*Sulfolobus solfataricus*, *Thermus thermophilus* HB27). Досі не ясно, з'явилися ці гемопротеїни на пізніших етапах еволюції цитохромів P-450, чи вони виникли у них



на початку еволюційного процесу. Архейні цитохроми Р-450 важливі для використання у біотехнологічних процесах у зв'язку з високою термо- і баростабільністю. Якщо СУР101 *P. putida* зберігає стабільність білкової молекули при 54 °С, то СУР119 з *Sulfolobus solfataricus* зберігає стабільність білкової молекули при 91 °С. Крім того, архейний гемопротеїн не руйнується при дії тиску у 2 кбар. Термо- і баростабільність швидше за все досягається за рахунок збільшення гідрофобних та ароматичних залишків амінокислот, що зменшує кількість  $\alpha$ -спіралей. Цистеїн 317 зв'язаний з гемом і утворює тіолатний ліганд у п'ятому аксіальному положенні гему. Активний центр ферменту більш відкритий, ніж активні центри бактеріальних цитохромів [16].

У *Thermus thermophilus* НВ27 був виділений термостабільний цитохром Р-450 (СУР175А1), який бере участь у метаболізмі  $\beta$ -каротиноїдів з утворенням зеаксантину ( $\beta$ ,  $\beta$ -каротин-3, 3'-діол). У структурі СУР175А1 дуже мало залишків ароматичних кислот на відміну від СУР119, а його термостабільність досягається за рахунок зниження загального розміру та зменшення лабільних залишків амінокислот, таких, як Asp, Gli, Cys [4].

### Цитохроми Р-450 у ціанобактерій

Найбільш древнім цитохромом Р-450 є гемопротеїн у ціанобактерій, який міг з'явитися у мезопротерозойський період протерозойської ери. На даний час, виявлено 35 цитохромів Р-450, а їх гени знайдені у 10 видів ціанобактерій. У них є дві великі родини цих гемопротеїнів СУР110 і СУР120 [13]. СУР 110 ціанобактерії *Anabaena sp. strain PCC 7120* індукується гексадеканом. При цьому рівень мРНК підвищується у 2 рази, а рівень СУР110 у клітинах зріс учетверо. Довголанцюгові насичені і ненасичені жирні кислоти мають велику спорідненість з активним центром цього гемопротеїну, тому вони є субстратами СУР110. На підставі зв'язування різних субстратів цитохрому Р-450, а також амінокислотних послідовностей цього гемопротеїну зроблено висновок, що СУР110 є  $\omega$ -гідроксилазою жирних кислот *Anabaena sp. strain PCC 7120*. Він, на відміну від інших бактеріальних цитохромів, зв'язаний з цитоплазматичною мембраною клітин ціанобактерій, а саме, у мезосомах і тому СУР110 більше нагадує еукаріотний цитохром Р-450 [37]. У родині ціанобактеріальних цитохромів (СУР120) існують чотири підродини. СУР120А1 виділено з *Synechocystis sp. PCC 6803*, СУР120А2 з *Trichodesmium erythraeum IMS101*, СУР120В1 і СУР120С1 з *Nostoc punctiforme PCC 73102*. Усі ці гемопротеїни беруть участь у метаболізмі ретинової кислоти [13]. Низка цитохромів Р-450 ціанобактерій беруть також участь у метаболізмі терпенів [2].

На підставі літературних даних, викладених у даній статті, можна зробити висновок, що компоненти системи бактеріальних цитохромів Р-450 є розчинними формами. Їх гіперекспресія призводить до значного збільшення концентрації цих гемопротеїнів у бактеріальних клітинах.



Таким чином, можна накопичити значні кількості цих компонентів, які використовуються для остаточного з'ясування механізмів активації молекулярного кисню та зробити припущення про короткоживучі проміжні форми гему. Подібні дослідження допоможуть у подальшому використовувати ці системи для потреб промисловості. Бактеріальні цитохроми P-450 завдяки своїй здатності брати участь у катаболізмі ксенобіотиків забезпечують бактеріям можливість використовувати ці чужорідні речовини як єдине джерело вуглецю і енергії. Крім того, бактеріальні цитохроми P-450 можна використовувати для синтезу фармацевтичних препаратів та необхідних органічних сполук.

Основні успіхи у вивченні гемопротеїнів пов'язані з сайт-спрямованим мутагенезом для зміни каталітичних властивостей бактеріальних цитохромів P-450.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Галкін Б.М., Філіпнова Т.О. Цитохроми P-450: I. Загальні і еволюційні аспекти // Мікробіол. і біотехнол. — 2010. — № 3. — С. 8—20.
2. Agger S.A., Lopez-Gallego F., Hoye Th.R., Schmidt-Dannert Cl. Identification of Sesquiterpene Synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. Strain PCC 7120 // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190, № 18. — P. 6084—6096.
3. Appleby C.A. A soluble haemoprotein P 450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids // Biochim. Biophys. Acta. — 1964. — V. 147, № 2. — P. 399—402.
4. Blasco F., Kauffmann I., Schmid R.D. CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first  $\beta$ -carotene hydroxylase of the P450 superfamily // Appl. Gen. and Mol. Biotech. — 2004. — V. 64, № 1. — P. 671—674.
5. Boddupalli S.S., Estabrook R.W., Peterson J.A. Fatty Acid Monooxygenation by Cytochrome P-450BMw3 // J. Biol. Chem. — 1990. — V. 265, № 8. — P. 4233—4239.
6. Cupp-Vickery J.R., Poulos T.L. Structure of cytochrome P-450eryF involved in erythromycin biosynthesis // Nature Struct. Biol. — 1995. — V. 2, № 2. — P. 144—152.
7. Gunsalus I.C., Wagner G.C. Bacterial P-450cam methylene monooxygenase components: cytochrome m, putidaredoxin and putidaredoxin reductase // Meth Enzymol. — 1978. — V. 52. — № 1. — P. 166—188.
8. Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Peterson J.A., Deisenhofer J. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution // J. Mol. Biol. — 1994. — V. 236, № 4. — P. 1169—1185.
9. Hedegaard J., Gunsalus I.C. Mixed Function Oxidation: IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation // J. Biol. Chem. — 1965. — V. 240, № 10. — P. 4038—4043.



10. Huang J.J., Kimura T. Studies on adrenal steroid hydroxylases. Oxidation-reduction properties of adrenal iron-sulphur proteins // *Biochem.* 1973. — V. 12, № 2. — P. 406–409.

11. Jackson C.J., Lamb D.C., Marczylo T., Warrilow A.G., Manning N.J., Lowe D.J., Kelly D.E., Kelly S.L. A novel sterol 14 $\alpha$ -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus cupsulutus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, № 45. — P. 46959–46965.

12. Janssen D.B., Dinkla J.T., Terpstra P. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities // *Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 7, № 12. — P. 1868–1882.

13. Ke N., Baudry J., Makris T.M., Schuler M.A., Sligar S.G. A retinoic acid binding cytochrome P450: CYP120A1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2005. — V. 36, № 1. — P. 110–120.

14. Kelly S.L., Lamb D., Jackson C.J., Warrilow A.G., Kelly D.E. The Biodiversity of Microbial Cytochromes P450 // *Advan. Microbiol. Physiol.* — 2003. — V. 47, № 1. — P. 131–186.

15. Kim D-H., Kim K-H., Jung H-C., Pan J-G., Yun Ch-H. Generation of Human Metabolites of 7-Ethoxycoumarin by Bacterial Cytochrome P450 BM3 // *Drug Metabol. and Disposition* . — 2008. — V. 36, № 11 . — P. 2166–2170.

16. McLean M.A., Maves S.A., Weiss K.E., Krepich Sc., Sligar1 St.G. Characterization of a Cytochrome P450 from the Acidothermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1998. — V. 252, N 1. — P. 166–172.

17. Miles J.S., Munro A.W., Rospendowski B.N., Smith W.E., McKnight J., Thomson A.J. Domains of the catalytically self-sufficient cytochrome P-450 BM-3. Genetic construction, overexpression, purification and spectroscopic characterization // *Biochem. J.* — 1992. — V. 288, № 2. — P. 503–509.

18. Munro A.W., Lindsay J.G., Coggins J.R. Alkane metabolism by cytochrome P450 BM3 // *Biochem. Soc. Trans.* — 1993. — V. 21, № 4. — P. 412S.

19. Munro A.W., Malarkey K., McKnight J., Thomson A.J., Kelly S.M., Price N.C., Lindsay J.G., Coggins J.R., Miles J.S. The role of tryptophan 97 of cytochrome P450 BM3 from *Bacillus megaterium* in catalytic function. Evidence against the 'covalent switching' hypothesis of P-450 electron transfer // *Biochem. J.* — 1994. — V. 303, № 2. — P. 423–428.

20. Munro J., Lindsay J.G. Bacterial cytochromes P-450 // *Mol. Microbiol.* — 1996. — V. 20, № 6. — P. 1115–1125.

21. Narhi L.O., Fulco A.J. Characterization of a catalytically self-sufficient 1 19 000-Dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* // *J. Biol. Chem.* — 1986. — V. 261, № 16. — P. 7160–7169.



22. *Narhi L.O., Wen L.-P., Fulco A.J.* Characterization of the protein expressed in *Escherichia coli* by a recombinant plasmid containing the *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 gene // *Mol. Cell. Biochem.* — 1988. — V. 79, № 1. — P. 63–71.
23. *O'Keefe D.P., Harder P.A.* Occurrence and biological function of cytochrome P-450 monooxygenases in the actinomycetes. // *Mol. Microbiol.* — 1991. — V. 5, № 8. — P. 2099–2105.
24. *Pike S.F., Shephard E.A., Rabin B.R., Phillips I.R.* Induction of cytochrome P-450 by phenobarbital is mediated at the level of transcription // *Biochem. Pharmacol.* — 1985. — V. 34, № 14. — P. 2489–2494.
25. *Poulos T.L.* Modeling of mammalian P-450s on basis of P-450cam X-ray structure // *Meth. Enzymol.* — 1991. — V. 206, № 1. — P. 11–30.
26. *Poulos T.L., Raag R.* Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer // *FASEB J.* — 1992. — V. 6, № 2. — P. 674–679.
27. *Ramachandran G., Gurumurthy P., Narayanan P.R., Mahadevan U.* Cytochrome P-450 in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Infect. Dis.* — 1995. — V. 171, № 10. — P. 954–960.
28. *Sakaki T., Sugimoto H., Hayashi K., Shiro Y.* Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450 // *Biochem. Biophys. Res. Commn.* — 2004. — V. 320, № 1. — P. 156–164.
29. *Sariaslani F.S., Rosazza J.P.* Microbial transformation of natural antitumor agents products of rotenone and dihydrorotenone transformation // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1983. — V. 49, № 2. — P. 451–452.
30. *Sariaslani F.S., Rosazza J.P.* Novel biotransformations of 7-ethoxycoumdrin by *Streptomyces griseus* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1983. — V. 46, № 2. — P. 468–474.
31. *Sariaslani F.S., Eckenrode F.M., Beale J.M., Rosazza J.P.* Formation of a reactive iminium derivative by enzymatic and chemical oxidations of 16-O- acetylvindoline // *J. Med. Chem.* — 1984. — V. 27, № 6. — P. 749–754.
32. *Sasaki M., Akahira A., Matsumura Y.* Purification of Cytochrome P450 and Ferredoxin, Involved in Bisphenol A Degradation, from *Sphingomonas sp.* Strain AO1 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 71, № 12. — P. 8024–8030.
33. *Shafiee A., Hutchinson C.R.* Purification and reconstitution of the electron transport components for 6- deoxyerythronolide B hydroxylase, a cytochrome P-450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis // *J. Bacteriol.* — 1988. — V. 70, № 4. — P. 1548–1553.
34. *Shaw G.C., Fulco A.J.* Inhibition by barbiturates of the binding of Bm3R1 repressor to its operator site on the barbiturate-inducible cytochrome P450BM-3 gene of *Bacillus megaterium* // *J. Biol. Chem.* — 1993. — V. 268, № 4. — P. 2997–3004.

35. *Sligar S.G., Filipovic D., Stayton P.S.* Mutagenesis of cytochromes P450cam and b5 // *Meth. Enzymol.* — 1991. — V. 206, № 1. — P. 31–49.

36. *Stayton P.S., Sligar S.G.* Cytochrome P-450cam binding surface defined by site-directed mutagenesis and electrostatic modeling // *Biochem.* — 1990. — V. 29, № 32. — P. 7381–7386.

37. *Torres S., Fjetland C.R., Lammers P.J.* Alkane-induced expression, substrate binding profile, and immunolocalization of a cytochrome P450 encoded on the *nifD* excision element of *Anabaena* 7120 // *BMC Microbiol.* — 2005. — V. 5, № 16. — P. 370–382.

38. *Trower M.K., Sariaslani F.S., O'Keefe D.P.* Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P-450 from *Streptomyces griseus* // *J. Bacteriol.* 1989. — V. 171, № 4. — P. 1781–1787.

**Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, В.А. Иваниця**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЦИТОХРОМЫ P-450: II. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ**

### **Реферат**

В статье представлен обзор современных научных публикаций, в которых приведены данные о молекулярной структуре, механизмах монооксигеназного катализа, генетике, систематике, эволюционном происхождении семейств бактериальных цитохромов P-450 и их биологических функциях. Проведён сравнительный анализ семейств бактериальных цитохромов P-450.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** бактериальные цитохромы P-450, монооксигеназы, гены CYP, НАДФН-цитохром P-450 редуктаза, ферредоксины, НАДН-ферредоксин редуктаза.





**B.M. Galkin, T.O. Filipova, V.O. Ivanytsia**

Odesa National Mechnykov University,  
2, Dvoryanska st., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **BACTERIAL CYTOCHROME P-450: II. STRUCTURE AND FUNCTIONS**

### **Summary**

The article presented the review of current scientific publications, which contains the data about the molecular structure, the mechanisms of monooxygenase catalysis, genetics, systematics, evolutionary origins of the families of bacterial cytochrome P-450 and their biological functions. The comparative analysis of the families of bacterial cytochrome P-450.

**Key words:** bacterial cytochrome P-450, monooxygenases, genes CYP, NADPH-cytochrome P-450 reductase, ferredoxine, NADH-ferredoxine reductase.



А.Г. Дьяченко<sup>1</sup>, А.А. Демьянова<sup>1</sup>, И.М. Балута<sup>2</sup>, И.Ю. Кучма<sup>2</sup>,  
В.В. Леизин<sup>2</sup>, А.Ю. Волянский<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сумский государственный университет, ул. Р. Корсакова, 2, Сумы, 40007,  
Украина, e-mail: ag\_dyachenko@list.ru

<sup>2</sup>ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины»,  
ул. Пушкинская, 14, Харьков, 61057, Украина, тел.: (057) 717-98-67

## ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ САЛЬМОНЕЛЛ И ПАТОГЕНЕЗ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Проведен анализ современных литературных данных, касающихся механизмов развития ограниченной и системной сальмонеллезной инфекций. Замечательная способность сальмонелл уже через несколько минут после поглощения инфицированной пищи проникать в фагоциты и энтероциты и далее по всему телу обеспечивается набором из нескольких десятков эффекторов (всего бактериальный геном включает около 4500 генов), чья координированная экспрессия способствует внутриклеточному выживанию и репликации бактерий. Основная часть эффекторов связана с островами патогенности сальмонелл, SPI-1 и SPI-2. Кроме того, многие штаммы сальмонелл содержат в составе геномов другие локусы патогенности, контролирующие бактериальную адгезию, инвазию, инфекцию, устойчивость к антимикробным средствам. Серьезная угроза, которую представляет собой сальмонеллез, является стимулом для дальнейшего его изучения и совершенствования инфраструктуры общественного здравоохранения.

*Ключевые слова:* сальмонеллез, *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis*, патогенез.

*Salmonella enterica* является членом семейства *Enterobacteriaceae*, большой группы грамотрицательных факультативных анаэробов, большая часть которых входит в состав кишечной микробиоты позвоночных. Из известных на сегодняшний день более, чем 2500 сероваров *S. enterica* лишь некоторые ассоциированы с заболеваниями людей, которые обычно протекают в виде самоограниченного или более серьезного гастроэнтерита, либо в виде тифа/паратифа. *S. enterica* (серовары *Typhimurium* и *Enteritidis*) является одной из наиболее частых причин диарейных заболеваний у людей, а также важным патогеном сельскохозяйственных животных, включая телят, свиней и цыплят. Сальмонеллы являются факультативными внутриклеточными паразитами, в организм человека поступают с мясом инфицированных животных или из окружающей среды. После поглощения пищи и кишечной колонизации сальмонеллы



внедряются в слизистую кишечника несколькими путями: бактерии могут поглощаться примированными М-клетками, они могут быть захвачены в просвете кишечника CD18+ фагоцитами, проникшими через эпителиальный монослой, дендритными клетками (ДК) или могут самостоятельно проникнуть в нефагоцитирующие энтероциты. При интернализации в нефагоцитирующие клетки сальмонеллы формируют внутриклеточное фагосомальное образование (*Salmonella*-containing vacuole, SCV). Созревающая SCV переносится к аппарату Гольджи селективным внутриклеточным путем. Располагаясь в перинуклеарной зоне, заключенные в SCV бактерии размножаются, формируя структуры — филаменты (*Salmonella*-induced filaments, Sifs). Хотя большинство инфицирующих сальмонелл остаются локализованными в кишечнике, где они вызывают воспалительные ответы, включая диарею, при системных заболеваниях сальмонеллы достигают субмукозы, интернализуются резидентными макрофагами, частично выживают в них и быстро диссеминируют с кровотоком, накапливаясь в мезентериальных лимфоузах и, в конечном итоге, в селезенке [45]. Способность бактерий выживать в разных типах клеток хозяина определяет успех инфекции, является атрибутивным признаком паразитизма сальмонелл. Основные этапы сальмонеллезной инфекции представлены на рисунке 1. Исход ее зависит от большого набора факторов паразита и хозяина, анализу которых посвящен настоящий обзор.

**Инфекция и колонизация кишечника.** Сальмонеллезная инфекция передается фекально-оральным путем. Инфекционная доза составляет от 30 до 100 микроорганизмов и более и зависит от характера поглощенной пищи и напряженности факторов врожденного иммунитета [49]. Высокое содержание жира в пище уменьшает дозу инфекта [21]. Чтобы достичь места колонизации сальмонеллы должны преодолеть неблагоприятную среду желудка, включая действие сильных неорганических кислот. Сальмонеллы используют механизмы, которые позволяют выживать при низких значениях pH и в присутствии сильных кислот. Многие из экспрессируемых шоковых белков ассоциированы с участком генома ATR (acid tolerance response), обеспечивающим устойчивость к кислотам. Белки RpoS и PhoP Q важны для выживания при низких значениях pH, вызываемых неорганическими кислотами, в то время как белки FliC и RpoS участвуют в регуляции толерантности к органическим кислотам [3]. Вслед за проникновением в организм бактерии колонизируют множество сайтов, включая тонкий кишечник, толстую и слепую кишки. Адгезия осуществляется посредством ворсинок (фимбрий) или пилей, имеющих на поверхности бактерий. Геном сальмонелл содержит 13 локусов, предположительно кодирующих ворсинки, многие из которых индуцируются *in vivo* и требуются для образования биопленки, прикрепления к клеткам хозяина и колонизации, но не для выживания внутри этих клеток [20]. Идентифицировано несколько типов фимбрий, участвующих



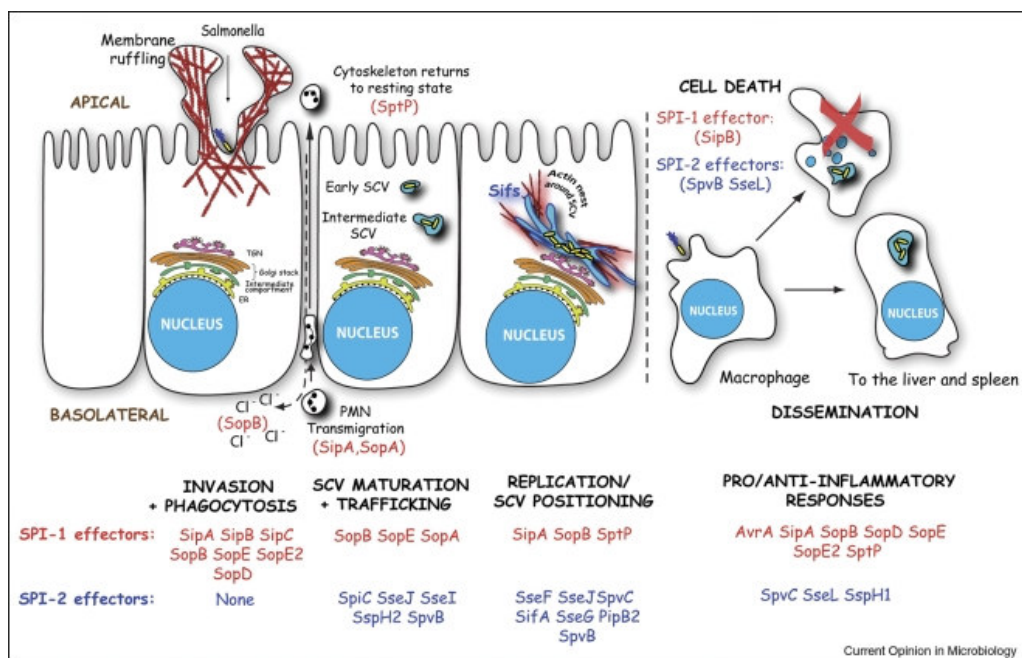


Рис. 1. Основные этапы сальмонеллезной инфекции

Бактерии проникают в нефагоцитирующие клетки посредством индукции деформации мембраны, реаранжировки подлежащего актинового цитоскелотона (образование складок) и включения возбудителей во внутриклеточные фагосомальные образования (SCV). Эти вакуоли переносятся в перинуклеарную область клетки хозяина, где и созревают. Вслед за размещением SCV вблизи аппарата Гольджи начинается репликация внутриклеточных бактерий. При этом образуются тубуло-везикулярные структуры (Sif), и накапливается актин вокруг бактериальной фагосомы. Секретия Cl<sup>-</sup> и миграция полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) способствуют развитию кишечного воспаления и диареи. Параллельно сальмонеллы модифицируют иммунные ответы хозяина. При системной инфекции возбудители инфицируют кишечные макрофаги, индуцируя их гибель, или используют их для распространения через кровь или лимфу, достигая печени и селезенки. Эффекторы SPI-1 и SPI-2 играют ключевую роль в созревании, позиционировании и репликации SCV [32].

Fig. 1. Schematic representation of the major stages underlying Salmonella infection

Bacteria invade non-phagocytic cells by inducing membrane deformation and rearrangement of the underlying actin cytoskeleton (membrane ruffling), enclosing bacteria in intracellular phagosomal compartments termed Salmonella-containing vacuoles (SCVs). SCVs traffic towards the perinuclear region of the host cell and mature there. Once the SCV is positioned next to the Golgi apparatus, intracellular bacterial replication begins. This stage is characterized by the formation of SCV tubulovesicular structures called Salmonella-induced filaments (Sifs) and the accumulation of F-actin around the bacterial phagosome (actin nest). Chloride ion (Cl<sup>-</sup>) secretion and polymorphonuclear leukocyte (PMN) transmigration cause diarrhoea and intestinal inflammation. In addition, Salmonella modifies specific host immune response pathways. Salmonella serovars associated with systemic disease are able to enter intestinal macrophages, inducing cell death as well as using them as a vehicle to disseminate to the liver and spleen via the bloodstream and lymphatic system. SPI-1 and SPI-2 effectors are involved in each stage of SCV maturation, positioning and replication [32].

в колонизации, в том числе фимбрии 1 типа (Fim), длинные полярные фимбрии (Lpf), тонкие фимбрии и кодируемые плазмидами фимбрии (Pef) [8]. Fim связывается со специфическими D-маннозными рецепторами на поверхности клеток разных типов. Эти фимбрии кодируются 7 генами (fimAICDHF). Основная структурная единица — FimA, FimH — субъединица, которая взаимодействует с поверхностными клеточными рецепторами, усиливая присоединение [8]. Этот адгезин также опосредует независимое от первой системы третьего типа (Т3SS-1) поглощение сальмонелл дендритными клетками [16]. Другие типы фимбрий также обнаруживают определенную тропность: Lpf связывается с поверхностью Пейеровых бляшек и М-клеток, Pef связывается с ворсинками кишечника.

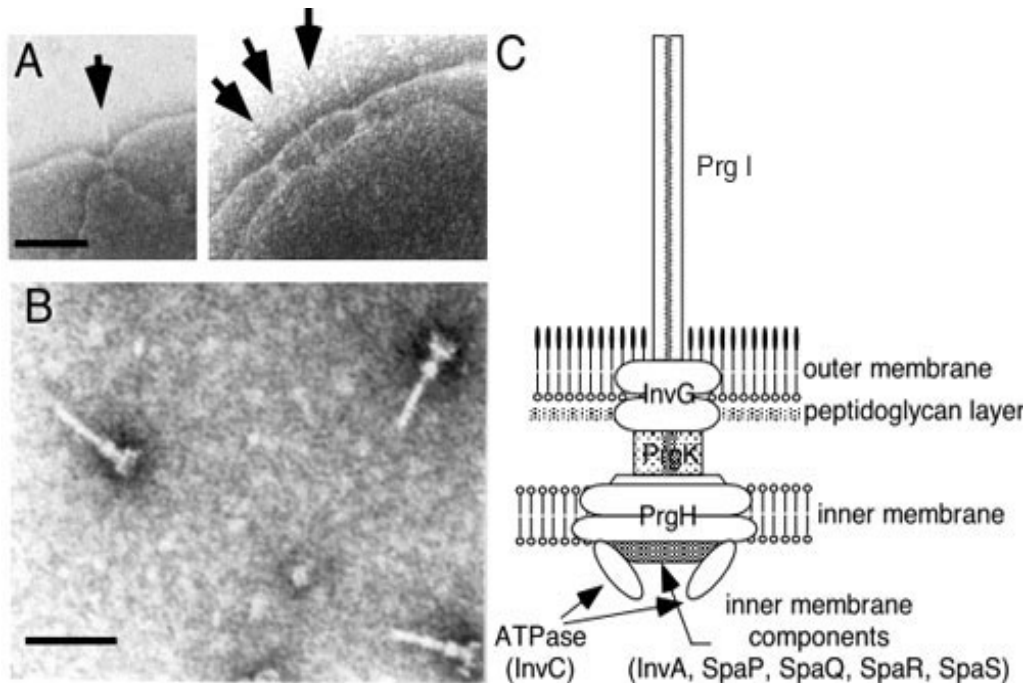
#### **Инвазия в эпителиальные нефагоцитирующие клетки хозяина.**

Интернализация сальмонелл в клетки хозяина происходит посредством двух различных процессов. Профессиональные фагоциты, такие как макрофаги, используют фагоцитоз для эффективного распознавания и поглощения бактериальных патогенов. Кроме того, сальмонеллы могут активно внедряться как в фагоцитирующие, так и в нефагоцитирующие клетки, используя т.н. системы секреции. Фагоцитоз грамотрицательных бактерий является сложным процессом, в который вовлечено множество рецепторов, часть из которых повышает эффективность поглощения, а другие активируют различные сигнальные пути фагоцитоза. Специфические рецепторы распознают молекулы, ассоциированные с патогенами, включая липополисахарид (ЛПС) и флагеллин, и связываются с лигандом на поверхности клетки или внутри фагосомы, воздействуя тем самым на созревание фагосомы, экспрессию сигналов и генов [25]. В то время как фагоцитоз является важнейшей функцией врожденного иммунитета, рассчитанной на применение к максимально широкому кругу различных патогенов, опосредованная системами секреции инвазия сальмонелл в эпителиальные клетки — высоко специфический процесс, который зависит от точной регуляции экспрессии ряда бактериальных факторов [22]. Известны несколько систем секреции. Так, два больших белка, VarA и SiiE, ассоциированных с поверхностной мембраной, принимают участие в инвазии/адгезии и переносятся посредством *систем секреции 1 типа*, VarBCD и SiiCDF соответственно [14]. Однако основным механизмом, используемым бактериями для проникновения в клетку, является Т3SS-1.

Вслед за контактом с клеткой-хозяином сальмонеллы начинают экспрессировать гены, расположенные в пределах первого и второго островов патогенности, SPI-1 и SPI-2. Значительная часть из них входит в состав Т3SS, которая принимает самое активное участие в инвазии сальмонелл. Главным регуляторным белком Т3SS является HilA, экспрессия которого связана с рядом внешних факторов, важных для выживания клетки. Т3SS обеспечивает транспорт факторов вирулентности сальмонелл прямо в клетку хозяина и включает по меньшей мере 20



структурных и регуляторных белков, участвующих в инвазии. Базовая структура комплекса охватывает мембраны бактерии и клетки, а иглоподобная структура выдвигается из базовой, взаимодействуя с клеткой хозяина (рис. 2). Внутри «иглы» находится палочковидная структура, которая формирует канал между бактериальной цитоплазмой и мембраной клетки хозяина. На цитоплазматической (бактериальной) стороне ТЗСС структуры располагаются части экспортной системы, содержащей АТФазный комплекс, который ускоряет транспорт эффекторных молекул через внутренний канал в транслоказный комплекс, находящийся на клеточной мембране [22, 32]. Гены, кодирующие ТЗСС комплекс, ассоциированы с локусом SPI-1, который детерминирует и другие факторы вирулентности (адгезины, инвазины, токсины). Помимо регуляторных и эффекторных генов расположенный на SPI-1 комплекс ТЗСС содержит структурные гены *prgHIJK*, *spaMNOPQRS*, *invABCEFGH*.



**Рис. 2.** Система секреции третьего типа *S. Typhimurium*

(А) Электронная микрография *S. Typhimurium*, разрушенной осмотическим шоком, с иглоподобными комплексами на бактериальной мембране (стрелки). (В) Электронная микрография очищенных иглоподобных комплексов. (С) Гипотетическая схема иглоподобного комплекса *S. Typhimurium* и его компонентов. Масштаб 100 нм [26].

**Fig. 2.** *S. Typhimurium* type III protein secretion system

(A) electron micrograph of the surface of *S. Typhimurium* destroyed by osmotic shock with needle-like complex on bacterial membrane (arrows) (B) electron micrograph of the purified needle-like complex (C) Hypothetical scheme of the *S. Typhimurium* needle-like complex and its components. Scale 100 nm [26].

Сборка ТЗСС начинается с внутренней кольцевой структуры, которая охватывает клеточную мембрану и собирается из субъединиц PrgH и PrgK [12]. Затем из белков InvA, InvC, SpaP, SpaQ, SpaR, SpaS собирается цитоплазматическое экспортное устройство. Одновременно из белков InvG и InvH на внешней мембране собирается внешняя кольцевая структура, которая соединяется с внутренней при помощи регуляторного белка InvJ. Завершается сборка присоединением иглоподобной и палочковидной структур, составленных из субъединиц PrgJ и PrgI [12]. Завершенная ТЗСС структура перемещает эффекторный белок из бактериальной цитоплазмы в клетку хозяина. В бактериальной цитоплазме молекулы-шапероны связываются с эффекторными белками и сопровождают их в экспортную систему ТЗСС. Шапероны взаимодействуют с АТФазой, что позволяет эффекторам отделяться от шаперонов и проникать в «иглу» и далее в клетку хозяина. Процесс переноса осуществляется при помощи транслоказы, встроенной в мембрану клетки хозяина. Белки этого комплекса продуцируются бактерией и являются частью начальных эффекторных молекул, секретируемых ТЗСС. Белки «иглы» взаимодействуют с транслоказой в переносе бактериальных белков в цитозоль хозяина [12].

Не менее 15 белков переносятся посредством ТЗСС-1 в клетки хозяина [32]. В результате этого четко скоординированного процесса небольшая группа эффекторных белков, кодируемых в пределах SPI-1 (SipA, SipC, SopB/SigD, SopD, SopE2 и SptP), кооперативно индуцирует деформацию мембраны и драматическую реаранжировку подлежащего актинового цитоскелета, вследствие чего происходит массивное локальное образование мембранных морщин (*ruffles*), сопровождающееся быстрой интернализацией бактерий в SCVs [32]. Остальные эффекторы связаны с процессами, протекающими после инвазии, включая выживание в клетке-хозяине, биогенез SCV и модулирование воспалительного ответа.

С-терминальный компонент SPI-1 ТЗСС локуса SipC непосредственно управляет сборкой актина, ведущей к быстрому росту филаментов [17]. SipA (SspA) повышает эффективность инвазии в клетки культуры [17] и усиливает проявления энтероколита *in vivo* [27]. SipA способствует полимеризации актина, уменьшая критическую для сборки его концентрацию, и соединяется с F-актином с высокой аффинностью, что приводит к механической стабилизации филаментов [17, 33]. Кроме того, SipA потенцирует нуклеацию актина, повышает активность клеточного белка T-пластин (фимбрин) и предотвращает связывание клеточного актин-деполимеризующего белка АДФ/кофилин с F-актином, одновременно разрушая уже образовавшиеся комплексы [33]. В отличие от SipA и SipC, SopE и SopE2 не связывают актин. Они модулируют цитоскелет опосредованно через обмен гуанина наподобие клеточных гуанин-обменных факторов (GEFs) [40]. Они, в частности, катализируют замену связанного ГДФ на ГТФ, что необходимо для активации клеточной Rho-ГТФазы. Это, в свою очередь, запускает сборку актинового цитоскелета через Agr2/3.



*In vitro* SopE и SopE2 имеют различные субстратные специфичности: SopE активирует Rac-1 и Cdc42, а SopE2 обнаруживает специфичность только к Cdc42 [40]. SopE-зависимая активация только Rac-1 кажется вполне достаточной для бактериальной инвазии.

Инозитолфосфатаза SopB (SigD) дефосфорилирует ряд инозитолфосфатных субстратов *in vivo* и *in vitro* [27, 40]. Подавление активности SopB инозитолфосфатазы ослабляет индуцированную сальмонеллами реорганизацию цитоскелетона [40]. SopB-зависимая стимуляция клеточного фактора SGEF (SH-содержащий GEF) приводит к активации небольшой ГТФазы RhoG, которая принимает активное участие в перестройке актина, происходящей во время инвазии сальмонелл [41]. Другой эффектор, SopD, кооперирует с SopB, помогая в расщеплении мембраны и формировании макропиносом [2]. Каждая из этих функций, как полагают, зависит от синтеза специфических фосфатидов в местах локализации SopB, т.е. плазме и SCV мембранах.

Другими T3SS-1 эффекторами, участвующими в биогенезе SCV/Sif, являются тирозинфосфатаза SptP, которая дефосфорилирует AAA+ АТФазу VCP [19] и требуется для выключения образований складок после инвазии, и SipA, который причастен к морфологии и перинуклеарному позиционированию SCV, и, как показано, кооперирует с SPI-2 эффектором SifA [5].

После поглощения сальмонелл клеточный цитоскелетон возвращается к состоянию покоя. Это событие управляется N-терминальным ГТФаза-активирующим (GAP) доменом SptP. Это стимулирует базальную активность SopE/SopE2/SopB-активированных Cdc42 и Rac-1, приводя к снижению их активности [40].

**Созревание и перенос вакуоли, содержащей сальмонеллы.** Вслед за интернализацией и формированием SCV, на ее поверхности накапливаются ранние эндосомальные клеточные маркеры, например, трансферриновый рецептор (TfnR), ранний эндосомальный антиген 1 (EEA1), и несколько Rab ГТФаз, таких как Rab4, Rab5 и Rab11, а SCV созревает Rab7-зависимым образом [47]. Затем эти маркеры быстро удаляются и через 60–90 мин после инвазии SCV интенсивно обогащаются маркерами поздних эндосом и лизосом, включая Rab7, вакуолярную АТФазу (v-АТФаза) и лизосомальные мембранные гликопротеины (lpgs), в том числе LAMP-1 [47]. Для вовлечения Rab5 в созревание SCV требуются SopE и SopB. Эти и другие данные предполагают, что SopB играет ключевую роль в реализации собственного, отличного от эндосом пути созревания SCV. Помимо этого SopB требуется для активации Akt [27], который в свою очередь деактивирует Rab14 GAP, AS160. Активированный Rab14 повышает репликацию внутриклеточных сальмонелл, возможно, препятствуя слиянию SCV и лизосом. SpiC, как полагают, также предотвращает слияние макрофагальных поздних эндосом/лизосом с SCV [47]. Это позволяет сальмонеллам избегать гибели от воздействия фаголизосом,





что играет ключевую роль в инвазивной инфекции. Поэтому способность бактерий выживать и пролиферировать в SCV является главным фактором вирулентности сальмонелл.

SPI-1 эффектор *SopA*, структурно и функционально напоминающий клеточную НЕСТ E3 убиквитинлигазу, способствует выходу бактерий из SCV посредством нарушения ее целостности [47]. Через несколько часов после инфекции клеток хозяина F-актиновая сеть собирается вокруг репликативной SCV и стабилизируется под действием *SipA* [42, 47]. Несколько SPI-2 эффекторов регулируют динамику ассоциированного с SCV актина [42].

Инвазивная сальмонеллезная инфекция ассоциирована с T3SS-2, которая кодируется в пределах SPI-2. Гены T3SS-2 экспрессируют только при внутриклеточной локализации SCV. Хотя роли индивидуальных T3SS-2 эффекторов остаются во многом неопределенными, некоторые из них участвуют в позиционировании SCV и образовании *Sifs*, которые распространяются с поверхности поздних SCV ( $\geq 6$  ч после инфекции) в эпителиальные клетки. Другие гены требуются для функционирования структуры T3SS: аппарата секреции (*sscG*), секреции эффекторов (*sseABCDEF*), шаперонов (*sscAB*) и регуляторов (*ssrAB*). Экспрессия генов SPI-2 T3SS регулируется двухкомпонентной системой *SsrA-SsrB*, которая в свою очередь управляется второй двухкомпонентной системой *OmpR-EnvZ* [13].

Активированные гены в составе T3SS-2 принимают участие в переносе эффекторов из цитоплазмы сальмонеллы через SCV мембрану к мишеням в клетке-хозяине. Многие эффекторный белки T3SS-2 участвуют в образовании и сохранении SCV. Так, *SseF* и *SseG* требуются для сохранения SCV и внутриклеточной репликации [44]. *SifA* необходим для образования *Sif* и сохранения структуры SCV мембран: мутанты, лишённые *SifA*, размножаются в цитозоле [4]. Два других T3SS-2 эффектора, *PipB2* и *SseJ*, кооперируют с *SifA* с участием клеточных белков. *PipB2* вместе с кинезином участвует в перемещении микротрубочек от поверхности перинуклеарной SCV к периферии клетки-хозяина [23]. SPI-2 эффектор *SseJ* требуется для реализации вирулентности при системной инфекции и локализации SCV. Эффектор обладает деацетилазной активностью *in vitro*, а во время сальмонеллезной инфекции он эстерифицирует холестерол, входящий в состав SCV мембран.

**Перемещение SCV и образование сальмонелла-индуцированных филаментов (*Sifs*).** Во время созревания SCV мигрирует от периферии клетки к перинуклеарной области клетки хозяина, используя взаимодействующий с *Rab7* лизосомальный белок (*RILP*), который, в свою очередь, ассоциирован с микротубулярным мотором — динеином [15]. Нахождение SCV в перинуклеарном регионе поблизости от МТОС важно для бактериальной репликации [44]. Близость SCV к аппарату Гольджи способствует воздействию на транспортные везикулы. Для переадресо-



вки транспортных везикул к SCV требуются SifA, SseG и SseF. SseG и SseF удерживают SCV в перинуклеарной области, образуя функциональный комплекс [24], который привязывает SCV к аппарату Гольджи или управляют активностью динеина [9]. Напротив, SifA связывает клеточный белок SKIP (SifA и кинезин-взаимодействующий белок), снижая активность PipB2-индуцированного привлечения двигательного кинезина микротрубочек к SCV [18]. Эффективное присоединение SifA к SCV медируется SPI-1 эффектором SipA [6]. Для удержания SCV в перинуклеарной области клетки требуется также SopB-медирированное фосфорилирование связанной с актином легкой цепи моторного миозина II (MLC) через сигнальный путь Rho/ROCK/MLC [50].

Вслед за позиционированием SCV начинается репликация бактерий. Начало ее сопровождается появлением специализированных тубовезикулярных структур-филаментов (Sifs) [11]. Как полагают, образование Sifs является результатом расщепления SCV посредством поздних эндосом/лизосом, для чего необходим эффектор SifA [47]. Его краткая суперэкспрессия достаточна, чтобы индуцировать набухание и агрегацию поздних эндосом и формирование Sif-подобных структур в животных клетках [47]. Кодированный SPI-2 эффектор PipB2 также способствует расширению сети Sif в основном за счет прямого взаимодействия с кинезином-1 [18]. SseG и SseF усиливают образование Sif, модулируя агрегацию эндосомального компартмента. Напротив, SseJ и SpvB являются антагонистами образования Sif. Мутации в этих генах увеличивают число Sifs [9]. Экспрессия SseJ фактора приводит также к потере целостности SCV.

**Модулирование врожденного иммунного ответа и смерть клетки-хозяина.** Одним из главных клинических признаков сальмонеллезной инфекции является диарея, которая вызывается перенесенными посредством T3SS белками. SopB играет важную роль в активации секреторного пути привлечения нейтрофилов к местам инфекции и изменении ионного баланса в клетках. SPI-1 эффекторы дополнительно индуцируют острое кишечное воспаление. Стимуляция Cdc42 под действием SopE/SopE2, SopB во время инвазии сальмонелл ведет к зависимой от Raf1 индукции Erk, Jnk и p38 митоген-активированных протеинкиназных (МАРК) путей и последующей активации факторов транскрипции AP-1 и NF-κB [40,41]. Это приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов, включая IL-8, привлечению полиморфно ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ). Одновременно N-терминальный регион SipA включает новые сигнальные каскады Atf6 и фосфолипазы D, которые активируют протеинкиназу Ca, что приводит к апикальной секреции мощного ПМЯЛ хемоаттрактанта — гепоксилина A3 [27]. Он способствует трансмиграции ПМЯЛ через эпителий в просвет кишечника, которая, возможно, усиливается E3-убиквитинлигазной активностью SopA [10]. Трансмиграция ПМЯЛ способствует распространению сальмонелл фекально-оральным путем. Продукция Ins(1,4,5,6)



P4 через SopB инозитолфосфатазную активность также вносит вклад в индукцию диареи, усиливая секрецию клеточных ионов хлора и истечение жидкости [27, 40]. Нарушение тесного контакта эпителиальных клеток, который обеспечивается SopE/SopE2, SopB и SipA, также содействует истечению жидкости и трансмиграции ПМЯЛ [5], в то время как другой SPI-1 эффектор, AvgA, подавляет эту активность [28].

Воспалительный эффект далее усиливается гибелью макрофагов вследствие апоптоза, который индуцируется эффектором SipB. Этот процесс может быть следствием прямой активации каспазы-1 либо осуществляется через каспаза-1-независимый путь [27, 28]. Наконец, SprvB и SseL индуцируют более медленный SPI-2-зависимый путь клеточной смерти [7].

Сальмонелла вырабатывает эффекторы, подавляющие клеточные иммунные ответы, в основном нейтрализуя ядерные факторы транскрипции, стимулирующие экспрессию генов.

**Детерминанты вирулентности сальмонелл, влияющие на их внутриклеточную выживаемость.** Вдобавок к вирулентным факторам, локализованным в пределах SPI-1 и SPI-2 T3SS, у сальмонелл имеются и другие факторы, такие как фимбрии, флагеллы и системы транспорта ионов, которые играют важную роль в установлении и сохранении внутриклеточной ниши. Гены многих из этих факторов находятся в плаزمиде.

*Жгутики (флагеллы).* Связанная с флагеллами подвижность повышает инвазивность сальмонелл [44]. Структура флагелл включает базальное тело, крюк и филамент. У сальмонелл формирование жгутиков контролируют свыше 50 генов. Экспрессия этих генов организована в три уровня. На вершине иерархии находится оперон 1 класса flhDC, который необходим для экспрессии всех генов флагеллярного каскада. Ряд глобальных регуляторных факторов влияют на экспрессию flhDC. Опероны класса 2 содержат гены, кодирующие структурные белки жгутиков и несколько регуляторных белков, а также компоненты флагелла-специфического T3SS экспортного механизма. Гены оперонов 3 класса участвуют в образовании филаментов, вращении жгутиков и хемотаксисе [30]. Основным белком филаментов, флагеллин, существует в двух антигенно различных формах, кодируемых генами fliB fliC [30]. Он переносится из цитоплазмы в базальное тело посредством флагеллин-специфической T3SS-1. Там он далее полимеризуется при помощи кэп-белка FliD [30]. В то же время флагеллиновые мономеры являются мощными индукторами врожденного иммунитета [34]. FliC включает путь передачи сигнала через Toll-подобные рецепторы 5 (TLR5), что приводит к активации инфламмосомы и опосредованной каспазой-1 смерти клетки [35]. В кишечном эпителии флагеллин индуцирует воспаление, ингибируя в то же время апоптоз через TLR5.

*Плазмиды вирулентности.* Известно, что плазмиды могут переносить кластеры генов, обеспечивающих селективные преимущества своим



хозяевам, такие как вирулентность или устойчивость к антибактериальным препаратам. Очень многие штаммы сальмонелл лишены плазмид вирулентности, однако наиболее важные для здоровья людей серовары, включая *Typhimurium* и *Enteritidis* имеют такие плазмиды. Эти плазмиды несут генетический локус, содержащий гены *spvRABCD*. Два гена, *spvB* и *spvC*, кодируют главные плазмидные факторы вирулентности, связанные с сероваром *Typhimurium*. Они переносятся в клетки хозяина через T3SS-2 [31]. Другие гены, расположенные на плазмиде вирулентности, кодируют фимбрии (*refABCDI*) и резистентность к сыворотке (*traT*). Большинство вирулентных плазмид не способны к самопереносу в другие бактерии, хотя некоторые из них содержат полный комплект транспортных генов (*tra*) обеспечивающих такую возможность путем конъюгации, что приводит к повышению вирулентности штамма-реципиента. Плазмиды являются высоко консервативным генетическим образованием, что придает штаммам-носителям значительные преимущества.

**Супероксиддисмутаза.** Многие клетки хозяина продуцируют высоко реактивные дериваты кислорода в основном благодаря активности фагосомальной NADPH оксидазы (NOX2). Эти формы кислорода необходимы для уничтожения внутриклеточных патогенов. Чтобы противостоять этой активности, сальмонеллы используют супероксиддисмутазу, *SodCI*. Этот связанный с периплазмой фермент обладает устойчивостью к протеазам, что позволяет ему функционировать в суровых условиях фагосомы [38].

**Транспорт ионов.** В эукариотическом хозяине доступность железа ограничена вследствие активности железо-связывающих белков, таких как трансферин и *Ngmp 1/Slc11A1*, дивалентного металлопротонового импортера, находящегося в макрофагах, нейтрофилах и ДК [37]. Чтобы преодолеть это ограничение, сальмонеллы в ответ на нехватку железа продуцируют два сидерофора: энтеробактин и сальмохелин [36]. Сальмохелин — это гликозилированное производное энтеробактина. Эта модификация может быть важной для устойчивости к липокалину-2, противомикробному белку, который предотвращает накопление железа бактериями в инфицированном кишечном эпителии [43].

Сальмонеллы имеют три разные системы доставки магния: *SogA*, *MgtA* и *MgtB*, каждая из которых необходима для реализации вирулентности [39]. Еще один фактор вирулентности, *MgtC*, кодируется тем же самым опероном, что и *MgtB*. В то же время обеспечение магнием не обязательно для выживания сальмонелл в макрофагах и роста в лишенной магния среде [1].

Два других металлоиона, которые имеют отношение к внутриклеточному выживанию сальмонелл — калий и цинк. Высоко аффинная *ZnuABC* система транспорта  $Zn^{2+}$  необходима для роста сальмонелл в дефицитной по цинку среде.



Бактерии поддерживают относительно стабильной концентрацию внутриклеточного калия (300–500 мМ), которая необходима для выполнения многих существенных жизненных функций, включая поддержание клеточного тургора и гомеостаза, активацию цитоплазматических ферментов. Поскольку бактерии подвергаются воздействию широкого диапазона внешних концентраций калия, они используют ряд переносчиков и эффлюкс-насосов для стабилизации внутриклеточной концентрации калия. Наиболее хорошо изучены у грамотрицательных бактерий транспортные системы Trk, Kdp и Kup. Trk — это низко аффинная транспортная система переносит калий при нейтральных и щелочных значениях pH [49]. Генные продукты этого мультиединичного комплекса экспрессируют конститутивно. Kdp — высоко аффинная транспортная система, которая индуцируется при низких ( $\leq 5$  мМ) концентрациях  $K^+$  в среде. Kup-система также имеет низкий аффинитет к  $K^+$  и осуществляет его транспорт при кислых значениях среды. Trk участвует в экспрессии и секреции эффекторных белков T3SS-системы, которая кодируется в пределах SPI-1 и которая необходима для внедрения сальмонелл в клетки эпителия кишечника. Кроме того, что *trkA* (*sapG*) необходим для устойчивости к антимикробным пептидам [48]. Более того, внешний калий модулирует патогенные свойства сальмонелл путем повышения экспрессии и секреции эффекторных белков T3SS-системы и путем повышения инвазии эпителиальных клеток. Таким образом, калий активно вовлечен в патогенез сальмонеллеза, а бактерии приобретают преимущество и становятся более вирулентными при высокой концентрации калия внутри клетки и кишечной жидкости, что является обычным следствием диареи [48].

За последние 20 лет достигнут существенный прогресс в изучении взаимодействия сальмонелл с клеткой-хозяином. Патогенез сальмонеллеза осуществляется путем доставки в клетку-хозяина свыше 30 специализированных эффекторных белков через две различные секреторные системы III типа. Эти эффекторы, аранжированные в единый оркестр, воздействуют на цитоскелетон инфицированной клетки, пути переноса сигналов, мембранный транспорт и провоспалительный ответ. Это позволяет сальмонелле внедряться в нефагоцитирующие эпителиальные клетки, ДК и макрофаги, выживать и размножаться внутриклеточно, а в некоторых случаях диссеминировать, вызывая системные заболевания. Установлено, что для установления и поддержания персистирующей (подострой) инфекции в печени и селезенке требуется экспрессия не менее 118 генов (3% генома), 30% которых сосредоточены в геномных областях SPI-1 и SPI-2, лизогенных фагах и различных плаزمидов [29]. В то же время целый ряд вопросов патогенеза остается пока без ответа. Понятие деталей взаимодействия возбудителя и клетки-хозяина, ускользания патогена от эффекторов иммунной системы и выработки устойчивости к действию противомикробных средств позволит не только заполнить оста-



ющиеся пробелы, но и разработать новые, более эффективные средства воздействия на убиквитарный патоген.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Alix E., Blanc-Potard A.B.* Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor // *EMBO J.* — 2008. — V. 27. — P. 546–557.
2. *Bakowski M.A., Cirulis J.T., Brown N.F., Finlay B.B., Brummel J.F.* SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* invasion // *Cell Microbiol.* — 2007. — V. 9. — P. 2839–2855.
3. *Bearson S.M., Bearson B.L., Rasmussen M.A.* Identification of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* genes important for survival in the swine gastric environment // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — V. 72. — P. 2829–2836.
4. *Beuzone C.R., Salcedo S.P., Holden D.W.* Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* *sifA* mutant strain in the cytosol of different cell lines // *Microbiol.* — 2002. — V. 148. — P. 2705–2715.
5. *Boyle E.C., Brown, B.B. N.F. Finlay* *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* effectors SopE/SopE2, SopB and SipA disrupt tight junction structure and function // *Cell Microbiol.* — 2006. — V. 8. — P. 1946–1957.
6. *Brawn L.C., Hayward R.D., Koronakis V.* *Salmonella* SPI-1 effector SipA persist after entry and cooperates with SPI-2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication // *Cell Host Microbe.* — 2007. — V. 1. — P. 63–75.
7. *Browne S.H., Hasegawa P., Okamoto S., Fiere J., Guiney D.G.* Identification of *Salmonella* SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated cytotoxicity in macrophages and virulence in mice // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2008. — V. 52. — P. 194–201.
8. *Darwin K.H., Miller V.L.* Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1999. — V. 12. — P. 405–428.
9. *Deiwick J., Salcedo S.P., Boucrot E. et al.* The translocated *Salmonella* effector proteins SseF and SseG interact and are required to establish an intracellular replication niche // *Infect. Immun.* — 2006. — V. 74. — P. 6965–6972.
10. *Diao J., Zhang Y., Huibregtse J.M., Zhou D., Chen J.* Crystal structure of SopA, a *Salmonella* effector protein mimicking a eukaryotic ubiquitin ligase // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2008. — V. 15. — P. 65–70.
11. *Drecktrah D., Levine-Wilkinson S., Dam T. et al.* Dynamic behavior of *Salmonella*-induced membrane tubules in epithelial cells // *Traffic.* — 2008. — V. 9. — P. 2117–2129.
12. *Galan J.E., Wolf-Watz H.* Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines // *Nature.* — 2006. — V. 444. — P. 567–573.



13. Garmendia J., Beuzon C.R., Ruiz-Albert J., Holden D.W. The role of SsrA-SsrB and OmpR-EnvZ in the regulation of genes encoding the *Salmonella typhimurium* SPI-2 type III secretion system // Microbiol. — 2003. — V. 149. — P. 2385–2396.

14. Gerlach R.G., Jackel D., Stecher B. et al. *Salmonella* pathogenicity island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesion and the cognate type 1 secretion system // Cell Microbiol. — 2007. — V. 9. — P. 1834–1850.

15. Guignot J., Caron E., Beuzon C. et al. Microtubule motors control membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles // J. Cell Sci. — 2004. — V. 117. — P. 1033–1045.

16. Guo A., Lasaro M. A., Sirard J. C. et al. Adhesin-dependent binding and uptake of *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* by dendritic cells // Microbiology. — 2007. — V. 153. — P. 1059–1069.

17. Hayward R. D., Koronakis V. Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins // Trends Cell Biol. — 2002. — 12. — P. 15–20.

18. Henry T., Couillault C., Rockenfeller P. et al. The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinase-1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — V. 103. — P. 13497–13502.

19. Humphreys D., Hume P. J., Koronakis V. The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche // Cell Host Microbe. — 2009. — V. 5. — P. 225–233.

20. Humphries A. D., Townsend S. M., Kingsley R. A. et al. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars // FEMS Microbiol. Lett. — 2001. — V. 201. — P. 121–125.

21. de Jong H., Ekdahl M. O. The comparative burden of salmonellosis in the European Union member states, associated and candidate countries // BMC Public Health. — 2006. — V. 6. — P. 4–12.

22. Kage H., Takaya A., Ohya M., Yamamoto T. Coordinated regulation of expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 and flagellar type III secretion systems by ATP-dependent ClpXP protease // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190. — P. 2470–2478.

23. Knodler L. A., Steel-Mortimer O. The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/ lysosome distribution to mediate Sif extension // Mol. Biol. Cell. — 2005. — V. 16. — P. 4108–4123.

24. Kuhle V., Abrahams G. L., Hensel M. Intracellular *Salmonella enteric* redirect exocytic processes in a SPI-2-dependent manner // Traffic. — 2006. — V. 7. — P. 716–730.

25. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response // Biochem. J. — 2009. — V. 420. — P. 1–16.

26. Kubori T., Sukhan A., Aizawa S.-I., and Galón J. E. Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella*



*typhimurium* type III protein secretion system. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — V. 97(18). — P. 10225–10230.

27. Layton A. N., Galyov E. E. *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications // Expert Re. Mol. Med. — 2007. — V. 9. — P. 1–17.

28. Liao A. P., Petrof E. O., Kuppireddi S. et al. *Salmonella* type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells // PLoS ONE. — 2008. — V. 3. — e2369.

29. Lawley T. D., Bouley D. M., Hoy Y. E. et al. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota // Infect. Immun. — 2008. — V. 76. — P. 403–416.

30. Macnab R. M. Type III flagellar protein export and flagella assembly // Biochem. Biophys. Acta. — 2004. — V. 1694. — P. 207–217.

31. Mazurkiewicz P., Thomas J., Thompson J. A. et al. SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases // Mol. Microbiol. — 2008. — V. 67. — P. 1371–1383.

32. McGhie E. J., Brawn L. C., Hume P. J. et al. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host // Curr. Opin. Microbiol. — 2009. — V. 12. — P. 117–124.

33. McGhie E. J., Hayward R. D., Koronakis V. Control of actin turnover by a *Salmonella* invasion protein // Mol. Cell. — 2004. — V. 13. — P. 497–510.

34. Miao E. A., Alpuche-Aranda C. M., Dors M. et al. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of IL-1 $\beta$  via Ipaf // Nat. Immunol. — 2006. — V. 7. — P. 569–575.

35. Miao E. A., Andersen-Nissen E., Warren S. E., Aderem A. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system // Semin. Immunopathol. — 2007. — V. 29. — P. 275–288.

36. Muller S. I., Valdebenito M., Hantke K. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella* // Biometals. — 2009. — V. 22. — P. 691–695.

37. Nairz M., Fritsche G., Crouch M. L. et al. Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition // Cell Microbiol. — 2009. — V. 11. — P. 1365–1381.

38. Pacello F., Ceci P., Ammendola S. et al. Periplasmic Cu, Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps occur in protecting *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* from extracellular reactive oxygen species // Biochim. Biophys. Acta. — 2008. — V. 1780. — P. 226–232.

39. Papp-Wallace K. M., Nartea M., Kehres D. G. et al. The CorA Mg<sup>2+</sup> channel is required for the virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190. — P. 6517–6523.





40. Patel G. C., Galan G. E. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella* – all in the name of entry // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – V. 8. – P. 10–15.

41. Patel G. C., Galan G. E. Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions // J. Cell Biol. – 2006. – V. 175. – P. 453–463.

42. Poh J., Odendall C., Spanos A. et al. Stec C is a *Salmonella* kinase required for SPI-2 dependent F-actin remodeling // Cell Microbiol. – 2008. – V. 10. – P. 20–30.

43. Raffatellu M., George M. D., Akiyama Y. et al. Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* for growth and survival in the inflamed intestine // Cell Host Microbe. – 2009. – V. 5. – P. 476–486.

44. Salcedo S. P., Holden D. W. SseG, a virulence protein that targets *Salmonella* to the Golgi network // EMBO J. – 2003. – V. 22. – P. 5003–5014.

45. Salcedo S. P., Noursadeghi M., Cohen J., Holden D. W. Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages in vivo // Cell. Microbiol. – 2001. – V. 3. – P. 587–597.

46. Schmitt C. K., Ikeda J. S., Darnell S. C. et al. Absence of all components of the flagella export and synthesis machinery differentially alters virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis // Infect. Immun. – 2001. – V. 69. – P. 5619–5625.

47. Steel-Mortimer O. The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the time // Curr. Opin. Microbiol. – 2008. – V. 11. – P. 38–45.

48. Su J., Gong H., Lai J., Main A., Lu S. The potassium transporter Trk and external potassium modulate *Salmonella enterica* protein secretion and virulence // Infect. Immun. – 2009. – V. 77. – P. 667–675.

49. Vought K. J., Tatini S. R. *Salmonella enteritidis* contamination of ice cream associated with a 1994 multistate outbreak // J. Food Prot. – 1998. – V. 61. – P. 5–10.

50. Wasylnka J. A., Bakowski M. A., Szeto J. et al. Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 2722–2735.



А.Г. Дьяченко<sup>1</sup>, А.А. Дем'янова<sup>1</sup>, І.М. Балута<sup>2</sup>, І.Ю. Кучма<sup>2</sup>,  
В.В. Леїзин<sup>2</sup>, А.Ю. Волянський<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сумський державний університет, вул. Р. Корсакова, 2, Суми, 40007, Україна,  
e-mail: ag\_dyachenko@list.ru

<sup>2</sup>ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова АМН України»,  
вул. Пушкінська, 14, Харків, 61057, Україна, тел.: (057) 717-98-67

## ФАКТОРИ ВІРУЛЕНТНОСТІ САЛЬМОНЕЛ І ПАТОГЕНЕЗ САЛЬМОНЕЛЬОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

### Реферат

Проведено аналіз сучасних літературних даних щодо механізмів розвитку обмеженої та системної сальмонельозних інфекцій. Чудова здатність сальмонел вже через кілька хвилин після поглинання інфікованої їжі проникати в фагоцити та ентероцити і далі по всьому організму забезпечується набором із кількох десятків ефекторів (усього бактеріальний геном містить близько 4500 генів), чия координована експресія сприяє внутрішньоклітинному виживанню та реплікації бактерій. Основна частина ефекторів пов'язана з островами патогенності сальмонел, SPI-1 і SPI-2. Крім того, багато штамів сальмонел містять у складі геному інші локуси патогенності, які контролюють бактеріальну адгезію, інвазію, інфекцію, опірність до протимікробних засобів. Серйозна небезпека, якою є сальмонельоз, стимулює подальше його вивчення та вдосконалення інфраструктури охорони здоров'я суспільства.

Ключові слова: сальмонельоз, *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, *Salmonella enterica* серовар *Enteritidis*, патогенез.



A.G. Dyachenko<sup>1</sup>, A.A. Demyanova<sup>1</sup>, I.M. Baluta<sup>2</sup>, I.Yu. Kuchma<sup>2</sup>,  
V.V.Leisin<sup>2</sup>, A.Yu. Voliansky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sumy State University, School of Medicine, 2, R. -Korsakov str., Sumy, 40007,  
Ukraine, e-mail: ag\_dyachenko@list.ru

<sup>2</sup>Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, AMS Ukraine, 14,  
Pushkinska str., Kharkiv, 61057, Ukraine tel.: (057) 717-98-67

## THE FACTORS OF SALMONELLA VIRULENCY AND PATHOGENESIS OF THE SALMONELLA INFECTION

### Summary

Salmonella pathogenesis relies upon the delivery of over thirty specialized effector proteins into the host cell via two distinct type III secretion systems. These effectors act in concert to subvert the host cell cytoskeleton, signal transduction pathways, membrane trafficking and proinflammatory responses. This allows Salmonella to invade non-phagocytic epithelial cells, establish and maintain an intracellular replicative niche and, in some cases, disseminate to cause systemic diseases. This review focuses on the action of the effectors on their host cell targets during each stage of Salmonella infection.

**Key words :** salmonellosis, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*, pathogenesis.



УДК 579.26

Е.В. Мошинец<sup>1</sup>, Ж. Бруне<sup>2</sup>, С.Е. Рымарь<sup>1</sup>, И.В. Косаковская<sup>3</sup>,  
Г. Поттерс<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
ул. ак. Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680,  
тел.: +380979186618; e-mail: moshynets@gmail.com

<sup>2</sup>Университет Парижа Эст Критейл, Париж, Франция, 61,  
проспект Генерала де Голля, 94010, Франция  
e-mail: judicaelle.brunet@gmail.com

<sup>3</sup>Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,  
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01601, Украина,  
тел.: +380505039195; e-mail: science@botany.kiev.ua

<sup>4</sup>Университет г. Антверпена, Бельгия, В-2020, Антверпен, вул. Грёненборген, 171,  
тел.: +32496410684;  
e-mail: geert.potters@ua.ac.be

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТЕНИЙ БАМБУКА (*PHYLLOSTACHYS* И *FARGESIA*)

Эндофитные бактерии из растений бамбуков (подсемейство *Vambusoideae*) выделены и идентифицированы путём анализа нуклеотидного состава фрагментов *rrs*-генов (генов 16S рДНК), амплифицируемых как из тканей растений, так и из выделенных культур эндофитов. Выделено 74 штамма бактерий, из которых 47 отнесены к семействам *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Raenibacillaceae*, *Microbacteriaceae* родам *Agrobacterium/Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*.

Ключевые слова: эндофитные бактерии, бамбук, идентификация, 16S рДНК.

Многие представители подсемейства *Vambusoideae* (Бамбуковые) семейства *Poaceae* (Злакоцветные) являются важными аграрными и промышленными культурами. Их древесина используется как строительный и декоративный материал, а растительная биомасса является источником получения возобновляемой энергии [1, 2]. При получении биомассы предпочтение отдаётся культурам, способным расти на загрязнённых почвах [3, 4]. Бамбук является одним из таких растений: некоторые виды бамбука способны расти на закисленных грунтах с



pH 3 (неопубликованные данные), на грунтах, загрязнённых тяжелыми металлами. По способности к поглощению тяжелых металлов бамбук опережает такие популярные в фиторемедиационных мероприятиях культуры как тополь и ива [5, 6]. Поэтому бамбук рассматривают как растение-кандидат для получения биомассы и очистки грунтов от тяжелых металлов в условиях климата севера Европы. В результате продолжительных исследований на полях Ирландии и Фландрии (Бельгия) доказана возможность успешного культивирования растений бамбука *Phyllostachys vivax*, *P. aureosulcata*, *P. praecox*, *P. humilis*, *P. decora*, *P. bissetti*, *P. aurea* в условиях умеренного климата [3].

Вся фитосферная микробиота оказывает существенное влияние на устойчивость растений к неблагоприятным внешним факторам и на развитие их фиторемедиационных свойств [7, 8, 9]. Однако, эндофитная микробиота, находясь в особенно тесных структурно-функциональных взаимоотношениях с растительным организмом, принимает особое участие в адаптации растений к неблагоприятным факторам [10–13]. Эндофиты существенно влияют на устойчивость растений к неблагоприятным воздействиям и способны к некоторой модификации вредных факторов окружающей среды. Показано, что при повышении концентрации загрязнителя происходит активация процесса роста эндофитов [14]. Недавно открытый эндофитный микроорганизм *Methylobacterium populum* sp. nov., штамм VJ001, участвует в разложении ряда органических загрязнителей, а именно 2,4,6-тринитротолуина, гексагидро-1,3,5-тринитро-1,3,5-триазина и гексагидро-1,3,5-гексанитро-1,3,5-триазина [15]. Среди эндофитов тополя обнаружены штаммы, способные нейтрализовать бензол, толуол, этилбензол и ксилол и трихлорэтилен [16].

Поскольку метаболическая активность эндофитов является важным фактором процесса очистки загрязнённых почв, а эндофитные сообщества бамбука, среди которых есть как культивируемые, так и некультивируемые микроорганизмы [17, 18], практически не исследовались, целью нашей работы была идентификация культивируемых и некультивируемых эндофитных бактерий бамбука и получение коллекции чистых культур этих бактерий.

### Материалы и методы

В работе использовались растения бамбука *P. humilis*, *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *Fargesia rufa*, полученные методом микроразмножения на базе фирмы Origins Plant NV, г. Рийкеворсел (Rijkevorsel), Бельгия. Для экспериментов использовались как растения, выращенные *in vitro*, так и растения, полученные в результате культивирования *in vitro* в специальном субстрате, разработанном и изготовленном фирмой Bamboo Select<sup>®</sup>, Бельгия (<http://eng.bambooselect.com/>). Стерилизацию надземных и подземных поверхностей растений, выращиваемых в нестерильных усло-



виях в субстрате, осуществляли согласно схеме: 3 мин в 70% этаноле, 5 мин в 12% растворе гиперхлорита натрия, 1 мин в 70% этаноле [19].

Для выделения эндофитов из надземных тканей растений, выращиваемых в субстрате, каждый кусочек растения с простерилизованными поверхностями покровных тканей помещали в 5 мл питательной среды: *глюкозный бульон* (5 г пептона С, 2 г гидролизованного пептона № 3, 3 г пептона G, 3 г говяжьего экстракта, 5 г глюкозы и 5 г NaCl на 1 литр водопроводной воды) и *колумбийский бульон* (12 г пептона С, 5 г пептона, 3 г дрожжевого экстракта, 3 г говяжьего экстракта, 1 г крахмала пшеницы и 5 г NaCl на 1 литр водопроводной воды). Инкубацию проводили при 28 °С в течение 48 часов, периодически встряхивая, после чего выращенные в питательных средах микроорганизмы переносили на соответствующие агаризованные питательные среды, содержащие 1,5% агара. Инкубация на агаризованных средах продолжалась 24 часа при 28 °С. Для последующего молекулярно-генетического анализа отобранные отдельные колонии культивировали на глюкозном и колумбийском бульонах.

Для выделения бактерий из подземных органов бамбука, использовали растения, выращенные в субстрате. Подземные части промывали в дистиллированной воде для удаления частиц субстрата и стерилизовали в соответствии с протоколом [19]. Растительную ткань (1 г) измельчали, перетирая в 10 мл натрий-фосфатного буфера (рН 7,4). Полученную суспензию разводили в 10 и 100 раз. По 100 мкл из каждого разведения культивировали на агаризованном LB и глюкозном агаре. Инкубацию продолжали от 24 до 48 ч при температуре 28 °С. Для выделения ДНК бактерии из отдельных колоний выращивали в соответствующих жидких средах.

Для выделения бактерий из тканей растений бамбука, выращенных *in vitro*, 0,5 г биомассы целых растений, выращенных *in vitro*, растирали в 5 мл натрий-фосфатного буфера. Полученную гомогенную суспензию разводили в 10 и 100 раз. Пробы объемом 100 мкл из каждого разведения наносили на агаризованные среды LB и глюкозный агар. Инкубацию проводили от 24 до 72 ч при температуре 28 °С. Для последующего молекулярно-генетического анализа отдельные колонии пересеивали в соответствующие жидкие питательные среды. Выделенные изоляты бактерий сохраняли в виде ночной культуры с добавлением до 20% глицерина при температуре -70 °С.

Экстракцию ДНК из клеток бактерий, полученных из тканей растений, проводили щелочным методом [20].

Для экстракции ДНК из тканей бамбука каждый образец, весом 0,25 г замораживали в жидком азоте. Замороженные ткани гомогенизировали в 1 мл метанола с использованием набора для гомогенизации Magnalyser (Roche, Германия). Выделение ДНК и депротеинизацию проводили в соответствии со стандартной методикой [21]. Концентрацию ДНК определяли с помощью прибора NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific Inc., США).



Ген, кодирующий 16S рДНК, амплифицировали с использованием универсальных прямого праймера 25F (5'-AAC TCA AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3'), обратного праймера 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') [19] и набора для ПЦР (Roche, Германия). ПЦР проводили согласно инструкции производителя набора. Условия реакции были следующими: денатурация в течение 10 мин при 94 °С; 35 циклов в режиме: 45 с при 94 °С, 45 с при 62 °С, 1 мин при 72 °С; 10 мин при 72 °С. Продукт визуализировали с помощью гель-электрофореза в 0,8% агарозном геле согласно стандартной методике [20]. Клонирование продуктов ПЦР проводили, используя рGEM T<sup>®</sup> Easy вектор (Promega, USA) согласно инструкции производителя. Выделение плазмидной ДНК осуществляли с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Roche, Германия) согласно инструкции производителя. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР продуктов проводили, используя специфические праймеры T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') и SP6 (5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3') в секвенаторе Applied Biosystems 3730 (США). Анализ нуклеотидной последовательности 16S рДНК фрагментов проводили используя BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) и базу данных NCBI (США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [22].

### Результаты исследований и их обсуждение

Для выявления и определения эндофитов растений бамбука использовали два подхода. Первый заключался в выделении культивируемых эндофитов из тканей надземных и подземных органов растений, а также из тканей молодых растений, выращенных в условиях *in vitro*. Второй — в выделении тотальной ДНК из образцов тканей растений и её последующий анализ на наличие бактериального гена *rrs*.

В результате культивирования тканей *P. humilis* и *F. rufa* на глюкозном агаре были получены мелкие белые колонии. При культивировании на колумбийском агаре выросли белые и желтые колонии микроорганизмов из *P. humilis*. Выделение ДНК проводили из суточных культур, полученных после пересева колоний, используя ДНК как матрицу для ПЦР, амплифицировали фрагмент 16S рДНК, нуклеотидный состав которого в дальнейшем анализировали с целью определения таксономического положения микроорганизмов. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Таким образом, из надземной части бамбуков *P. humilis* и *F. rufa* посредством культивирования на искусственных питательных средах удалось выделить культуры бактерий отнесенные к видам эндофитов, *Bacillus amyloliquefaciens* и *B. subtilis*. Из тканей бамбука *P. humilis* также удалось выделить эндофитную бактерию *B. mojavensis*, относящуюся к тому же семейству. Виды рода *Bacillus* являются довольно распространенными эндофитами и описаны для многих растений [23, 24]. Они выполняют важную фитопротекторную функцию и повышают устойчивость к фитопатогенным грибам [25].



Таблица 1  
Культивируемые эндофиты надземной части бамбуков *P. humilis* и *F. ruфа*

Table 1  
Cultivated endophytes of the aerial parts of bamboo plants *P. humilis* and *F. ruфа*

Вид бамбука	Наиболее близкородственный микроорганизм	Гомология нуклеотидного состава ПЦР фрагментов 16S рДНК, %
<i>F. ruфа</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	100%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	100%
<i>P. humilis</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	100%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	100%
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	99%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	99%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	100%
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (XE6676)	98%
	<i>Bacillus subtilis</i> (XB7767)	98%
	<i>Bacillus mojavensis</i>	98%

В следующей серии экспериментов было проведено выделение тотальной ДНК из тканей надземной части молодых бамбуков *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *P. humilis*, выращенных в субстрате. В препаратах общей ДНК, выделенной из растительных тканей, наряду с ДНК бамбука обнаружена ДНК эндофитных бактерий. Результаты анализа нуклеотидной последовательности фрагментов 16S рДНК, амплифицированных с использованием соответствующих праймеров с ДНК тканей бамбуков *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *P. humilis*. представлены в таблице 2.

В результате анализа ПЦР-фрагментов *rrs* генов у бамбуков *P. atrovaginata*, *P. nigra* и *P. humilis* выявлены эндофитные бактерии семейства *Mycobacteriaceae*, отдела *Actinobacteria*. В тканях *P. atrovaginata* обнаружены бактерии *Mycobacterium palustre* и *M. lentiflavum*; в тканях *P. nigra* — бактерии *M. avium* complex и *M. arosiense*; в тканях *P. humilis* — несколько клонов некультивируемых бактерий. Во всех экспериментах выявлены фрагменты митохондриальной и хлоропластной ДНК.

Таким образом, при использовании метода лабораторного культивирования и молекулярно-генетического метода для изучения состава эндофитных бактерий надземной части растений *P. humilis*, выявлены разные виды микроорганизмов. С данным эффектом сталкивались и многие другие исследователи [26–29].





Таблица 2  
Эндофитные бактерии надземной части бамбуков *P. atrovaginata*,  
*P. nigra* и *P. humilis*

Table 2  
Endophytic bacteria of the aerial parts of bamboo plants *P. atrovaginata*,  
*P. nigra* and *P. humilis*

Вид бамбука	Наиболее близкородственный микроорганизм	Гомология нуклеотидного состава ПЦР фрагментов 16S рДНК, %
<i>P. atrovaginata</i>	<i>Mycobacterium palustre</i> (E846)	99%
	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> (UN-106)	99%
	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> (GR-2466)	99%
<i>P. nigra</i>	<i>Mycobacterium avium complex</i> (5356591)	99%
	<i>Mycobacterium arosiense</i> (T1919)	99%
<i>P. humilis</i>	Uncultured bacterium clone nbt35d06	99%
	Uncultured bacterium clone nbt36d12	99%
	Uncultured bacterium clone p8k02ok	99%

Одной из причин этого может быть тот факт, что исходное количество клеток бацилл на фоне других бактерий в растении было достаточно низким, что снизило возможности их идентификации молекулярно-генетическим методом, но количество клеток существенно увеличивалось в селективных условиях — в культуре [30, 31]. Некультивируемые эндофиты *Mycobacterium* spp. были найдены и у других растений порядка Злакоцветные (*Poales*) [29], в то время как среди культивируемой микробиоты микобактерии не обнаруживались [32]. В целом, микобактерии являются сапрофитами, комменсалами или симбионтами животных, человека и простейших. Ряд эндофитных *Mycobacterium* spp. найден в корнях риса [33], пшеницы [27] и торфяного мха [34]. В то же время микобактерии очень редко выступают эндофитами надземных частей. Нами найдено только две работы, в которых описываются эндофитные микобактерии. В обоих случаях, как и в нашей работе, микобактерии выделяли из растений, полученных методом микроразмножения, или из тканевых культур [29, 35].

Кроме идентифицированных некультивируемых эндофитов, нами были обнаружены и неидентифицированные некультивируемые бактерии. Неидентифицированные эндофиты у бамбука были обнаружены впервые, что, впрочем, скорее связано с малой изученностью микроби-

оты бамбуков. Некультивируемые эндофиты обнаружены у злаков [28], картофеля [36] и др.

При анализе эндофитов подземной части бамбука *P. humilis* гомогенаты тканей высевали на питательные среды — глюкозный агар и агаризованную LB. В ходе исследования эндофитов подземной части бамбука *P. humilis* выделено 61 культуру микроорганизмов, отличающихся по окраске колоний и морфологическими особенностями клеток. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов 16S рДНК изолированных бактерий представлены в таблице 3.

Таблица 3  
Культивируемые эндофиты подземной части бамбука *P. humilis*

Table 3  
Cultivated rhizome endophytes of bamboo plant *P. humilis*

Номер культуры	Наиболее близкородственный микроорганизм	Гомология нуклеотидного состава ПЦР фрагментов 16S рДНК, %
2, 5, 12	<i>Microbacterium laevaniformans</i> (EU545414)	99%
24, 25	<i>Paenibacillus chondroitinus</i> (EU290158)	99%
8, 35, 36, 44, 53	<i>Paenibacillus</i> sp.	99%
9, 14, 23	<i>Leifsonia</i> sp.	98%
11, 26	<i>Burkholderia</i> sp. ( <i>B. fungorum</i> HM113360)	99%(98%)
10	<i>Burkholderia cepacia</i> complex	99%
27	<i>Agrobacterium/Rhizobium</i>	100%
102	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> (FJ483524)	100%
107	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (EU159479)	99%

Анализ эндофитных бактерий, культивируемых из подземной части бамбука *P. humilis*, выявил большее, по сравнению с надземной частью, разнообразие микроорганизмов. Были выделены и определены культуры *Microbacterium laevaniformans* и *Leifsonia* sp., принадлежащие семейству *Microbacteriaceae* отдела *Actinobacteria*; *Paenibacillus* sp. и *Paenibacillus chondroitinus*, относящиеся к семейству *Paenibacillaceae* отдела *Firmicutes*; а также несколько изолятов, относящихся к отделу *Proteobacteria*, один изолят *Agrobacterium/Rhizobium*, принадлежащий *Alphaproteobacteria*, два изолята — *Pseudomonas fuscovaginae* и *Pseudomonas fluorescens*, относящихся к *Gamma*proteobacteria, и два



изолята — *Burkholderia cepacia* complex и *Burkholderia* sp., относящихся к *Betaproteobacteria*.

Исследование молодых тканей бамбуков, выращенных в условиях *in vitro*, показало, что культуры, полученные из гомогената тканей *P. atrovaginata*, соответствуют *Acinetobacter calcoaceticus*, в то время как культуры, полученные из гомогената тканей *P. humilis* гомологичны *Achromobacter* sp. Обе выделенные бактерии относятся к отделу *Proteobacteria*. *A. calcoaceticus* принадлежит к *Gammaproteobacteria*, а изолят *Achromobacter* sp. — к *Betaproteobacteria*. Такое снижение разнообразия эндофитной микробиоты у *in vitro* растений по сравнению с растениями, растущими в субстрате, по-видимому, является следствием того, что опытный растительный материал многократно клонировался и находился при этом в стерильных условиях [36].

Таким образом, был проанализирован состав популяции эндофитных микроорганизмов нескольких представителей подсемейства *Bambusoideae* (Табл. 4).

Среди эндофитов надземной части растений идентифицированы исключительно грамположительные бактерии, относящиеся к семействам *Bacillaceae* и *Mycobacteriaceae*, тогда как в подземной части и в тканях, выращенных *in vitro*, обнаружены как грамположительные, принадлежащие к семействам *Microbacteriaceae* и *Paenibacillaceae*, так и грамотрицательные бактерии, принадлежащие к группам *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria* филума *Proteobacteria*. Установлено, что грамотрицательные эндофиты преобладали в подземной части растений.

Полученные результаты совпадают с данными исследований других авторов. Так, эндофиты подземной части *Phyllostachys edulis* и *Zea mays* L. более разнообразны по сравнению с эндофитами надземной части [19, 23], а эндофиты растений, выращенных в субстрате, многообразнее эндофитов *in vitro* растений [29, 36]. Представители родов *Burkholderia* и *Agrobacterium* обнаружены среди эндофитов подземной части *P. edulis*, *Z. mays* L. и изученного нами бамбука *P. humilis* [19, 23]. Аналогичные результаты получены при изучении эндофитов надземной части растений. Так, среди эндофлоры надземной части бамбуков *P. humilis* и *F. rufa*, как и среди эндофитов многих растений, в том числе и злака — кукурузы, выявлены представители семейств *Bacillaceae* [37]. Среди эндофитов надземной части бамбуков найдены бактерии семейства *Mycobacteriaceae*. *Mycobacterium* spp. были обнаружены среди эндофитов надземной части растений и у других злаков [29]. Эндофит *Acinetobacter calcoaceticus* нами обнаружен в тканях *P. atrovaginata*, выращенных *in vitro*, в то время как в кукурузе *Acinetobacter* sp. локализован в стеблях [19].

Таблица 4

Эндофитные бактерии представителей подсемейства *Bambusoideae*

Table 4

Endophytic bacteria of *Bambusoideae* subfamily

Растительные ткани	Филогенетическая группа	Род	Вид	Вид бамбука
Стебель	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>P. humilis</i>
			<i>B. subtilis</i>	<i>F. rufo</i>
			<i>B. mojavensis</i>	<i>P. humilis</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. palustre</i>	<i>P. atrovaginata</i>
			<i>M. lentiflavum</i>	
			<i>M. avium complex</i>	<i>P. nigra</i>
			<i>M. arosiense</i>	
Uncultured bacterium clones				<i>P. humilis</i>
Корень, ризомы	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Agrobacterium/Rhizobium</i>	<i>Agrobacterium/Rhizobium sp.</i>	<i>P. humilis</i>
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia sp.</i>	
			<i>B. cepacia complex</i>	
	<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. fuscovaginae</i>	
			<i>P. fluorescens</i>	
	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus sp.</i>	
<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>M. laevaniformans</i>		
	<i>Leifsonia</i>	<i>Leifsonia sp.</i>		
In vitro	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter sp.</i>	<i>P. humilis</i>
	<i>Gammaaproteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>P. atrovaginata</i>

Полученные результаты продемонстрировали, что ткани исследованных видов бамбука, произрастающие *in vitro* и в субстратах для выращивания растений, представляют собой фитонишу, колонизируемую эндофитными бактериями. Определено 18 видов бактерий, колонизирующих эндосферу бамбуков, что пополнило список идентифицированных ранее эндофитов бамбуков [19]. Впервые определены как эндофиты бамбуков бактерии *Agrobacterium/Rhizobium sp.*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *M. palustre*, *M. lentiflavum*, *M. avium complex*, *M. arosiense*, *P. fuscovaginae*, *P. fluorescens*, *P. chondroitinus*, *M. laevaniformans*, *Achromobacter sp.* и *A. calcoaceticus*. Эндофиты надземной части представлены исключительно грамположительными бактериями, тогда как среди микробиоты подземной части только 44,4% эндофитов принадлежали к грамположительным, а 55,6% — к грамотрицательным



бактериям. Эндифиты, выявленные в растениях *in vitro*, представлены грамотрицательными бактериями.

Показано, что эндифитная микробиота подземной части растений многообразнее микробиоты надземных частей, а микробиота растений, растущих в субстрате многообразнее микробиоты растений, растущих в условиях *in vitro*. Кроме культивируемых эндифитов, в растениях бамбука найдены и некультивируемые бактерии. Анализ полученных экспериментальных данных и данных литературы показал, что ткани бамбуков, выращенных в разных климатических условиях, а именно в условиях естественного местообитания в Китае и в природных условиях Бельгии, колонизируются теми же представителями бактерий: *Paenibacillaceae* sp., *Bacillaceae* sp., *Pseudomonas* sp., *Microbacteriaceae* sp., *Acinetobacter* sp. и *B. ceracia* complex.

Дальнейшее изучение свойств выделенных эндифитных бактерий бамбука может способствовать решению ряда фундаментальных и прикладных проблем в области экологии, цитологии и биотехнологии растений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Scurlock J., Dayton D., Hames B.* Bamboo: an overlooked biomass resource? // *Biomass and Bioenergy*. – 2000. – 19. – P. 229–244.
2. *Potters G., Schoeters G., Tytgat T., Horvath G., Ludeche C., Cool P., Lenaerts S., Appels L., Dewil R.* Pyrolysis kinetics of bamboo material // *Renewables from Biomass and Waste*. – 2010. – P. 391–396.
3. *Potters G., Brems A., Valcke R., Dewil R., D'Haese L., Samson R., Gielis J.* Energy crops in Western Europe: is bamboo an acceptable alternative? // *VIII World Bamboo Congress Proceedings*. – 2009 – 3. – P. 22–34.
4. *Aslibekian O., Moles R.* Environmental risk assessment of metals contaminated soils at silvermines abandoned mine site, Co Tipperary, Ireland // *Environmental Geochemistry and Health*. – 2003. – 25, № 2. – P. 247–266.
5. *Leigh M. B., Fletcher J. S., Fu X., Schmitz F. J.* Root turnover: an important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – 36. – P. 1579–1583.
6. *White J. C., Wang X., Gent M. P., Iannucci-Berger W., Eitzer B. D., Schultes N. P., Arienzo M., Mattina M. I.* Subspecies-level variation in the phytoextraction of weathered p,p'-DDE by *Cucumbita pepo* // *Environ. Sci. Technol.* – 2003. – 37. – P. 4368–4373.
7. *Newman L. A., Reynolds C. M.* Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants // *Trends in Biotechnology*. – 2005. – 23, № 1. – P. 6–9.



8. Козировська Н. О. Взаємодія ендоефітних бактерій з рослиною на клітинному та молекулярному рівнях // *Biopolymers and Cell*. — 1998. — 14, № 6. — С. 488—499.

9. Thomas P., Kumari S., Swarna G. K., Prakash D. P., Dinesh M. R. Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya // *Cell Biology and Morphogenesis*. — 2007. — 26. — P. 1491—1499.

10. Pirttilä A. M., Podolich O., Koskimäki J. J., Hohtola E., Hohtola A. Role of origin and endophyte infection in browning of bud-derived tissue cultures of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2008. — 95, № 1. — P. 47—55.

11. Compant S., Clement C., Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization // *Soil Biology & Biochemistry* — 2010. — 42. — P. 669—678.

12. Siciliano S. D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L. G., Banks M. K., Schwab P., Lee K., Greer C. W. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — 67. — P. 2469—2475.

13. Van Aken B., Yoon J. M., Schnoor J. L. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides/nigra* DN34) // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — 70. — P. 508—517.

14. Moore P. F., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C. D., Moore E. R. B. Endophytic bacterial diversity in Poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation // *Sys. App. Microbiol.* — 2006. — 29. — P. 539—556.

15. Vervaeke P., Luysaert S., Mertens J., Meers E., Teck F. M. G., Kust N. Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial // *Environ. Poll.* — 2003. — 126. — P. 275—282.

16. Laureysens I., Temmerman L. De, Hastir T., Van Gysel M., Ceulemans R. Clonal variation in heavy metal accumulation and biomass production in a polar coppice culture. II. Vertical distribution and phytoextraction potential // *Environ. Poll.* — 2005. — 133. — P. 541—551.

17. Thomas P. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissues cultures // *Current Science*. — 2004. — 87, № 1. — P. 67—72.

18. Thomas P., Swarna G. K., Patil P., Rawl R. D. Ubiquitous presence of normally non-culturable endophytic bacteria in field shoot-tips of banana and their gradual activation to quiescent cultivable form in tissue cultures // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2008. — 93, № 1. — P. 39—54.



19. Han J., Xia D., Li L., Sun L., Yang K., Zhang L. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) // *Microbial Ecology*. — 2009. — 58. — P. 363–373.

20. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning — a laboratory manual*. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

21. Khanuja S. P. S., Shasany A. K., Darokar M. P., Kumar S. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils // *Plant Molecular Biology Reporter*. — 1999. — 17. — P. 1–7.

22. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool // *Journal of Molecular Biology*. — 1990. — 215. — P. 403–410.

23. Melnick R. L., Zidack N. K., Bailey B. A., Maximova S. N., Guiltinan M., Backmann P. A. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. From annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao // *Biological Control*. — 2008. — 46. — P. 46–56.

24. Bai Y., D'Aoust F., Smith D. L., Driscoll B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean foot nodules // *Can. J. Microbiol.* — 2002. — 48. — P. 230–238.

25. Wilhelm E., Arthofer W., Schafleitner R., Krebs B. *Bacillus subtilis* as endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) // *Plant Cell, Tissues and Organ Culture*. — 1998. — 52. — P. 105–108.

26. Sessitsch A., Reite B., Pfeifer U., Wilhem E. Cultivation independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2002. — 39. — P. 23–32.

27. Conn V. M., Franco C. M. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — 70. — P. 1787–1794.

28. Tejesvi M. V., Ruotsalainen A. L., Markkola A. M., Pirtilla A. M. *Phialocephala fortinii* is an abundant root associate of dwarf shrubs and the graminoid *Deschampsia flexuosa* along a primary succession gradient on a midboreal island: a phylogenetic analysis // *Fungal Diver.* — 2010. — 41. — P. 125–134.

29. Koskimaki J. J., Hankala E., Suorsa M., Sannakajsa N., Pirtilla A. M. Mycobacteria are hidden endophytes in the shoots of rock plant [*Pogonatherum paniceum* (Lat.) Hack.] (Poaceae) // *Environ. Microbiol. Reports*. — 2010. — 2(4). — P. 619–624.

30. Ward D. M., Bateson M. M., Weller R., Rulif-Roberts A. L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature // *Adv. Microb. Ecol.* — 1992. — 12. — P. 219–289.

31. Waner M., Amann R., Lemmer H., Schleifer K. H. Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of



culture-dependent methods for describing microbial community structure // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1993. — 59. — P. 1520–1525.

32. *White J. F.* Widespread distribution of endophytes in the Poaceae // *Plant Disease.* — 1987. — 71. — P. 340–342.

33. *Mano H., Tanaka F., Nakamura C., Kaga H., Morisaki H.* Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field // *Microbes Environ.* — 22. — P. 175–185.

34. *Katila M. L., Iivanainen E., Torkko P., Kauppinen J., Martikainen P., Vaananen P.* Isolation of potentially pathogenic mycobacteria in the Finnish environment // *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* — 1995. — 98. — P. 9–11.

35. *Laukkanen H., Soini H., Kontunen-Soppela S., Hohtola A., Viljanen M.* A mycobacterium isolated from tissues cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings // *Tree Physiol.* — 2000. — 20. — P. 915–920.

36. *Подоліч О. В., Арданов П. Є., Вознюк Т. М., Ковальчук М. В., Данильченко О. В., Лащевський В. В., Ляшенко С. А., Козировська Н. О.* Ендofітні бактерії картоплі in vitro, активовані екзогенними непатогенними бактеріями // *Biolumens and Cell.* — 2007. — 23, № 1. — С. 21–27.

37. *McInroy J. A., Klopper J. W.* Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn // *Plant and Soil.* — 1995. — 173, № 2. — P. 337–342.

**O.V. Moshynets<sup>1</sup>, J. Brunet<sup>2</sup>, S.U. Rymar<sup>1</sup>, I.V. Kosakivska<sup>3</sup>,  
G. Potters<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150, Zabolotny Str., Kyiv, Ukraine, 03680, tel.: +38 097 918 66 18; e-mail: moshynets@gmail.com

<sup>2</sup>Paris University, 61, General de Gaulle str., 94010, Créteil Cedex, France, e-mail: judicaelle.brunet@gmail.com

<sup>3</sup>Institute of Botany after M.G. Kholodny, NASU, 2, Tereshchenkivska str., Kyiv, 01601, Ukraine, tel.: +380505039195; e-mail: science@botany.kiev.ua

<sup>4</sup>University of Antwerp, 171, Groenenborgerlan, B-2020, Antwerp, Belgium, tel.: +32 49 641 06 84; e-mail: geert.potters@ua.ac.be

## **EXTRACTION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM BAMBOO PLANTS (*PHYLLOSTACHYS* AND *FARGESIA*)**

### **Summary**

Endophytic bacteria from rhizomes and culms of bamboo plants (*Bambusoideae*) have been identified by the way of DNA extraction from both plant tissues and isolated bacterial cultures and subsequent determination





of the *rrs* (16S rDNA) sequences. 74 endophytic strains have been isolated thus far, leading to the identification of 47 unique species, belonging to the families *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Paenibacillaceae* and *Microbacteriaceae* and the genera *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Achromobacter* and *Acinetobacter*.

**К е у w o r d s :** endophytes, bamboo, identification, 16S nRNK.

**О.В. Мошинець<sup>1</sup>, Ж. Бруне<sup>2</sup>, С.Ю. Римар<sup>1</sup>, І.В. Косаківська<sup>3</sup>, Г. Потерс<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
вул. ак. Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна,  
тел.: +380979186618; e-mail: moshynets@gmail.com

<sup>2</sup>Університет Парижу Ест Критейл, Париж, Франція, 61,  
проспект Генерала де Голля, 94010, Критейл, Франція  
e-mail: judicaelle.brunet@gmail.com

<sup>3</sup>Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,  
ул. Терещенківська, 2, Київ, Україна, 01601,  
тел.: +380505039195; e-mail: science@botany.kiev.ua

<sup>4</sup>Університет Антверпену, Бельгія, В-2020, Антверпен, вул. Гроненборген, 171,  
тел.: +32496410684; e-mail: geert.potters@ua.ac.be

## **ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ЕНДОФІТНИХ БАКТЕРІЙ ІЗ РОСЛИН БАМБУКА (*PHYLLOSTACHYS* І *FARGESIA*)**

### **Реферат**

Ендофітні бактерії, які колонізують тканини рослин бамбуків підродини *Vamusoideae* (Бамбукові) ізольовано та ідентифіковано шляхом аналізу нуклеотидного складу фрагментів *rrs*-генів (генів 16S рДНК), що ампліфікували як з тканин рослин, так і з виділених колоній культур ендофітів. Виділено 74 штами мікроорганізмів, із яких 47 віднесено до родин *Bacillaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Paenibacillaceae* і *Microbacteriaceae* та родів *Agrobacterium/Rhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Leifsonia*, *Achromobacter* і *Acinetobacter*.

**К л ю ч о в і с л о в а :** ендофітні бактерії, бамбук, ідентифікація, 16S рДНК.



Т.О. Филиппова, В.А. Иваница, Б.Н. Галкин, Н.С. Водзинская,  
Н.Б. Галкин, О.Ю. Зинченко, И.О. Малярчик, А.В. Никитин,  
М.Ю. Русакова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,  
Одесса, 65082, Украина, e-mail: tphilippova@ukr.net

## СОДЕРЖАНИЕ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИОФАГА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

*Изучено содержание провоспалительных – ФНО- $\alpha$  и  $\gamma$ -ИФН, и противовоспалительного – ИЛ 10 цитокинов у мышей после одно- и трехкратного введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*. Полученные результаты показали, что даже однократное введение этого препарата вызывает значительные изменения уровней изучаемых цитокинов. Содержание  $\gamma$ -ИФН в сыворотке, лимфатических узлах и селезенке повышается в 2,2–2,9 раза, а содержание ФНО- $\alpha$  – на 20–28%. После трехкратного введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus* уровни этих цитокинов, особенно  $\gamma$ -ИФН, возрастают еще больше. Его содержание в сыворотке и лимфоидных органах в 8–10 раз превышает контрольные значения. Содержание ФНО- $\alpha$  повышается на 50–60%. Содержание ИЛ 10, напротив, снижается и после трехкратного введения этого препарата составляет примерно половину от исходного.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а*: бактериофаг *Staphylococcus aureus*, содержание про- и противовоспалительных цитокинов, фактор некроза опухолей альфа (ФНО- $\alpha$ ), гамма интерферон ( $\gamma$ -ИФН), интерлейкин 10 (ИЛ 10).

В последнее время вновь отмечается рост интереса к использованию бактериофагов в качестве терапевтических средств [4, 9]. Причем препараты бактериофагов применяются не только для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, но и используются также для контроля состояния иммунной системы у пациентов с иммунодефицитами [5, 8]. Ведутся исследования иммуномодулирующих свойств, как очищенных фагов, так и коммерческих препаратов, которые кроме фаговых частиц содержат лизаты бактерий и, часто, компоненты культуральной среды. Ранее нами было показано, что препарат бактериофага *Clostridium perfringens*, разработанный сотрудниками Института бактериофагии,



микробиологии и вирусологии имени Г. Элиавы АН Грузии для лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекции у людей и сельскохозяйственных животных, введенный перорально, усиливает ответ организма на стандартные флоготенные агенты: карагенан и зимозан [2] и активирует синтез в организме провоспалительных цитокинов:  $\gamma$ -ИФН и ФНО- $\alpha$  [1, 3]. Способность влиять на баланс цитокинов в организме открывает новые перспективы практического использования препарата. В связи с этим представляет интерес выяснение способности препаратов других бактериофагов оказывать подобные эффекты.

Целью данной работы было выявление способности препарата бактериофага *Staphylococcus aureus* изменять уровни про- и противовоспалительных цитокинов в организме.

### Материалы и методы

Эксперименты проводились на мышах линии BALB/c массой 18–20 г. В исследованиях *in vivo* препарат бактериофага *Staphylococcus aureus*, содержащий  $10^7$  БОЕ/мл, вводили внутривенно через зонд по 0,5 мл однократно и в течение трех дней. Через сутки после заключительного введения определяли содержание в сыворотке и селезенке  $\gamma$ -интерферона ( $\gamma$ -ИФН), фактора некроза опухолей  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкина 10 (ИЛ 10). Сыворотку получали общепринятым способом. Селезенку и лимфатические узлы гомогенизировали в физиологическом растворе, центрифугировали и использовали супернатант для определения цитокинов. Содержание цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием тест наборов Anti-mouse Ready-Set-Go! Cytokine ELISA Kit фирмы «eBioscience», США, руководствуясь инструкцией изготовителя. Учет результатов осуществляли на планшетном фотометре «Униплан», Россия, при длине волны 450 нм. Все эксперименты повторяли пятикратно. Математическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы MS Excel. Достоверность различий показателей оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что препараты бактериофагов *Clostridium perfringens* и *Staphylococcus aureus* оказывают провоспалительный эффект, подавляют *in vivo* и *in vitro* фагоцитарную способность макрофагов и образование ими активных форм кислорода, а также увеличивают содержание НК-клеток и их киллерную активность [6]. Выраженность этих эффектов зависит от длительности приема препарата и его концентрации в среде инкубации. Поскольку одним из возможных механизмов такого действия может быть влияние препаратов на образование цитокинов, в работе изучено содержание провоспалительных — ФНО- $\alpha$  и  $\gamma$ -ИФН, и противовоспалительного — ИЛ 10, цитокинов у мышей после одно- и трехкратного введения препарата стафилококкового бактериофага. Уров-



ни данных цитокинов у контрольных животных представлены в таблице. После однократного введения препарата содержание провоспалительных цитокинов возрастает и в сыворотке, и в лимфоидных органах. Уровень ФНО- $\alpha$  превышает контрольные значения на 20–28%, а  $\gamma$ -ИФН – в 2,2–2,9 раза (рис. 1, 2).

Таблица  
Содержание цитокинов в сыворотке и лимфоидных органах контрольных мышей  
( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Table

Cytokines contents in control mice serum and lymphoid organs

Цитокин	Сыворотка, пг/мл	Лимфоузлы, пг/100 мг	Селезенка, пг/100 мг
ФНО- $\alpha$	70,5 $\pm$ 5,1	54,2 $\pm$ 3,1	63,6 $\pm$ 2,0
$\gamma$ -ИФН	7,7 $\pm$ 0,5	18,3 $\pm$ 1,1	17,8 $\pm$ 0,9
ИЛ 10	616 $\pm$ 45	1360 $\pm$ 79	1467 $\pm$ 88

Трехкратное введение стафилококкового бактериофага приводит к еще большему увеличению содержания данных цитокинов.

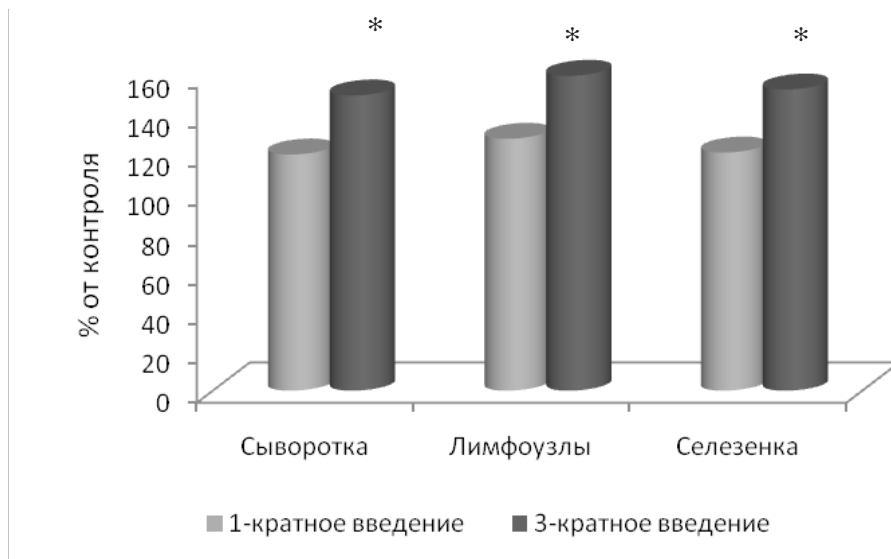


Рис. 1. Содержание фактора некроза опухолей  $\alpha$  в сыворотке и лимфоидных органах мышей после введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*

Примечание: \* – различия по сравнению с контролем достоверны

Fig. 1. Tumor necrosis factor  $\alpha$  content in mice serum and lymphoid organs after administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage

Note: \* – significant different from control

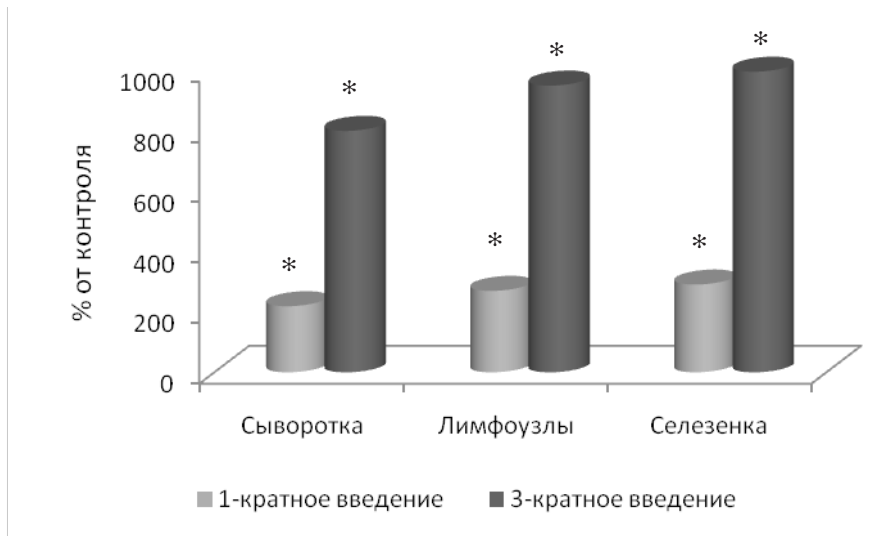


Рис. 2. Содержание  $\gamma$ -интерферона в сыворотке и лимфоидных органах мышей после введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*  
Примечание: \* — различия по сравнению с контролем достоверны

Fig. 2. Gamma interferon content in mice serum and lymphoid organs after administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage  
Note: \* — significant different from control

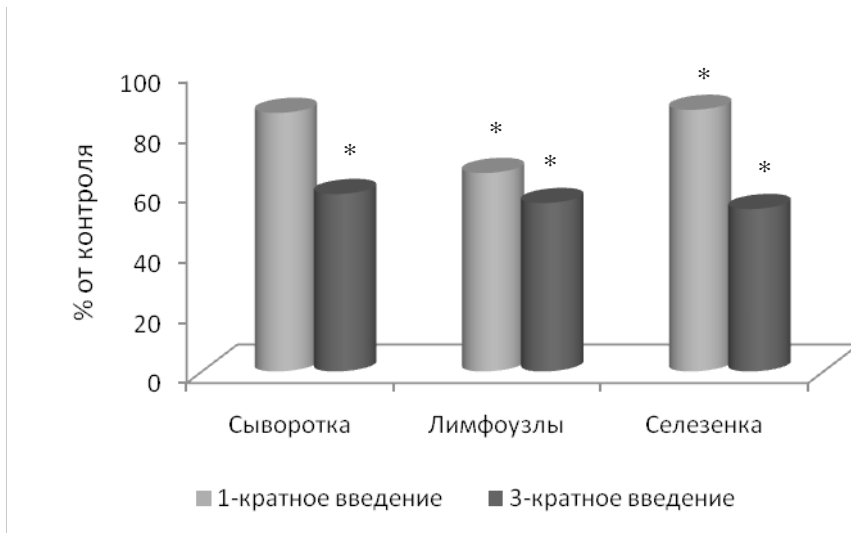


Рис. 3. Содержание интерлейкина 10 в сыворотке и лимфоидных органах мышей после введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*  
Примечание: \* — различия по сравнению с контролем достоверны

Fig. 3. Interleukin 10 content in mice serum and lymphoid organs after administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage  
Note: \* — significant different from control

Особенно значительно возрастает уровень  $\gamma$ -интерферона — в 8–10 раз. Содержание фактора некроза опухолей увеличивается на 50–60%.

В то же время, содержание ИЛ 10 под влиянием препарата бактериофага дозо-зависимо снижается и после трехкратного введения составляет примерно половину от исходного (рис. 3).

Полученные данные дают основание предполагать, что препарат бактериофага оказывает активирующее воздействие на Th1 субпопуляцию хелперных лимфоцитов и НК-клетки, которые служат основными продуцентами  $\gamma$ -интерферона. Учитывая эти результаты, а также увеличение образования в организме фактора некроза опухолей  $\alpha$ , можно ожидать усиление противовирусной и противоопухолевой резистентности организма при фаготерапии. Вместе с тем, подавление продукции ИЛ 10 свидетельствует о возможном снижении активности Th2 хелперов и, соответственно, интенсивности гуморальных иммунных реакций.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о том, что препарат бактериофага *Staphylococcus aureus* индуцирует образования в организме двух важнейших цитокинов с провоспалительным действием:  $\gamma$ -ИФН и ФНО- $\alpha$ . Аналогичное возрастание уровня фактора некроза опухолей  $\alpha$  отмечалось при фаготерапии у людей. Кроме того, у этих пациентов подавлялась фагоцитарная активность нейтрофилов, что наблюдалось и через три месяца после окончания лечения [7, 14]. Снижение продукции ИЛ 10 может быть обусловлено эффектами провоспалительных цитокинов. Следует подчеркнуть, что воздействие стафилококкового бактериофага на уровень цитокинов в организме мышей полностью совпадает с обнаруженными ранее эффектами бактериофага *Clostridium perfringens* [1, 3, 6].

Нерешенным остается вопрос о том, сами ли фаги, или другие компоненты препаратов (лизаты бактерий) ответственны за обнаруженные эффекты. Известно, что фаги при пероральном введении могут проникать через слизистую желудочно-кишечного тракта и длительное время персистировать в организме [10, 11]. При этом они обнаруживаются в лимфоузлах и селезенке и могут оказывать прямое влияние на иммунокомпетентные клетки. Значительное усиление образования в организме  $\gamma$ -ИФН и ФНО- $\alpha$  объясняет также обнаруженную в экспериментах на животных противоопухолевую активность фага Т4 [12]. Причем такое действие может быть обусловлено как цитокинами, так и активированными иммунным интерфероном натуральными киллерами. Поэтому представляется интересным оценить количественные и функциональные изменения основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в организме при введении очищенных бактериофагов и их препаратов.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Іваниця В.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Іваниця Т.В., Чанишвілі Н., Барбуташвілі Т. Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональний стан макрофагів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 1. — С. 23–28.
2. Іваниця В.А., Філіппова Т.О., Галкин Б.Н., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Іваниця Т.В., Чанишвили Н., Барбуташвили Т. Провоспалительные и цитотоксические свойства бактеріофага *Clostridium perfringens* // Тези доповідей міжнародної конференції «Мікробні біотехнології», Одеса, 2006. — С. 126.
3. Філіппова Т.О., Іваниця В.А., Галкин Б.Н., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Іваниця Т.В., Чанишвили Н., Барбуташвили Т. Влияние препарата бактеріофага *Clostridium perfringens* на образование про- и противовоспалительных цитокинов // Материали VI міжнародної научної конференції «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2008. — С. 139–141.
4. Barrow P.A., Soothill J.S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential // Trends Microbiol. — 1997. — V. 5. — P. 268–271.
5. Brockstedt D.G., Bahjat K.S., Giedlin M.A., Liu W. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity // Nature Med. — 2005. — V. 11. — P. 853–860.
6. Filipova T., Ivanytsya V., Gudzenko T., Galkin B., Ivanytsya T., Rusakova M., Stepanova T., Chanishvili N., Barbutashvili T. *Clostridium perfringens* bacteriophage effect on macrophages functional activity and TNF- $\alpha$  production in vivo и in vitro / In: 2<sup>nd</sup> Polish-Ukrainian Weigl Conference “Microbiology in the XXI century”, 24–26 September, Warsaw, 2007. — P. 163–167.
7. Kozminska J., Weber-Dabrowska B., Mulczyk M. The study on biology of bacteriophages and their usage in the treatment of bacterial diseases and on the influence of different bacteriophages on cytokine production by leukocytes in human peripheral blood // Otolaryngologia Polska. — 1997. — V. 51, Suppl. 25. — P. 195–198.
8. Kucharewicz-Krukowska A., Slopek S. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. — 1987. — V. 35. — P. 553–561.
9. Merril C.R., Scholl D., Adhya S.L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine // Nat. Rev. Drug Discov. — 2003. — V. 2. — P. 489–497.



10. Reynaud A., Cloastre L., Bernard J., Laveran H., Ackermann H.W., Licois D., Joly B. Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy // *Vet. Microbiol.* — 1992. — V. 30. — P. 203–212.

11. Smith H.W., Huggins M.B. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics // *J. Gen. Microbiol.* — 1982. — V. 128. — P. 307–318.

12. Weber-Dabrowska B., Dabrowski M., Slopek S. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy // *Archivum Immunologii et Therapiae Experimentalis.* — 1987. — V. 35. — P. 563–568.

13. Dabrowska K., Opolski A., Wietrzyk J., Switala-Jelen K., Godlewska J., Boratynski J., Syper D., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Anticancer activity of bacteriophage T4 and its mutant HAP1 in mouse experimental tumor models // *Anticancer Res.* — 2004. — V. 24. — P. 3991–3995.

14. Weber-Dabrowska B., Zimecki M., Mulczyk M., Gorski A. Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2002. — V. 34. — P. 135–138.

**T.O. Filipova, V.O. Ivanytsia, B.M. Galkin, N.S. Vodsinska,  
M.B. Galkin, O.Yu. Zinchenko, I.O. Maliarchyk, O.V. Nikitin,  
M.Yu. Rusakova**

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

## **THE PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES CONTENTS IN MICE AFTER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BACTERIOPHAGE ADMINISTRATION**

### **Summary**

A contents of the proinflammatory — TNF- $\alpha$ ,  $\gamma$ -IFN; and anti-inflammatory — IL 10 cytokines in mice after one- and three times administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage have been studied. Results of this investigation show that even one administration of this preparation, posses a strong changes in the level of the examined cytokines.  $\gamma$ -IFN content in serum, lymph nodes and spleen of mice increase in 2.2–2.9 times, and content of the TNF- $\alpha$  increase for 20–28%. After three times administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage, level of this





cytokines increase were higher, then after one time injection, especial for  $\gamma$ -IFN. Its level in serum and lymphoid organs was in 8–10 times higher in contrast the control animals. Tumor necrosis factor content increased for 50–60%. In contrast, level of the IL 10 were decrease and after three time administration of this preparation its level compiled a half over there starting level.

**Key words:** *Staphylococcus aureus* bacteriophage, pro- and anti-inflammatory cytokines content, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), gamma interferon ( $\gamma$ -IFN), interleukin 10 (IL 10).

**Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця, Б.М. Галкін, Н.С. Водзінська, М.Б. Галкін,  
О.Ю. Зінченко, І.О. Малярчик, А.О. Нікітін, М.Ю. Русакова**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: tphilippova@ukr.net

## **ВМІСТ ПРО- И ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ В ОРГАНІЗМІ МИШЕЙ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ БАКТЕРІОФАГА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

### **Реферат**

Вивчено вміст прозапальних — ФНП- $\alpha$  і  $\gamma$ -ІФН, та протизапального — ІЛ 10, цитокінів у мишей після одно- і триразового введення препарату бактеріофага *Staphylococcus aureus*. Отримані результати показали, що навіть одноразове введення цього препарату викликає значні зміни рівнів досліджуваних цитокінів. Вміст  $\gamma$ -ІФН у сироватці, лімфатичних вузлах та селезінці підвищується у 2,2–2,9 рази, а вміст ФНП- $\alpha$  — на 20–28%. Після триразового введення препарату бактеріофага *Staphylococcus aureus* рівні цих цитокінів, особливо  $\gamma$ -ІФН, зростають ще більше. Його вміст у сироватці і лімфоїдних органах у 8–10 разів перевершує контрольні значення. Вміст ФНП- $\alpha$  підвищується на 50–60%. Рівень ІЛ 10, навпаки, знижується і після триразового введення цього препарату складає приблизно половину від початкового.

**Ключові слова:** бактеріофаг *Staphylococcus aureus*, вміст про- і протизапальних цитокінів, фактор некрозу пухлин альфа (ФНП- $\alpha$ ), гамма інтерферон ( $\gamma$ -ІФН), інтерлейкін 10 (ІЛ 10).



**В.В. Позур**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, просп. Глушкова, 2,  
Київ, 03022, Україна

## **ОСОБЛИВОСТІ ДОЗРІВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ПІД ВПЛИВОМ ТЕЙХОЄВОЇ КИСЛОТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 *IN VITRO***

*Досліджували вплив тейхоєвої кислоти (ТК) зі Staphylococcus aureus Wood 46 на фенотипові властивості та функціональне дозрівання дендритних клітин (ДК) in vitro. Показано, що обробка незрілих ДК приводить до підвищення ступеня їх зрілості, що проявляється у зростанні рівня експресії поверхневих маркерів HLA-DR та CD80, CD86. Обробка ДК ТК у концентрації 2 мкг/мл спричиняла підсилення здатності цих клітин індукувати проліферацію алогенних лімфоцитів.*

*Ключові слова: тейхоєва кислота, Staphylococcus aureus Wood 46, дендритні клітини, проліферація, лімфоцити.*

Бактерії та їх субклітинні компоненти вже близько 100 років застосовуються в терапії хворих зі злоякісними пухлинами, зокрема як додаткові компоненти, що посилюють імуногенність вакцинних препаратів. [9, 15]. Серед них найбільш дослідженим є стафілококовий білок А, який використовується у клінічних дослідженнях [11, 13]. Крім того, бактерії та їх компоненти останнім часом застосовуються в терапії онкологічних захворювань як ад'юванти і високоімуногенні компоненти протипухлинних вакцин [8, 5].

Тейхоєві кислоти (ТК) — одні із важливих компонентів клітинної стінки грампозитивних мікроорганізмів. Результати досліджень останніх років переконливо доводять імуномодуляторні властивості ТК [16]. Здатність ТК ініціювати прозапальну імунну відповідь дозволила розглядати їх як потенційні терапевтичні агенти в лікуванні онкологічних захворювань, перебіг яких, як відомо, супроводжується імуносупресивним станом [10].

Унікальними антигенпрезентуючими клітинами, які поглинають антиген (АГ), процесують його та презентують Т-лімфоцитам, є дендритні клітини (ДК). [6]. Такі клітини можна розглядати як ендогенний ад'ювант, який при використанні з пухлинним антигеном викликає індукцію специфічної протипухлинної імунної відповіді [12]. Функціональна активність цих клітин у онкологічних хворих значно знижена, і однією з причин цього являється нездатність диференціювання ДК в зрілі форми. Відомо, що



лише зрілі ДК моноцитарного походження здатні ефективно стимулювати розвиток специфічної клітинної імунної відповіді [4]. Для забезпечення дозрівання ДК як правило використовують стандартний набір цитокинів IL-4, GM-CSF, TNF, або деякі субстанції бактеріального походження — ліпополісахарид (ЛПС), CpG ДНК [3].

З літератури відомо, що застосування мураміддипептида та тейхоевої кислоти, призводить до індукції дозрівання моноцитів з периферичної крові людини та продукції прозапальних цитокинів (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6) [7].

Препарати тейхоевих кислот відрізняються за походженням, структурою і, як наслідок, за впливом на імунну систему. Метою даної роботи було дослідити вплив ТК *S. aureus* Wood 46 на фенотипові і функціональні властивості ДК, вирощених *in vitro*.

### Матеріали та методи

Тейхоеву кислоту отримували із клітинних стінок бактерій штаму *Staphylococcus aureus* Wood 46 за методикою Арчібальда [1], шляхом обробки клітинних стінок 10% трихлороцтовою кислотою.

З периферичної крові 10-ти практично здорових осіб отримували мононуклеари методом центрифугування з використанням градієнту щільності фікол-верографіну ( $\rho$ -1,077). Отримані мононуклеарні лейкоцити дворазово відмивали центрифугуванням при 150 g упродовж 10 хвилин у розчині Рінгера. На наступному етапі проводили сепарацію моноцитів за їх здатністю адгезувати на пластиковій поверхні. Для цього отримані клітини ресуспендували у середовищі культивування (середовище RPMI-1640 з 2 mM L-gly, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну) та інкубували в пластикових чашках Петрі при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> упродовж 3 год. Після інкубації клітини м'яко струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання попередньо прогрітим до 37 °C середовищем RPMI-1640. Концентрацію клітин, що адгезували, довели до 0,5 · 10<sup>6</sup> /мл. Клітини культивували впродовж 6 діб при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Після цього для забезпечення функціонального дозрівання ДК в середовище культивування додавали ТК в концентраціях 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 мкг/мл і інкубували ще 24 години. На 8 добу культивування аналізували фенотипові властивості клітин, а також їх функціональні властивості в реакції змішаної культури лімфоцитів (ЗКЛ), для чого до ДК додавали алогенні лімфоцити (ЛЦ) в співвідношенні ДК/ЛЦ — 1/10 і інкубували протягом 3 діб. Після цього визначали ДНК-статус лімфоцитів, що проліферували, з використанням методу проточної цитофлуориметрії. Для визначення фенотипових властивостей ДК обробляли моноклональними антитілами анти-CD86-FITC та анти-HLA-DR-PE, фіксували 1% розчином параформальдегіду. Аналізували фенотип ДК з використанням проточного цитофлуориметру FACScan і програми обробки даних CellQuest. Для визначення ДНК статусу лімфоцити після інкубації з ДК інкубували у 1% розчині Triton X-100 у



ЗФР з додаванням РНК-ази (25мкг/мл) і ДНК-тропного барвника пропідій-йодиду (PI) (5 мкг/мл). Далі клітини відмивали і фіксували 1% розчином параформальдегіду. Аналізували проби з використанням проточного цитофлуориметру FACSscan і програми обробки даних ModFit.

### Результати та їх обговорення

Після обробки ТК отриманих ДК аналіз їх фенотипових властивостей показав високий рівень експресії коstimуляторних молекул ДК – CD80 і CD86, та важливої для презентації антигенів поверхневої молекули ДК HLA-DR, що свідчить про фенотипову зрілість оброблених клітин (дані не представлені). Можна припустити, що зрілі за фенотиповими властивостями ДК є також зрілими функціонально.

Основною функцією ДК є їх унікальна здатність презентувати антигени Т-клітинам, після чого останні активуються, проліферують і далі диференціюються в ефекторні клітини [14]. Здатність стимулювати проліферацію лімфоцитів за допомогою ДК *in vitro*, як правило, вивчають з використанням реакції змішаної культури лімфоцитів (ЗКЛ). На наступному етапі ми досліджували проліферативну активність лімфоцитів шляхом встановлення їх ДНК-статусу, а саме проліферативного індексу.

Проліферативним індексом вважають відсоток клітин, які активно діляться і знаходяться в S- та G2-M-фазах клітинного циклу. Як відомо, за умов відсутності активної імунної відповіді проліферативний індекс лімфоцитів периферичної крові практично здорової людини становить до 10% клітин [2].

Як видно з таблиці, проліферативний індекс лімфоцитів, що інкубували з алогенними ДК, вирощеними за стандартним протоколом (без додавання ТК), становив 32,2%.

Таблиця

Розподіл клітин згідно фаз клітинного циклу (%).

Table

Cell division according to the cell cycle phases (%).

Варіанти досліджу	G0-G1	G2-M+S	Апоптоз
Нестимульований контроль	73,26	32,21	11,03
ФГА	57,12	53,25	16,37
ТК 0,1 мкг/мл	61,52	31,23	12,76
ТК 0,2 мкг/мл	61,08	47,7	16,0
ТК 0,5 мкг/мл	61,93	46,06	14,15
ТК 1,0 мкг/мл	60,72	46,14	12,91
ТК 2,0 мкг/мл	62,55	55,8	14,01



Додавання до ДК, що вирощували *in vitro*, ТК у різних концентраціях призводило до підвищення зрілості цих клітин і стимуляції ними поділу лімфоцитів. Найефективнішою виявилась концентрація ТК 2 мкг/мл при якій проліферативний індекс лімфоцитів становив 55,8%. При інкубації лімфоцитів з поліклональним активатором лімфоцитів ФГА (позитивний контроль проліферації), проліферативний індекс становив 53,25%.

Таким чином, можна вважати, що оброблені ТК ДК є надзвичайно активними стимуляторами проліферації алогенних лімфоцитів на рівні поліклонального активатора лімфоцитів ФГА.

Рівень апоптозу лімфоцитів, що інкубували з ДК до яких додавали ТК в концентрації 0,2 мкг/г, становить 16,0% і є порівняним результатом з ФГА. Це є ще одним свідченням здатності активованих ТК-ю ДК спричинити активацію алогенних лімфоцитів.

Інкубація дендритних клітин *in vitro* з тейхоевою кислотою зі *S. aureus* Wood 46 приводить до підвищення ступеня зрілості цих клітин.

На поверхні ДК зростає рівень експресії коstimуляторних молекул CD80 і CD86 та важливої для презентації антигенів CD4+Т-лімфоцитам молекули HLA-DR.

При додаванні до ДК ТК в найбільшій концентрації (2 мкг/мл) спостерігали найбільш виразний активаторний вплив на проліферацію Т-лімфоцитів.

Показано, що тейхоеву кислоту *S. aureus* Wood 46 можна використовувати як альтернативний стимулятор дозрівання ДК при вирощуванні їх *in vitro*.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Арчибальд А.Р. Методы исследования углеводов. М: Выс. школа, 1975. — 350 с.
2. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика // Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. — М.: Лабинформ-РАМЛД. — 1999. — С. 170–177.
3. Askew D., Chu R.S., Krieg A.M., Harding C.V. CpG DNA Induces Maturation of Dendritic Cells with Distinct Effects on Nascent and Recycling MHC II Antigen-Processing Mechanisms // The Journal of Immunology. — 2000. — V. 165 — P. 6889–6895.
4. Gilboa E. DC-based cancer vaccines // The Journal of Clinical investigation. — 2007. — № 5. — P. 1195–1203.
5. Hara I., Sato N., Miyake H., Muramaki M., Hikosaka S., Kamidono S. Introduction of 65 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG therapy//Microbiol Immunol. — 2004. — 48(4). — P. 289–95.



6. *Hottl L., Zelle-Reiser C., Gander H.* Immunotherapy of metastatic renal carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells // *Clin Cancer Res.* — 2002. — № 8. — P. 3369–76.

7. *Kim H.J., Yang J.S., Woo S.S.* Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines // *J Leukoc Biol.* — 2007. — № 81(4). — P. 983–9.

8. *Lycke N.* From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM // *Cell Microbiol.* — 2004. — 6(1). — P. 23–32.

9. *Maeda H., Akaike T., Wu J., Noguchi Y., Sakata Y.* Bradikinin and nitric oxide in infectious disease and cancer // *Immunopharmacology.* — 1996. — 33(1–3). — P. 222–30.

10. *Okamoto M., Ohe G., Furuichi S., Nishikawa H., Oshikawa T., Tano T., Ahmed S.U., Yoshida H., Moriya Y., Matsubara S., Ryoma Y., Saito M., Sato M.* Enhancement of anti-tumor immunity by lipoteichoic acid-related molecule isolated from OK-432, a streptococcal agent, in athymic nude mice bearing human salivary adenocarcinoma: role of natural killer cells // *Anticancer Res.* — 2002. — 22. — 6A: P. 3229–39.

12. *Quan W.D. Jr., Palackdharry C.S.* Common cancers-immunotherapy and multidisciplinary therapy: Parts III and IV. — *Dis Mon.* — 1997. — 43(11). — P. 745–808.

12. *Schuler G.* Dendritic cells in cancer immunotherapy // *Eur J. Immunol.* — 2010. — № 40(8). — P. 2123–30.

13. *Shimizu M., Matsuzawa A., Takeda Y.* A novel method for modification of tumor cells with bacterial superantigen with a heterobifunctional cross-linking agent in immunotherapy of cancer // *Mol Biotechnol.* — 2003. — 25(1). — P. 89–94.

14. *Steinman R.* The dendritic cell system and its role in immunogenicity // *Ann Rev Immunol.* — 1999. — № 9. — P. 271–296.

15. *Terman D.S.* Protein A and staphylococcal products in neoplastic disease // *Crit Rev Oncol Hematol.* — 1985. — 4(2). — P. 103–24.

16. *Wang J.E., Jurgensen P.F., Almlöf M., Thiernemann C., Foster S.J., Aasen A.O., Solberg R.* Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* Induce Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6 (IL-6), and IL-10 Production in Both T Cells and Monocytes in a Human Whole Blood Model. // *Surg Infect (Larchmt).* — 2003. — 4:2: P. 181–91.



**В.В. Позур**

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, просп. Глушкова, 2,  
Киев, 03022, Украина

**ОСОБЕНОСТИ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПОД  
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕЙХОЕВОЙ КИСЛОТЫ  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 *IN VITRO***

**Реферат**

Исследовали влияние тейхоевой кислоты (ТК) *Staphylococcus aureus* Wood 46 на фенотипические свойства и функциональное дозревание дендритных клеток (ДК) *in vitro*. Показано, что обработка незрелых ДК приводит к повышению степени их зрелости, которая проявляется в росте уровня экспрессии поверхностных маркеров HLA-DR и CD80, CD86. Обработка ДК ТК в концентрации 2 мкг/мл приводила к усилению способности этих клеток индуцировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** тейхоевая кислота, *Staphylococcus aureus*, дендритные клетки, пролиферация, лимфоциты.

**V.V. Pozur**

T.G. Shevchenko Kyiv National University, 2, Glushkova ave.,  
Kyiv, 03022, Ukraine

**THE EFFECT OF TEICHOIC ACID FROM  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 ON THE  
DENDRITIC CELLS MATURATION *IN VITRO***

**Summary**

The effect of teichoic acid from *Staphylococcus aureus* Wood 46 on DC maturation *in vitro* was investigated. It was shown that treatment of immature DC with teichoic acid resulted in increasing of DC maturation. Treated with teichoic acid DC demonstrated the high level of HLA-DR and CD80, CD86 markers expression. Treatment of immature DC with 2 mkg/ml of teichoic acid caused increase of its ability to stimulate allogenic lymphocyte proliferation *in vitro*.

**Key words:** teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, dendritic cells, proliferation, lymphocyte.



**Н.В. Ткачук, В.О. Янченко, А.М. Демченко**

Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г.Шевченка,  
вул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернігів, 14013, Україна,  
тел.: +38 (04622) 3 21 06, e-mail: smykun\_nata@list.ru

## **ЧУТЛИВІСТЬ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ ТА АМОНІФІКУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ ДО ПОХІДНИХ 4-АМІНО-3,5-ДИМЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛІЇ**

*Досліджено чутливість мікроорганізмів корозійно небезпечних груп – сульфатвідновлювальних і амоніфікувальних бактерій до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію. Продукти, що містять 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафталеніл)етильний радикал є перспективними інгібіторами корозійно небезпечних бактерій.*

*К л ю ч о в і с л о в а : антимікробні сполуки, сульфатвідновлювальні бактерії, амоніфікувальні бактерії, похідні 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію.*

Мікроорганізми виступають важливим чинником корозійних руйнувань металів [5]. Корозійно-небезпечні угруповання мікроорганізмів формуються навколо металевих споруд у феросфері. На поверхні, що руйнується, утворюється біоплівка [5, 12]. В лабораторних модельних експериментах показано, що на перших етапах розвитку біоплівки найактивнішими мікроорганізмами є амоніфікувальні бактерії (АМБ). Вони продукують значну кількість екзополімерів, що сприяє формуванню структури біоплівки і створенню анаеробних умов для подальшого розвитку бактерій інших груп [8]. Зокрема основними агентами корозійного руйнування металів за анаеробних умов є сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ) [5].

Для попередження розвитку бактерій та захисту матеріалів від пошкодження використовують антибактеріальні сполуки [2]. Практичний інтерес мають четвертинні солі нітрогенвмісних гетероциклічних сполук, зокрема похідні 1,2,4-триазолу, серед яких знайдено та впроваджено в практичну діяльність ряд сполук з антибактеріальними та протигрибковими властивостями [13]. Триазолам притаманні й високі протикорозійні властивості [9, 11, 14–17] і в умовах мікробної корозії [2, 9, 15, 16].

Тому метою роботи було дослідити чутливість сульфатвідновлювальних та амоніфікувальних бактерій до деяких похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію.





**Матеріали і методи**

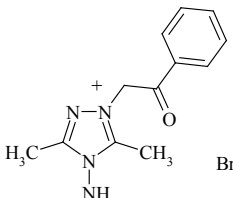
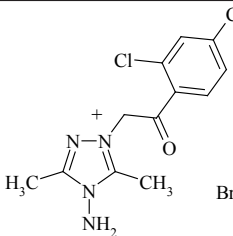
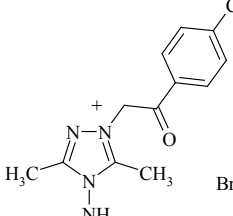
Об'єктом дослідження були 4-добові накопичувальні культури корозійно-активних бактерій – СВБ та АМБ (після п'яти пасажів на серовищі Постгейта В та м'ясо-пептонному бульйоні відповідно за умов періодичного культивування [6]), отримані нами з феросфери сталльної труби, що кородувала. Визначали чутливість культур мікроорганізмів до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію (табл. 1), які синтезовано на кафедрі хімії Чернігівського національного педагогічного університету імені Т.Г. Шевченка під керівництвом д.ф.н., професора Демченка А.М. Солі 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію (I–VII) отримували безпосередньою взаємодією 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолу з відповідними заміщеними фенацилбромідами при нагріванні в етанолі протягом 3-х годин [10]. Сіль VIII отримували за тих же умов із 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолу та α-хлорацетаніліду. Склад та будова сполук підтверджені сучасними методами фізико-хімічного аналізу.

Таблиця 1

Формули похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію

Table 1

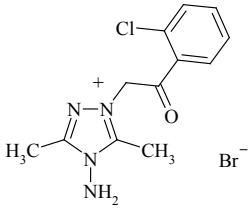
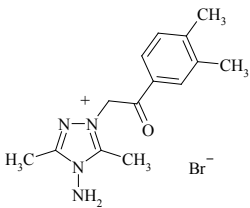
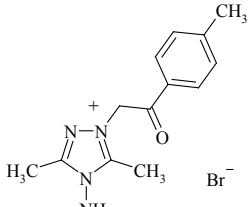
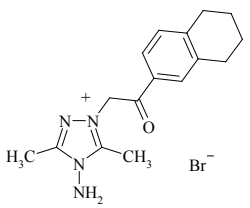
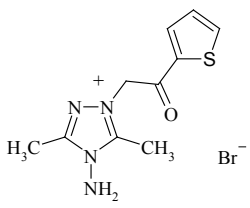
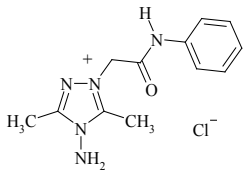
The formulas of 4-amino-3,5-dimethyl-4H-1,2,4-triazolium derivatives

Умовне позначення	Формула	Назва
<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
I		4-аміно-3,5-диметил-1-(2-оксо-2-фенілетил)-4Н-1,2,4-триазол-1-ій бромід
II		4-аміно-1-[2-(2,4-дихлорфеніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил--4Н-1,2,4-триазол-1-ій бромід
III		4-аміно-1-[2-(4-хлорфеніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил--4Н-1,2,4-триазол-1-ій бромід
<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>



## Продовження таблиці 1

Table 1 (continued)

IV		4-аміно-1-[2-(2-хлорфеніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил--4 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ій бромід
V		4-аміно-1-[2-(3,4-диметилфеніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил--4 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ій бромід
VI		4-аміно-1-[2-(4-метилфеніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил--4 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ій бромід
VII		4-аміно-3,5-диметил-1-[2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафталеніл)етил]-4 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ій бромід
VIII		4-аміно-1-[2-(2-тієніл)-2-оксоетил]-3,5-диметил--4 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ій бромід
IX		4-аміно-3,5-диметил-1-фенілкарбамоїлметил-4 <i>H</i> -1,2,4-триазол-1-ій хлорид



Чутливість культур СВБ та АМБ до похідних визначали методом дифузії в агар з використанням стерильних дисків з фільтрувального паперу [3], з концентрацією відповідних речовин на диск 12 мкг, 60 мкг та 120 мкг. Титр бактерій  $10^7$  клітин в 1 мл елективних агаризованих середовищ: Постгейта В (для СВБ) та м'ясо-пептонному агарі (для АМБ). Для вирощування СВБ використовували метод Л.Д. Штурм в модифікації В.І. Дуди [1]. За діаметром зони пригнічення росту мікроорганізмів визначали їх чутливість до речовин [3]. Діаметр зон пригнічення росту бактерій визначали з урахуванням середнього квадратичного відхилення [4]. Відносна похибка представлених даних не перевищує 10%.

### Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження чутливості мікроорганізмів корозійно-небезпечних груп до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію наведено в таблиці 2.

Таблица 2

Чутливість корозійно-небезпечних бактерій до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію

Table 2

Corrosion-dangerous bacteria sensitivity to the derivatives of 4-amino-3,5-dimethyl-4H-1,2,4-triazolium

Умовне позначення сполуки	Діаметр зони пригнічення росту бактерій (в мм) за відповідної концентрації сполуки					
	СВБ			АМБ		
	12 мкг/диск	60 мкг/диск	120 мкг/диск	12 мкг/диск	60 мкг/диск	120 мкг/диск
I	—	9,0±0,1*	9,7±0,7*	—	—	—
II	—	10,3±2,0*	12,7±0,7*	—	—	—
III	—	10,7±0,7*	16,0±0,6*	—	—	—
IV	—	—	10,0±0,1*	—	—	—
V	—	9,7±0,8*	9,7±0,8*	—	—	—
VI	—	10,0±0,1	12,7±1,1	—	—	—
VII	—	14,0±1,1*	21,7±1,7*	—	—	14,0±0,6
VIII	—	9,0±0,1	10,5±1,1	—	—	—
IX	—	—	—	—	—	—

Примітка: «—» — ріст бактерій не пригнічений

\* — в зоні пригнічення росту окремі колонії



Встановлено, що СВБ слабкочутливі до похідного, яке не містить замісників в 2-оксо-2-фенілетильному залишку (сполука I) (табл. 1). Діаметр зон пригнічення росту бактерій становив  $9,0 \pm 0,1$  мм (при концентрації 60 мкг/диск) та  $9,7 \pm 0,7$  мм (при концентрації 120 мкг/диск) (табл. 2).

Порівняння антибактеріальної активності споріднених хлорвмісних сполук II, III та IV (містять атоми хлору в 2-оксо-2-фенілетильному залишку (табл. 1)) свідчить, що введення атомів хлору забезпечує невисокі антибактеріальні властивості щодо асоціативної культури СВБ. Так, бактерії виявились чутливими до похідних II та III в концентрації 60 та 120 мкг/диск, а до похідного IV в концентрації 120 мкг/диск (табл. 2). При цьому похідне із Cl-замісником в пара-положенні (сполука III) проявило більш високі антимікробні властивості. В зоні інгібування росту є окремі колонії, що свідчить про гетерорезистентність дослідженої культури СВБ щодо похідних II, III та IV.

Похідні V та VI є аналогами і містять метильні замісники в 2-оксо-2-фенілетильному залишку (табл. 1). Діаметр зон пригнічення росту СВБ при концентрації 60 та 120 мкг/диск для даних сполук однаковий — 9,7 мм та 10,0–12,7 мм відповідно. Але за дії сполуки V в зоні відсутності бактерій є окремі колонії (табл. 2). Отже, метильний замісник в пара-положенні 2-оксо-2-фенілетильного залишку (сполука VI) посилює антимікробні властивості похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію. Зокрема посилення токсичних властивостей сполук щодо СВБ при пара-положенні метилу в бензеновому кільці відмічено в роботі [7].

За дії похідного VII, яке містить 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафтеніл)-етильний залишок (табл. 1), зона пригнічення росту СВБ виявилась максимальною для досліджених похідних і при концентрації 120 мкг/диск становила  $21,7 \pm 1,7$  мм (табл. 2). Але культура СВБ проявила гетерорезистентність. Сполука VII також токсична і щодо АМБ. Так, при концентрації 120 мкг/диск зона пригнічення бактерій становила  $14,0 \pm 0,6$  мм. До всіх інших сполук АМБ виявились нечутливими.

Сульфатвідновлювальні бактерії виявились слабкочутливими до сполуки VIII, яка містить 2-тієніл-2-оксоетил (табл. 1). За концентрації 60 та 120 мкг/диск діаметр зон пригнічення росту бактерій становив  $9,0 \pm 0,1$  мм та  $10,5 \pm 1,1$  мм відповідно (табл. 2).

До сполуки IX, яка містить фенілкарбамоїлметильний фрагмент (табл. 1), сульфатвідновлювальні та амоніфікувальні бактерії виявились нечутливими (табл. 2).

Таким чином, подальший пошук антимікробних сполук щодо корозійно небезпечних бактерій (сульфатвідновлювальних та амоніфікувальних) перспективний серед продуктів, що містять 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагідро-6-нафталеніл)етильний радикал у першому положенні гетеросистеми.



## ЛІТЕРАТУРА

1. *Бабьева И.П.* Биология почв: учебник [для студ. высш. уч. завед.] / И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. — М.: Изд-во МГУ, 1989. — 336 с.
2. *Герасименко А.А.* Защита машин от биоповреждений / Герасименко А.А. — М.: Машиностроение, 1984. — 112 с.
3. *Егоров Н.С.* Основы учения об антибиотиках / Егоров Н.С. — М.: Высш. шк., 1969. — 479 с.
4. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Лакин Г.Ф. — М.: Высш. шк., 1973. — 343 с.
5. *Мікробна корозія підземних споруд* / [Андреюк К.І., Козлова І.П., Коптева Ж.П. та ін.]. — К.: Наук. думка, 2005. — 260 с.
6. *Романенко В.И.* Экология микроорганизмов пресных водоёмов / Романенко В.И., Кузнецов С.И. — Л.: Наука, 1974. — 193 с.
7. *Приходько С.В.* Функціонування корозійно активного мікробного угруповання ґрунту за присутності похідних триазолоазепіну: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд.біол.наук: спец.03.00.07 „Мікробіологія” / С.В. Приходько. — Київ, 2009. — 20 с.
8. *Пуріш Л.М.* Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі / Пуріш Л.М., Асауленко Л.Г. // Мікробіол. журн. — 2007. — Т. 69, № 6. — С. 19–25.
9. *Царенко И.В.* Ингибирование коррозии пятичленными полиазотистыми гетероциклами. II. 1,2,4-триазолы / Царенко И.В., Макаревич А.В., Кофман Т.П. // Защита металлов. — 1997. — Т. 33, № 4. — С. 415–417.
10. *Янченко В.О.* Основы химии гетероциклических сполук: [навч. посіб.] / Янченко В.О., Смольський О.С., Демченко А.М. — Чернігів: Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г. Шевченка, 2010. — 224 с.
11. A benzotriazole derivative as a pretreatment corrosion inhibitor for copper / Notoya T., Satake M., Yashiro H. et al. // 15<sup>th</sup> International Corrosion Congress, Frontiers in Corrosion Science and Technology, Granada (Spain). September 22 to 27, 2002. Abstracts. — P. 290.
12. *Lewandowski Z.* Structure and Function of Biofilms / Lewandowski Z. // Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed. by L.V. Evans. — Harwood: Harwood Acad. Publ., 2000. — P. 1–17.
13. *Negwer M.* Organic chemical drugs and their synonyms. 7-th revised / Negwer M. — Berlin. Acad. Verlag., 1994. — P. 4284.
14. *Synthesis* and evaluation of the inhibitor effect of a new class of triazole compounds / El Hajjaji S., Lgamri A., Aziane D. et al. // Progr. In Org. Coat. — 2000. — Vol. 38, № 3–4. — P. 207–212.
15. *Tsarenko I.V.* Microbicidal properties of polymer films modified by 5-membered polynitrogen heterocycles / Tsarenko I.V., Makarevich A.V., Orekhov D.A. // Bioprocess Eng. — 1998. — Vol. 19, № 6. — P. 469–473.



16. Пат. 2292687 Великобритания, МКИ А 01 № 25/00 А 61 L 2/18. Corrosion inhibition of oxidant-based anti-microbial compositions: Пат. 2292687 Великобритания, МКИ А 01 № 25/00 А 61 L 2/18/ Green Bruce Philip. — № 9417241.8; Заявл. 26.8.94; Опубликовано. 06.03.96; НКИ А5Е. — 7 с.

17. Пат. 5968408 США, МПК С 07 D 249/18, С 09 К 3/00. Methods of inhibiting corrosion using isomers of chloromethylbenzotriazole: Пат. 5968408 США, МПК С 07 D 249/18, С 09 К 3/00/ Anderson Sydia B., Cheng Longchun, Cady Michael A. (США); BetzDearborn Inc. — № 09/103493; Заявл. 24.06.98; Опубликовано. 19.10.99; НПК 282/180. — 9 с.

### **Н.В. Ткачук, В.А. Янченко, А.М. Демченко**

Черниговский национальный педагогический университет имени Т.Г. Шевченко,  
ул. Гетьмана Полуботка, 53, Чернигов, 14013, Украина,  
тел.: +38 (04622) 3 21 06, e-mail: smykun\_nata@list.ru

## **ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ И АММОНИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К ПРОИЗВОДНЫМ 4-АМИНО-3,5-ДИМЕТИЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛИЯ**

### **Реферат**

Исследована чувствительность бактерий коррозионно опасных групп — сульфатвосстанавливающих и аммонифицирующих к производным 4-амино-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолия. Антимикробные соединения, которые содержат 2-оксо-2-(1,2,3,4-тетрагидро-6-нафталенил)этильный радикал, являются перспективными для разработки ингибиторов коррозионно опасных бактерий.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** антимикробные соединения, сульфатредуцирующие бактерии, аммонифицирующие бактерии, производные 4-амино-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолия.



**N.V. Tkachuk, V.O. Yanchenko, A.M. Demchenko**

Chernihiv National Pedagogical University named after T.G.Shevchenko,  
53, G. Polubotka Str., Chernihiv, 14013, Ukraine,  
tel.: +38 (04622) 3 21 06, e-mail: smykun\_nata@list.ru

**SULPHATE-REDUCING AND AMMONIFYING BACTERIA  
SENSITIVITY TO THE DERIVATIVES  
OF 4-AMINO-3,5-DIMETHYL-4H-1,2,4-TRIAZOLIUM**

**Summary**

The sensitivity of corrosion-dangerous groups bacteria – sulphate-reducing bacteria and the ammonifying bacteria to the derivatives of 4-amino-3,5-dimethyl-4H-1,2,4-triazolium has been investigated. It is supposed that antimicrobial substances can be found in the series of products, containing 2-oxo-2-(1,2,3,4-tetrahydro-6-naphtalenyl)ethyl radical.

**Key words :** antimicrobial substances, sulphate-reducing bacteria, ammonifying bacteria, the derivatives of 4-amino-3,5-dimethyl-4H-1,2,4-triazolium.



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

## БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛАЗ ПРОБИОТИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ СОВМЕСТНОМ ВЫРАЩИВАНИИ

*Изучены рост пробиотических штаммов *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140 и биосинтез выделяемых ими в среду ферментов целлюлазного комплекса при глубинном способе культивирования на целлюлозе. Показана возможность использования совместного культивирования изучаемых штаммов не только для интенсификации накопления ими биомассы клеток, но и биосинтеза внеклеточных целлюлаз, в том числе при добавлении в среду культивирования лактата или лактулозы в качестве дополнительного источника углерода.*

*Ключевые слова: *Bacillus*, целлюлазы, совместное культивирование.*

Для создания комплексных пробиотиков, в том числе и синбиотиков, большое значение приобретают смешанные культуры бактерий, что приводит к более полному усвоению источников питания, а также упрощению технологии производства целевого продукта. Уже разработаны технологии совместного глубинного культивирования при создании ряда биопрепаратов на основе штаммов кишечной палочки и энтерококка, бифидо-, лактобактерий и бацилл [3, 5, 7, 12–15]. Применение совместного культивирования — идея не новая. Его издавна использовали для биосинтеза белков, биологически активных веществ, очистки сточных вод, оптимизации и интенсификации процессов выращивания и получения микробных клеток [11–12].

Смешанные культуры используют также для интенсификации процесса биосинтеза ферментов микроорганизмами различных таксономических групп с целью увеличения активности экзопротеаз и литических ферментов [2, 6–9, 14–15]. Это дает возможность, с одной стороны, ускорить биосинтез того или иного фермента и увеличить его активность, с другой — усилить или пополнить комплекс ферментов с целью более глубокого гидролиза субстрата, а также значительно расширить спектр потребляемых субстратов. Примеров применения этого способа культивирования для усиления биосинтеза целлюлолитических ферментов нами не найдено.





Изучаемые нами штаммы бактерий *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140, на основе которых методом отдельного глубокого культивирования уже создан высокоэффективный пробиотик эндоспорин для лечения и профилактики ряда послеродовых и кишечных заболеваний, характеризуются высокой биохимической лабильностью, способностью синтезировать многие соединения (антибиотики, ферменты, экзополисахариды) [3, 4].

Настоящая работа посвящена изучению особенностей биосинтеза целлюлолитических ферментов пробиотическими штаммами *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140 при совместном их выращивании на целлюлозе.

### Материалы и методы

Объектом исследований служили пробиотические штаммы *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140, являющиеся основой препарата эндоспорин [4].

Совместное и отдельное культивирование бактерий проводили в течение 24 часов на оптимизированной для их роста среде следующего состава (г/л): натрия цитрат — 1,29;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  — 4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 9,6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,18, pH среды —  $7,0 \pm 0,2$ , с добавлением 0,5% кукурузного экстракта. В качестве основного источника углерода использовали целлюлозу (0,5%), а в качестве дополнительного источника углеродного питания лактит или лактулозу (по 15%). Лактит и лактулоза — продукты изомеризации лактозы, химически близкородственные соединения с известными пребиотическими свойствами, используются в составе пищевых продуктов и при создании комплексных препаратов [11]. В состав лактулозы входит галактоза и фруктоза, лактита — галактоза и сорбит [10].

В качестве посевного материала использовали суточные культуры исследуемых штаммов бактерий, выращенных на среде аналогичного состава с добавлением глюкозы (1,5%) при температуре  $37 \pm 2$  °C на качалке при 200 об/мин. Посевной материал состоял из смеси выросших суспензий штаммов в соотношении 1:1. Перед смешиванием культур оптические плотности их суспензий уравнивали физраствором к 0,5 ед. на ФЕК 56 при длине волны 540 нм. Полученную таким образом суспензию культур вносили в среду из расчета 5 об%, что соответствовало количеству клеток  $10^6$ – $10^7$  в 1 мл.

Активности целлюлолитических ферментов в надосадочной жидкости определяли по количеству глюкозы в 1 мл культуральной жидкости в соответствии с методами, ранее описанными в работе [1]. Исследование стабильности целлюлаз в зависимости от pH среды проводили в растворах 1/15 М цитратно-фосфатного буфера с величиной pH 5,5 при 50 °C. pH-стабильность ферментов изучали после инкубации культуральной жидкости в течение 1 часа и 24 часов при температуре 12 °C (во избежание термоинактивации). Термостабильность целлюлаз исследовали после прогревания культуральной жидкости в течение часа при температурах от 30 °C до 100 °C (с интервалом 10 °C) в 1/15 М цитратно-фосфатном буфере (pH 6,0) и инкубирования в течение 1 часа при 50 °C. Опреде-



ление температурного оптимума действия ферментов проводили при температурах от 30 °С до 70 °С в том же буфере при рН 6,0.

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

### Результаты и их обсуждение

В связи с перспективностью создания комплексных препаратов, в том числе синбиотиков, основанных на глубинном культивировании штаммов-продуцентов, использование совместного метода выращивания приобретает особую важность, поскольку отдельное культивирование бактерий, входящих в препарат, экономически менее выгодно.

Результаты проведенных экспериментов показали, что рост изучаемых штаммов бацилл в условиях совместного культивирования заметно активизировался в сравнении с культивированием их в монокультуре. Скорость роста смешанной культуры составила  $0,807 \pm 0,015$  ч<sup>-1</sup> и превосходила этот показатель при отдельном культивировании штаммов *B. subtilis* 5139 и *B. subtilis* 5140 ( $0,776 \pm 0,013$  и  $0,751 \pm 0,010$  ч<sup>-1</sup> соответственно). Максимальная концентрация накапливаемой в этих условиях биомассы жизнеспособных клеток находилась на уровне  $8,5 \pm 0,11 \cdot 10^9$  КОЕ/мл, что в 1,1–1,3 раза было выше, чем при выращивании штаммов в монокультурах.

Известно, что регуляция активности ферментов может осуществляться на уровне их биосинтеза или изменения активности [15]. Ранее нами показано, что синтез секретируемых бациллами гидролаз при выращивании их в монокультурах зависит от условий культивирования, состава среды, ее основных источников питания, и кислотности [1, 10]. Было установлено, что изучаемые штаммы на ранее оптимизированной для них среде, в состав которой в качестве источника углерода была взята целлюлоза, продуцируют целлюлазный комплекс, представляющий собой сложную систему отдельных компонентов, состоящий из 4 типов целлюлаз: C<sub>x</sub>-, C<sub>1</sub>-, C<sub>2</sub>-ферментов и целлобиазы, способных расщеплять различные целлюлозные субстраты (карбоксиметилцеллюлозу, хлопковую вату, фильтровальную бумагу и целлобиозу соответственно).

Полагая, что интенсификация синтеза изучаемых экзоцеллюлаз у исследуемых штаммов бацилл может происходить за счет условий их культивирования, нами был исследован процесс синтеза целлюлолитических ферментов у бактерий при совместном росте, а также при внесении в среду различных по составу дисахаридов в качестве источников дополнительного углеродного питания (рис. 1). Представленные данные подтвердили возможность использования совместного культивирования изучаемых бактерий как для интенсификации накопления ими биомассы клеток, так и для биосинтеза ферментов в этих условиях. Совместное культивирование исследуемых штаммов практически не влияло на каче-



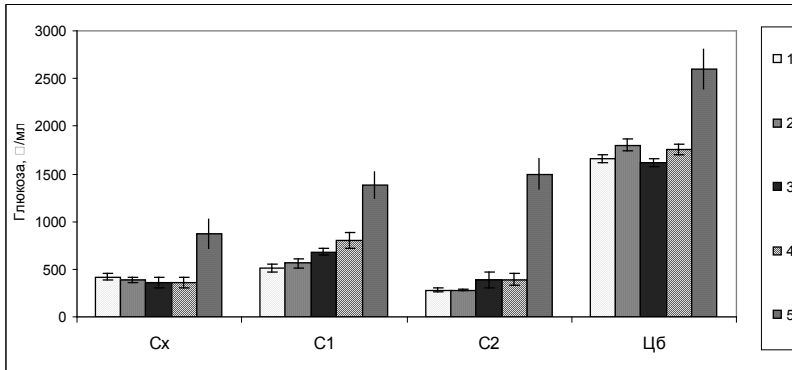


Рис. 1. Целлюлазная активность штаммов *B. subtilis* при раздельном и совместном культивировании на среде с целлюлозой и дополнительными источниками углерода

Обозначение вариантов эксперимента:

- 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – штаммы 5139 +5140,
- 4 – штаммы 5139 +5140 +лактит, 5 – штаммы 5139 +5140 +лактулоза.

Fig. 1. Cellulases activity of strains *B. subtilis* at in mono and joint cultivation on medium with cellulose and additional carbon sources

Notation of the variants of experiment:

- 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – strains 5139 +5140,
- 4 – strains 5139 +5140 +lactit, 5 – strains 5139 +5140 +lactulosa.

ственный и количественный состав получаемого при этом целлюлазного комплекса. При внесении в среду культивирования дополнительных источников углерода смешанная культура бацилл сохраняла активность ферментов C<sub>x</sub> и целлобиазы, но при этом несколько увеличивала активность синтеза C<sub>1</sub>- и C<sub>2</sub>-ферментов. В отличие от лактита внесенная в среду лактулоза, имеющая в составе более доступные углеводы [10], способствовала повышению активности всех типов целлюлаз, продуцируемых штаммами бацилл при их совместном выращивании: в 1,5 и 1,7 раза активность целлобиазы и C<sub>1</sub>-фермента и в 2,4 и 3,8 раза – C<sub>x</sub>- и C<sub>2</sub>- ферментов соответственно. Следовательно, полученные результаты дают основание полагать, что лактулозу и лактит можно использовать для выращивания продуцентов этих ферментов для создания на их основе комплексного синбиотического препарата, характеризующегося высокой целлюлолитической активностью.

Наряду с полученными результатами по изучению физиологии роста изучаемых культур и синтеза ими целлюлазного комплекса выявлено также их влияние на свойства секретируемого ими комплекса ферментов. Значения найденных для монокультур рН-оптимумов действия целлюлаз не изменялись при их совместном культивировании и находились в интервале рН 6,0–7,0 для C<sub>x</sub>-, C<sub>1</sub>- ферментов и целлобиазы и в более широкой зоне рН от 5,0 до 8,0 – для C<sub>2</sub>-фермента. Однако, не изменяя рН культуральной среды, лактит и лактулоза влияли на энзиматические свойства целлюлазного комплекса в разной степени. Так, если на рН-оптимум C<sub>2</sub>- фермента эти вещества в среде культивирования не влияли,

то рН-оптимум  $C_x$ -фермента и целлюбиазы сдвигался под их действием в более кислую область и находился уже в диапазоне рН 5,0–8,0. рН-оптимум  $C_1$ - фермента сдвигался в ту же область рН лишь в присутствии в среде лактулозы (рис. 2).

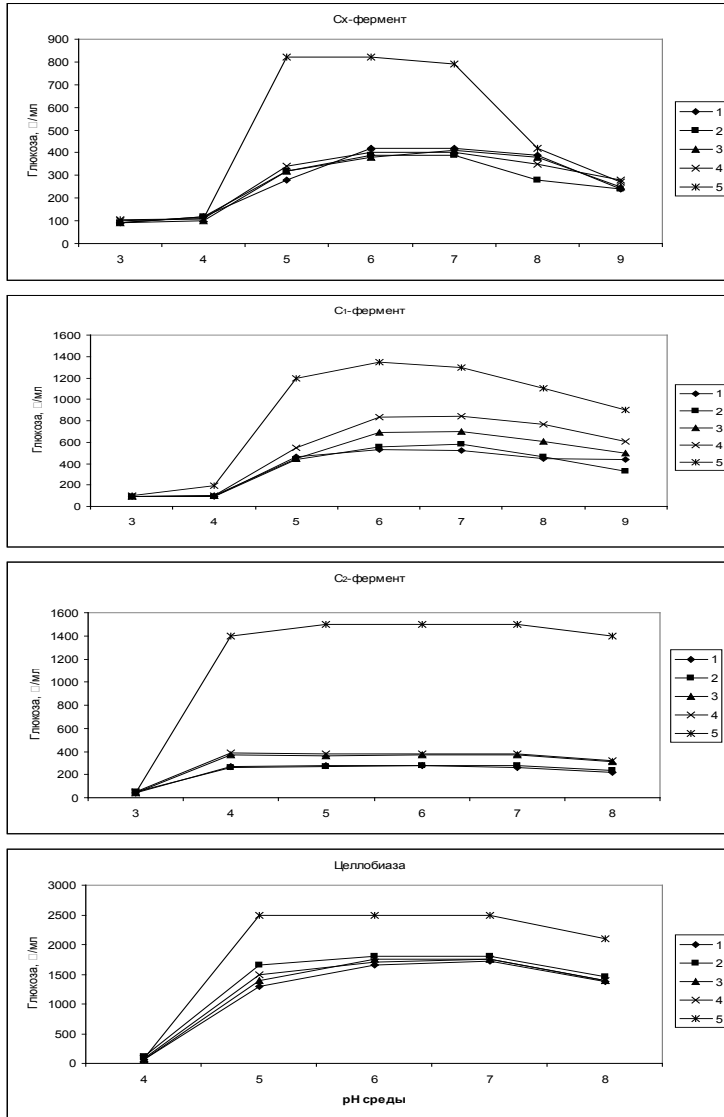
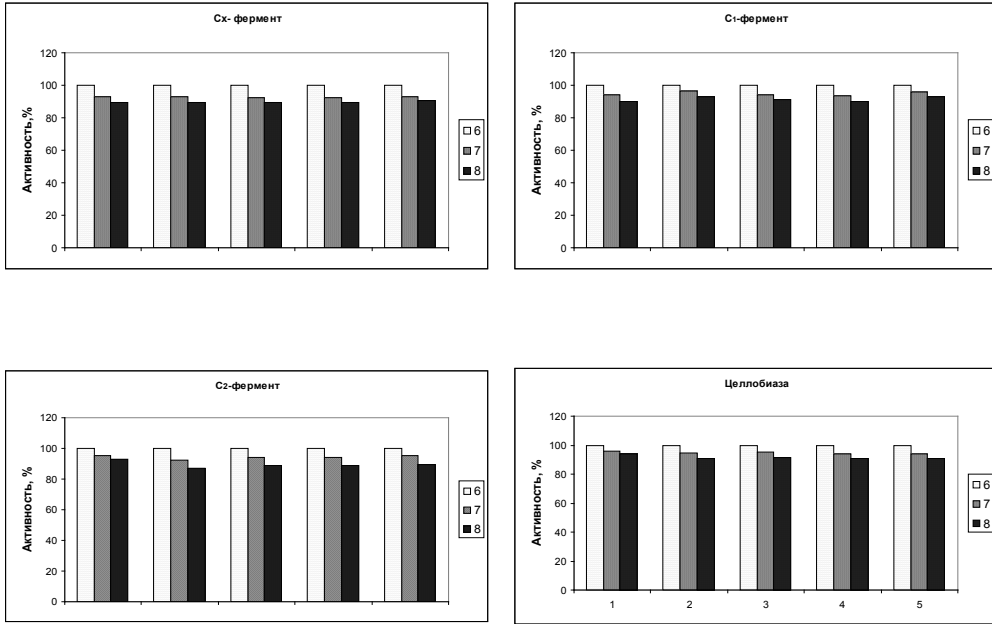


Рис. 2. Уровень рН-оптимума действия продуцируемых штаммами *B. subtilis* целлюлаз при культивировании в моно- и смешанной культурах  
Обозначения: 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – штаммы 5139 +5140, 4 – штаммы 5139 +5140 +лактит, 5 – штаммы 5139 +5140 +лактuloза.

Fig. 2. The level of pH-optimum of the action of produced by strains *B. subtilis* cellulases at cultivation in mono- and joint cultures  
Notations: 1 – *B. subtilis* 5139, 2 – *B. subtilis* 5140, 3 – strains 5139 +5140, 4 – strains 5139 +5140 +lactit, 5 – strains 5139 +5140 +lactulosa.

При совместном культивировании изучаемых штаммов рН-стабильность целлюлолитических ферментов поддерживалась на том же уровне, что и в монокультурах. Выделяемые в этих условиях целлюлазы сохраняли свою активность при рН 6,0 даже после выдерживания культуральной жидкости при 12 °С в течение 24 часов: при этом потери активности составили лишь 7–12% от исходной (рис. 3).



**Рис. 3. Стабильность ферментов продуцируемого бациллами целлюлозного комплекса при рН-оптимуме 6,0 (принято за 100%)**

Варианты эксперимента: 6 — исходная культуральная жидкость, 7 — после инкубации в течение 1 час, 8 — после инкубации в течение 24 час.

Обозначение 1–5 такое же, как на рис. 1.

**Fig. 3. Stability of the enzymes of cellulitic complex produced by bacilli at pH optimum 6,0 (accepted for 100 %)**

The variants of the experiment: 6 — initial medium liquid, 7 — at 1 hour of ageing per a cooler, 8 — at 24 hour of ageing per a cooler.

Notation 1–5 the same, as on fig. 1.

Температурный оптимум действия целлобиазы в монокультурах изучаемых бацилл находился при температуре 40 °С, для остальных типов целлюлаз — при 50 °С (эти значения были приняты за 100%). При совместном культивировании этот показатель не менялся и находился в тех же пределах температур (рис. 4). Не изменялся он и под влиянием вносимых в среду лактита и лактулозы.

У исследуемых штаммов при культивировании их монокультур наибольшая термостабильность  $S_x$ -фермента проявлялась в интервале тем-

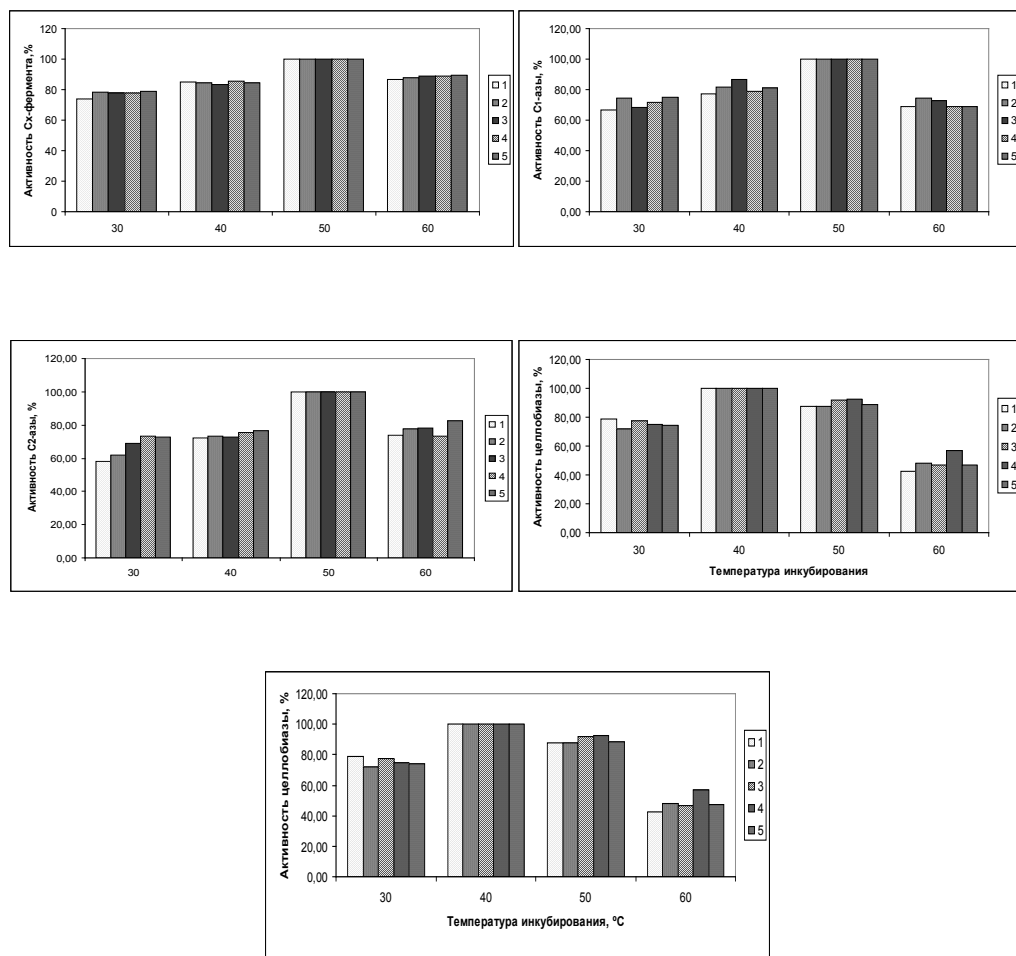


Рис. 4. Температурный оптимум действия различных целлюлаз, продуцируемых бациллами при культивировании их в моно- и смешанной культурах  
Обозначение 1–5 такое же, как на рис. 1.

Fig. 4. Various cellulases temperature action optimum produced by bacilli at cultivation in mono- and joint cultures  
Notation 1–5 the same, as on fig. 1.

ператур 40–50 °C. Остальные типы целлюлаз были стабильны в более широком интервале температур – от 40 до 70 °C (рис. 5). При совместном выращивании выделяемые бациллами целлюлазы сохраняли такую же, как и в монокультурах термостабильность. Так, после прогревания культуральной жидкости в течение 1 часа при 80 °C сохранялось еще до 50,0–60,0% активности  $C_x$  – фермента, до 78,0–99,0% –  $C_1$ - и  $C_2$ -ферментов и до 99% – активности целлобиазы. И даже при 100 °C (при кипячении культуральной жидкости в течение получаса) сохранялось еще до 25–32% исходной активности целлюлаз.

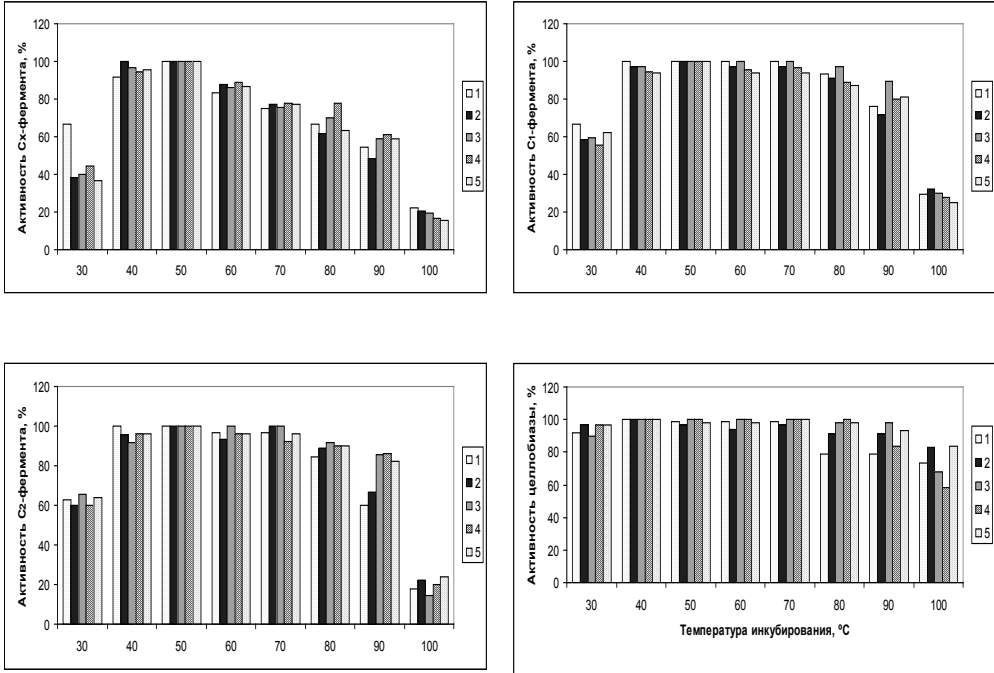


Рис. 5. Термостабильность целлюлаз штаммов *B. subtilis* при культивировании в моно- и смешанной культурах на средах с лактитом или лактулозой  
Обозначение 1–5 такое же, как на рис. 1

Fig. 5. Cellulases thermostability of strains *B. subtilis* at cultivation in mono- and joint cultures on medium with additional of lactitol or lactuloses  
Notation 1–5 the same, as on fig. 1.

Таким образом, результаты исследований показали возможность использования совместного культивирования изучаемых штаммов бацилл не только для увеличения накопления биомассы, но и для интенсификации процесса биосинтеза целлюлаз. Можно полагать, что полученные результаты могут быть использованы при разработке технологий получения новых биопрепаратов в основе с изучаемыми пробиотическими штаммами, выращиваемыми как отдельным, так и совместным способами глубинного культивирования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Л.В., Осадча А.И., Сафронова Л.А., Иляш В.М., Хархота М.А. Синтез гідролітичних ферментів у бацил в залежності від складу поживного середовища // Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 1. — С. 44–52.
2. Бондаренко В.М., Воробьев А.А., Гершанович М.А., Мельникова И.Ю., Петров Л.Н. Обоснование и тактика назначения в медицинской практике

различных форм пробиотических препаратов // Сб. матер. конф. "Пробиотики, пребиотики и синбиотики и функциональные продукты питания. Современное состояние и перспективы". М. 2004. — С. 5–6.

3. Видоградова С.П., Кушнир С.Н. Биосинтез гидролитических ферментов при совместном культивировании макро- и микромицетов // Прикладная биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 6. — С. 652–655.

4. Кистень А.Г., Рой А.А., Курдиш И.К. Физиологическая активность смешанной культуры *Methylococcus capsulatus* УКМ В-3030 *Bacillus megaterium* УКМ В- 5723 и *Bacillus subtilis* ВКПМ В — 4189 при колонизации твердой поверхности // Микробиол. журнал. — 2002. — Т. 64, № 6. — С. 73–78.

5. Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Калиновский Г.Н. Эндоспорин — новый эффективный препарат для лечения и профилактики послеродовых эндометритов и задержания последа у коров // Ветеринарная медицина. — 2004, Харьков. — В. 84. — С. 396–403.

6. Кульчицкая М.А. Разработка аппаратных методов совместного культивирования кишечных бактерий, применяемых при производстве окарина // Вест. ун-та Н.И. Лобачевского. Сер. Биология. — 2001. — № 1(3). — С. 90–92.

7. Логинова Л.Г. Микробиологические аспекты сверхсинтеза ферментов микроорганизмами // Изв. АН СССР. Серия биол. — 1989. — № 5. — С. 682–688.

8. Нуртдинова А.Н. Разработка и изучение биологических свойств комплексного препарата — бифидоспорина. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. —Уфа. 2003. — 22 с.

9. Острикова Н.А., Коновалов С.А. Биосинтез комплекса целлюлозо-разрушающих ферментов смешанным культивированием микроорганизмов // Биотехнология. — 1986. — № 3. — С. 62–68.

10. Полищук В.М. Лактит, можливість створення нових продуктів // Молочна промисловість. — 2003. — № 6(9). — С. 8–9.

11. Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М. Синбиотики: перспективы создания на основе бактерий рода *Bacillus* и лактита // Лікарська справа. — 2007. — № 4. — С. 3–8.

12. Штанько Т.В. Біологічні властивості бацилл та лактобактерій, перспективних для створення комплексного пробіотика. Автореф. дис. ...канд. біол. наук. — К., 2009. —19 с.

13. Яковлева Е.П. Совместное культивирование продуцентов биологически активных веществ с другими организмами (обзор). // Прикладная биохимия и микробиология. — 1983. — № 3. — С. 330–347.

14. Bull A.T. Mixed microbial culture technology // Biochem. Soc. Trans. — 1984. — V. 12, № 6. — P. 1137–1140.

15. Ng T.K., Ben- Bassat A., Geikus G.Y. Ethanol production by Thermophilic Bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by cultures of *Clostridium thermocellum* and *C. thermohydrosulfuricum* // Appl. Environ. Microbiol. — 1981. — 41, № 6. — P. 1337–1343.





UDC 579.152.3

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

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

## **BIOSYNTHESIS OF CELLULASES BY PROBIOTIC STRAINS *BACILLUS SUBTILIS* AT JOINT CULTIVATION**

### **Summary**

It is studied the growth of probiotic strains *B. subtilis* 5139 and *B. subtilis* 5140 and biosynthesis of extracellular enzymes of cellulases complex at deep cultivation on cellulose. It is shown the possibility of use of joint cultivation studied strains not for only intensification of cells biomass accumulation, but also for biosynthesis of extracellular cellulases, and possibility of addition of lactitol or lactuloses on cultivation medium as a source of carbon.

**Key words:** *Bacillus*, cellulases, joint cultivation.

УДК 579.152.3

**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

## **БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЮЛАЗ ПРОБИОТИЧНИМИ ШТАМАМИ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ**

### **Реферат**

Вивчено ріст пробіотичних штамів *B. subtilis* 5139 і *B. subtilis* 5140 та біосинтез ферментів целюлазного комплексу, що виділяються ними в середовище, при глибинному способі культивування на целюлозі. Показано можливість використання сумісного культивування досліджуваних штамів не лише для інтенсифікації накопичення ними біомаси клітин, але і для біосинтезу позаклітинних целюлаз, у тому числі при додаванні в середовище культивування лактиту або лактулози як додаткових джерел вуглецю.

**Ключові слова:** *Bacillus*, целюлази, сумісне культивування.



Ю.С. Сухарев<sup>1</sup>, С.О. Гужвинська<sup>1</sup>, С.Ю. Сухарев<sup>2</sup>, І.В. Головіна<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААНУ, вул. Пушкінська, 83, Харків, 61023, Україна, тел.: +38 066 498 48 11

<sup>2</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, площа Свободи, 4, Харків, 61077, Україна, e-mail: Yuriy\_sukharev@mail.ru

## СПОСІБ ІМУНОБІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНТЕРОТОКСИНІВ *ESCHERICHIA COLI*

*Приведені відомості про вперше створений імунобіосенсор для ідентифікації ентеротоксинів E. coli, відповідальних за розвиток діарейного синдрому при колібактеріозі. Біосенсор реєстрував величину світлового потоку розсіяваного антитілами до кон'югату ST/LT ентеротоксинів, іммобілізованих на монодисперсних полістиролових латексах, що аглютинували у присутності ентеротоксинів. Час визначення концентрації ентеротоксинів в досліджуваних зразках – 5 хвилин. Представлені дані про концентрацію ентеротоксинів в досліджуваних зразках, а також по селективності біосенсора. Розроблений біосенсор характеризується високою операційною стабільністю, відтворюваністю і придатний для використання в реальних умовах.*

*Ключові слова: Escherichia coli, ентеротоксини, біосенсор, полістиролові латекси, кон'югат.*

За даними світової літератури, провідним елементом оцінки патогенності *E. coli* є наявність у неї генів, що детермінують синтез ентеротоксинів — термостабільного (ST) і термолабільного (LT), відповідальних за розвиток діарейного синдрому при колібактеріозі [9, 10]. У зв'язку з цим, при експрес-діагностиці необхідна ідентифікація цих факторів патогенності [1]. Але це пов'язано зі значними труднощами, головним чином, з недосконалістю сучасних методів визначення токсигенності *E. coli* [4, 8].

Останнім часом найбільшого розвитку набули методи аналізу, які дозволяють судити про присутність речовини та її концентрації за характером і величиною впливу на певний біологічний матеріал, взятий як індикаторний [2, 5]. Такі аналітичні пристрої отримали назву «біосенсори» або «біочіпи» [3, 6]. У зв'язку з цим була поставлена мета розробити спосіб визначення ентеротоксинів *E. coli* за допомогою імунобіосенсора для діагностики колібактеріозу.



### Матеріали і методи

*Конструювання імунобіосенсора.* Антитіла до кон'югату ST/LT- ентеротоксинів, які були вилучені з гіперімунних антитоксичних сироваток крові кролів за допомогою імуносорбенту, розводили у 0,05 М гліцин-HCl буфері до одержання 1,0–1,2% концентрації, а монодисперсні полістиролові латекси з діаметром 0,31 мкм (Росія) — у співвідношенні 1:3 гліциновим буфером рН 8,0–8,2; потім в кюветі нефелометра змішували рівні об'єми суспензії латексів і розчину антитоксинів, суміш витримували впродовж 1–2 годин при 37 °С періодично струшуючи, після чого додавали дві частини гліцинового буфера, який містив 1,0% гліцерину і витримували у холодильнику 3–5 днів при 4 °С. Перед застосуванням біотрансд'юсер струшуювали.

У ролі фізичного трансд'юсера використовували нефелометр 2100N (НАСН, Ratio™), який реєстрував величину світлового потоку розсіюваного антитілами, іммобілізованими на монодисперсних полістиролових латексах, що аглютинували під дією ентеротоксинів.

Досліджуваним матеріалом були фекалії хворих на діарею і вміст тонкого кишечника полеглих від колібактеріозу телят. Кишковий вміст і фекалії центрифугували при 4000–6000 g протягом 20–40 хвилин, збирали супернатант і концентрували його у 5 разів ПЕГ з молекулярною масою 35000–40000 D.

*Облік реакції.* До біотрансд'юсера додавали 0,5 мл досліджуваної рідини, витримували 5 хвилин і кювети встановлювали у нефелометр. При наявності в реакційній суміші гомологічних антитілам токсичних речовин, відбувалася аглютинація латексів. В контролі використовували біотрансд'юсер виготовлений з антитіл нормальної кролячої сироватки крові іммобілізованих на латексах, які не реагували з ентеротоксинами *E. coli*. Різниця у показниках розсіювання світла між дослідними і контрольними зразками, що реєструвалася нефелометром, свідчила про наявність ентеротоксинів *E. coli*.

Кількісне визначення ентеротоксинів в досліджуваних зразках проводили за даними калібрувальної кривої залежності величини розсіювання світла від середньої концентрації ентеротоксинів, яку розраховували за формулою Калькара:  $\text{мг/мл} = 1,45E_{280} - 0,74E_{260}$  (табл. 1).

### Результати дослідження та їх обговорення

Специфічність імунобіосенсора, тобто здатність ідентифікувати тільки ту речовину, для визначення якої він розроблений, була підтвержена шляхом постановки тесту з безклітинним супернатантом добової культури токсигенного штаму *Proteus vulgaris* і синтетичним стерильним середовищем для культивування токсигенних штамів *E. coli* [7].



Таблиця 1  
Концентрація ентеротоксинів *E. coli* в фекаліях хворих і вмісті тонкого кишечника  
полеглих телят, яка визначається імунобіосенсором

Table 1  
Concentration of enterotoxins *E. coli* in patients excrements and contents of small  
intestine of the lost calves, defined by immunobiosensor

Досліджуваний зразок	Величина розсіювання світла (NTU) $\bar{X} \pm s, n=4$	Концентрація ентеротоксина (мкг/мл) $\bar{X} \pm s, n=4$	Рд-к
Фекалії	74,75 $\pm$ 1,25	3,12 $\pm$ 0,74	$\leq 0,05$
Контроль	5,00 $\pm$ 0,81	–	
Вміст кишечника	97,50 $\pm$ 17,00	6,24 $\pm$ 0,85	$\leq 0,05$
Контроль	5,00 $\pm$ 0,81	–	

Величина розсіювання світла безклітинного супернатанта, яка містила токсин *P. vulgaris*, і стерильного середовища культивування токсигених штамів, достовірно не відрізнялася від контролю (табл. 2.).

Таблиця 2  
Величина розсіювання світла (NTU) безклітинного супернатанту *P. vulgaris*,  
стерильного середовища культивування токсигених штамів *E. coli* і контролю,  
яка визначається імунобіосенсором

Table 2  
Size of light dispersion (NTU) of cell-free supernatant *P. vulgaris*, the sterile  
environment of cultivation toxigenic strains *E. coli* and the control,  
defined by immunobiosensor

Досліджувана речовина	Величина розсіювання світла (NTU) $\bar{X} \pm s, n=4$	Рд-к
Безклітинний супернатант <i>P. vulgaris</i>	7,00 $\pm$ 0,85	$\geq 0,05$
Стерильне середовище культивування <i>E. coli</i>	6,50 $\pm$ 0,91	$\geq 0,05$
Контроль	5,00 $\pm$ 0,91	–

Таким чином, розроблений спосіб ідентифікації ентеротоксинів *E. coli* за допомогою імунобіосенсора дає змогу аналізувати складні суміші на присутність ентеротоксинів *E. coli*, без їх попереднього видалення і очистки; виявляти дуже низькі концентрації ентеротоксинів у малих



зразках; здійснювати експрес-діагностику колібактеріозу, що дозволяє своєчасно проводити протиепідеміологічні і профілактичні заходи, а також епізоотологічний моніторинг за присутністю і розповсюдженням токсигенних штамів кишкової палички у навколишньому середовищі.

Наступний етап роботи передбачає адаптацію імунобіосенсора до ветеринарної практики, розробку оптимальних алгоритмів його застосування для поліпшення технологічності, підвищення ефективності та зменшення вартості діагностичних досліджень.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Александрин А.П., Матевосян К.Ш., Белоновская О.С., Серебряков С.Н.* Иммуноферментная тест-система для определения термолабильного энтеротоксина эшерихий // Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: Сб. научн. тр. — М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2004—2005. — С. 53—56.
2. *Божков А.И.* Биотехнология (Фундаментальные и промышленные аспекты) — Харьков. — 2008. — С. 292—303.
3. *Варфоломеев С.Д., Березин И.В.* Физическая химия (Современные проблемы). М. — Химия. — 1982. — С. 68—94.
4. *Иванов А.С.* Современные подходы к микробиологической диагностике и терапии инфекционных диарей // Болезни органов пищеварения. — 2004. — № 2. — С. 2—10.
5. *Мазена В.Н., Орлова К.А., Бруснигина Н.Ф.* Метод ПЦР в диагностике острых кишечных инфекций // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. — Н.Новгород. — 2006. — С. 127—128.
6. *Солдаткин О.О., Пешкова В.М., Дзядевич С.В., Ёльска Г.В.* Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для визначення сахарози // Біотехнологія. — Т. 1. — № 1. — 2008. — С. 116—122.
7. *Сухарев Ю.С.* Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе). — Харьков: Коллегиум. — 2009. — 92 с.
8. *Gomi H., Jiang Z.-D., Adachi J.A., Ashley D., Lowe B., Verenkar M.P., Steffen R., DuPont H.L.* In Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Enteropathogens Causing Traveler's Diarrhea in Four Geographic Regions // *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2001. — 45. — P. 212—216.
9. *Thielman N.M., Guerrant R.L.* Acute infectious diarrhea // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — V. 350 (1). — P. 38—47.
10. *Wingate D., Phillips S.E., Lewis S.J.* Guidelines for adults on self-medication for the treatment of acute diarrhea // *Aliment. Pharmacol Ther.* — 2001. — № 15. — P. 773—782.



Ю.С. Сухарев<sup>1</sup>, С.А. Гужвинская<sup>1</sup>, С.Ю. Сухарев<sup>2</sup>, И.В. Головина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины»  
НААНУ, ул. Пушкинская, 83, Харьков, 61023, Украина, тел.: +38 066 498 48 11  
<sup>2</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, площадь Свободы,  
4, Харьков, 61077, Украина, e-mail: Yuriy\_sukharev@mail.ru

## СПОСОБ ИММУНОБИОСЕНСОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНТЕРОТОКСИНОВ *ESCHERICHIA COLI*

### Реферат

Приведены сведения о впервые созданном иммунобиосенсоре для идентификации энтеротоксинов *E. coli*, ответственных за развитие диарейного синдрома при колибактериозе. Биосенсор регистрировал величину светового потока рассеиваемого антителами к конъюгату ST/LT энтеротоксинов, иммобилизованными на монодисперсных полистироловых латексах, агглютинировавших в присутствии энтеротоксинов. Время определения концентрации энтеротоксинов в исследуемых образцах — 5 минут. Представлены данные о концентрации энтеротоксинов в исследуемых образцах, а также по селективности биосенсора. Разработанный иммунобиосенсор характеризуется высокой операционной стабильностью, воспроизводимостью и пригоден для использования в реальных условиях.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, энтеротоксины, биосенсор, полистироловые латексы, конъюгат.



**Yu.S. Suharev<sup>1</sup>, S.O. Guzhvinska<sup>1</sup>, S.Yu. Suharev<sup>2</sup>, I.V. Golovina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> SNC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» NAAC, 83, Pushkinska str., Kharkov, 61023, Ukraine, tel.: +38 066 498 48 11

<sup>2</sup>Kharkov National University named after V.N. Karazin, 4, square Svobody, Kharkov, 61077, Ukraine, e-mail: Yuriy\_suharev@mail.ru

## **METHOD OF IMMUNOBIOSENSOR DETERMINATION OF ENTEROTOXINS *ESCHERICHIA COLI***

### **Summary**

The information over is brought about the first created immunobiosensor for identification of enterotoxins of *E. coli*, cause development of diarrheal syndrome at colibacteriosis. The touchcontrol registered the size of light stream dispersed by antibodies to conjugate ST/LT enterotoxins, immobilized on monodispersible polystyrene latexs, agglutinating in presence of enterotoxins. Time of determination of enterotoxins concentration in the investigated standards is 5 minutes. Data are presented on the concentration of enterotoxins in the investigated standards, and also on selectivity of touchcontrol. Constructed immunobiosensor is characterized by high operating stability, by reproducibility and it is suitable for use in the real life environment.

**Key words:** *Escherichia coli*, enterotoxins, touchcontrol, polystyrene latexs, conjugate.



**В.О. Іваниця, Н.М. Непомяща, С.П. Ужевська, О.С. Багаєва,  
Т.М. Кривицька, Н.С. Бобрешова**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: grass\_snake@ukr.net

## **МЕТОДИ ОЦІНКИ ЕНТОМОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ЩОДО ЛИЧИНОК ГРИБНОГО КОМАРИКА (*SCIARIDAE*)**

*Описано методи експрес-оцінки ентомоцидної дії та оцінки метатоксичної дії бактеріальних препаратів щодо грибного комарика (*Sciaridae*) – основного шкідника їстівних грибів (гливи та печериць) та постановки пілотних і виробничих випробувань. Показано доцільність їх використання для відбору активних штамів, а також розробки та визначення ефективності ентомопатогенних мікробних препаратів для захисту їстівних грибів як у лабораторних так і виробничих умовах.*

*Ключові слова: ентомоцидна активність, бактерійні препарати, грибний комарик *Bradisia pilisriata*, метод.*

В сучасному агропромисловому комплексі України зростає виробництво їстівних грибів у першу чергу гливи та печериць. У зв'язку з цим зростає актуальність боротьби з комахами-шкідниками грибів та виробництва екологічно чистих продуктів харчування. Основну шкоду врожаю їстівних грибів наносять представники двокрилих комах грибні комарика *Bradisia pilisriata* Frey., які також завдають шкоди рослинам закритого ґрунту (овочам, декоративним рослинам тощо) [1]. У практиці сільського господарства для боротьби з комахами-шкідниками широкого застосування набули ентомопатогенні мікроорганізми.

Для пошуку та розробки активних штамів необхідна розробка методики визначення інсектицидної активності мікроорганізмів та мікробних препаратів проти грибних комариків [2, 3], що і було метою цієї роботи.

В основу розробленої методики було взято рекомендації щодо вивчення шкідників сільськогосподарських рослин [3, 4, 5]. Методика визначення інсектицидної активності мікроорганізмів та мікробних препаратів проти грибних комариків складається з декількох етапів: підготовка комах, підготовка бактерій та препарату, підготовка поживного субстрату для комах, постановка експерименту, аналіз результатів.





### Матеріали і методи

Підготовка тест-культури грибного комарика.

Модельним об'єктом методик є грибний комарик (рис. 1) найбільш поширений представник родини Sciaridae (*Bradisia pilisriata* Frey.), для якого добре вивчено цикл розвитку.



а

б

Рис. 1. Грибний комарик (*Bradisia pilisriata* Frey.)

а) – самець, б) – самка.

Fig. 1. Fungous midge (*Bradisia pilisriata* Frey.)

а) – male, б) – female.

Розвиток личинки грибного комарика (рис. 2.) триває 8–12 діб, лялечки – 4–7 діб. Цикл індивідуального розвитку за температури 18–25 °С становить 19–27 діб. Самиця комахи відкладає до 50 яєць. Живляться личинки переважно міцелієм та загниваючими рештками субстрату [6].

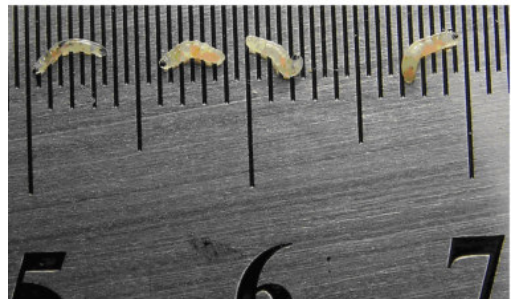


Рис. 2. Личинки грибного комарика (*Bradisia pilisriata* Frey.)

Fig. 2. Fungous midge (*Bradisia pilisriata* Frey.) larvae

Грибні комарики потрапляють у приміщення для культивування грибів у стадії імаго. Яйця відкладають у прорізи в блоках. Після виходу через 7–8 діб личинки проникають в верхні шари субстрату з пророслим міцелієм і завдають суттєвої шкоди гливі (рис. 3.), печерицям, аурикулярії, а на початку обростання субстрату міцелієм можуть шкодити шиїткам та ганодермі.



Рис. 3. Ушкодження міцелію личинками грибного комарика виробничого блоку з субстратом для вирощування гливи

Fig. 3. The damage of mycelium made by fungous midge larvae from the production block with the substrate for pleurotus cultivation

Грибних комариків збирають та постійно вирощують в інсектарії на субстраті з міцелієм гливи (рис. 4).



Рис. 4. Культура грибного комарика (*Bradisia pilisriata* Frey.)

Fig. 4. The culture of fungous midge (*Bradisia pilisriata* Frey.)

Личинок грибних комариків відбирають препарувальною голкою або пензликом на шматок вологого фільтрувального паперу, який переносять потім в підготовлені заздалегідь для проведення випробування склянки з міцелієм гливи.

#### Підготовка поживного субстрату для комах

Для культивування комах використовують зерновий міцелій гливи *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm, який вирощують за загальною методикою і надають у продаж [7]. Блок в стерильних умовах фасують в малі пакети, закривають і зберігають при температурі 4–5 °С у холодильнику. За потреби відбирають необхідну кількість міцелію для дослідів.

#### Підготовка бактерій і препарату

Для випробування дії мікробних препаратів проти личинок грибних комариків мікробні препарати готують у вигляді бактеріальної суспензії, отриманої шляхом змиву з МПА біомаси бактерій стерильною водою (вік мікробної культури – 7–10 діб) або використовують рідкі препарати отримані при культивуванні бактерій на рідких поживних середовищах в колбах чи в біореакторах. Перед проведенням випробувань визначають концентрацію мікробних клітин та спор традиційними методами [8]. Суспензію бактеріальних клітин доводять стерильною водою до кінцевої концентрації не менше  $2 \cdot 10^9$  мікробних клітин та  $n \cdot 10^7$ – $10^8$  спор [9, 10, 11]. Сухі бактерійні препарати розчиняють у стерильній воді і доводять до вказаної вище концентрації.

#### Скринінг-метод лабораторних випробувань

Базуючись на загальних рекомендаціях [4] і проведених попередніх дослідженнях пропонується скринінг-метод визначення ентомоцидної дії мікроорганізмів при роботах з масового відбору активних ентомопатогенних штамів.

Досліди проводять в чашках Петрі, в яких попередньо вирощено міцелій з 10–15 зерняток інокульованих гливою та розміщених на зволоженому фільтрувальному папері (рис. 5). Субстрат дослідного варіанту обробляють підготовленою суспензією бактерій з розрахунку 1 мл на чашку способом дрібнодисперсного розпилювання. Контрольний варіант обробляють стерильною водою з такого ж розрахунку.

У кожному чашку на міцелій гливи поміщають по 10–20 личинок II і III віків. Препарат потрапляє у кишечник личинок при поїданні субстрату. Оптимальними умовами для випробування є температура  $20 \pm 1$  °С та відносна вологість повітря 80–90%. Кількість повторів – не менше трьох. Ларвіцидну дію бактерій визначають на третю добу. Для порівняння ларвіцидної активності різних штамів бактерій та визначення ентомоцидної активності підраховують відсоток смертності личинок в дослідних та контрольних варіантах. Розрахунки здійснюють за формулою Еббота:  $E = (A - B / 100 - B) \cdot 100\%$ , де А – відсоток смертності в досліді; В – відсоток смертності в контролі; Е – ефективність дії препарату в % (з поправкою на контроль) [4].



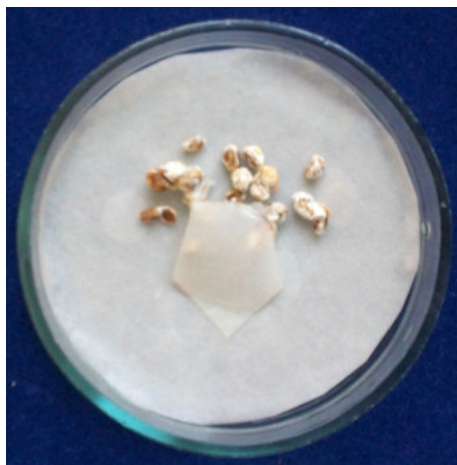


Рис. 5. Зерна пшениці, що обросли міцелієм гливи, нанесені на зволожений фільтрувальний папір у чашці Петрі

Fig. 5. Wheat grains with pleurotus mycelium on wet filter paper in Petri dish

Лабораторний метод визначення метатоксичної дії препаратів

Для визначення віддалених наслідків дії препарату (метатоксичної дії) під час розробки та дослідження нових препаратів підраховується кількість особин, що закінчили свій розвиток, тобто кількість імаго, які з'являються через 7–14 діб. Це потребує більших ємкостей та кількості субстрату, тому випробування проводять в ємкостях, де комахи будуть мати умови розвиватись з личинки до імаго, а досліднику в свою чергу буде досить легко зробити облік імаго (склянках місткістю 0,25–0,5 л). На дно ємкості розкладають целюлозний субстрат для вирощування гливи: шар фільтрувального паперу та бавовняної вати (рис. 6.).



Рис. 6. Ємкості для визначення метатоксичної дії бактеріальних препаратів проти грибних комариків

Fig. 6. The cans for determination of bacterial preparation metatoxic action against fungous midges

Після зволоження субстрату водою на нього рівномірно наносять приблизно 15–20 г зернового міцелію гливи. Склянки залишають для проростання міцелію на 1–2 доби при температурі 20 °С. Після утворення суцільного шару міцелію на поверхню субстрату з гливою в склянці аерозольним способом наносять приблизно 1 мл суспензії мікробного препарату (в контролі стерильної води). Після цього з тест-культури відбирають личинок грибних комариків II–III віків (20–30 екз.), поміщають на шматок вологого фільтрувального паперу та переносять в підготовлені дослідні чи контрольні склянки. Склянки покривають сіткою і ставлять до термостату (20 °С). Кількість повторів — не менше 3. Визначення метатоксичної дії препарату проводять через 2 тижні. Підраховують кількість отриманих імаго протягом тижня і проводять розрахунки ефективності дії за формулою Еббота як описано вище [4].

*Метод пілотного випробування*

Визначення ефективності використання мікробного препарату для знищення грибних комариків при вирощуванні гливи проводиться в камері (рис. 7), в якій штучно створюють високий інсектиційний фон шляхом внесення значної кількості імаго грибних комариків. Дослідження проводять на промислових грибних блоках з субстратом, засіяним міцелієм гливи.



Рис. 7. Камера (інсектарій) для проведення пілотних випробувань

Fig. 7. Camera (insectarium) for pilot tests

В промислових грибних блоках вагою 15 кг з субстратом роблять 15–16 технологічних прорізів для надходження повітря та утворення примордіїв. В дослідних варіантах обробляють грибні блоки мікробним препаратом, який перед обробкою ретельно перемішують. Мікробний препарат наносять у вигляді аерозолю переважно в надрізи, з розрахунку 1–2 мл на один проріз. На обробку грибного блока витрачається біля

20 мл мікробного препарату. В контрольних варіантах наносять на грибні блоки у такий же спосіб адекватну кількість води.

Після обробки мікробним препаратом на дно камери поміщають відкриту склянку з культурою комариків (біля 100 особин імаго). Температура повітря близько  $20 \pm 2$  °С, відносна вологість — 70–90%. Кількість повторів (грибних блоків) — не менше 3.

Ефективність обробки визначають через 14, 28, 32 доби. Реєструють цілі та ушкоджені личинками грибних комариків надрізи у грибних блоках, де спостерігається оголення субстрату, зникає міцелій, не утворюються плодові тіла. Оцінку ушкодження грибних блоків в камері виставляють у балах за такою шкалою: 1 бал — ушкодження до 25% прорізів; 2 бали — ушкодження до 50% прорізів; 3 бали — ушкодження до 70% прорізів; 4 бали — ушкодження до 100% прорізів. Визначають площу субстрату, пошкодженого личинками (в технологічних прорізах). Як і в виробничих умовах для розрахунків ступеню ушкодження грибних блоків (У) використовують формулу Еббота [4]:

$$У = (a_1 \times b_1 + \dots + a_n \times b_n) / Н,$$

де а — кількість грибних блоків з відповідним балом пошкодження; б — відповідний пошкодженню бал; Н — загальна кількість ушкоджених грибних блоків.

#### *Метод виробничого випробування*

За схемою схожою з пілотними випробуваннями проводять обробку грибних блоків мікробним препаратом при випробуваннях у виробничих умовах, де визначається інсектицидність препаратів для усіх шкідників, що зустрічаються в блоках. У випробуваннях ефективності промислового застосування мікробних препаратів у грибівництві нами модифіковано методику [4, 5], що рекомендована для оцінки ефективності застосування ентомоцидних препаратів у рослинництві.

Випробування проводять в одному виробничому приміщенні. Дослідні блоки обробляються препаратом, контрольні водою. Обробку дрібнодисперсним обприскуванням препаратом проводять після обростання субстрату міцелієм, тобто приблизно через два тижні після встановлення блоків, одразу після здійснення прорізів у блоках. На одну обробку одного грибного блока використовують 30–40 мл мікробного препарату. Кількість повторів (грибних блоків) — не менше 10.

Для оцінки дієвості препарату здійснюють контроль чисельності личинкових стадій у субстраті (відбираються зразки із прорізів на блоках з глибини 3 см і площі 5·10 см<sup>2</sup> (5 блоків) [12] та літаючих особин імаго (на липких стрічках на 1 дм<sup>2</sup>/добу) [13]. Через два тижні рахують наявність оголень на блоках. Після збору першого врожаю визначають остаточну кількість оголень на блоках, рахують ступінь ушкодження в балах і визначають ефективність використання препарату [4]. Оцінка економічної ефективності застосування досліджуваного мікробного препарату проводиться з врахуванням врожайності гливи за весь час використання дослідних і контрольних блоків.



У роботі випробовувалися відомі виробничі штами ентомопатогенних мікроорганізмів *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23, *B. thuringiensis var. israelensis* ВКМП В-3313, *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795 (діючі інгредієнти препаратів) та штами отримані на кафедрі мікробіології і вірусології Одеського національного університету *Bacillus sp. 3*, *Bacillus sp. 6*, *Bacillus thuringiensis* ONU 10019, *Bacillus thuringiensis* ONU 10020. Досліджувані штами культивували на середовищах МПА та МПБ.

### Результати та їх обговорення

Для демонстрації відпрацьованих протягом дворічних досліджень в лабораторних та виробничих умовах методик проведено оцінку ентомоцидної активності промислових штамів *B. thuringiensis var. israelensis* ВКМП В-3313 і *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795 (діючі інгредієнти препаратів бактокуліциду та сфероларвіциду) та штамів *Bacillus sp. 3*, *Bacillus sp. 6*, *Bacillus thuringiensis* ONU 10019, *Bacillus thuringiensis* ONU 10020. Проведені дослідження показали (табл. 1), що промислові штами *B. thuringiensis var. israelensis* ВКМП В-3313 і *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795, які активні проти кровосисних комарів, по відношенню до грибного комарика *Bradysia pilistriata* не виявили ларвіцидної активності.

Таблиця 1  
Ларвіцидна активність штамів проти грибного комарика

Table 1  
Strains' larvaecide effect against fungous midges

Штами	Смертність личинок, %	Ефективність, %
<i>B. thuringiensis var. israelensis</i> ВКМП В-3313	6,3 ± 2,4	3
<i>B. sphaericus</i> ВКМП В-3296	1,8 ± 1,6	0
<i>B. sphaericus</i> ВНДІСГМ В-1795	1,2 ± 1,1	0
<i>B. thuringiensis var. israelensis</i> ВНДІСГМ 7-1/23	34,8 ± 6,9	29
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10019	78,0 ± 4,0	75
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10020	80,0 ± 4,2	77
<i>Bacillus sp. 3</i>	69,6 ± 3,4	67
<i>Bacillus sp. 6</i>	73,7 ± 4,3	71



Лише штам *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23 показав ефективність на рівні 29%. Бактеріальні штами *Bacillus sp. 3*, *Bacillus sp. 6*, *Bacillus thuringiensis* ONU 10019, *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 через три доби показали високу (69,6–80,0%) ларвіцидну активність та 67–77% ефективності ентомоцидної дії проти грибного комарика (рис. 8).

Випробування методики експрес-оцінки ларвіцидної активності засобів регуляції чисельності сциарид показало, що за наявності тест-культури комариків отримати результати можливо через 3 доби при температурі  $20 \pm 1$  °С.



Рис. 8. Личинки, що загинули від дії бактеріального препарату

Fig. 8. Died larvae as a result of the bacterial preparation effect

Метатоксичну дію визначали за описаною методикою при дослідженні отриманих нами штамів мікроорганізмів *Bacillus thuringiensis* ONU 10019 та *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 (табл. 2). Через три тижні спостережень досліджувані штами продемонстрували метатоксичну активність на рівні 84% та 85% загибелі комариків, відповідно. Ці штами показали стабільну дію проти *Bradysia pilistriata* протягом дворічних лабораторних випробувань.

Таблиця 2

Метатоксична дія ларвіцидних штамів *Bacillus* по відношенню до грибного комарика *Bradysia pilistriata*

Table 2

Metatoxic action of larvaecyde strains *Bacillus* to fungous midges *Bradysia pilistriata*

Штам	Загибель комариків, %
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10019	84,4 ± 3,1
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 10020	85,7 ± 1,7
Контроль	8,6 ± 1,9



Виробничі випробування проведено в господарстві, що вирощує гливу (рис. 9) в пристосованих приміщеннях, де є вільний доступ для шкідливих комах. Обробка мікробним препаратом була проведена після обростання блоків міцелієм (через 2 тижні після встановлення блоків). В приміщенні за одну добу реєструвались імаго брадисії у кількості  $4,2 \pm 1,6$  екз. на  $100 \text{ см}^2$  липкої стрічки.



Рис. 9. Промислове вирощування гливи *Pleurotus ostreatus* в умовах фермерського господарства

Fig. 9. Production of *Pleurotus ostreatus* under farm condition

Після нанесення бактерійного препарату личинки в прорізах з'являлись, досягали I–II віків і гинули. Ступінь ушкодження в дослідному варіанті після обробки мікробним препаратом на основі *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 зареєстрована на рівні 1–2 балів. Через 21 добу в контролі показано розростання площі ушкодження міцелію більше, ніж в досліді на 25%. В блоках, оброблених препаратом, зареєстрована значна смертність личинок комариків. Результати випробувань через 21 добу представлені в табл. 3.

Через місяць після обробки проведено аналіз складу безхребетних в грибних блоках, який показав, що кількість личинок брадисії в контролі складала 8 екз/100 г повітряно-сухої ваги субстрату. В дослідних зразках личинки були відсутні. Плодові тіла на оброблених препаратом блоках не були ушкоджені личинками комариків. Зареєстровано збільшення урожайності грибів на 44,8–55,2%.

Таблиця 3  
Ефективність виробничого використання ларвіцидного препарату на основі штаму *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 для регуляції чисельності грибних комариків на гливі

Table 3  
Efficiency of the production use of larvaecide preparation based on *Bacillus thuringiensis* ONU 10020 strain for the regulation of fungous midges quantity on pleurotus

Варіант обробки грибних блоків	Ступінь ушкодження грибних блоків			Середній врожай з одного блоку, кг
	бали	%	Показник Еббота, бали	
Нанесення мікробного препарату на всю поверхню блоку	1-2	14	1,64	4,2 ± 0,7
Внесення мікробного препарату в прорізи на поверхню блоку	1-2	11	1,45	4,5 ± 0,8
Контроль (без обробки)	3-4	53	3,40	2,9 ± 0,8

Випробування бактеріальних препаратів має ряд особливостей, які залежать від їх форми. Препарати, що мають дієвим компонентом тільки кристали та токсини повинні наноситися у великій кількості і бути доступними для поїдання личинками, що не завжди можна здійснити (личинки на поверхні субстрату не перебувають, вони заглиблюються в субстрат на 2–3 см).

Отже проведені випробування запропонованих методик експрес-оцінки інсектицидної дії та оцінки метатоксичної дії бактеріальних препаратів на грибно комарика (брадисій) та постановка пілотних і виробничих випробувань показали доцільність їх використання для розробки та визначення ефективності біологічних препаратів як у лабораторних так і виробничих умовах.

*Робота виконана за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (проекти ДБ 421 та М/64-2008).*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Багаєва О.С., Ужєвская С.Ф., Кривицькая Т.Н., Непом'яща Н.Н., Бобрєшова Н.С., Бєляєва Т.А., Багаєв А.К., Ракитская С.И., Іваниця В.А. Микробиологическая защита вешенки от личинок грибных комариков // Информационный бюллетень ВПРС МОББ, Киев: Колобіг, 2009. — № 39. — С. 12–16.



2. *Кандыбин Н.В.* Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. — М.: Агропромиздат, 1989. — 167 с.

3. *Прищепя Л. И., Кондратенко Т. П.* Методика выявления и учета фитофагов из отряда двукрылых (Сем. *Sciaridae*, *Psychodidae*, *Ephydriidae*): Методическое пособие. — Беларусь, Институт защиты растений, 2009. — 20 с.

4. *Методики* випробування і застосування пестицидів // С.О. Трибель, Д.Д. Сігарьова, М.П. Секун, О.О. Іващенко та ін. За ред. проф. С.О. Трибеля. — К.: Світ. — 2001. — 448 с.

5. *Дядечко М.П., Падій М.М.* Біологічний захист рослин. — Біла Церква, 2001. — 12 с.

6. *Непомяца Н.М., Ужєвська С.П.* Грибний комарик *Bradysia pilistriata* Frey (*Sciaridae*) — основний шкідник гливи на Одещині// Карантин і захист рослин. — 2010. — № 11. — С. 18–20.

7. *Основы* биотехнологии высших грибов: Учебное пособие./ *Н.А. Заикина, А.Е. Коваленко, В.А. Галынкин, Ю.Т. Дьяков, А.Д. Тищенко.* — СПб.: Проспект Науки, 2007. — 336 с.

8. *Руководство* к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. // *Методы общей бактериологии.* — М.: Изд-во МГУ, 1995. — 221 с.

9. *Гар К.А.* Методы испытания токсичности и эффективности инсектицидов. Ред Э.Э. Савдарг М: Изд сельскохозяйственной литературы, журналов и плакатов., 1963. — 288 с.

10. *Патогены* насекомых: структурные и функциональные аспекты/ Отв ред. Глухов В.В. — М.: Круглый год, 2001. — 736 с.

11. *Гиляров М.С., Стриганова Б.А.* Количественные методы в почвенной зоологии. — М.: Наука, 1987. — 288 с.

12. *Фурсов В.Н.* Как собирать насекомых-энтомофагов (сбор, содержание и выведение паразитических перепончатокрылых насекомых), Киев: Изд-во Логос, 2003. — Отд. Изд. № 1. — 66 с.

**В.А. Иваниця, Н.Н. Непом'яща, С.Ф. Ужєвская, О.С. Багаева,  
Т.Н. Кривицькая, Н.С. Бобрєшова**

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

## **МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭНТОМОЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЛИЧИНОК ГРИБНЫХ КОМАРИКОВ (SCIARIDAE)**

### **Реферат**

Описано методики экспресс-оценки энтомоцидного воздействия и оценки метатоксического действия бактериальных препаратов на грибного комарика (*Sciaridae*) — основного вредителя съедобных грибов (вешенки и шампиньонов) и постановки пилотных и производственных испытаний. Показана целесообразность их применения для разработки и определения эффективности микробных препаратов как в лабораторных так и производственных условиях.

**Ключевые слова:** энтомоцидная активность, бактериальные препараты, грибной комарик *Bradisia pilisriata*, методика.

**V. Ivanytsia, N. Nepomiashcha, S. Uzhevskya, O. Bagaeva,  
T. Kryvytska, N. Bobreshova**

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

## **METHODS FOR THE STUDY OF MICROBIAL ENTOMOCIDE ACTIVITY AGAINST FUNGOUS MIDGE LARVAE (SCIARIDAE)**

### **Summary**

Express methods of entomocide effect estimation and methods for the evaluation of metatoxic effect of bacterial preparations against fungous midges (*Sciaridae*) — the main pest of edible mushrooms (pleurotus and champignons) — were described. Methods of pilot and industrial tests were elucidated. The expediency of their use in active strains selection and in development of entomopathogenic microbial preparations and estimation of their effectiveness was shown both under laboratory and production conditions.

**Key words:** entomocide activity, bacterial preparations, fungous midge *Bradisia pilisriata*, method.



АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ  
У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2010 РОЦІ

ALPHABETIC INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL  
«MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY» IN 2010 YEAR

Автори	№ вип.	№ стор.
Авдєєва Л.В. див. Балко О.І.	2	51
Авдєєва Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Синтез гідролітичних ферментів у бацил в залежності від складу поживного середовища	1	44
Авдєєва Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Ліполітична активність бактерій роду <i>Vacillus</i>	3	41
Авдєєва Л.В., Осадча А.І., Сафронова Л.А., Іляш В.М., Хархота М.А. Пектолітична активність бактерій роду <i>Vacillus</i>	3	71
Авдєєва Л.В., Осадча А.І., Хархота М.А. Біосинтез целюлаз пробіотичними штамми <i>Vacillus subtilis</i> при сумісному культивуванні	4	80
Бабенко Л.А., Скоробогатов О.Ю., Дубровський О.Л., Корнелюк О.І. Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)pLysE	3	21
Багаєва О.С. див. Іваниця В.О.	4	96
Багаєва О.С. див. Кривицька Т.М.	3	86
Балко О.І., Кіпріанова О.А., Коваленко О.Г., Шепелевич В.В., Авдєєва Л.В. Антифітовірусна активність біопрепарату гаупсин	2	51
Балута І.М. див. Дьяченко А.Г.	4	26
Бега З.Т. див. Чуйко Н.В.	2	43
Білявська Л.О. див. Копилов Є.П.	1	80
Бобрешова Н.С. див. Іваниця В.О.	4	96
Бондар О.С. див. Приходько С.В.	3	79
Борзова Н.В., Варбанець Л.Д. Дослідження термоінактивації А-галактозидази <i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	30
Бруне Ж. див. Мошинець О.В.	4	44
Булашенко Л.В. див. Чуйко Н.В.	2	43
Варбанець Л.Д. див. Борзова Н.В.	1	30
Вертикова О.К. див. Левицький А.П.	2	6
Вінніков А.І. див. Лаврентьєва К.В.	1	68
Віт В.В. див. Левицький А.П.	2	67
Водзінська Н.С. див. Філіпова Т.О.	4	58
Водзінський С.В. див. Галкін М.Б.	3	51
Волянський А.Ю. див. Дьяченко А.Г.	4	26
Вострова Л.М. див. Русакова М.Ю.	1	88



Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Гаврик А.Г. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Галкін Б.М. див. Малярчик І.О.</i>	3	32
<i>Галкін Б.М. див. Русакова М.Ю.</i>	1	88
<i>Галкін Б.М. див. Степанова Т.Ю.</i>	1	73
<i>Галкін Б.М. див. Філіпова Т.О.</i>	4	58
<i>Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Цитохроми Р-450: I. Загальні і еволюційні аспекти</i>	3	8
<i>Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Іваниця В.О. Бактеріальні цитохроми Р-450: II. Структура і функції</i>	4	8
<i>Галкін М.Б. див. Філіпова Т.О.</i>	4	58
<i>Галкін М.Б., Водзінський С.В., Кириченко Г.М., Іваниця В.О. Особливості формування біоплівки <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 при темновому та фотоіндукованому впливі вісмут-містких порфіринів</i>	3	51
<i>Гнатуш С.О. див. Кушкевич І.В.</i>	3	61
<i>Головіна І.В. див. Сухарев Ю.С.</i>	4	90
<i>Голубець О.В. див. Копилов С.П.</i>	1	80
<i>Горішний М.Б. див. Левицька О.В.</i>	1	53
<i>Гренадьорова М.В. див. Русакова М.Ю.</i>	1	88
<i>Гудзь С.П. див. Левицька О.В.</i>	1	53
<i>Гужвинська С.О. див. Сухарев Ю.С.</i>	4	90
<i>Данилова А.О. див. Страшнова І.В.</i>	2	81
<i>Дем'янова А.А. див. Дьяченко А.Г.</i>	4	26
<i>Демченко А.М. див. Ткачук Н.В.</i>	4	72
<i>Демченко Н.Р. див. Ткачук Н.В.</i>	2	75
<i>Дубровський О.Л. див. Бабенко Л.А.</i>	3	21
<i>Дуденко Ю.Ю. див. Страшнова І.В.</i>	2	81
<i>Дьяченко А.Г., Дем'янова А.А., Балута І.М., Кучма І.Ю., Леізін В.В., Волянський А.Ю. Фактори вірулентності сальмонел і патогенез сальмонельозної інфекції</i>	4	26
<i>Захарієва З.Є. див. Страшнова І.В.</i>	2	81
<i>Зінченко О.Ю. див. Філіпова Т.О.</i>	4	58
<i>Іваниця В.О. див. Галкін Б.М.</i>	4	8
<i>Іваниця В.О. див. Галкін М.Б.</i>	3	51
<i>Іваниця В.О. див. Кривицька Т.М.</i>	3	86
<i>Іваниця В.О. див. Ліманська Н.В.</i>	2	30
<i>Іваниця В.О. див. Страшнова І.В.</i>	2	81
<i>Іваниця В.О. див. Філіпова Т.О.</i>	4	58



Автори	№ вип.	№ стор.
Іваниця В.О., Непомяца Н.М., Ужєвська С.П., Багаєва О.С., Кривицька Т.М., Бобрешова Н.С. Методи оцінки ентомоцидної активності мікроорганізмів щодо личинок грибного комарика (Sciaridae)	4	96
Ляш В.М. див. Авдєєва Л.В.	1	44
Ляш В.М. див. Авдєєва Л.В.	3	41
Ляш В.М. див. Авдєєва Л.В.	3	71
Каракіс С.Г. Особливості регуляції амінокислотами активності аспартаткінази та гомосериндегідрогенази у мутантних штамів <i>Spirulina platensis</i> з надсинтезом метіоніну	1	23
Кириченко Г.М. див. Галкін М.Б.	3	51
Кіпріанова О.А. див. Балко О.І.	2	51
Коваленко О.Г. див. Балко О.І.	2	51
Копилов Є.П., Наджерничний С.П., Білявська Л.О., Голубець О.В. Індукування стійкості рослин пшениці ярої до збудників кореневих гнилей за сприяння ґрунтового сапрофітного гриба <i>Chaetomium cochliodes palliser</i>	1	80
Копитіна Н.І., Тарасюк І.В. Вищі морські гриби пелагіалі авандельти ріки Дунай	1	37
Корнелюк О.І. див. Бабенко Л.А.	3	21
Коробкова К.С., Панченко Л.П., Онищенко А.М., Остапчук А.М., Панюта О.О. Вплив мікоплазмової інфекції на жирнокислотний склад загальних ліпідів та морфологію клітин калюсів пшениці	1	62
Коробкова Т.П. див. Чернова Н.І.	1	6
Косаківська І.В. див. Мошинець О.В.	4	44
Кривицька Т.М. див. Іваниця В.О.	4	96
Кривицька Т.М., Багаєва О.С., Ужєвська С.П., Непомяца Н.М., Іваниця В.О. Характеристика штамів бактерій роду <i>Bacillus</i> з ларвіцидною активністю до грибних комариків <i>Bradysia pilistriata</i> frey (Sciaridae)	3	86
Кузнєцов В.О. Мікробіологічні дослідження професора О.А. Веріго (1837–1905) в Одеському (Новоросійському) університеті	3	95
Курдиш І.К. див. Чуйко Н.В.	2	43
Курмакова І.М. див. Приходько С.В.	3	79
Кучма І.Ю. див. Дьяченко А.Г.	4	26
Кушкевич І.В., Гнатуш С.О. Пігменти фотосинтезувальних зелених сіркобактерій <i>Chlorobium limicola</i> Ya-2002 за впливу солей важких металів	3	61
Лаврентьєва К.В., Черевач Н.В., Вінніков А.І. Здатність ґрунтових фосфатмобілізуєчих бактерій до колонізації коренів пшениці	1	68
Левицька О.В., Горішній М.Б., Гудзь С.П. Взаємозв'язок азотного живлення та утворення глікогену в клітинах <i>Chlorobium limicola</i>	1	53

Автори	№ вип.	№ стор.
Левицький А.П., Вертикова О.К., Селіванська І.О. Хлорогенова кислота: біохімія і фізіологія	2	6
Левицький А.П., Віт В.В., Цисельський Ю.В., Селіванська І.О. Вплив ліпополісахариду <i>Escherichia coli</i> на ступінь кишкового дисбіозу та на стан сітківки ока щурів	2	67
Леізін В.В. див. Дьяченко А.Г.	4	26
Ліманська Н.В., Іваниця В.О., Гаврик А.Г., Сергєєва Ж.Ю., Товкач Ф.І. Вплив бактеріоцинів <i>Rhizobium vitis</i> на експериментальне утворення пухлин у рослин	2	30
Малярчик І.О. див. Філіпова Т.О.	4	58
Малярчик І.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М. Утворення біоплівки <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> і <i>Pseudomonas aeruginosa</i> за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду	3	32
Мамєєва О.Г., Остапчук А.М., Підгорський В.С. Синтез 2-фенілетанолу та етанолу дріжджами <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	14
Мошинець О.В., Бруне Ж., Римар С.Ю., Косаківська І.В., Потерс Г. Виділення та ідентифікація ендоефітних бактерій із рослин бамбука ( <i>Phyllostachys</i> і <i>Fargesia</i> )	4	44
Надкерничний С.П. див. Копилов Є.П.	1	80
Непомяца Н.М. див. Іваниця В.О.	4	96
Непомяца Н.М. див. Кривицька Т.М.	3	86
Нікітін А.О. див. Філіпова Т.О.	4	58
Онищенко А.М. див. Коробкова К.С.	1	62
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	1	44
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	3	41
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	3	71
Осадча А.І. див. Авдєєва Л.В.	4	80
Остапчук А.М. див. Коробкова К.С.	1	62
Остапчук А.М. див. Мамєєва О.Г.	1	14
Панченко Л.П. див. Коробкова К.С.	1	62
Панюта О.О. див. Коробкова К.С.	1	62
Підгорський В.С. див. Мамєєва О.Г.	1	14
Підгорський В.С. див. Янева О.Д.	2	22
Позур В.В. Особливості дозрівання дендритних клітин під впливом тейхоєвої кислоти <i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46 <i>in vitro</i>	4	66
Поліщук В.П. див. Удовиченко К.М.	2	37
Потебня Г.П. див. Танасієнко О.А.	2	59





Автори	№ вип.	№ стор.
Потерс Г. див. Мошинець О.В.	4	44
Приходько С.В., Бондар О.С., Курмакова І.М., Третьяк О.П. Ріст корозійно небезпечних бактерій за присутності пестициду 2,4-Д	3	79
Римар С.Ю. див. Мошинець О.В.	4	44
Рудик М.П. див. Танасієнко О.А.	2	59
Русакова М.Ю. див. Філіпова Т.О.	4	58
Русакова М.Ю., Галкін Б.М., Вострова Л.М., Філіпова Т.О., Гренадьорова М.В. Активність ізатинового гідразида феноксіоцтової кислоти щодо деяких штамів <i>Fusarium spp.</i>	1	88
Сафронова Л.А. див. Авдєєва Л.В.	1	44
Сафронова Л.А. див. Авдєєва Л.В.	3	41
Сафронова Л.А. див. Авдєєва Л.В.	3	71
Селіванська І.О. див. Левицький А.П.	2	6
Селіванська І.О. див. Левицький А.П.	2	67
Сергєєва Ж.Ю. див. Ліманська Н.В.	2	30
Скоробогатов О.Ю. див. Бабенко Л.А.	3	21
Смирнова Г.Ф. див. Янева О.Д.	2	22
Степанова Т.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б.М. Вплив тілорону на вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у мишей з експериментальним алергічним енцефаломієлітом	1	73
Страшнова І.В., Захарієва З.Є., Дуденко Ю.Ю., Данилова А.О., Іваниця В.О. Вплив харчових волокон на мікробіоту товстої кишки у щурів з алоксановим діабетом	2	81
Сухарєв С.Ю. див. Сухарєв Ю.С.	4	90
Сухарєв Ю.С., Гужвинська С.О., Сухарєв С.Ю., Головіна І.В. Спосіб імунобіосенсорного визначення ентеротоксинів <i>Escherichia coli</i>	4	90
Танасієнко О.А., Рудик М.П., Тітова Г.П., Потебня Г.П. Індукція протипухлинної резистентності у мишей цитотоксичним лектином бактеріального походження	2	59
Тарасюк І.В. див. Копитіна Н.І.	1	37
Тітова Г.П. див. Танасієнко О.А.	2	59
Ткачук Н.В., Демченко Н.Р. Антибактеріальна дія четвертинних солей триазолоазепінію щодо амоніфікувальних бактерій корозійно-небезпечного угруповання	2	75
Ткачук Н.В., Янченко В.О., Демченко А.М. Чутливість сульфатвідновлювальних та амоніфікувальних бактерій до похідних 4-аміно-3,5-диметил-4Н-1,2,4-триазолію	4	72
Товкач Ф.І. див. Ліманська Н.В.	2	30
Третьяк О.П. див. Приходько С.В.	3	79
Тряпціцина Н.В. див. Удовиченко К.М.	2	37

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Удовиченко В.М.</i> див. <i>Удовиченко К.М.</i>	2	37
<i>Удовиченко К.М., Тряпичина Н.В., Удовиченко В.М., Поліщук В.П.</i> Поширення вірусів у насадженнях груші деяких регіонів України	2	37
<i>Ужєвська С.П.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	4	96
<i>Ужєвська С.П.</i> див. <i>Кривицька Т.М.</i>	3	86
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Галкін Б.М.</i>	3	8
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Галкін Б.М.</i>	4	8
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Малярчик І.О.</i>	3	32
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Русакова М.Ю.</i>	1	88
<i>Філіпова Т.О.</i> див. <i>Степанова Т.Ю.</i>	1	73
<i>Філіпова Т.О., Іваниця В.О., Галкін Б.М., Водзінська Н.С., Галкін М.Б., Зінченко О.Ю., Малярчик І.О., Нікітін А.О., Русакова М.Ю.</i> Вміст про- і протизапальних цитокінів в організмі мишей після введення препарату бактеріофага <i>Staphylococcus aureus</i>	4	58
<i>Хархота М.А.</i> див. <i>Авдєєва Л.В.</i>	1	44
<i>Хархота М.А.</i> див. <i>Авдєєва Л.В.</i>	3	41
<i>Хархота М.А.</i> див. <i>Авдєєва Л.В.</i>	3	71
<i>Хархота М.А.</i> див. <i>Авдєєва Л.В.</i>	4	80
<i>Цисельський Ю.В.</i> див. <i>Левіцький А.П.</i>	2	67
<i>Черевач Н.В.</i> див. <i>Лаврентьєва К.В.</i>	1	68
<i>Чернова Н.І., Коробкова Т.П.</i> Сучасний стан та перспективи використання мікроводоростей для енергетичних цілей	1	6
<i>Чуйко Н.В., Бега З.Т., Булавенко Л.В., Курдиш І.К.</i> Вплив бактеріального препарату комплексної дії на ріст декоративних рослин	2	43
<i>Шепелевич В.В.</i> див. <i>Балко О.І.</i>	2	51
<i>Янева О.Д., Смирнова Г.Ф., Підгорський В.С.</i> Акумуляція та ефлюкс іонів міді та кадмію штамми <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	22
<i>Янченко В.О.</i> див. <i>Ткачук Н.В.</i>	4	72



## ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

**Рубрики журналу:** “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 на дискеті або дискві (Word, шрифт Times New Roman, кегль 14, інтервал автоматичний, не більше 30 рядків на сторінці, поля по 2 см).

**При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:**

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

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

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



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

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

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

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

## ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ

### На книги

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

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

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

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

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

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

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

### На журнальні статті

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

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

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

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



**На тези доповідей**

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

**На депоновані наукові роботи**

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

**На стандарти**

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

**На автореферати дисертацій**

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



## INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

**Languages:** Ukrainian, Russian, English.

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

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

#### **Article appearance:**

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

The following articles are accepted:

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



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

### Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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





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

### Books

*Bergeys Manual of Systematic Bacteriology.* — 9<sup>th</sup> ed. — Baltimore; London, 1986. — Vol. 2. — 1599 p.

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

### Journals

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

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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



*Наукове видання*

**«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»**

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

Підп. до друку 23.12.2010 р. Формат 70x108/16.  
Гарн. Таймс. Тираж 300 прим.

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