

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
Microbiology & Biotechnology

№ 1(9)
2010

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 1



2010

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsya

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. Ivanytsya, T.O. Filipova

Accepted for publishing articles are reviewed

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

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

PUBLISHERS

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

A d d r e s s:

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

www.mbt.onu.edu.ua

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 1



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. Капрельянц, О.А. Кіпріанова, Н.К. Коваленко, І.К. Курдиш, Б.П. Мацелюх, Б.Н. Мілкус, 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

Наукові редактори випуску В.О. Іваниця, Т.О. Філіпова

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

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2010

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- N.I. Chernova, T.P. Korobkova**
MICROALGAE AS SOURCE OF ENERGY: CURRENT SITUATION AND PERSPECTIVES OF USE..... 14
- ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ
- O.G. Mameeva, A.M. Ostapchuk, V.S. Podgorsky**
THE 2-PHENYLETHANOL AND ETHANOL PRODUCTION BY YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 14
- S.G. Karakis**
PECULIARITIES OF ASPARTATE KINASE AND HOMOSERINE DEHYDROGENASE ACTIVITIES REGULATION BY AMINO ACIDS IN *SPIRULINA PLATENSIS* MUTANT STRAINS WITH METHIONINE SUPER SYNTHESIS 23
- N.V. Borzova, L.D. Varbanets**
STUDY OF THERMAL INACTIVATION *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES* α -GALACTOSIDASE 30
- N.I. Kopytina, I.V. Tarasyuk**
AQUATIC FUNGI OF THE WATER COLUMN OF THE DANUBE RIVER AVANDELTA 37
- L.V. Avdeeva, A.I. Osadcha, L.A. Safronova, V.M. Ilyash, M.A. Kharkhota**
SYNTHESIS OF HYDROLYTIC BACILLI ENZYMES DEPENDING ON NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION 44
- O.V. Levytska, M.B. Gorishniy, S.P. Gudz**
INTERRELATION OF NITROGEN NUTRITION AND GLYCOGEN ACCUMULATION IN THE CELLS OF *CHLOROBBIUM LIMICOLA* 53
- K.S. Korobkova, L.P. Panchenko, A.M. Onischenko, A.M. Ostapchuk, O.O. Panuta**
MYCOPLASMA INFECTION EFFECT TO FATTY ACID COMPOSITION OF COMMON LIPIDS AND TO WHEAT CALLUS CELLS MORPHOLOGY..... 62
- K.V. Lavrentyeva, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov**
CAPABILITY OF SOIL PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIAL STRAINS TO COLONIZE WHEAT ROOTS 68
- T.Yu. Stepanova, T.O. Filipova, B.M. Galkin**
EFFECT OF TILORONE ON MAIN LYMPHOCYTE POPULATIONS AND SUB-POPULATIONS IN MICE WITH EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS 73
- E.P. Kopylov, S.P. Nadkernychny, L.O. Belavskaya, O.V. Golubets**
THE INDUCTION OF SPRING WHEAT RESISTANCE TO ROOT ROTS AGENTS UNDER THE INFLUENCE OF FUNGUS *CHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISER 80
- M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, L.M. Vostrova, T.O. Filipova, M.V. Grenaderova**
THE ISATIN PHENOXYACETIC ACID HYDRAZIDE ACTIVITY RELATIVELY TO SOME *FUSARIUM SPP.* STRAINS 88
- INSTRUCTIONS TO AUTHORS 98

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Н.І. Чернова, Т.П. Коробкова

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ
МІКРОВОДОРОСТЕЙ ДЛЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ЦІЛЕЙ..... 6

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

О.Г. Мамєєва, А.М. Остапчук, В.С. Підгорський

СИНТЕЗ 2-ФЕНІЛЕТАНОЛУ ТА ЕТАНОЛУ ДРІЖДЖАМИ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE 14

С.Г. Каракіс

ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ АМІНОКИСЛОТАМИ АКТИВНОСТІ
АСПАРТАТКІНАЗИ ТА ГОМОСЕРИНДЕГІДРОГЕНАЗИ У МУТАНТНИХ
ШТАМІВ *SPIRULINA PLATENSIS* З НАДСИНТЕЗОМ МЕПІОНІНУ 23

Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанець

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРМОІНАКТИВАЦІЇ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ
CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES..... 30

Н.І. Копитіна, І.В. Тарасюк

ВИЩІ МОРСЬКІ ГРИБИ ПЕЛАГІАЛІ АВАНДЕЛЬТИ РІКИ ДУНАЙ..... 37

Л.В. Авдєєва, А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, В.М. Іляш, М.А. Хархота

СИНТЕЗ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У БАЦИЛ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД
СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА..... 44

О.В. Левицька, М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ ТА УТВОРЕННЯ ГЛІКОГЕНУ
В КЛІТИНАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA*..... 53

**К.С. Коробкова, Л.П. Панченко, А.М. Онищенко, А.М. Остапчук,
О.О. Панюта**

ВПЛИВ МІКОПЛАЗМОВОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД
ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ ТА МОРФОЛОГІЮ КЛІТИН КАЛЮСІВ ПШЕНИЦІ 62

К.В. Лаврентьєва, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков

ЗДАТНІСТЬ ҐРУНТОВИХ ФОСФАТМОБІЛІЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ
ДО КОЛОНІЗАЦІЇ КОРЕНІВ ПШЕНИЦІ 68

Т.Ю. Степанова, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін

ВПЛИВ ТІЛОРОНУ НА ВМІСТ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ТА
СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ У МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ
АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТОМ 73

Є.П. Копилов, С.П. Надкерничний, Л.О. Білявська, О.В. Голубець

ІНДУКУВАННЯ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ДО ЗБУДНИКІВ
КОРЕНЕВИХ ГНИЛЕЙ ЗА СПРИЯННЯ ГРИБА *SNAETOMIVM COCHLIODES*
PALLISER 80

**М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Л.М. Вострова, Т.О. Філіпова,
М.В. Гренадьорова**

АКТИВНІСТЬ ІЗАТИНОВОГО ГІДРАЗИДА ФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ
ЩОДО ДЕЯКИХ ШТАМІВ *FUSARIUM SPP.* 88

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 94

УДК: 620.95.504.7

Н.И. Чернова, Т.П. Коробкова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1, Москва, 119991, ГСП-1, Россия,
тел.: +7 (495) 939 42 57, e-mail: rsemsu@mail.ru

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

В статье представлен обзор литературных данных, касающихся нетрадиционного вида сырья для целей биоэнергетики – микроводорослей как источника биотоплива (метана, биоводорода, биодизеля и жидких углеводов). Рассмотрены преимущества использования микроводорослей как биотоплива второго поколения, высокая продуктивность и энергосодержание которых ставят их в фокус широких научных исследований. Проведен сравнительный анализ урожайности масличных растений и микроводорослей. В силу высокой продуктивности микроводорослей по маслу, замена масличных культур на микроводорослевые позволит сократить необходимые площади от 50 до 100 раз, причем, с использованием земель, непригодных для растениеводства. Рассмотрены спектр микроводорослей – продуцентов масла и жидких углеводов, технологии их выращивания и способы переработки биомассы.

К л ю ч е в ы е с л о в а : биоэнергетика, биотехнологии, биотопливо, липиды, биомасса микроводорослей.

В последние годы ускоренное развитие биоэнергетики стало глобальной общемировой тенденцией. Более 100 ведущих фирм из 17 стран мира занимаются исследованиями, разработкой технологий, проектированием и инжинирингом объектов для биотопливной промышленности и производством возобновляемого топлива. Использование биотоплива позволяет решать как экономические, так и экологические проблемы: замещение ископаемых ресурсов, диверсификация источников энергии для обеспечения энергетической безопасности стран-импортеров, дополнительное производство в аграрном секторе экономики конкурентоспособной экспортной продукции, сокращение эмиссии парниковых газов в атмосферу. В большинстве развитых стран наблюдается тенденция увеличения потребления биотоплива. Темпы роста производства различных видов жидких биотоплив составляют в мире, по разным оценкам, 20–40% в год. В странах ЕС к 2010 г. их доля в общем потреблении нефтяного топлива должна достигнуть 5,75% [2]. Мировая биотопливная промышленность переходит в стадию состоявшейся быстрорастущей отрасли, которая привлекает все больше внимания и денег со стороны «традиционных» топливных игроков, инвесторов и государств. Объем инвестиций в эту

© Н.И. Чернова, Т.П. Коробкова, 2010



отрасль, например, в США достиг за последние 10 лет 150 млрд. дол. [6]. До недавнего времени сырьем для производства биотоплива служили зерновые и масличные культуры (биотопливо 1-го поколения), что в результате привело к противоречивому отношению к биоэнергетике как масштабному потребителю пищевых ресурсов. Это дало стимул к разработке биотоплива из непищевого сырья: лигноцеллюлозы древесных и сельскохозяйственных отходов и др. Так, Европейский Союз принял поправки в программы по биотопливу, увеличив обязательную долю биотоплива из непищевого сырья. Идут активные поисковые работы в области получения такого биотоплива, которое названо «биотопливом второго поколения».

В качестве альтернативы традиционным энергетическим культурам могут выступать фотосинтезирующие микроводоросли — перспективные источники различных видов возобновляемого биотоплива: метана при анаэробном сбраживании, водородорода, биоэтанола, биодизеля из водородоролевого масла, углеводов из микроводоросли *Botryococcus braunii*, из которых были получены 65% бензина, 15% авиационного топлива, 18% дизеля, 2% мазута [14].

Биомасса микроводорослей отвечает большинству предъявляемых к растительному энергетическому сырью требованиям.

Водоросли — фотоавтотрофы. Им для роста и развития нужен солнечный свет, CO₂, вода с небольшим количеством минеральных солей.

Продуктивность микроводорослей по биомассе и маслу на порядки превышает продуктивность наземных растений. Так, например, в некоторых видах водорослей при оптимальных условиях культивирования содержание липидов превышает таковое в масличных растениях: у *Scenedesmus dimorphus* содержание липидов составляет 16–40%, у *Prymnesium parvum* — 22–38%, *Euglena gracilis* — 14–20%, *Chlorella vulgaris* — 14–22%, *Dunaliella salina* — 16–44%, *Haematococcus pluvialis* — 25–45%, *Tetraselmis suecica* — 20–30%, *Isochrysis galbana* — 22–38%, *Nannochloropsis sp.* — 33–38%, *Stichococcus sp.* — 40–59%, а у *Botryococcus braunii* — до 80%, при этом площади их выращивания значительно сокращаются по сравнению, например, с рапсом в 50–100 раз (табл. 1) [11].

Таблица

Сравнительная оценка источников сырья для производства биодизеля*

Table

The comparative value of the crude sources for biodiesel production

Культура	Урожай масла, л/га	Площадь, необходимая для производства масла (· 10 ⁶ га)**
Кукуруза	172	1540
Соя	446	594
Канола	1190	223
Ятрофа	1892	140
Кокосовый орех	2689	99
Пальмовое масло	5950	45
Микроводоросли (30%)***	58 700	4,5
Микроводоросли (70%)****	136 900	2

* Данные получены в экспериментах по выращиванию микроводорослей на площади 5681 м² в Новой Зеландии

** Для замены 50% всего транспортного топлива в США

*** 30% масла (от биомассы по сухому весу)

**** 70% масла (от биомассы по сухому весу)



Для выращивания водорослей не требуются пахотные земли, плантации можно размещать на поверхности водоемов или на непригодных для земледелия почвах (засоленных, пустынных и др.).

- Плантации микроводорослей могут служить эффективным стоком CO_2 , при этом водоросли конвертируют его в жидкую форму энергии высокой плотности.
- Водоросли требуют намного меньше воды, чем традиционные зерновые культуры. Их можно выращивать и в соленой воде, и на сточных водах, ослабляя давление на ресурсы чистой воды.
- Микроводоросли не являются традиционным пищевым сырьем.
- Одним из возможных путей сокращения стоимости биотоплива из микроводорослей является получение ценных сопутствующих продуктов из них для химической, фармацевтической, медицинской, пищевой, кормовой промышленности (бета-каротин, астаксантин, фикоцианин, хлорофилл, глицерин и т.д.) и использование в технологиях выращивания отходов других производств.
- При существующих в мире технологиях становится возможным крупномасштабное выращивание биомассы микроводорослей круглогодично не только в условиях тропического и субтропического климата, но и в климатических условиях, например, штата Монтана, где температура зимой опускается до $-18\text{ }^\circ\text{C}$ [12].
- Использование микроводорослей в качестве сырья для энергетики способствует диверсификации энергетических источников.

Широкий фронт научно-исследовательских и инженерных разработок направлен на решение главных задач производства микроводорослевого биотоплива. В основе его лежит промышленная культура микроводоросли, которая должна обладать способностью быстро расти, синтезировать и аккумулировать значительные количества липидов в виде триацилглицеридов и жидких углеводов. В связи с этим ведется поиск в природных популяциях микроводорослей, отвечающих этим требованиям. Установлено, что наиболее перспективными являются представители зеленых и диатомовых микроводорослей, причем наивысший уровень триацилглицеридов (ТАГ) (40–60%) обнаружен у последних. Следует отметить, что помимо ТАГ водоросли могут продуцировать углеводороды, аналогичные ископаемым. В настоящее время известны только две культуры микроводорослей, образующие жидкие углеводороды: *Botryococcus braunii* и недавно выделенный японскими учеными штамм *Pseudochorocystis ellipsoidea* [16]. Решением SERI\NREI (Solar Energy Research Institute\ National Renewable Energy Laboratory, US) создана коллекция микроводорослей в рамках программы **Aquatic Species Program**, являющаяся ценным генетическим ресурсом. Эта первая коллекция микроводорослей из пресных и соленых водоемов находится в Университете на Гавайях и доступна для исследователей [20].

Помимо активного поиска микроводорослей-продуцентов липидов в природе проводится создание новых штаммов микроводорослей путем мутагенеза и методами геной инженерии, отвечающих основным требованиям промышленного производства — повышению продуктивности по биомассе и липидам.

Увеличение эффективности фотосинтеза и оптимизация процесса биосинтеза липидов являются задачами многих исследовательских программ. Известно, что во-



доросли могут эффективно использовать до 10% от полного солнечного света. Сверх этого уровня солнечная энергия не используется и, более того, может повредить фотосинтетический аппарат, вызывая фотоингибирование. Одна из возможностей повышения — мутации или геновая инженерия. Это позволит фотосинтетическому аппарату усваивать только такое количество света, которое он может использовать, а результатом будет снижение потерь, уменьшение опасности фотоокисления в фотосинтетическом реакционном центре и увеличение сверхпродукции водорослевой культуры. В работе Melis A. с соавт. [18] продемонстрирована возможность получения высокой эффективности и высокого уровня светового насыщения для водорослевых культур.

Чтобы избежать проблем культивирования микроводорослей, связанных с освещенностью, в промышленном масштабе исследователи пошли по пути создания гетеротрофных штаммов водорослей из облигатных фотоавтотрофов. Введение в микроводоросль *Phaeodactylum tricornutum* гена, отвечающего за транспорт глюкозы, позволило ей утилизировать экзогенный органический углерод и расти вне зависимости от света. Это первая успешная трофическая конверсия облигатного фотоавтотрофа путем метаболической инженерии, показавшая, что способ клеточного питания может быть фундаментально изменен интродукцией одного гена [10]. Китайскими исследователями запатентован способ получения биодизеля с использованием гетеротрофной хлореллы *Chlorella kessleri*, обеспечивающий высокую продуктивность по биомассе и по содержанию масла — 108 г/л и 52%, соответственно [19]. Для сокращения расходов по производству водорослевого биодизеля за счет уменьшения размеров инфраструктуры для выращивания, облегчения сбора биомассы водоросли и выделения масла компания SOLAZYME, US также работает над получением генетически модифицированных штаммов водорослей с гетеротрофным типом питания. Использование гетеротрофных штаммов микроводорослей снимает вопросы освещенности культуры при выращивании, но ставит проблему применения углеводов для их питания [5].

Значительный прогресс достигнут исследователями в понимании того, как происходит накопление липидов в микроводорослях [15]. Было установлено, что при выращивании диатомовых водорослей нехватка кремния в питательной среде, который является главным компонентом клеточной стенки диатомей, может индуцировать синтез липидов. В зеленых водорослях синтез и аккумуляция липидов идет в условиях азотного голодания. Механизм, запускающий аккумуляцию липидов, до конца не ясен. Полагают, что недостаток питания может затрагивать такие специфические биохимические пути, как липидная аккумуляция, сопровождаемая увеличением запасных липидов (триацилглицеридов) по отношению к мембранным полярным липидам. Что касается диатомовых водорослей, то недостаток кремния в питательной среде увеличивает экспрессию, по крайней мере, одного гена, включенного в липидный синтез — ацетил-КоА-карбоксилазы. Ген, кодирующий продукцию этого фермента, был выделен и клонирован. Изоляция этих генов способствовала развитию систем переноса генов в диатомовых водорослях. Была показана возможность его сверхэкспрессии, что позволяет надеяться, что увеличение уровня активности ацетил-КоА-карбоксидазы в клетке приведет к росту продуктивности масла в водорослях [20].

Для реализации биосинтетических возможностей природных и реконструированных штаммов микроводорослей-автотрофов используются два способа



культивирования: в фотобиореакторах (ФБР) — закрытый способ — и в открытых культиваторах. ФБР обеспечивают контролируемые условия и высокий выход продукции, но дороги. Открытые пруды значительно дешевле, но легко подвергаются контаминации и только три вида водорослей оказались способными к широкомасштабному культивированию. Гибридная система для выращивания объединяет все преимущества ФБР и открытых культиваторов, избегая их недостатков. Так, в 1997—2001 гг. на Гавайях осуществлено успешное крупномасштабное культивирование зеленой микроводоросли *Haematococcus pluvialis* с применением гибридной системы [15]. ФБР обеспечивают устойчивое культивирование водорослей, которые не могут расти в открытых культиваторах, обеспечивая непрерывную поставку высококачественного инокулюма в открытые пруды. Высокая скорость роста в открытых прудах позволяет за короткое время (1—2 дня) получить большую биомассу и помогает избежать заражения посторонней микрофлорой, а возникающий при этом лимит питательных веществ стимулирует биосинтез масла и пигмента астаксантина. Предложенная система непрерывного культивирования микроводоросли гематококкус состояла из закрытых трубчатых фотокультиваторов и открытых прудов общей площадью 2 га. Средняя энергопродуктивность биомассы *H. pluvialis* составила в этом проекте 763 ГДж/га/год при энергопродуктивности по маслу 422 ГДж/га/год. Максимальные же выходы составили 1836 ГДж/га/год (1014 ГДж/га/год), соответственно. Эти величины существенно больше, чем для наземной растительности, большая часть которой обеспечивает от 50 до 400 гДж/га/год. Проведенный нами сравнительный анализ продуктивности масличных культур (рапса) и микроводоросли *H. pluvialis* как сырья для биодизеля показал принципиальную возможность замены наземных растений микроводорослями для получения биотоплива. Установлено, что производство биотоплива из высших растений, эквивалентное $300 \cdot 10^{18}$ Дж/год, требует на порядки большую площадь пахотных земель, чем биомасса микроводорослей, причем для выращивания водорослей не нужна плодородная почва [9]. Оценки, проведенные по результатам данного проекта, показали, что стоимость биодизеля, произведенного из микроводоросли была близка к текущим ценам на минеральный дизель.

При использовании водорослей-продуцентов липидов с гетеротрофным типом питания будет полезен огромный опыт, накопленный микробиологической промышленностью при многотоннажном выращивании продуцентов различных биологически активных соединений.

Большое внимание уделяется удешевлению способов выделения и трансформации водорослевых масел. Избежать фильтрации биомассы и химической экстракции масла из нее помогает метод, предложенный компанией OriginOil, US и основанный на обработке водорослевой суспензии в переменном электромагнитном поле при изменении pH с помощью добавок CO_2 , что приводило к разрушению клеточной стенки водоросли и всплытию масла [4]. Метод, основанный на кислотном катализе [17], позволяет свести в одну стадию процесс выделения липидов из микроводорослей и получения биодизеля. Избежать гибели культуры при извлечении липидов возможно при использовании мезопористых наночастиц, которые экстрагируют масла из живых клеток водорослей; дальнейшее выделение масла происходит с использованием специально разработанного и запатентованного катализатора Catilin [13].



В последние годы инвестиции в водорослевые проекты активно растут: только в 2008 г. в США в них вложено свыше 300 млн. дол. Ведущие компании США планируют достичь коммерческих объемов производства водорослевого биотоплива в ближайшие 2–3 года (Solazyme – 100 млн. галлонов/год к 2012–2013 гг., PetroAlgae – 100 млн. галлонов/год к 2011г). Пессимистически относятся к этим заявлениям в European Algae Biomass Association, заявляя, что на коммерческий уровень производство водорослевого биотоплива выйдет не ранее, чем через 10–15 лет.

В лаборатории возобновляемых источников энергии географического факультета МГУ в течение последних 20 лет проводятся научно-исследовательские работы по крупномасштабному выращиванию биомассы микроводорослей в открытых плоскостных фотокультураторах как для целей энергетики, так и для комплексного использования в качестве кормовых и пищевых добавок. Изучаются вопросы систематики микроводорослей. Создается коллекция культур микроводорослей-продуцентов липидов. По нашему мнению первостепенной задачей является поиск в природных условиях штаммов, адаптированных к предполагаемым районам выращивания, в связи с чем, в частности, проводится поиск культур – представителей рода *Botryococcus* в водоемах Московской и Тверской областей. Выделены изоляты ботрикокка с целью уточнения их систематического положения, определения содержания в них углеводов и перспективности их использования в качестве сырья для получения биотоплива.

Анализ литературных данных и собственные работы по выделению культур из природных источников были положены в основу создания базы данных и формирования коллекции микроводорослей-продуцентов липидов лаборатории ВИЭ географического факультета МГУ [1, 3, 7, 8, 9].

Таким образом, моторные топлива можно создавать на основе нового поколения нетрадиционного сырья – биомассы микроводорослей. Следует отметить, что плантации микроводорослей одновременно будут служить эффективным стоком антропогенного CO₂, конвертируя его в энергию высокой плотности.

Использование микроводорослей для производства жидкого биотоплива становится бурно развивающейся отраслью, требующей инноваций для ускоренной коммерциализации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В.В., Лямин М.Я., Чернова Н.И. и др. Энергетические плантации // География, общество, окружающая среда. Т. III: Природные ресурсы и устойчивое развитие. М.: «Изд. дом «Городец». 2004. – С. 578–607.
2. Директива 2003/30/ЕС Европейского парламента и Союза от 8 мая 2003 г. «О содействии использованию биогорючего и других видов горючего на транспорте».
3. Коробкова Т.П., Чернова Н.И., Киселева С.В., Зайцев С.И. Штамм *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitl. 1/02-T/03-5 - продуцент белковой биомассы: Патент на изобретение РФ №2322489 // Б.И. 2008. № 11.
4. Официальный сайт фирмы OriginOil: <http://www.originoil.com/technology/low-cost-oil-extraction.html>.
5. Официальный сайт фирмы Solazyme: <http://www.solazyme.com>
6. Синицин А.П. Биотехнология производства биотоплив: «Точка невозврата пройдена»// Материалы международного конгресса «Биоэтанол-2009». Москва (15–16 апреля 2009 г.). <http://www.bioethanol.ru>



7. Чернова Н.И., Коробкова Т.П., Киселева С.В. Инновационные технологии биоэнергетики // Вестник Международной академии наук экологии и безопасности жизнедеятельности, С.-Пб., 2008а. — Т. 13, № 3. — С. 171–178.
8. Чернова Н.И., Киселева С.В. Использование микроводорослевых биотехнологий в решении проблем рационального природопользования // Инновационные технологии XXI века для рационального природопользования, экологии и устойчивого развития. М.: Ноосфера. 2004. — С. 205–217.
9. Чернова Н.И., Киселева С.В., Коробкова Т.П., Зайцев С.И. Микроводоросли в качестве сырья для получения биотоплива // Альтернативная энергетика и экология. 2008. — № 9. — С. 68–74.
10. Apt Kirk E. et al. Trophic conversion of obligate phototrophic algae through metabolic engineering: Patent EP1780283(A1). — 2007.
11. Chisti Y. Biodiesel from Microalgae // Biotechnology Advances. 2007. — Vol. 25. — P. 294–306.
12. Green star products complete. Algae demonstration report. <http://www.greenstarusa.com>
13. <http://www.nanowerk.com/news/newsid=9991/php>
14. Hillen L.W., Pollard G., Wake L.V., and White N. Hydrocracking of the oils of *Botryococcus braunii* to transport fuels // Biotechnol. Bioeng. 1982. — Vol. 24. — P. 193–205.
15. Huntley M., Redalje D. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal // Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change. 2007. — Vol. 12, — P. 573–608.
16. Kurano N. et al. Novel microalgae and process for producing hydrocarbon: Patent KR20070121051(A). 2007.
17. Machacek M.T., Smith T.G. Continuous algal biodiesel production facility: Patent WO 20090118230(A1). 2009.
18. Melis A., Neihardt J. and Benemann J. Dunaliella salina (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells // Journal of Applied Phycology. 1999. — Vol. 10. — P. 515–525.
19. Qingyu Wu, Wei Xiong. Method for producing biodiesel by autotrophic culture and heterotrophic culture of chlorella: Patent CN101280328 (A). 2008.
20. Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P.A. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program — Biodiesel from Algae, National Renewable Energy Institute. 1998. NREL/TP-580-24190, 328 pp.



Н.І. Чернова, Т.П. Коробкова

Московський державний університет імені М.В. Ломоносова,
Ленінські гори, 1, Москва, 119991, МСП-1, Росія
тел.: +7 (495) 939 42 57, e-mail: rsemsu@mail.ru

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ ДЛЯ ЕНЕРГЕТИЧНИХ ЦІЛЕЙ

Реферат

Стаття присвячена нетрадиційному виду сировини для цілей біоенергетики — мікрородоростям як джерелу біопалива (метану, біоводню, біодизелю та рідких вуглеводнів). Розглянуто переваги використання мікрородоростей як біопалива другого покоління, висока продуктивність та енерговміст яких ставлять їх у фокус широких наукових досліджень. Проведено порівняльний аналіз врожайності олійних рослин та мікрородоростей. У зв'язку з високою продуктивністю мікрородоростей по олії, заміна олійних культур на мікрородорості дозволить скоротити площі вирощування від 50 до 100 разів, з використанням земель, непридатних для рослинництва. Розглянуто спектр мікрородоростей-продуцентів олії та рідких вуглеводнів, технології їх вирощування та переробки біомаси.

Ключові слова: біоенергетика, біотехнології, біопаливо, ліпіди, біомаса мікрородоростей.

N.I. Chernova, T.P. Korobkova

Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory,
Moscow, 119991, GSP-1, Russia,
tel.: +7 (495) 939 42 57, e-mail: rsemsu@mail.ru

MICROALGAE AS SOURCE OF ENERGY: CURRENT SITUATION AND PERSPECTIVES OF USE

Summary

The article is devoted to alternative crude for bioenergy — microalgae as a source of biofuels (methane, biohydrogen, biodiesel and liquid hydrocarbons). There were considered the advantages of microalgae as biofuels-2 generation, its high productivity and energy content bring up these organisms to extensive research activities focus.

The comparative analysis of oil plants productivity and microalgae was carried out. As demonstrated here, oil productivity of many microalgae greatly exceeds the oil productivity of the best producing oil crops, so replacement of the plants by microalgae will allow to reduce cropland aimed for energy plantations by a factor of 50–100, at that there will be possible to use land resources unsuitable for plant cultivation. There are considered microalgae — oil and liquid hydrocarbons-producers, production methods and means of biomass converting.

Key words: bioenergy, biotechnology, biofuels, lipide, microalgae biomass.



УДК 663.12/.14:547.568.5_

O.G. Mameeva, A.M. Ostapchuk, V.S. Podgorsky

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU,
154, Zabolotnogo str., D03680, Kiev, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

THE 2-PHENYLETHANOL AND ETHANOL PRODUCTION BY YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

The present study is focused on the determination of the 2-phenylethanol and ethanol production with use of statistical analyses experiments combined with Box-Behnken design under the influence of sucrose, yeast extract and L-phenylalanine concentrations. The effect of each factor as well as their interactions was assessed by ANOVA technique. S. cerevisiae UCM Y-514 and UCM Y-524 produced the highest calculated adjusted level 1.21 g/l of 2-phenylethanol. Meanwhile, the level of ethanol reached 22.39 g/l. The regression equations derived from statistical analysis of three main effects and the models with multiple correlation coefficients were obtained.

Key words: S. cerevisiae, 2-phenylethanol, ethanol, optimization, statistical analysis.

Alcohol fermentation is a process used for formation of many different aroma compounds. High aromatic alcohols are responsible for the taste of beer and wines. They influence the flavours and quality of champagne and muscatel wines. One of the main commercially utilized higher aromatic alcohols that are produced by alcohol fermentation is 2-phenylethanol. Due to its strongly pronounced aroma of roses, this type of alcohol is widely used in the production of a variety of alcoholic beverages throughout the industry.

Various yeast including *Saccharomyces cerevisiae* [3, 5, 6, 12–14], *S. bayanus* [14], *Kluyveromyces marxianus* [4–6], *K. lactis* [8], *Pichia fermentans* [3, 4, 6, 7], *P. anomala*, *P. membranaefaciens* [5], *Candida utilis* [11], along with many others have been reported to be capable of producing 2-phenylethanol.

The genera *Saccharomyces* is able to produce significant amounts of 2-phenylethanol. For that reason, *Saccharomyces cerevisiae* is currently receiving attention as a yeast having a great prospect in development of biotechnological production of 2-phenylethanol. Previously, several groups of researchers have conducted series of experiments in 2-phenylethanol production with effects of sucrose and L-phenylalanine on yeast. *S. cerevisiae* DSMZ 70487 has been reported to be able to produce up to 0.34 g/l of 2-phenylethanol [5]; *S. cerevisiae* NCYC has been known to produce



1.5 g/l [1]; mutant *S. cerevisiae* is capable to result in 750 mg/l of 2-phenylethanol; *S. cerevisiae* K-9 was able to produce 1.3 g/l [4]. During the experiment, different cultivations parameters, such as precursor concentrations, cultivation temperature, initial pH and others were put under consideration. Though it has not been exactly established which of the three main effects has played the main role in the 2-phenylethanol and ethanol syntheses? It is well known that *Saccharomyces* yeast is Crabtree-positive. Consequently, the yeast can produce ethanol under aerobic conditions as a toxic by-product. Thus the knowledge of the bioconversion of L-phenylalanine to 2-phenylethanol with the usage of sucrose or glucose as carbon and energy sources is rather useful [4–7]. The estimation of the significant yeast extract concentrations in the production of the 2-phenylethanol and ethanol has been carried out only to a limited extent [7, 9].

The purpose of the present study is to determine the maximum levels of the 2-phenylethanol and ethanol production by yeast *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 using surface methodology combined with Box-Behnken design under the influence of sucrose, yeast extract and L-phenylalanine concentrations.

Materials and methods

Yeast strain and inoculum preparation. The yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 from the collection of yeasts (UCM) of the Industrial Microorganisms Physiology Department, Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev were used in this study.

The yeasts inoculums (10^6 - 10^7 cells/ml) were grown in a medium, containing (g/l): 80 sucrose, 7 L-phenylalanine, 22.8 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.3 citric acid, 0.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.17 Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, adjusted to pH 5.0. To optimize experiments we used yeast strains incubated at periodic culture in a different medium, containing 150 ml in different combination according to Box-Behnken experimental design: 0%, 9%, 18% sucrose and 0%, 0.75%, 1.5% yeast extract, 0 mg/l, 0.1 mg/l, 0.2 mg/l L-phenylalanine in 750 ml Erlenmeyer flasks for 26 h at 28–30 °C, adjusted to pH 5.0 with HCl and shaking at 240 rpm.

Biomass and medium pH determination. Growth of yeast biomass after cultivation was measured as optical density at 540 nm and recalculated as biomass dry weight. Medium pH was determined directly with pH meter (Model pH-150MA, Antex, Byelorussia). All data was standardized and carried out in triple frequency.

GC/MS analysis. The concentrations of 2-phenylethanol and ethanol in the medium were measured after filtrations by GC/MS analyses. Samples were filtered through 0.2 μm filters prior to GC/MS analyses (Agilent Technologies, USA). GC/MS analyses were performed on Agilent 6890N/5973 inert chromatograph / mass spectrometer (Agilent Technologies, USA) equipped with DB-FFAP capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm , J&W Scientific, USA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. The temperature program was as follows: 60 °C for 1 min and then increased to 220 °C at a rate 20 °C/min and held for 10 min. The temperature of injector was maintained at 250 °C. Detection was followed at SCAN rate. 2-phenylethanol and ethanol were identified by NIST 02 mass spectrum database and 2-phenylethanol and ethanol standard solution (Merck, Germany).

Statistical analysis. The conditions for biomass, 2-phenylethanol and ethanol syntheses were optimized with respect to sucrose (X_1), yeast extract (X_2) and L-



phenylalanine (X_3) concentrations using the Box-Behnkan experimental design with the software STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., 2001). This design determines the effect of a combination of process factors (X_1 , X_2 , X_3), each at three equidistant levels (-1, 0, +1) and their interactions on the response variable, which were the biomass yield (Y1), 2-phenylethanol (Y2) and ethanol (Y3) syntheses. In total, 15 combinations of factors were used. The analysis of variance technique was used to determine the significant difference at 95% confidence ($p \leq 0.05$) level. The effect of each factor and their interactions was assessed by ANOVA technique. The desirability function to get optimal biomass yield, 2-phenylethanol and ethanol syntheses were fitted by the least square method using the software. The 3D response graph and profile for predicted values and desirability level for factors were plotted using the software.

Results and discussion

The high aromatic alcohols are responsible for the taste of beer, white and muscatel wines, and also negatively influence the taste and quality of sparkling wines [11]. Our previous work has revealed that among sixteen *S. cerevisiae* yeast strains tested, two produce the highest yield of 2-phenylethanol. *S. cerevisiae* UCM Y-514 produced 0.11 g/l; 0.12 g/l was produced by *S. cerevisiae* UCM Y-524. Both were obtained from wine making. These strains are capable of achieving high product yields in different cultivation conditions [10].

Previously, neither reports on optimization of 2-phenylethanol and ethanol syntheses by yeast *S. cerevisiae* nor 2-phenylethanol production using surface methodology combined with Box-Behnken design for biomass growth has been done. For our experiments the regression coefficients for the main effects and their interactions were obtained by the regression analysis of the optimized experimental data to fit suitable regression equations for biomass yield, 2-phenylethanol and ethanol productions as a function of linear and quadratic effects of main factors and the linear-by-linear interaction effects with regression coefficients. The regression equations obtained were response variable biomass yield, 2-phenylethanol and ethanol productions for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524. The analyses regression equations showed the complicate nature of all interactions.

The regression equations obtained for *S. cerevisiae* UCM Y-514 were

$$Y(1) = 1.63 + 0.22 \cdot X_1 + 0.14 \cdot X_1^2 + 0.33 \cdot X_2 + 0.17 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0.17 \cdot X_1^2 \cdot X_2$$

$$R^2: 0.99668 \quad (1),$$

$$Y(2) = 0.22 - 0.26 \cdot X_1 - 0.15 \cdot X_1^2 - 0.031 \cdot X_2 + 0.08 \cdot X_2^2 - 0.09 \cdot X_3 - 0.05 \cdot X_3^2$$

$$+ 0.064 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.12 \cdot X_1 \cdot X_2^2 + 0.03 \cdot X_1^2 \cdot X_2 + 0.18 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0.07 \cdot X_1^2 \cdot X_3$$

$$R^2: 0.99997 \quad (2),$$

$$Y(3) = 6.48 + 0.89 \cdot X_1 + 3.41 \cdot X_1^2 + 3.19 \cdot X_2 + 0.7 \cdot X_3 + 1.82 \cdot X_3^2 + 6.67 \cdot X_1 \cdot X_2$$

$$+ 1.53 \cdot X_1 \cdot X_2^2 + 4.98 \cdot X_1^2 \cdot X_2 + 0.68 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0.73 \cdot X_1^2 \cdot X_3$$

$$R^2: 0.99998 \quad (3),$$

where Y(1) – biomass yield, CDW, g/l, and 1.63; 0.22 etc. regression coefficients;

Y(2) – 2-phenylethanol production, mg/ml, and 0.22; 0.26 etc. regression coefficients;

Y(3) – ethanol production, mg/ml, and 6.48; 0.89 etc. regression coefficients.



The regression equations obtained for *S. cerevisiae* UCM Y-524 were

$$Y(1) = 1.82 + 0.41 \cdot X_2 + 0.17 \cdot X_3^2$$

$$R^2: 0.98632 (4),$$

$$Y(2) = 0.29 - 0.32 \cdot X_1 - 0.18 \cdot X_1^2 - 0.13 \cdot X_2 + 0.11 \cdot X_2^2 - 0.083 \cdot X_3 + 0.21 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.19 \cdot X_1 \cdot X_2^2 + 0.11 \cdot X_1^2 \cdot X_2$$

$$R^2: 0.99948 (5),$$

$$Y(3) = 6.43 + 1.91 \cdot X_1^2 + 7.54 \cdot X_2 + 1.9 \cdot X_2^2 + 1.91 \cdot X_3 + 3.57 \cdot X_3^2 + 3.21 \cdot X_1 \cdot X_2^2 - 1.66 \cdot X_1^2 \cdot X_2 + 2.56 \cdot X_1^2 \cdot X_3 + 5.32 \cdot X_2 \cdot X_3$$

$$R^2: 0.99816 (6),$$

where Y(1) – biomass yield, CDW, g/l, and 1.82; 0.41 etc. regression coefficients;

Y(2) – 2-phenylethanol production, mg/ml, and 0.29; 0.32 etc. regression coefficients;

Y(3) – ethanol production, mg/ml, and 6.43; 1.91 etc. regression coefficients.

The results showed the ability of yeast to grow on any substrates, like sucrose, yeast extract or L-phenylalanine and their variations (Table 1). The regression equations data indicated that the significant factors for the first strain were sucrose and yeast extract concentrations whereas for the other were yeast extract and L-phenylalanine. In regard to 2-phenylethanol and ethanol production the significant factors were sufficiently all main factors. We can note that the yeast extract demonstrated its ability to affect 2-phenylethanol and ethanol syntheses. This could be explained by the fact that yeast extract in addition to providing adequate nitrogen contains various vitamins which increased growth of the yeast strains. The received results completely coincided with the results of other authors [1, 7, 9]. The values of the determination coefficients for biomass yield by *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 (R^2 : 0.99668 and R^2 : 0.98632), for 2-phenylethanol production (R^2 : 0.99997 and R^2 : 0.99948), for ethanol production (R^2 : 0.99998 and R^2 : 0.99816) indicates that only 0.33 and 1.36%, 0.003 and 0.052%, 0.002 and 0.18%, respectively, of the total variation is not explained by the model, indicating the high goodness of fit of the model.

The effect of each factor and their interactions was assessed by ANOVA technique. The analysis of variance shows that the models are very significant for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 (Table 2). That was confirmed by Fisher F test, where F values were calculated.

The closeness of the observed and the adjusted data can be noted which indicates that all regression equations can be used to determine biomass yield, 2-phenylethanol and ethanol concentrations at different levels of factors. Correlation coefficients were close to 1.0 and an excellent correlation between the experimental and adjusted values were obtained.

Also, we received the response surface graph of the effect of sucrose and yeast extract concentrations. It indicates that the biomass, 2-phenylethanol and ethanol productions were highly influenced by the increasing yeast extract concentrations in the medium. The lowest addition of the yeast extract determined an increase in 2-phenylethanol production (flowery perception) while the high concentrations of the yeast decreased the high aroma alcohol concentrations. The last can be explained by the formation of some carboxylic acids [2]. Graphical study accorded to the high significance of the regression model.



Table 1

Combination of independent factors for optimization experiments and response variables for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and *S. cerevisiae* UCM Y-524

Run N	Su*, % (X ₁)	YE, % (X ₂)	L-ph, mg/l (X ₃)	B, g/l (Y1)	2-PE, g/l (Y2)	Eth, g/l (Y3)	Detected compounds
<i>S. cerevisiae</i> UCM Y-514							
1	0	0	0.1	1.25	0.49	13.61	2-PE, Eth*
2	18	0	0.1	1.37	0	0	AA, FA, F, P, PN, FC
3	0	1.5	0.1	1.35	0.26	0	2-PE, AA, FA, B, P, F
4	18	1.5	0.1	2.14	0.026	13.08	2-PE, Eth
5	0	0.75	0	1.35	1.21	0	2-PE
6	18	0.75	0	1.75	0	4.51	Eth, AA
7	0	0.75	0	1.325	1.21	0	2-PE
8	18	0.75	0.2	1.78	0.083	7.26	2-PE, Eth, AA, FA, B, P, PN, FC
9	9	0	0	1.25	0	0	AA, FA, F, P, PN, FC
10	9	1.5	0	2.48	0	18.22	Eth, AA, FA
11	9	0	0.2	1.27	0	0	AA, FA, F, P, PN, FC
12	9	1.5	0.2	2.24	0.035	21.15	2-PE, Eth, AA, FA, P
13	9	0.75	0.1	1.86	0.041	13.41	2-PE, Eth, AA, FA, P
14	9	0.75	0.1	1.78	0.060	13.32	2-PE, Eth, AA, FA, P
15	9	0.75	0.1	1.90	0.053	13.51	2-PE, Eth, AA, FA, P
<i>S. cerevisiae</i> UCM Y-524							
1	0	0	0.1	1.75	0.84	0	2-PE
2	18	0	0.1	1.35	0.02	0	2-PE, AA, FA, F, P, FC
3	0	1.5	0.1	2.50	0.008	19.51	2-PE, Eth, AA, FA, B
4	18	1.5	0.1	2.50	0.05	15.10	2-PE, Eth
5	0	0.75	0	1.45	1.21	0	2-PE
6	18	0.75	0	2.10	0.03	10.22	Eth, AA
7	0	0.75	0	1.75	1.21	0	2-PE
8	18	0.75	0.2	2.00	0.06	11.06	2-PE, Eth, AA, FA, B, P, PN, FC
9	9	0	0	1.325	0	0	AA, FA, F, P, PN, FC
10	9	1.5	0	1.50	0.04	0	2-PE, AA, FA
11	9	0	0.2	1.30	0.008	0	2-PE, AA, FA
12	9	1.5	0.2	2.30	0.05	21.30	2-PE, Eth, AA
13	9	0.75	0.1	2.20	0.08	17.07	2-PE, Eth, AA
14	9	0.75	0.1	1.96	0.12	16.60	2-PE, Eth, AA
15	9	0.75	0.1	2.00	0.07	15.20	2-PE, Eth, AA

* Su – sucrose, YE – yeast extract, L-ph – L-phenylalanine, B – biomass, 2-PE – 2-phenylethanol, Eth – ethanol, AA – acetic acid, FA – formic acid, B – 2,3-Butanediol, P – 2-Propanone, PN – 4H-Pyran-4-one, FC – 2-Furancarboxaldehyde, F – 2-Furanmethanol.

Many researchers suggested that the yeast extracts and autolysates can strongly modify wine aroma composition, affecting the volatility of wine aroma compounds [2]. Our data confirmed this statement. In addition to 2-phenylethanol and ethanol *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 produced other aroma compounds such as acetic acid, formic acid, 2,3-butanediol, 2-propanone, 4H-pyran-4-one, 2-furancarboxaldehyde, 2-furanmethanol. Volatile compounds were detected in higher concen-



trations at the presence of cultivating media 9–18% sucrose and 0.75–1.5% yeast extract. This tendency was not observed when we added 0.2 mg/l L-phenylalanine to sucrose and yeast extract. In this case we found present acetic acid, formic acid, and ethyl acetate. This phenomenon could be explained by using the main metabolic pathways via acetyl-CoA and the entry of carbon into the central metabolism via succinyl-CoA [12, 13].

Table 2

ANOVA for biomass yield (Y1), 2-phenylethanol (Y2) and ethanol production (Y3) by *S. cerevisiae* UCM Y-524 as a function of sucrose (X_1), yeast extract (X_2) and L-phenylalanine (X_3) concentrations and their interactions

Factors	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean sum of squares	F value	p
for biomass yield					
YE (X_2)	1.237531	1	1.237531	74.85068	0.013098
Lph (X_3^2)	0.386508	1	0.386508	23.37749	0.040214
<i>Total</i>	<i>2.416543</i>	<i>14</i>			
for 2-phenylethanol production					
Su (X_1)	0.755050	1	0.755050	1078.643	0.000926
Su (X_1^2)	0.508898	1	0.508898	726.997	0.001373
YE (X_2)	0.115824	1	0.115824	165.463	0.005989
YE (X_2^2)	0.198307	1	0.198307	283.295	0.003511
Lph (X_3^2)	0.102052	1	0.102052	145.788	0.006789
$X_1 \cdot X_2$	0.185761	1	0.185761	265.373	0.003747
$X_1^2 \cdot X_2^2$	0.301088	1	0.301088	430.126	0.002317
$X_1^2 \cdot X_2$	0.097682	1	0.097682	139.546	0.007090
<i>Total</i>	<i>2.710487</i>	<i>14</i>			
for ethanol production					
Su (X_1^2)	53.915	1	53.915	56.9744	0.017103
YE (X_2)	409.694	1	409.694	432.9425	0.002302
YE (X_2^2)	53.774	1	53.774	56.8254	0.017146
Lph (X_3)	26.404	1	26.404	27.9024	0.034021
Lph (X_3^2)	188.694	1	188.694	199.4019	0.004978
$X_1 \cdot X_2^2$	82.497	1	82.497	87.1785	0.011277
$X_1^2 \cdot X_2$	22.145	1	22.145	23.4012	0.040175
$X_1^2 \cdot X_3$	52.326	1	52.326	55.2958	0.017608
$X_2 \cdot X_3$	113.423	1	113.423	119.8589	0.008240
<i>Total</i>	<i>1027.689</i>	<i>14</i>			

* Su – sucrose concentrations, YE – yeast extract concentrations, Lph – L-phenylalanine concentrations;

** X_1, X_2, X_3 – linear term, X_1^2, X_2^2, X_3^2 – quadratic term;

*** $p \leq 0.05$.



The profiles for adjusted response for factors indicate that the sucrose and yeast extract concentrations were 13.5% and 1.5% respectively, without L-phenylalanine giving an optimal *S. cerevisiae* UCM Y-514 biomass yield 2.5 g/l. The optimal *S. cerevisiae* UCM Y-524 biomass yield of 2.53 g/l gives high yeast extract and L-phenylalanine concentrations. Profiles for adjusted values for optimum 2-phenylethanol production 1.21 mg/ml were both for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 with yeast extract concentrations of 0.75% and L-phenylalanine concentration of 0.2 mg/l (Fig. 1).

The adjusted values of optimal ethanol production show that the optimum concentrations were obtained at 22.39 and 21.3 mg/ml respectively for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524. The adjusted profiles indicate that the yeast extract concentrations maintained the same 1.5% for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524, while the sucrose and L-phenylalanine concentrations did not differ significantly.

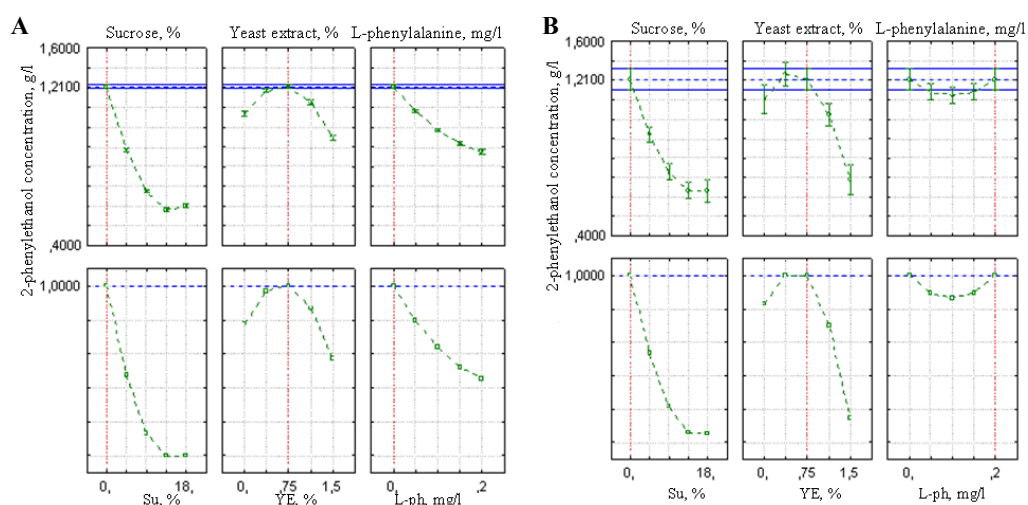


Fig. 1. Profiles for adjusted values of optimal 2-phenylethanol production by *S. cerevisiae* UCM Y-514 (A) and *S. cerevisiae* UCM Y-524 (B) with respect to different factors

In summary, based on the data obtained in the present study, yields of the biomass, 2-phenylethanol and ethanol production were optimized using a statistically designed experiment. The optimized conditions for maximum 2-phenylethanol syntheses were determined to be 5% sucrose, 0.75% yeast extract and 0.2 mg/l L-phenylalanine. The optimized conditions for maximum ethanol syntheses were set at 9–13.5% sucrose, 1.5% yeast extract and 0.15–0.2 mg/l L-phenylalanine. The results showed that *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 were capable of producing up to 1.21 g/l of 2-phenylethanol and up to 22.39 g/l of synthesized ethanol. The high biomass yield completely confirmed that in these concentrations alcohols in cultivation medium are not toxic to yeast.

We gratefully acknowledge Dr S.S. Nagornaya for the provision of yeast cultures from the collection of the Department of Industrial Microorganisms Physiology, Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev.



REFERENCES

1. *Albertazzi E., Cardillo R., Servi S., Zucci G.* Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylacetate important aroma components // *Biotechnol. Lett.* — 1994. — 16. — P. 491–496.
2. *Comuzzo P., Tat L., Tonizzo A., Battistuta F.* Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility // *Food Chem.* — 2006. — 99. — P. 217–230.
3. *Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazola L., Martinez-Rodriguez S., Las Heras-Vazquez F.J., Rodriguez-Vico F.* Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation // *Int. J. of Food Microbiol.* — 2005. — 98. — P. 301–308.
4. *Etschmann M.M.W., Bluemke W., Shell D., Schrader J.* Biotechnological production of 2-phenylethanol // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — 59. — P. 1–8.
5. *Etschmann M.M.W., Shell D., Schrader J.* Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium // *Biotechnol. Lett.* — 2003. — 25. — P. 531–536.
6. *Fabre C.E., Duveau V.J., Blanc P.J., Goma G.* Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus* // *Biotechnol. Lett.* — 1995. — 17. — P. 1207–1212.
7. *Huang C.J.R., Lee S.L., Chou C.C.* Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components // *J. Biosci. Bioeng.* — 2000. — 90. — P. 142–147.
8. *Jiang J.* Identification of flavour volatile compounds produced by *Kluyveromyces lactis* // *Biotechnol. Tech.* — 1993. — 7. — P. 863–866.
9. *Lee S.L., Chou C.C., and Wu C.M.* Effect of some factors on the volatile flavour production by *Sporobolomyces odoratus* // *J. Chin. Agric. Chem. Sci.* — 1992. — 16. — P. 1183–1188.
10. *Мамеева О.Г., Нагорная С.С., Подгорский В.С.* Скрининг продуцентов 2-фенилэтанолу среди дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluyveromyces* // *Микология и фитопатология.* — 2008. — Т. 42, вып. 2. — С. 185–191.
11. *Rodopulo A.K., Lyudnikova T.A., Bezzubov A.A.* Effect of yeast cultivation conditions on the biosynthesis and accumulation of aromatic substances // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 1995. — 21. — P. 332–336.
12. *Stark D., Munch T., Sonnleitner B., Marison I.W., von Stockar U.* Extractive bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol. Prog.* — 2002. — 18. — P. 514–523.
13. *Stark D., Kornmann H., Munch T., Sonnleitner B., Marison I.W., von Stockar U.* Novel type of in situ extraction: Use of solvent containing microcapsules for the bioconversion of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae* // *Biotechnol. and Bioeng.* — 2003. — 83. — P. 376–385.
14. *Torija M.J., Beltran G., Novo M. et al.* Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine // *Int. J. Food Microbiol.* — 2003. — 85. — P. 127–136.



УДК 663.12/.14:547.568.5

О.Г. Мамеева, А.М. Остапчук, В.С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

СИНТЕЗ 2-ФЕНИЛЭТАНОЛА И ЭТАНОЛА ДРОЖЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Реферат

Настоящая работа сфокусирована на определении синтеза 2-фенилэтанолa и этанолa с использованием методов статистического анализа на основании модели Бокса-Бенкена при действии различных концентраций сахарозы, дрожжевого экстракта и L-фенилаланина. Влияние каждого фактора, также как и их комбинаций, оценено методом ANOVA. *S. cerevisiae* УКМ Y-514 и УКМ Y-524 при самом высоком рассчитанном вероятностном уровне синтезируют до 1,21 г/л 2-фенилэтанолa. При этом уровень синтеза этанолa достигает 22,39 г/л. Выведены уравнения регрессии на основании статистического анализа влияния трёх основных эффектов, получены коэффициенты регрессии и коэффициенты детерминации.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *S. cerevisiae*, 2-фенилэтанол, этанол, оптимизация, статистический анализ.

УДК 663.12/.14:547.568.5

О.Г. Мамеева, А.М. Остапчук, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН
України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

СИНТЕЗ 2-ФЕНІЛЕТАНОЛУ ТА ЕТАНОЛУ ДРІЖДЖАМИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Реферат

Дане дослідження спрямоване на визначення продукування 2-фенілетанолу і етанолу з використанням методів статистичного аналізу на основі моделі Бокса-Бенкена за дії різних концентрацій сахарози, дріжджового екстракту і L-фенілаланіну. Вплив кожного фактору, також і їх комбінації, оцінені методом ANOVA. *S. cerevisiae* УКМ Y-514 і УКМ Y-524 за найвищого розрахованого ймовірного рівня синтезують до 1,21 г/л 2-фенілетанолу. При цьому рівень синтезу етанолу досягає 22,39 г/л. Виведені рівняння регресії на основі статистичного аналізу впливу трьох основних ефектів, отримані коефіцієнти регресії і коефіцієнти детермінації.

К л ю ч о в і с л о в а : *S. cerevisiae*, 2-фенілетанол, етанол, оптимізація, статистичний аналіз.



С.Г. Каракіс

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 32,
e-mail: karakis_sg@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ РЕГУЛЯЦІЇ АМІНОКИСЛОТАМИ АКТИВНОСТІ АСПАРТАТКІНАЗИ ТА ГОМОСЕРИНДЕГІДРОГЕНАЗИ У МУТАНТНИХ ШТАМІВ *SPIRULINA PLATENSIS* З НАДСИНТЕЗОМ МЕТІОНІНУ

*Ферментативну активність аспартаткінази (АК) та гомосериндегідрогенази (ГСДГ) визначено в клітинах батьківського штаму дикого типу (ДТ) ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* та його етіонінрезистентних мутантів 30Б та 198Б, отриманих у ході селекції штамів з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі. Встановлено підвищений рівень АК-активності у порівнянні зі штамом ДТ у штаму 198Б (в 1,8 рази). АК усіх штамів підлягає кумулятивному інгібуванню лізином та треоніном. У штаму 198Б інгібувальна дія цих амінокислот значно менша, ніж у штаму ДТ. За рівнем ГСДГ-активності значної різниці між штамми не встановлено. Виявлено, що ГСДГ усіх штамів підлягає інгібуванню треоніном, однак різною мірою. У штаму ДТ треонін у концентрації 5 мМ пригнічує активність ГСДГ повністю, у штаму 30Б – на 53%, у штаму 198Б – на 21%. У штамів ДТ і 30Б ГСДГ активується ізольцином на 32 та 14%, відповідно. У штаму 198Б ГСДГ втрачає здатність до активації ізольцином, але набуває підвищеної здатності (на 33%) до активації метіоніном.*

*К л ю ч о в і с л о в а : *Spirulina platensis*, синтез метіоніну, аспартаткіназа, гомосериндегідрогеназа, регуляція.*

Ціанобактерії вважаються перспективними об'єктами фотоавтотрофних біотехнологій [1]. Однак, у даний час, незважаючи на зусилля вчених, серед ціанобактерій не селекціоновано промислово-перспективних штамів-продуцентів вільних амінокислот. Тому вивчення особливостей метаболізму мутантів ціанобактерій, здатних до надсинтезу амінокислот, дуже важливе як для розуміння особливостей метаболізму ціанобактерій та механізмів його контролю, так і для селекції згаданих штамів-продуцентів.

Раніше нами опубліковано дані про селекцію мутантних штамів ціанобактерії *Spirulina platensis*, стійких до DL-етіоніну – аналогу метіоніну, які були здатні до надсинтезу метіоніну та накопичували його в біомасі [2, 3]. Враховуючи той факт, що у багатьох промислових штамів-продуцентів вільних амінокислот надпродукція обумовлена генетично-детермінованими порушеннями регуляції ключових ферментів в шляхах біосинтезу цих амінокислот [4, 5], важливо провести порівняльне дослідження активностей ключових ферментів та деяких моментів їх регуляції в



шляхах біосинтезу амінокислот аспарагінової родини, до якої належить і метіонін, у отриманих нами штамів, здатних до надсинтезу метіоніну, та у їх батьківського штаму дикого типу.

Аспартаткіназа (АТФ: α -аспартат-4-фосфотрансфераза, КФ 2.7.2.4., далі АК), та гомосериндегідрогеназа (L-гомосерин: НАДФ⁺оксидоредуктаза, КФ 1.1.1.3., далі ГСДГ) є важливими ключовими ферментами розгалуженого шляху біосинтезу амінокислот аспарагінової родини у мікроорганізмів, активність яких регулюється кінцевими продуктами цього шляху [7, 8]. Як було показано нами раніше, у ціанобактерії *S. platensis* 80% загальної АК-активності ферментного препарату підлягає кумулятивному інгібуванню L-треоніном та L-лізином. Решта АК-активності інгібується також L-гомосерином [6]. Даних про участь амінокислот аспарагінової родини в регуляції активності ГСДГ у *S. platensis* в доступній літературі виявити не вдалося.

Мета даної роботи — вивчити вплив амінокислот аспарагінової родини на активність АК та ГСДГ батьківського штаму дикого типу ціанобактерії *S. platensis* та його етіонінрезистентних мутантів 30Б та 198Б, отриманих на різних стадіях селекції штамів з надсинтезом метіоніну *in vitro*.

Матеріали та методи

В роботі використовували штами ціанобактерії *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl.: штам дикого типу (ДТ), та мутантні штами, отримані нами в ході селекції штамів з надсинтезом метіоніну у біомасі — проміжний штам 30Б, у котрого вміст метіоніну у біомасі на 27% вищий ніж у штаму ДТ, та штам 198Б, отриманий на останній стадії селекції, у якого вміст метіоніну у біомасі у 2,2 раза вищий ніж у штаму ДТ [2, 3].

Біомасу штамів вирощували та готували для дослідження, як описано в [6]. Для визначення ферментативних активностей в роботі використовували частково очищений ферментний препарат (безклітинний екстракт, висолений сульфатом амонію), який готували за методом [9].

Аспартаткіназну активність визначали методом Блека з деякими модифікаціями [11]. Стандартна реакційна суміш містила такі концентрації компонентів (об'єм 1 мл): 100 мМ калій-фосфатного буфера, рН 7,0; 100 мМ L-аспарагінової кислоти; 20 мМ АТФ; 20 мМ $MgCl_2$; 400 мМ гідроксиламіну; ферментний препарат (білок 3–5 мг/мл). Значення рН усіх компонентів, окрім $MgCl_2$, попередньо доводили до 7,0 за допомоги 6 N КОН. Після інкубування протягом 30 хвилин при 30 °С реакцію зупиняли додаванням 1,5 мл реагенту такого складу: 10% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ та 3,3% ТХУ в 0,7 N HCl. Денатурований білок вилучали центрифугуванням при 5000 об/хв впродовж 30 хв. Утворений внаслідок реакції β -гідроксамат L-аспарагінової кислоти визначали спектрофотометрично при 540 нм. АК-активність виражали кількістю наномолей β -гідроксамата L-аспарагінової кислоти, що утворювався за 1 хвилину на 1 мг білка ферментного препарату.

Гомосериндегідрогеназну активність визначали з використанням біохімічної реакції, що відбувалася у напрямку: гомосерин + НАДФ⁺ = напівальдегід аспарагінової кислоти + НАДФН, та аналізували за швидкістю відновлення НАДФ⁺ при 340 нм [13]. Тривалість реакції 5 хв. Стандартна реакційна суміш була такого складу (об'єм 3 мл): 10 мМ трис-HCl буфер, рН 9,0; 400 мМ KCl; 0,27 мМ НАДФ⁺; 1,7 мМ гомосерину та ферментний препарат (білок 3–5 мг/мл). Розчин



гомосерину попередньо доводили до рН 9,0 за допомоги 4 N КОН. ГСДГ-активність виражали кількістю наномоль НАДФН, що утворювався за 1 хвилину на 1 мг білка ферментного препарату.

Вплив амінокислот аспарагінової родини на активність АК та ГСДГ вивчали *in vitro* шляхом додавання їх у концентрації 5 мМ до реакційної суміші для визначення активностей цих ферментів. Як було встановлено нами в попередніх дослідженнях, ця концентрація є насичувальною для амінокислот аспарагінової родини, які впливали на активність АК [6] та ГСДГ (не опубліковані дані) у *S. platensis*.

Вміст білка у ферментних препаратах визначали за методом Лоурі, використовуючи альбумін людської сироватки як стандарт [12].

Експерименти повторювали шестикратно. Математичне опрацювання отриманих даних здійснювали з використанням програм MS Excel. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомоги *t*-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення

Враховуючи сучасні знання про шляхи біосинтезу амінокислот аспарагінової родини та їх регуляцію [7, 8], а також особливості метаболізму отриманих селекційно-генетичними та генно-інженерними методами штамів-продуцентів амінокислот цієї родини у різних мікроорганізмів [5, 9], нами було зроблене припущення, що у штамів *Arthrospira (Spirulina) platensis*, здатних до надсинтезу метіоніну, має місце порушення регуляції активності ключових ферментів аспартаткінази та гомосериндегідрогенази.

В табл. 1 наведені результати визначення аспартаткіназної та гомосериндегідрогеназної активностей в клітинах підслідних штамів. У проміжного мутанта 30Б АК-активність не перевищує аналогічний показник у штама ДТ. На відміну від нього, АК-активність у мутанта 198Б в 1,8 раза є вищою, ніж у штама ДТ. Гомосериндегідрогеназна активність у вивчених штамів суттєво не відрізняється.

Таблиця 1
Аспартаткіназна та гомосериндегідрогеназна активності в клітинах штамів *Spirulina platensis* ($M \pm m$, $n=6$)

Table 1
Aspartate kinase and homoserine dehydrogenase activities in cells of *Spirulina platensis* strains ($M \pm m$, $n=6$)

Штам	Аспартаткіназна активність		Гомосериндегідрогеназна активність	
	мкмоль β-гідроксамату L-аспарагінової кислоти/ хв на мг білка	%	нмоль НАДФН/ хв на мг білка	%
ДТ	6,15±0,17	100,0±2,7	1,67±0,06	100,0±3,2
30Б	6,18±0,12	100,4±2,0	1,90±0,06*	114,1±3,8*
198Б	10,95±0,34*	178,1±5,5*	1,63±0,02	97,9±1,4

* різниця вірогідна у порівнянні з ДТ ($p \leq 0,05$)



Враховуючи той факт, що в регуляції активностей АК та ГСДГ у мікроорганізмів беруть участь кінцеві продукти шляхів біосинтезу амінокислот аспарагінової родини [7–9], а також те, що у піддослідних мутантних штамів 30Б та 198Б має місце значне підвищення внутрішньоклітинного пулу вільних амінокислот у порівнянні з батьківським штамом ДТ [2], вивчали вплив амінокислот аспарагінової родини на активність вищезгаданих ферментів із штамів 30Б, 198Б та дикого типу *in vitro*. Результати дослідження активності АК із різних штамів за впливу амінокислот аспарагінової родини надані у табл. 2. Ці дані підтвердили встановлений нами раніше факт [6], що лізину та треоніну властива інгібувальна дія на активність АК із штаму ДТ з вираженим адитивним ефектом. Метіонін та ізолейцин не інгібують активність АК із ДТ.

Згідно з даними, наведеними у табл. 2, АК із проміжного штаму 30Б суттєво не відрізняється від АК із штаму ДТ за дією амінокислот аспарагінової родини на її активність. На відміну від цього, АК із штаму 198Б частково втрачає здатність до зворотного інгібування лізином та треоніном — вона майже у 2 рази слабше інгібується лізином та треоніном, ніж АК із штамів попередників. Окрім того, АК із штаму 198Б набуває здатності активуватися ізолейцином. У присутності цієї амінокислоти активність АК підвищується на 58% у порівнянні з контролем, у той час, як активність АК із штаму ДТ та штаму 30Б не зазнає змін під впливом ізолейцину. За дією метіоніну на активність АК штам 198Б не відрізняється від вихідних штамів.

Таблиця 2

Вплив амінокислот на активність аспартаткінази із різних штамів *Spirulina platensis* ($M \pm m$, $n=6$)

Table 2

Effect of amino acids on activity of aspartate kinase from different strains of *Spirulina platensis* ($M \pm m$, $n=6$)

Амінокислота (5 мМ)	Активність аспартаткінази (% від контролю)		
	Штам ДТ	Штам 30Б	Штам 198Б
Контроль (без додатків)	100,0 \pm 2,7	100,0 \pm 2,0	100,0 \pm 3,1
met	105,2 \pm 2,5	91,6 \pm 2,1*	108,2 \pm 3,4*
lys	30,0 \pm 0,9*	35,4 \pm 1,0*	79,5 \pm 2,8*
thr	40,0 \pm 0,7*	37,5 \pm 1,0*	79,0 \pm 2,7*
ile	102,8 \pm 2,8	98,8 \pm 2,4	157,9 \pm 5,8*
lys+thr	24,3 \pm 0,7*	31,3 \pm 1,0*	50,0 \pm 1,4*

* різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

В табл. 3 наведено результати порівняльного вивчення активності ГСДГ із різних штамів за впливом амінокислот, які синтезуються за її участю. Наведені



дані свідчать, що у штаму ДТ активність ГСДГ інгібується треоніном (при концентрації 5 мМ — повністю) і дещо активується ізолейцином — на 32%. У проміжного штаму 30Б має місце часткова втрата здатності ГСДГ до зворотнього інгібування її активності треоніном та активації ізолейцином. У присутності треоніну активність ГСДГ із штаму 30Б інгібується тільки на 53,3%, а у присутності ізолейцину — активується тільки на 14%. ГСДГ із штаму 198Б ще менш чутлива до дії треоніну та ізолейцину, ніж із штаму 30Б. В концентрації 5 мМ треонін пригнічує активність ГСДГ штаму 198Б лише на 20%, а ізолейцин майже не впливає на її активність.

Таблиця 3

Вплив амінокислот на активність гомосериндегідрогенази із різних штамів *Spirulina platensis* ($M \pm m$, $n=6$)

Table 3

Effect of amino acids on activity of homoserine dehydrogenase from different strains of *Spirulina platensis* ($M \pm m$, $n=6$)

Амінокислота (5 мМ)	Активність (% від контролю)		
	Штам ДТ	Штам 30Б	Штам 198Б
Контроль (без додатків)	100,0 \pm 3,2	100,0 \pm 3,8	10,0 \pm 2,4
met	107,1 \pm 1,4*	110,0 \pm 3,1*	133,3 \pm 0,1*
thr	0*	46,7 \pm 0,2*	79,0 \pm 2,7*
ile	132,1 \pm 1,5*	114,1 \pm 1,3*	104,7 \pm 2,5

* різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Отже, мутант 30Б відрізняється від батьківського штаму ДТ значною мірою лише втратою здатності ГСДГ до зворотнього інгібування треоніном. Ці зміни в метаболізмі обумовлюють незначне підвищення синтезу метіоніну у цього штаму — всього на 27%. На відміну від штаму 30Б, штам 198Б характеризується значним підвищенням АК-активності та частковою втратою здатності АК до зворотнього інгібування лізином та треоніном. Окрім того, у штаму 198Б ГСДГ ще більш значною мірою втрачає здатність до інгібування треоніном та активації ізолейцином та набуває здатності до активації метіоніном. Вочевидь, ці генетично-детерміновані особливості штаму 198Б дозволяють посилити потік метаболітів-попередників у індивідуальні шляхи синтезу метіоніну та обумовлюють його надсинтез (вміст метіоніну в його біомасі в 2,2 раза вищий, ніж у ДТ).

Таким чином, на основі порівняння рівнів АК- та ГСДГ-активностей та особливостей впливу амінокислот аспарагінової родини на активність АК та ГСДГ у підслідних штамів, можна зробити висновок, що значне підвищення синтезу метіоніну у спіруліни потребує одночасного послаблення негативного контролю активності як АК, так і ГСДГ кінцевими продуктами на фоні значного підвищення АК-активності.



ЛІТЕРАТУРА

1. Шестаков С.В. Перспективы использования фототрофных бактерий в биотехнологии // В кн.: Биотехнология, М.: Наука, 1984. — С. 212–215.
2. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагаріц В.А., Карнов Л.М. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі // Вісник ОНУ. — 2005. — Т. 10, в. 3. — С. 55–62.
3. Каракіс С.Г., Карнов Л.М., Драгоева Е.Г., Лавренюк Т.І., Сагаріц В.А., Марченко В.С. Биохимический состав биомассы штаммов *Arthrospira (Spirulina) platensis* // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 1. — С. 58–62.
4. Жданова Н.И. Мутационные нарушения регуляции биосинтеза как основа селекции штаммов микроорганизмов, продуцирующих аминокислоты: Автореф. дис. ... д-ра биол.наук. — М., 1980. — 50 с.
5. Park S.D., Lee J.Y., Sim S.Y., Kim Y., Lee H.S. Characteristics of methionine production by an engineered *Corynebacterium glutamicum* strain // Metab. Eng. — 2007. — 9(4). — P. 327–336.
6. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Чабан Ю.Л. Активність аспартаткінази *Spirulina platensis* за впливу амінокислот аспарагінової родини // Вісник ОДУ. — 2000. — Т. 5, в. 1. — С. 13–18.
7. Cahyanto M.N., Kawasaki H., Nagashio M., Fujiyama K., Seki T. Regulation of aspartokinase, aspartate dihydrodipicolinate synthase and dihydrodipicolinate reductase in *Lactobacillus plantarum* // Microbiology. — 2006. — 152(Pt 1). — P. 105–112.
8. Eikmanns B.J., Eggeling L., Sahm H. Molecular aspects of lysine, threonine, and isoleucine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* // Antonie Van Leeuwenhoek. — 1993–1994. — 64, № 2. — P. 145–163.
9. Шильникова И.И., Зайцева З.М., Тимохина О.А. Регуляция ферментов биосинтеза и катаболизма гомосерина у аналогорезистентных мутантов *Brevibacterium flavum* // Прикладная биохимия и микробиология. — 1985. — Т. XXI, № 5. — С. 602–609.
10. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycie influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (setch et Gardner) Geitler — in : Thesis présentées a la faculté des sciences de l'université de Paris — 1966. — 85 p.
11. Blak S., Wright N.G. β -aspartokinase and β -aspartil phosphate // J. Biol. Chem. — 1955. — V. 213. — P. 27–38.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193. — P. 265–275.
13. Miyajima R., Otsuka S., Shio A. regulation of aspartate famili amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. 1. Inhibition by amino acids of the enzymes in threonine biosynthesis // J. Biochem. — 1968. — 63, № 2. — P. 139–148.

С.Г. Каракіс

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis_sg@mail.ru

**ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ АМИНОКИСЛОТАМИ АКТИВНОСТИ
АСПАРТАТКИНАЗЫ И ГОМОСЕРИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ
У МУТАНТНЫХ ШТАММОВ *SPIRULINA PLATENSIS*,
ОБЛАДАЮЩИХ СВЕРХСИНТЕЗОМ МЕТИОНИНА**

Реферат

Ферментативная активность аспартаткіназы (АК) и гомосериндегідрогеназы (ГСДГ) были определены в клетках родительского штамма дикого типа (ДТ)



цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* и его этионинрезистентных мутантных штаммов 30Б и 198Б, полученных на разных этапах селекции штаммов с повышенным содержанием метионина в биомассе. Установлено, что только мутант 198Б имеет повышенный уровень АК-активности (в 1,8 раза) по сравнению со штаммом ДТ. АК всех штаммов коммулятивно ингибируется лизином и треонином. Однако, только у штамма 198Б ингибирующий эффект этих аминокислот намного меньше, чем у штамма ДТ. Существенной разницы в уровне ГСДГ-активности у изученных штаммов не выявлено. Показано, что ГСДГ всех штаммов ингибируется треонином. В концентрации 5 мМ треонин ингибирует ГСДГ штамма ДТ полностью, штамма 30Б — на 53%, штамма 198Б — на 21%. У штаммов ДТ и 30Б ГСДГ активируется изолейцином на 32 и 14%, соответственно. У штамма 198Б ГСДГ не активируется изолейцином, однако повышается способность к активации метионином на 33%.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Spirulina platensis*, синтез метионина, аспартаткиназа, гомосериндегидрогеназа, регуляция.

S.G. Karakis

Odesa National of Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis_sg@mail.ru

PECULIARITIES OF ASPARTATE KINASE AND HOMOSERINE DEHYDROGENASE ACTIVITIES REGULATION BY AMINO ACIDS IN *SPIRULINA PLATENSIS* MUTANT STRAINS WITH METHIONINE SUPER SYNTHESIS

Summary

The activities of aspartate kinase (AK) and homoserine dehydrogenase (GSDG) have been determined in cells of parental wild strain as well as 30B and 198B mutant strains, received on different stages of *Spirulina platensis* strain selection with elevated content of methionine in biomass. It was found, that only strain 198B showed considerable increase of AK activity (in 1.8 times) in respect to the wild strain. AK-activity is subject to cumulative inhibition by L-threonine and L-lysine in all strains. However, in mutant 198B inhibition effect of these amino acids on the activity AK is much smaller than the same in the wild strain. There is no essential difference in value of GSDG-activity between investigated strains. It is established, that GSDG-activity is subject to inhibition by L-threonine in all strains. GSDG from wild strain was completely inhibited by L-threonine (5 mM), from 30B strain — on 53%, from 198B strain — only on 21%. GSDG from wild strain and 30B strain was activated by L-isoleucine on 32 and 14%, according. GSDG of 198B mutant was not activated by L-isoleucine, but its had a high stimulatory effect (33%) by L-methionine.

Key words: *Spirulina platensis*, methionine synthesis, aspartate kinase, homoserine dehydrogenase, regulation.



Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанец

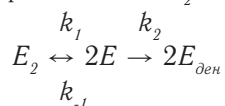
Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП ДО 3680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ α -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ *CLADOSPORIUM* *CLADOSPORIOIDES*

Исследована термостабильность α -галактозидазы Cladosporium cladosporioides в диапазоне температур 55–60 °С. Рассчитаны некоторые термодинамические параметры и предложен механизм термоинактивации фермента. Энергия активации перехода отдельной субъединицы α -галактозидазы из нативного состояния в денатурированный составила 165 кДж/моль. Показана стабилизация молекулы фермента в присутствии бычьего сывороточного альбумина (на 19%), глицерина (на 30–40%), галактозы (на 15%), мелибиозы, раффинозы и стахиозы (45%, 21% и 15%).

К л ю ч е в ы е с л о в а : α -галактозидаза, Cladosporium cladosporioides, термоинактивация.

В настоящее время имеется обширный материал по кинетике термоинактивации олигомерных ферментов в различных условиях. Можно указать на четыре основных типа инактивации ферментов [2]. Это необратимая инактивация первого порядка, инактивация по схеме последовательных превращений первого порядка, инактивация по механизму последовательно-параллельных реакций первого порядка и диссоциативная инактивация. Последний механизм наиболее важен для олигомерных молекул, поскольку в этом процессе обратимые стадии диссоциации предшествуют кинетически необратимому изменению их продуктов. Примером такого рода является распад димерного белка E_2 по кинетической схеме:



E — мономерный белок, способный к обратной ренатурации, а $E_{ден}$ — продукт необратимого изменения E . Белок $E_{ден}$ уже не способен к ассоциации с образованием функционально активного комплекса E_2 , например, вследствие нарушения свойств контактного участка белковой глобулы или существенных структурных изменений.

Зависимость кинетических кривых диссоциативной термоинактивации фермента по двустадийному механизму при $[E]_0 = const$ от температуры объясняется рядом факторов: различием температурных коэффициентов процессов диссоциации и денатурации и резким увеличением с ростом температуры величины $K_{дисс}$. Таким образом, поиск путей стабилизации олигомерного белка состоит в решении задачи сохранения интактности его четвертичной структуры путем подавления первичных



обратимых стадий термоинактивации. Положение точек излома и наклоны кривых в координатах кинетического уравнения первого порядка позволяют определить три элементарные кинетические константы: k_j (константа скорости диссоциации димера), $K_{дис}$ (константа равновесия диссоциации димера), $k_{ден}$ (константа скорости денатурации), где $K_{дис} = k_j/k_{-j}$. Все три параметра могут быть определены экспериментально в том случае, если данные получены для температурного интервала, который отвечает экспериментально наблюдаемому процессу диссоциации олигомера, и в области концентраций белка, соизмеримых с величиной $K_{дис}$.

Исследуемый нами фермент — α -галактозидаза *Cladosporium cladosporioides*, по нашим предварительным данным является гликозилированным гексамером [1], с молекулярной массой 400 кДа по данным гель-фильтрации, и 66 кДа — по данным SDS-ПААГ электрофореза. Данная работа посвящена изучению вопросов кинетики и термоинактивации этого олигомерного белка, с целью расширить возможные области его применения.

Материалы и методы

При исследовании процесса термоинактивации контрольную реакцию проводили при 37 °С, так как при этой температуре исследуемая α -галактозидаза *C. cladosporioides* за время реакции полностью сохраняла свою каталитическую активность. Удельная активность фермента составляла 3,6 Е/мл, K_m равнялась 0,79 мМ. Выбранные рабочие концентрации ферментов находились в пределах диапазона концентраций, где ферментативная активность прямо пропорциональна концентрации фермента $[E]_0$.

Термостатирование проводили при температурах 50–65 °С, периодически отбирая пробы (0,1 мл) для определения активности. Активность определяли по начальной скорости гидролиза *p*-нитрофенил- α -D-галактопиранозида спектрофотометрическим методом [3] при контрольной температуре и насыщающей концентрации субстрата, после чего рассчитывали начальные скорости реакций. Для реинактивации после термообработки образцы инкубировали при 40 °С от 5 до 24 часов.

Изучение кинетики и расчет констант термоинактивации проводили согласно работе Полторака и др. [2]. Для расчета эффективной константы скорости денатурации $k_{ден}$ и константы диссоциации $K_{дис}$ строили кинетические кривые термоинактивации в полулогарифмических координатах $\ln v_t/v_0$ от t , где v_0 — скорость ферментативной реакции при $t=0$. По пересечению касательных, проведенных к линейным участкам кинетической кривой определяли точку излома при $t=\tau$. По тангенсам углов наклона касательных определяли $k_{эф}$ (константы скорости диссоциации олигомера и ассоциации мономеров). Расчет $K_{дис}$ проводили по формуле:

$$K_{дис} = 4 [E_0] (v_0 - v_\tau)^2 / v_0 v_\tau,$$

где E_0 — концентрация олигомерной формы фермента в начальный момент времени, v_0 и v_τ — максимальные скорости контрольной каталитической реакции в начальный момент времени и в момент времени τ , отвечающий точке излома.

Константу скорости денатурации $k_{ден}$ определяли по формуле:

$$k_{ден} = k_{эф}(v_0 + v_\tau)/2(v_0 - v_\tau)$$



Обработку фермента глутаровым альдегидом проводили следующим образом: к 1 мл очищенного ферментного раствора (10 Е/мл) добавляли 10–50 мкл 50% глутарового альдегида и выдерживали при комнатной температуре в течение 15–60 мин, остатки реагента удаляли гель-фильтрацией на Sepharose 6В. Далее обработку проводили, как описано выше.

Углеводы (сахароза, галактоза, глюкоза, мелибиоза, раффиноза, стахиоза, трегалоза, мальтоза), сухую бычью кровь и БСА использовали в концентрации 0,5%, глицерин – 5–40%.

Результаты и их обсуждение

Как видно из рис. 1, процесс термоинактивации α -галактозидазы *C. cladosporioides* состоит из нескольких элементарных стадий, две из которых (начальную и конечную) можно оценить количественно. При построении кинетических кривых термоинактивации в полулогарифмических координатах наблюдался «излом», положение которого зависит от концентрации фермента при фиксированной температуре. Также показано, что фермент можно частично реинактивировать на начальных этапах термообработки, до «излома». Это обычная картина при наличии в системе диссоциативно-ассоциативного равновесия. Таким образом, мы предполагаем, что термоинактивация олигомерной α -галактозидазы *C. cladosporioides* при 55 и 60 °С проходит по механизму диссоциативной инактивации, а при 65 °С – необратимой инактивации первого порядка.

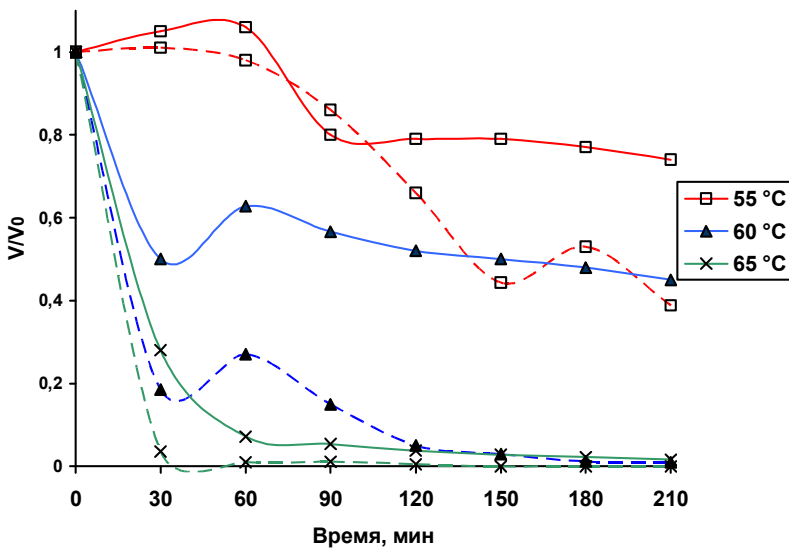


Рис. 1. Кинетические кривые термоинактивации α -галактозидазы *C. cladosporioides* при различных температурах инкубации

— очищенный фермент,
 ---- неочищенный ферментный препарат

Fig. 1. Thermal inactivation kinetic curve of *C. cladosporioides* α -galactosidase at different incubation temperature

— purified enzyme,
 ---- crude enzyme preparation



При температурі 55 і 60 °С на кінетических кривих спостерігаються індукційні ділянки, що може бути пов'язано з утворенням проміжних форм α -галактозидази *C. cladosporioides*, які не супроводжуються втратою активності.

Всі розраховані кінетическі параметри процесу термоінактивації α -галактозидази *C. cladosporioides* представлені в таблиці. Ефективна константа швидкості денатурації при температурі 55 °С була $5,35 \cdot 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, при підвищенні температури вона зростала і при 65 °С склала $1,94 \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

Таблиця

Кінетическі константи термоінактивації α -галактозидази *C. cladosporioides*

Table

Thermal inactivation kinetic constant of *C. cladosporioides* α -galactosidase

T, °C	$k_p, \text{ c}^{-1}$	$k_{-p}, \text{ c}^{-1}$	$K_{duc}, \text{ мкМ}$	$k_{ден}, \text{ c}^{-1}$
55	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$9,3 \cdot 10^{-5}$	0,7	$5,35 \cdot 10^{-5}$
60	$4,45 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	1,67	$9,5 \cdot 10^{-5}$
65	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	29,20	$1,94 \cdot 10^{-4}$

Для розрахунку кількості стадій, не супроводжуваних втратою активності, використовували емпіричну формулу, запропоновану Полтораком і соавт. [2] і отриману шляхом моделювання процесу інактивації на комп'ютері. В умовах нашого експерименту спостерігається мінімум дві стадії процесу термоінактивації, які не супроводжуються втратою активності.

Для визначення енергії активації побудували графік в координатах рівняння Аррениуса $\ln k_{ден} = f(1/T)$ (рис. 2). Тангенс кута нахилу цього графіка дозволив знайти енергію активації переходу окремої суб'єдиниці α -галактозидази з нативного стану в денатуроване рівну 165 кДж/моль.

Необхідно звернути увагу, що при великих відрізках часу в системі будуть проходити тільки необоротні зміни до повної інактивації ферменту. Необоротні зміни в молекулах ферментів виникають практично в момент початку термоінактивації, однак спочатку вони майже не виявляються на фоні оборотних реакцій. Також слід відзначити, що енергія активації цих процесів суттєво вище, ніж у оборотних і вимагає більшого часу для їх завершення. В цей період існують механізми для реінактивації ферменту.

При проведенні досліджень по реінактивації α -галактозидази *C. cladosporioides* було показано, що після 3-х годин термоінактивації при 55 і 60 °С ферментні препарати були здатні відновлювати свою активність на 7–10%. Однак при зберіганні цього ж препарату при 65 °С фермент практично весь переходив в денатуровану форму, неспроможну до реінактивації, впродовж 30 хв. При оцінці впливу ступеня очищення ферменту на стійкість до дії високих температур було показано, що очищені ферменти мали більшу термостабільність (рис. 1). Ймовірно, в неочищених препаратах спостерігався ефект інгібування ферменту присутніми в культуральній рідині і препаратах грубої очищення продуктами реакції і субстратами.



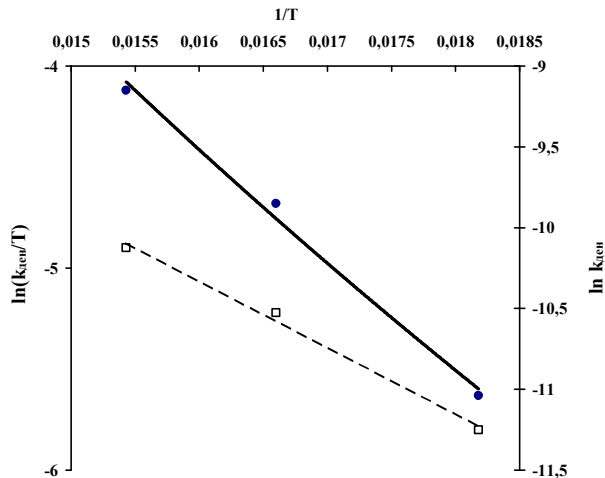


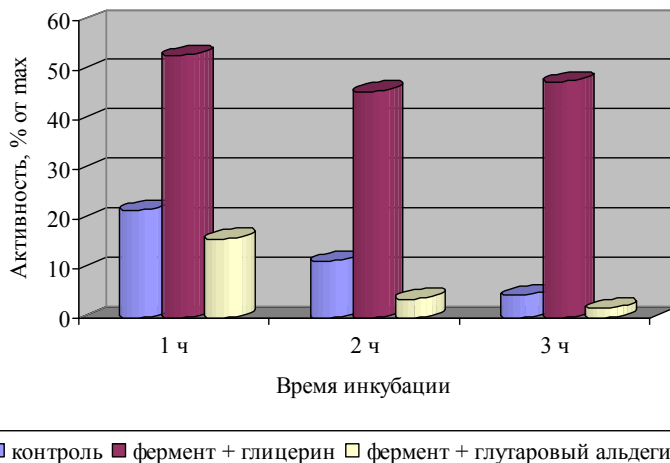
Рис. 2. Зависимость констант скорости денатурации от температуры:

--- $\ln(k_{\text{ден}}/T)$, — $\ln k_{\text{ден}}$.

Fig. 2. Temperature dependence upon denaturation rate constant:

--- $\ln(k_{\text{ден}}/T)$, — $\ln k_{\text{ден}}$.

При изучении возможностей замедления процесса термоинактивации α -галактозидазы *C. cladosporioides* в присутствии некоторых сахаров, субстратов фермента и БСА было показано, что защитный эффект на протяжении первого часа инкубации при 55–60 °С наблюдался в присутствии галактозы (на 15%), мелибиозы, раффинозы и стахиозы (45%, 21% и 15%) и альбумина (на 19%), незначительные протективные свойства были отмечены у трегалозы и мальтозы (около 8%), однако ко второму часу влияние этих веществ полностью нивелировалось. Значительный защитный эффект наблюдался в присутствии глицерина (на 30–40%) на протяжении 3 часов инкубации при 65 °С (рис. 3).

Рис. 3. Зависимость активности α -галактозидазы *C. cladosporioides* от времени в присутствии глицерина и глутарового альдегида при 65 °СFig. 3. *C. cladosporioides* α -galactosidase dependence upon time in presence of glycerol and glutaraldehyde at 65 °С

Таким образом, нами установлено, что термоинактивация α -галактозидазы *C. cladosporioides* происходит по диссоциативному типу, а при температуре 55 и 60 °C имеется индукционный период, и рассчитано, что число стадий, не сопровождающееся потерей активности, соответствует двум. При этих температурах установлены кинетически различимые две стадии процесса термоинактивации: обратимая диссоциация и необратимая денатурация. Рассчитаны кинетические параметры этих процессов. Все эти данные помогут оптимизировать процессы стабилизации молекулы α -галактозидазы на ранних стадиях термоинактивации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маланчук В.М. α -Галактозидаза *P. canescens* 239 і *C. cladosporioides* 189: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. К., 2000. — 21 с.
2. Полторак О.М., Чухрай Е.С., Торшин И.Ю. Диссоциативная термоинактивация, стабильность и активность олигомерных ферментов// Биохимия. — 1998. — 63, № 3. — С. 360—369.
3. McCleary B. α -D-Galactosidase from lucerne and guar seed // Methods Enzymol. — 1988. — 160. — P. 627—632.

Н.В. Борзова, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП ДО 3680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕРМОІНАКТИВАЦІЇ α -ГАЛАКТОЗИДАЗИ *CLADOSPORIUM CLADOSPORIOIDES*

Реферат

Досліджено термостабільність α -галактозидази *Cladosporium cladosporioides* у діапазоні температур 55–60 °C. Розраховані деякі термодинамічні параметри та запропоновано механізм термоінактивації ферменту. Енергія активації переходу окремої субодиниці α -галактозидази із нативного стану у денатурований склала 165 кДж/моль. Показана стабілізація молекули ферменту у присутності бичачого сироваткового альбуміну (на 19%), гліцерину (на 30–40%), галактози (на 15%), мелібіози, рафінози та стахіози (45%, 21% і 15%).

Ключові слова: α -галактозидаза, *Cladosporium cladosporioides*, термоінактивация.



N.V. Borzova, L.D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Academ. Zabolotny str., Kyiv, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 39, e-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

**STUDY OF THERMAL INACTIVATION *CLADOSPORIUM*
CLADOSPORIOIDES α -GALACTOSIDASE**

Summary

Thermostability of *Cladosporium cladosporioides* of α -galactosidase was studied in the range of 55 °C and 60 °C. Some of the thermodynamic parameters have been estimated and the mechanism of thermal inactivation has been suggested. Activation energy of transition α -galactosidase subunit from native to denatured state was 165 kJ/M. Stabilization of enzyme molecule in the presence of BSA (19%), glycerol (30–40%), galactose (15%), melibiose, raffinose and stachyose (45%, 21% and 15%) was shown.

Key words: α -galactosidase, *Cladosporium cladosporioides*, thermal inactivation.



Н.И. Копытина, И.В. Тарасюк

Одесский филиал Института биологии южных морей имени А.А. Ковалевского
НАН Украины, ул. Пушкинская, 37, Одесса, 65125, Украина,
тел.: +38 (048) 725 09 34,
e-mail: nade.kopytina@yandex.ru, irina.tarasyuk87@yandex.ru

ВОДНЫЕ ГРИБЫ ПЕЛАГИАЛИ АВАНДЕЛЬТЫ РЕКИ ДУНАЙ

Идентифицировано 46 видов грибов из 10 родов, 6 семейств, 6 порядков, 4 классов отдела Ascomycota (анаморфные роды). Наибольший вклад в видовой состав микобиоты принадлежал родам Aspergillus (18 видов) и Penicillium (7), для представителей этих родов также отмечена наибольшая частота встречаемости и плотность КОЕ · дм³. Число видов, частота встречаемости и плотность пропагул оппортунистических грибов в районе была выше, чем сапротрофных, особенно на станциях, расположенных ближе к берегу. В исследованный период не выявили зависимости плотности пропагул грибов от таких абиотических параметров, как глубина отбора проб, температура, соленость воды и удаленность станций от берега.

К л ю ч е в ы е с л о в а : микобиота, пропагулы грибов, оппортунистические микромицеты, авандельта р. Дунай.

Микроскопические грибы — неотъемлемая часть биоты пресных и морских водоемов — остаются наименее изученной группой водных организмов, особенно в контурных или краевых биотопах. Данная работа посвящена изучению микобиоты в авандельте р. Дунай, самой крупной реки, впадающей в Черное море.

Исследования грибов данного района, проведенные в 50–80 гг. прошлого столетия позволили выявить 123 вида грибов: из отделов Oomycota — 9 видов, Zygomycota — 15, Labyrinthulata — 5, Chytridiomycota — 6, Blastocladiomycota — 1, Ascomycota — 97 видов, из которых 94 представлены анаморфными стадиями [2, 3, 5, 7].

Цель работы — определить видовой состав мицелиальных водных грибов, установить зависимости численности пропагул грибов от глубины отбора проб, температуры, солености и удаленности станций от берега в воде авандельты реки Дунай.

Материалы и методы

Микологические исследования воды в районе авандельты р. Дунай, проводили в августе и октябре 2008 г. (86 проб). Абиотические параметры в местах отбора проб представлены в табл. 1, схема станций показана на рис. 1.

Воду с поверхностного горизонта отбирали пластмассовым ведром, с придонного — батометром Молчанова, объемом 1 л, которые были предварительно обработаны спиртом. Грибы выделяли из 20 мл нативной воды на целлюлозосодержащие субстраты-приманки (стерильные полоски фильтровальной бумаги, опилки дуба). Чашки Петри инкубировали в течение 2–3 месяцев при температуре 18–20 °С [1].



Таблиця 1

Глубина отбора проб, температура и соленость воды в акватории авандельты
р. Дунай (август, октябрь 2008 г.)

Table 1

Depth of sampling selection, temperature and salinity of water in the Danube
avandelta water area (August, October, 2008)

Месяц	Глубина отбора проб (м)	Температура воды (°C)	Соленость воды (д)
Август	0–22	8,8–29,2	0,3–17,7
Октябрь	0–23	14,4–16,7	0,04–17,1

Идентификацию грибов проводили по работам Саттон и др. [6], Хуг и др.[8]. Систематика грибов соответствует изложенной в электронной базе данных Index Fungorum [10]. Вычисляли встречаемость каждого вида (рода) и плотность пропагул грибов (КОЕ), в расчете на 1 дм³. Статистическая обработка микологических и абиотических данных выполнена с использованием пакета программ многомерного анализа PRIMER v. 5.28 [9].

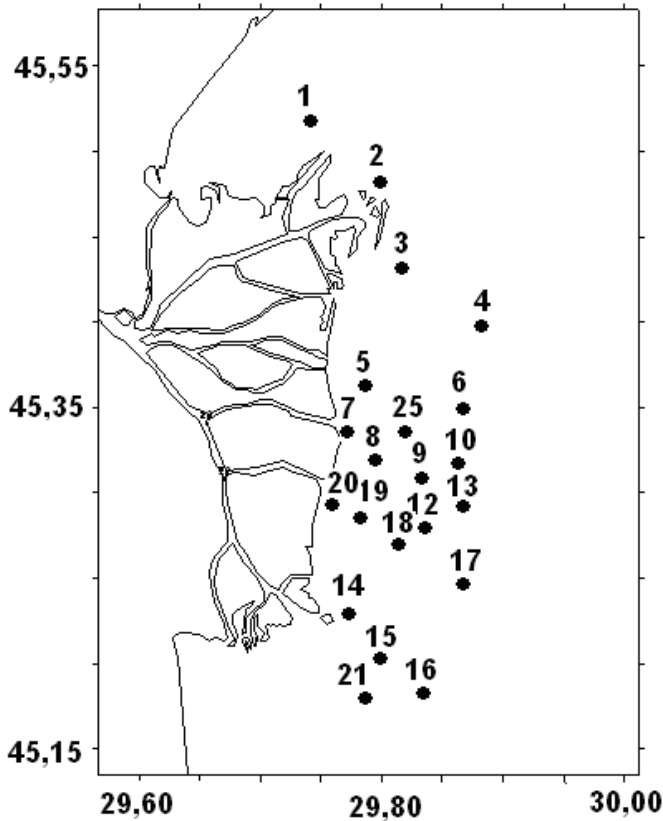


Рис. 1. Схема станций отбора проб в районе авандельты р. Дунай
Fig. 1. The scheme of sampling stations in the Danube avandelta area

Результаты и их обсуждение

Идентифицировано 46 видов грибов из 10 родов (*Acremonium* Link, *Alternaria* Nees, *Aspergillus* P. Micheli ex Link, *Candida* Berkhout, *Cladosporium* Link, *Dichocladosporium* K. Schub., U. Braun & Crous, *Exophiala* J.W. Carmich., *Neosartorya* Malloch & Cain, *Penicillium* Link, *Periconiella* Sacc.) (рис. 2), 6 семейств (Davidiellaceae, Herpotrichiellaceae, Incertae sedis, Mycosphaerellaceae, Pleosporaceae, Trichocomaceae), 6 порядков (Capnodiales, Chaetothyriales, Eurotiales, Hypocreales, Pleosporales, Saccharomycetales) 4 классов (Dothideomycetes, Eurotiomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes) отдела Ascomycota (анаморфные роды).

Максимальным количеством видов были представлены роды *Aspergillus* – 18 видов (рис. 2) (в августе – 17 видов, в октябре – 10) и *Penicillium* – 7 (в августе – 5 видов, в октябре – 7). Нами выявлены 21 вид микромицетов, которые были ранее указаны другими авторами [2, 5, 7], впервые для данного региона выявлены 25 факультативно морских видов грибов, 13 из которых – новые для Черного моря (*Acremonium atrogriseum* (Panas.) W. Gams, *A. roseogriseum* (S.B. Saksena) W. Gams, *Alternaria dianthicola* Neerg., *Aspergillus alliaceus* Thom & Church, *A. caesiellus* Saito, *A. carneus* Blochwitz, *A. conicus* Blochwitz, *A. unguis* (Émile-Weill & L. Gaudin) Thom & Raper, *Cladosporium bruhnei* Linder, *C. herbarum* (Pers.) Link, *C. macrocarpum* Preuss, *Dichocladosporium chlorocephalum* (Fresen.) K. Schub., U. Braun & Crous, *Exophiala castellanii* Iwatsu, Nishim. & Miyaji). В период исследований облигатно морские грибы не были обнаружены, вероятно, влияние стока р. Дунай определяет доминирование наземных видов в воде района.

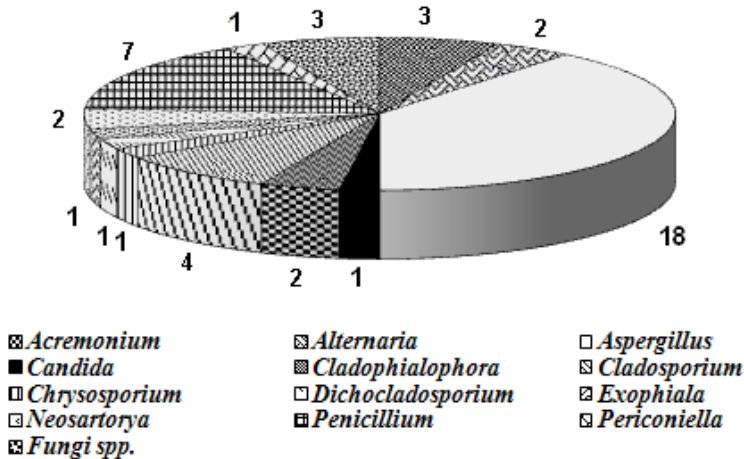


Рис. 2. Распределение микромицетов по родам

Fig. 2. Micromycetes distribution according to genera

Наибольшую частоту встречаемости отметили для *Aspergillus fumigatus* Fresen. (33,0%) и *Penicillium decumbens* var. *atrovirens* S. Abe. (30,8%), 18 видов выделили 1–2 раза (встречаемость 1,1–2,3%).

В поверхностном горизонте воды обнаружено 46 видов грибов, в придонном – 40, общими для двух экотопов были 39 видов. Сходство микокомплексов двух горизонтов воды по коэффициенту Брей-Куртиса составляло 70,8% (август – 73,7%, октябрь – 54,2%).



В августе грибы не были выявлены в 12 пробах, в октябре — в 15. Средняя плотность пропагул грибов в воде соответствовала 2298 ± 393 КОЕ · дм⁻³ (в августе — 3341 ± 429 КОЕ · дм⁻³, в октябре — 1255 ± 357 КОЕ · дм⁻³) плотность пропагул грибов по станциям изменялась от 0 до 11750 КОЕ · дм⁻³. Среднее число видов на станциях составляло 8. В августе — 3–13 (в среднем — 7 видов), в октябре — 0–5 (в среднем — 3 вида), значение индекса Шеннона (видовое разнообразие) соответствовало 2,17. В августе — 1,51–3,02 (в среднем $2,35 \pm 0,11$), в октябре — 0,466–1,535 (в среднем — $1,005 \pm 0,11$) бит · особь⁻¹. В августе средняя плотность пропагул грибов была в 2,6 раза выше, чем в октябре, что вероятно связано с сезонными особенностями роста и размножения микромицетов.

Сходство микокомплексов станций района было низким (от 10 до 40%). В районе исследований выявлено 17 видов (36,2%) оппортунистических грибов из родов *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* (широко распространенные сапротрофные грибы, продуцирующие микотоксины или способные при определенных условиях переходить к паразитизму). Максимальной встречаемостью в августе характеризовались *Aspergillus fumigatus* и *Penicillium decumbens* (по 36,3%), в октябре — *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* Keissl. и *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link (по 32,3%). Частота встречаемости и плотность оппортунистических грибов в районе была выше, чем сапротрофных (рис. 3, 4), особенно на станциях, расположенных ближе к берегу. Увеличение плотности пропагул потенциально патогенных грибов в прибрежных районах было отмечено и в исследованиях других авторов [5, 7]. Следовательно, в районе авандельты р. Дунай желательно проводить микологический контроль воды.

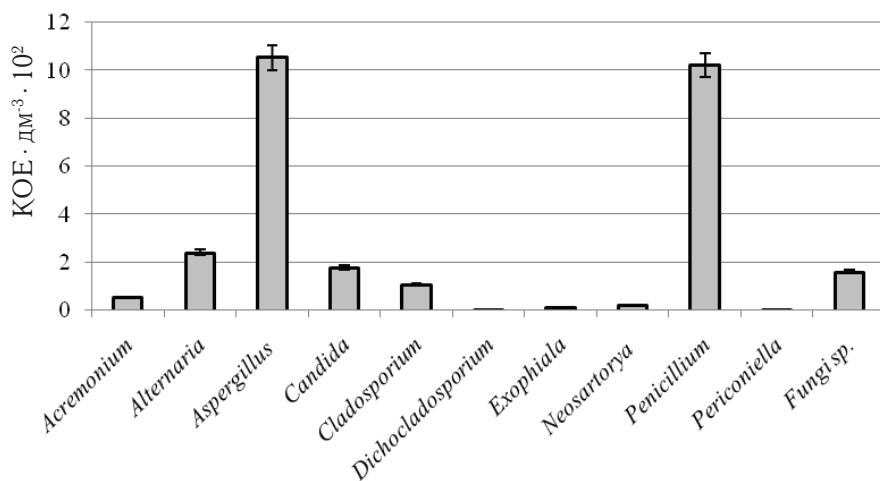


Рис. 3. Средняя плотность пропагул микромицетов по родам в августе 2008 г. (КОЕ · дм⁻³)

Fig. 3. Average density of micromycetes propagules according to genera in August, 2008 (CFU · dm⁻³)

По результатам сопоставления биотической и абиотической матриц сходства, рассчитаны наиболее высокие значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена (ρ_{\max}) для комбинаций биотических и абиотических переменных, в наи-

большей степени определяющих изменение численности грибов. В исследуемый период не выявили корреляции плотности пропагул грибов (КОЕ), выявленных методом посева, от таких абиотических параметров, как глубина отбора проб, температура, соленость воды и удаленность станций от берега (в пределах их колебаний) (табл. 2), что подтверждает данные, полученные ранее методом прямого микроскопирования [4].

Таблица 2

Наиболее высокие значения коэффициента ранговой корреляции Спирмена (ρ_{\max})

Table 2

The highest values of Spearman coefficient of grade correlation (ρ_{\max})

ρ_{\max}	Переменные	Количество переменных
0,099	температура+соленость	2
0,092	температура	1
0,067	глубина+температура+соленость	3

В районе идентифицировано 46 видов грибов из 10 родов, 6 семейств, 6 порядков, 4 классов отдела Ascomycota (анаморфные роды), обнаружено 25 новых для региона видов, среди которых 13 – впервые выделены в Черном море. Наибольший вклад в видовой состав микобиоты вносили виды из родов *Aspergillus* – 18 видов, *Penicillium* – 7, для них также были отмечены самая высокая частота встречаемости и плотность (КОЕ · дм⁻³).

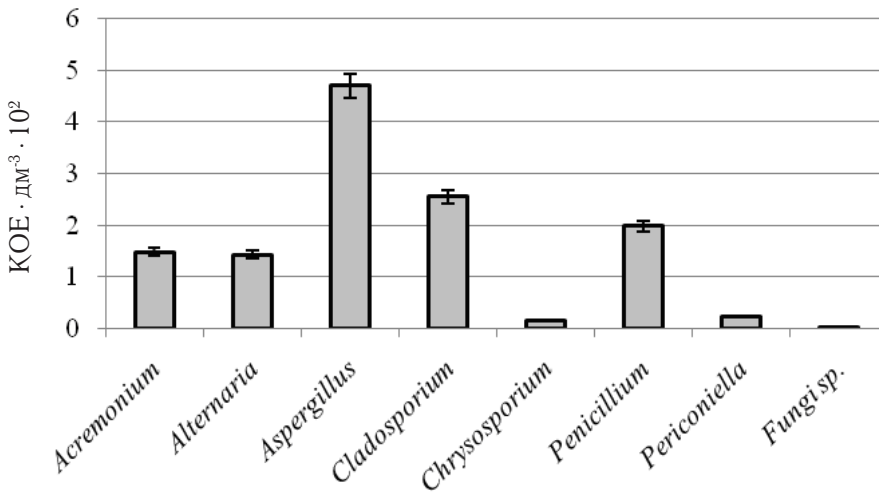


Рис. 4. Средняя плотность пропагул микромицетов по родам в октябре 2008 г. (КОЕ · дм⁻³)

Fig. 4. Average density of micromycetes propagulas according to genera in October, 2008 (CFU · dm⁻³)

В августе средняя плотность спор грибов была в 2,6 раза выше, чем в октябре, что вероятно связано с сезонными особенностями роста и размножения микромицетов.

Выделено 17 оппортунистических видов грибов (36,2% от видового состава). Отмечено увеличение числа видов, частоты встречаемости и плотности спор потенциально патогенных грибов на станциях, расположенных ближе к берегу, поэтому в районе дельты р. Дунай желательнее проводить микологический контроль воды.

В исследованный период не выявили зависимости плотности спор грибов от таких абиотических параметров, как глубина, температура, соленость воды и удаленность станций от берега.

Авторы выражают искреннюю благодарность коллегам из Одесского филиала Института биологии южных морей НАН Украины за отбор и доставку проб.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артемчук Н.Я.* Микофлора морей СССР. — М.: Наука, — 1981. — 190 с.
2. *Воронин Л.В.* Микофлора рыб дельты реки Дунай // Микол. и фитопатол. — 1984. — 18, № 3. — С. 265–270.
3. *Дудка И.А., Копытина Н.И.* Новые для Черного моря виды морских гифомицетов из рода *Cumulospora* // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. — 2007. — № 15. — С. 575–580.
4. *Копытина Н.И.* Абиотические условия распределения спор высших морских грибов в разных водных массах северо-западной части Черного моря // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. — 2007. — № 15. — С. 459–464.
5. *Мілько О.О.* Гриби, виділені з води радянської ділянки р. Дунаю // Микробиол. журн. — 1965. — 27, № 3. — С. 38–44.
6. *Саттон Д., Фотергил А., Ринальди М.* Определитель патогенных и условно патогенных грибов. — М.: Мир, 2001. — 468 с.
7. *Араş М.М.* Mycoplancton du Danube inferieur et de la zone marine d'influence // Cercetări marine I.R.C.M. — 1980. — № 13. — P. 63–65.
8. *De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J.* Atlas of clinical fungi. 2nd edition. — Centraalbureau voor Schimmelcultures. — 2000. — 1126 p.
9. *Warwick R.M., Clarke K.R.* Practical measures of marine biodiversity based on relatedness of species / R.M. Warwick, K.R. Clarke // Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. — 2001. — № 39. — P. 207–231.
10. <http://www.indexfungorum.org/>



Н.І. Копитіна, І.В. Тарасюк

Одеська філія Інституту біології південних морів імені О.О. Ковалевського,
НАН України, вул. Пушкінська, 37, Одеса, 65125, Україна,
тел.: +38 (048) 725 09 34, e-mail: nade.kopytina@yandex.ru,
irina.tarasyuk87@yandex.ru

ВИЩІ МОРСЬКІ ГРИБИ ПЕЛАГІАЛІ АВАНДЕЛЬТИ РІКИ ДУНАЙ

Реферат

Ідентифіковано 46 видів мікроміцетів з 10 родів, 6 родин, 6 порядків, 4 класів відділу Ascomycota (анаморфні роди). Найбільший внесок у видовий склад мікобіоти досліджуваної акваторії належить родам *Aspergillus* P. Micheli ex Link (18 видів) та *Penicillium* Link (7), для представників цих родів також було відмічено й найбільшу частоту зустрічальності та щільність КУО·дм⁻³. Кількість видів, частота зустрічальності та щільність пропагул опортуністичних грибів у районі була вище, ніж сапротрофних, особливо на станціях, розташованих ближче до берега. В досліджений період не виявлено залежності густоти пропагул грибів від таких абіотичних параметрів, як глибина відбору проб, температура, солоність води та віддаленість станцій від берега.

Ключові слова: мікобіота, пропагули грибів, опортуністичні мікроміцети, авандельта р. Дунай.

N.I. Kopytina, I.V. Tarasyuk

Odesa Branch, Institute of Biology of Southern Seas NASU, 37,
Pushkinskaja str., Odesa, 65125, Ukraine, tel.: +38 (048) 725 09 34,
e-mail: nade.kopytina@yandex.ru, irina.tarasyuk87@yandex.ru

AQUATIC FUNGI OF THE WATER COLUMN OF THE DANUBE RIVER AVANDELTA

Summary

Forty six species of fungi, belonging to ten genera of six families, six orders, and four classes of the section Ascomycota (anamorphic genera) were identified. The greatest contribution into the species diversity of investigated water area, as well as maximal frequency of occurrence and density of CFU·dm⁻³, belongs to such genera as *Aspergillus* P. Micheli ex Link (18 species) and *Penicillium* Link (7). The number of species, frequency of occurrence and density of propagulas of opportunistic fungi in the area was higher than of saprotrophic fungi, especially on the stations situated nearer the bank. During the investigation period we didn't identify any dependence between propagulas density and such abiotic factors as depth, temperature, salinity of water and distance of the stations from the river's mouths.

Key words: mycobiota, fungi propagulas, opportunistic micromycetes, the Danube river avandelta.



**Л.В. Авдеева, А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, В.М. Іляш,
М.А. Хархота**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН
України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д 03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

СИНТЕЗ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ У БАЦИЛ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА

*Вдосконалено поживне середовище для біосинтезу різних гідролаз бактеріями роду *Bacillus* та вивчена активність синтезу ними складної системи гідролітичних ферментів, що пов'язано з особливостями складу поживного середовища. Не змінюючи якісного складу середовища для культивування, оптимізовано співвідношення її компонентів, що забезпечують підвищений біосинтез та активність позаклітинних ферментів складного гідролітичного комплексу. Встановлено, що для бацил при підвищенні їх гідролазної активності найбільш значущим є поєднання неорганічного і органічного джерел азоту.*

*К л ю ч о в і с л о в а : гідролази, бактерії роду *Bacillus*, поживне середовище.*

Відомо, що мікроорганізми здатні використовувати різні ростові полісахаридні субстрати та синтезувати при цьому комплекс різних гідролітичних ферментів.

За даними ряду дослідників гідролітичні ферменти, зокрема ферменти целюлозолітичного комплексу, ксиланази, ліпази та інші відносяться до індукцибельних ферментів, що і визначає різні вимоги до складу поживного середовища, на якому культивуються бактерії-продуценти [2, 5, 6, 7, 12].

Тому одним з шляхів підвищення біосинтетичної здатності бацил без зміни їх генетичного апарату є направлене регулювання процесів біосинтезу ферментів шляхом зміни саме складу та співвідношень компонентів поживного середовища, на якому вони вирощуються. Особливо це важливо для промислових продуцентів ферментів, в тому числі гідролаз.

Метою даної роботи було вивчення закономірностей біосинтезу різних гідролаз бактеріями роду *Bacillus* на відповідних специфічних вуглецевісних субстратах, удосконалення складу поживного середовища для забезпечення найбільш активного біосинтезу цих ферментів.

Матеріали і методи

В роботі використано 36 культур бактерій роду *Bacillus* з колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАНУ, що пройшли етапи скринінгу та відібрані за найвищою гідролітичною активністю.

Вирощування бактерій проводили на рідкому поживному середовищі, раніше оптимізованому нами для глибинного культивування бацил, яке забезпечує їх оптимальний ріст та накопичення біомаси [8], такого складу (у г/л): натрію цитрат



— 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, рН середовища — $7,0 \pm 0,2$. Це середовище було використано як вихідне для підвищення біосинтезу та активності гідролаз бактеріями роду *Bacillus*. З метою вдосконалення середовища, додавали відповідний специфічний для кожного з ферментів субстрат (у %): для отримання ксиланази — ксилан 1,0; целюлази (ендоглюканази) — Na-KMЦ (натрієву сіль карбоксиметилцелюлози) 0,5; β -глюкозидази — целобіозу 0,2; пектинази — пектин 0,5; ліпази — маслинову олію 0,5, який використовували також як джерело вуглецю. Культивування проводили протягом 48 год при 37 °С в колбах ємністю 750 мл з 50 мл середовища на качалці з 200 об/хв. Після вирощування відокремлювали культуральну рідину від біомаси центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 20 хв та визначали ферментні активності у відповідних супернатантах за загальноприйнятими методами [3, 9, 13].

Оптимізацію складу вищезазначеного поживного середовища проводили з використанням математичного методу планування експерименту — методу ортогональних латинських прямокутників для п'яти чинників (тобто компонентів середовища) на чотирьох рівнях (їх концентраціях) [1]. Згідно існуючій матриці планування перевірено 24 варіанти середовища для кожного ферменту з одночасним варіюванням концентрацій всіх п'яти компонентів середовища. Варіант вихідного середовища був контрольним. Значення досліджуваних рівнів концентрації компонентів середовища такі (у г/л): для цитрату натрію — від 0 до 1,93; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — від 1,18 до 5,9; KH_2PO_4 — від 2,4 до 12,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — від 0,09 до 0,225; для кукурудзяного екстракту, який був введений в середовище, — від 2,5 до 12,5.

Математичне опрацювання результатів експериментів полягало у розрахунку величин ефектів впливу кожної концентрації компоненту середовища на активність процесу біосинтезу ферментів, що розраховували за математичним плануванням експерименту [1].

Ріст бактерій на середовищах з різними субстратами оцінювали вимірюванням оптичної густини суспензії, що виросла, на фотоелектроколориметрі ФЕК-56 при 540 нм, рН — потенціометрично. Для оптимізації середовища з метою вивчення ферментної активності спочатку використовували контрольні штами: *B. subtilis* МС-13₂, *B. subtilis* 55 ЛГ, *B. subtilis* 36ЛГ, *B. subtilis* 2Ш, які характеризувалися найвищою активністю щодо синтезу ксиланази та целобіази, целюлази, пектинази і ліпази, відповідно. В подальших дослідках на оптимізованих середовищах культивували решту штамів і потім порівнювали їх за активністю відповідного ферменту з контрольними штамами.

Одним з критеріїв, за допомоги якого оцінювали здатність вибірково відноситися до складу поживного середовища будь-якого з досліджуваних штамів бактерій до біосинтезу того або іншого ферменту, був також коефіцієнт Т [10], за значенням якого судили про ферментну активність.

Коефіцієнт Т по суті віддзеркалює відношення ферментативної активності кожної з досліджуваних культур в дослідних середовищах ($N_{\text{досл.}}$) з контрольним штамом на вихідному середовищі ($N_{\text{вих.}}$):

$$T = (N_{\text{досл.}} - N_{\text{вих.}}) / N_{\text{вих.}}$$



Результати та їх обговорення

Встановлено, що для синтезу ферментів склад середовища був схожим за якістю, а після оптимізації для кожного з них він відрізнявся за кількісним співвідношенням його компонентів (табл. 1).

Таблиця 1

Склад поживного середовища для синтезу гідролітичних ферментів бактеріями роду *Bacillus*

Table 1

Composition of nutrient medium for the synthesis of hydrolytic enzymes by bacteria of genus *Bacillus*

Компонент	Склад середовища (г/л)						Вихідне середовище
	Ендо- глюканаза	β-Глюко- зидаза	Ксила- наза	Пектиназа		Ліпаза	
				ПЕ	ПГ		
Цитрат натрію	1,29	1,29	0,645	1,93	1,29	1,29	1,29
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,9	4,75	2,37	5,9	5,9	5,9	4,75
KH ₂ PO ₄	4,8	2,4	12,0	12,0	9,6	9,6	9,6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,18	0,045	0,045	0,225	0,225	0,18	0,18
Кукурудзяний екстракт	12,5	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	-

З даних таблиці видно, що зниження у вихідному середовищі кількості солей амонію, магнію та цитрату за одночасного збільшення в ньому фосфатів стимулювало синтез ксиланаз досліджуваними штамми бацил, в той час як наявність в ньому більшої, ніж у контролі, кількості названих компонентів сприяла вже синтезу пектиназ. Для підвищення ж синтезу целюлаз в середовищі культивування бажана менша кількість солей фосфату. Крім того, для активного біосинтезу всіх досліджуваних гідролітичних ферментів бацилам необхідна обов'язкова наявність в середовищі кукурудзяного екстракту (5–12%).

Таким чином, в результаті проведених досліджень з оптимізації складу поживного середовища та розрахованих за ними ефектів впливу концентрації кожного з компонентів середовища на синтезувальну активність були встановлені їх оптимальні співвідношення для кожного з досліджуваних ферментів і на їх основі складені та реалізовані його нові варіанти.

З даних табл. 2 видно, що при знайденому співвідношенні компонентів середовища рівень ксиланаз, що секретується бактеріями, був вищим, ніж до оптимізації і склав 434,7±25,2 од/мл, що перевищувало активність контрольного штаму *B. subtilis* MC-13₂ на вихідному середовищі приблизно в 1,3 раза (328,4±15,1 од/мл).

Зміни у співвідношенні компонентів поживного середовища позитивно відбивалися також на збільшенні синтезу ферментів пектолітичного та целюлозолітичного комплексів. При цьому, ендоглюканазна активність контрольного штаму підвищилася в 5,4 раза, целобіазна активність — в 18,7 раза, ПЕ (пектинестерази) в 2,7 раза та ПГ (полігалактуронози) до 2,2 раза в порівнянні з активністю на вихідному середовищі. Активність синтезу ліпази підвищилася майже в 1,2 раза із збереженням достатньо високого рівня і продуктивності по біомасі з використанням в середовищі маслинової олії як єдиного джерела вуглецю.



Синтезувальна активність гідролаз штамами *Bacillus subtilis* на вихідному та оптимізованому середовищах

Table 2

Synthesis hydrolase activity by the strains of genus *Bacillus subtilis* on initial and optimised medium

Штам <i>B. subtilis</i>	Продукований фермент	Активність, од/мл	
		до оптимізації	після оптимізації
МС-13 ₂	ксилаза	328±15,1	434,7±25,2
55 ЛГ	ендоглюканаза	1016,1±10,1	5526±12,5
МС-13 ₂	β-глюкозидаза	90,5±5,8	1690±31
36 ЛГ	пектиностераза	0,55±0,05	1,51±0,98
36 ЛГ	полігалактуроназа	3,2±0,11	7,2±0,86
2Ш	ліпаза	24,4±2,0	28,8±4,8

Таким чином, в результаті оптимізації середовища культивування шляхом підбору співвідношень його компонентів було отримано вищий рівень синтезу позаклітинних ферментів, ніж на вихідному середовищі, який істотно варіював у бактерій в залежності як від виду, так і від штаму. Серед всіх досліджуваних за рівнем активності найбільше відрізнялися штами, які продукували целюлазу в межах від 3519 до 18680 од/мл, що перевищувало в 3,5–29,2 рази активність контрольного штаму на середовищі до оптимізації. Бактерії також мали високу, практично однакового рівня, целобіазну активність — 1670–1870 од/мл, що перевищувало в 6–7 разів активність цього штаму на вихідному середовищі (90,5 од/мл).

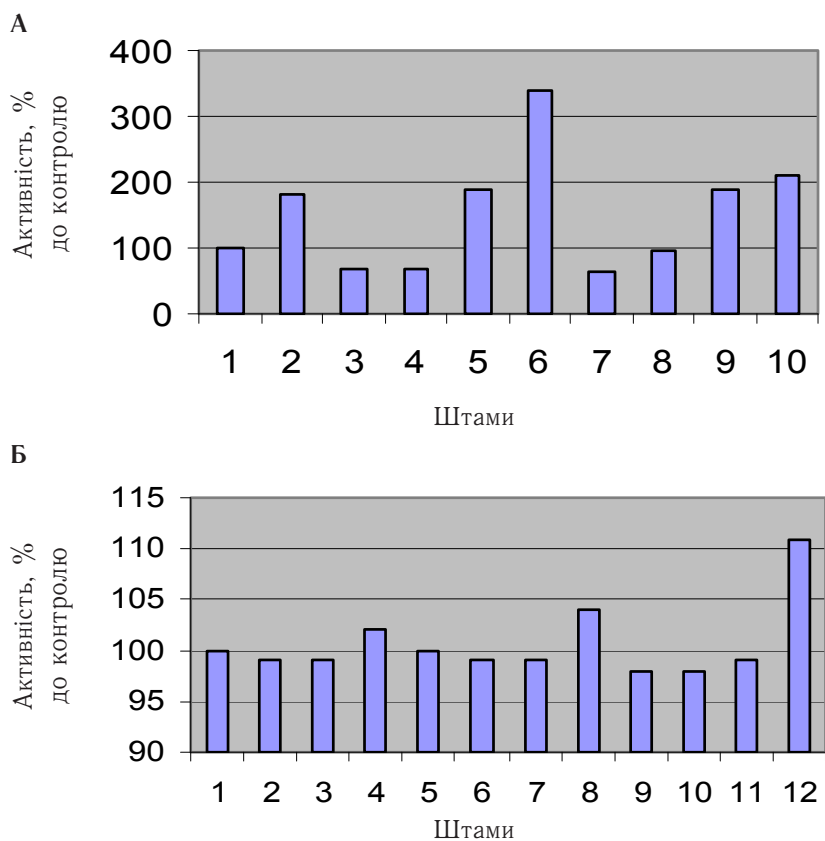
Порівняльний аналіз ферментної активності контрольних і досліджуваних штамів показав, що продукція ендоглюканаз штамом *B. subtilis* 229ж перевищувала рівень контрольного штаму на 82,3%, *B. subtilis* А_{5/1} — на 88,7%, *B. silvestris* А₁₀ — на 89,6% та штаму *B. licheniformis* А_{6/3} — на 111%, у решти штамів вона була нижчою. Рівень утворення целобіаз був вищим від контрольного тільки у трьох з досліджених штамів бактерій, але всього на 1,8–10,6% (рис. 1).

При культивуванні на оптимізованому середовищі бацили відрізнялися також різним рівнем синтезу ксиланаз та ліпаз (рис. 2). І хоча всі досліджувані штами, що вивчаються, мали здатність розщеплювати ксилан, рівень їх активності на цьому середовищі поступався активності контрольного штаму. Виключення представляв лише штам *B. subtilis* 80 ЛГ, який мав таку ж активність, як контрольний. Крім того, відрізнялися два штами *B. megaterium* 906 та *B. licheniformis* А_{6/3}, здатні продукувати позаклітинну ліпазу активніше за контрольний штам.

Щодо пектолітичного комплексу, то досліджувані штами бацил проявляли тільки на оптимізованому середовищі як пектиностеразну, так і полігалактуроназну активність. З існуючих даних літератури відомо, що рівень цієї активності, як правило, залежить від співвідношення різних типів пектиназ [4]. Нами показано, що штами бацил, культивування яких проводили на вихідному середовищі, взагалі не мали пектиностеразної активності.



Тоді як на оптимізованому середовищі співвідношення визначених пектиназ у досліджуваних штамів коливалося в межах від 0,5 до 55,6. Така розбіжність в коливанні, можливо, вказує на залежність синтезу пектиназ не стільки від штаму продуцента, скільки від способу та умов його культивування, чи від інших чинників [4].



А — целюлаза

Штами (10 шт.):

1 *B. subtilis* 55ЛГ (100%)

2 *B. subtilis* 229Ж

3 *B. subtilis* 30s

4 *B. subtilis* 1872

5 *B. subtilis* A_{5/1}

6 *B. subtilis* A_{5/2}

7 *B. cereus* 63/4

8 *B. oligonitrophilus* 5758

9 *B. silvestris* A₁₀

10 *B. licheniformis* A_{6/3}

Б — β-глюкозидаза

Штами (12шт.):

1 *B. subtilis* МС-13₂ (100%)

2 *B. subtilis* A_{5/1}

3 *B. subtilis* A_{5/2}

4 *B. subtilis* МС-2₂

5 *B. subtilis* МС-6₃

6 *B. subtilis* 45ЛГ

7 *B. subtilis* 49ЛГ

8 *B. subtilis* 51ЛГ

9 *B. subtilis* 39ЛГ

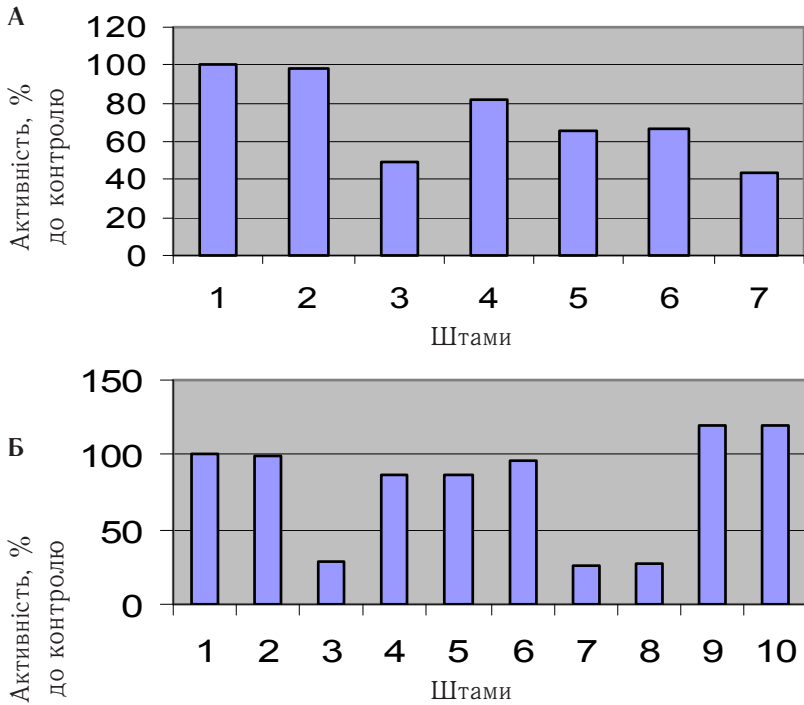
10 *B. silvestris* A₁₀

11 *B. licheniformis* A_{6/3}

12 *Bacillus* sp. A₇

Рис. 1. Синтез целюлаз штамми роду *Bacillus* на оптимізованому середовищі

Fig. 1. Synthesis of cellulase by the strains of genus *Bacillus* on the optimised medium



А — ксиланаза

Б — ліпаза

Штами (7 шт.):

Штами (10 шт.):

1 *B. subtilis* МС-13₂ (100 %)

1 *B. subtilis* 2Ш (100%)

8 *B. megaterium*

2 *B. subtilis* 80ЛГ

2 *B. subtilis* 39ЛГ

9 *B. megaterium* 906

3 *B. subtilis* 1155

3 *B. subtilis* 51ЛГ

10 *B. licheniformis* А_{6/3}

4 *B. subtilis* 39ЛГ

4 *B. subtilis* 36ЛГ

5 *B. subtilis* 51ЛГ

5 *B. subtilis* 1155

6 *B. megaterium* 906

6 *B. subtilis* 668

7 *B. licheniformis* А_{6/3}

7 *B. subtilis* 19ЛГ

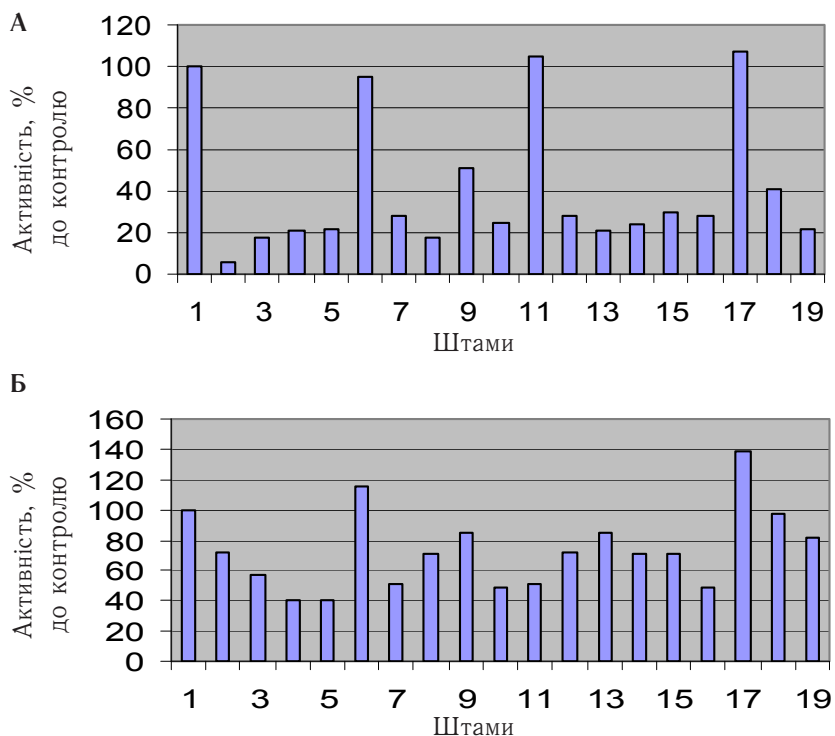
Рис. 2. Синтез ксиланаз (А) і ліпаз (Б) штамми роду *Bacillus* на оптимізованому середовищі

Fig. 2. Synthesis of xylanase (A) and lipase (B) by the strains of genus *Bacillus* on the optimised medium

Найбільш активним при синтезі обох ферментів виділився штам *B. megaterium* 906, який по ПЕ і ПГ перевершував контрольний на 6,6 і 38,9%, відповідно. Вище за контрольний по ПЕ були також штами *B. subtilis* 1701 (на 4,6%), а по ПГ штам *B. subtilis* 39ЛГ на 15,3% (рис. 3).

При порівнянні синтезувальної активності решти досліджуваних штамів, встановлено, що коефіцієнт Т по ксиланазі знаходився в межах значень від -0,35 до +0,09, по ліпазі — від -0,65 до +0,41, по ендоглюканазі — від +2,4 до +17,4, целобіазі — від +17,3 до +19,7, по ПЕ — від -0,05 до +2,97, по ПГ — від -0,09 до +2,12. Отримані значення коефіцієнта Т дали можливість підтвердити те, що досліджувані штами бактерій, використовуючи для біосинтезу специфічні субстрати, здатні синтезувати гідролітичні ферменти: ксиланози, ліпази, целюлази та пектинази.





- | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|--|
| 1 <i>B. subtilis</i> 36ЛГ (100%) | 7 <i>B. subtilis</i> 51ЛГ | 13 <i>B. licheniformis</i> MC13 ₁ |
| 2 <i>B. subtilis</i> 29ЛГ | 8 <i>B. subtilis</i> 83ЛГ | 14 <i>B. licheniformis</i> A _{6/3} |
| 3 <i>B. subtilis</i> 30 ЛГ | 9 <i>B. subtilis</i> 1155 | 15 <i>B. cereus</i> 504 |
| 4 <i>B. subtilis</i> 34ЛГ | 10 <i>B. subtilis fuscus</i> | 16 <i>B. cereus</i> 444 |
| 5 <i>B. subtilis</i> 49ЛГ | 11 <i>B. subtilis</i> 1701 | 17 <i>B. megaterium</i> 906 |
| 6 <i>B. subtilis</i> 39ЛГ | 12 <i>B. licheniformis</i> 5510 | 18 <i>B. pumilus</i> 21 |
| | | 19 <i>B. pulvifaciens</i> |

Рис. 3. Синтез пектиназ (А – пектинестераза, Б – полігалактураназа) штамми роду *Bacillus* при культивуванні на оптимізованому середовищі

Fig. 3. Synthesis of pectynase (A – pectynesterasa, B – polyhalactouronasa) by the strains of genus *Bacillus* at cultivation on the optimised medium

Разом з тим мікроорганізми по-різному реагували на співвідношення компонентів в оптимізованому середовищі, на що і вказує коефіцієнт Т зі знаком «+» або «-». Коефіцієнт Т був використаний нами як додатковий показник для виявлення найбільш активних штамів бацил за найбільшою абсолютною величиною та знаком «+».

Таким чином, отримані нами результати та їх статистичний аналіз підтвердили необхідність і важливість для біосинтетичної активності бактерій роду *Bacillus* всіх компонентів, що входять до складу поживного середовища для їх культивування, і при цьому дозволили виділити серед них основні, додавання яких призводило до найбільш позитивних ефектів. Такими були кукурудзяний екстракт та $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Поєднання джерел азоту (амонійного і амінного) виявилось найбільш сприятливим



і необхідним для активного синтезу ферментів бацилами. В літературі є чимало даних, що свідчать на користь цього чинника, котрий підсилює синтез ферментів у інших мікроорганізмів [5, 7, 11].

Узагальнюючи отримані результати, можна констатувати, що не змінюючи якісного складу вихідного поживного середовища можна зробити раціональнішим співвідношення його компонентів, що дозволяє забезпечити активний біосинтез бацилами позаклітинних ферментів складного гідролітичного комплексу. Дані літератури та власні дослідження свідчать про перспективність використання бацил для отримання комплексу гідролітичних ферментів не тільки шляхом підбору штамів, що продукують ці ферменти, але й вдосконаленням повноцінності середовищ для їх культивування, в тому числі у промисловому виробництві.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бирюков В.В. Практическое руководство по применению математических методов планирования эксперимента для поиска оптимальных условий в многофакторных процессах — Рига: Зинатне, 1969. — 79 с.
2. Иванова Н.П., Ерохина Л.И., Морозова Е.С. Сравнительное изучение способности различных бактериальных культур синтезировать целлюлолитические ферменты // Прикладная биохимия и микробиология. — 1977. — Т. 13, № 4. — С. 552—558.
3. Лифшиц Д.Б. Методы определения пектолитической активности препаратов плесневых грибов // Унифицирование методов определения активности ферментных препаратов производственного назначения. — Киев. — УкрНИИТИ. — 1967. — 42 с.
4. Лобанок А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В., Павловская Ж.И. Регуляция образования пектолитических и целлюлолитических ферментов микроорганизмами // Проблемы биоконверсии растительного сырья. М.: Наука, 1986. — С. 192—214.
5. Логинова Л.Г., Иванова И.И., Гужова Э.П., Храцова Г.И., Исмаилова Д.Ю., Бурденко Л.Г. Целлюлазы термофильных микроорганизмов // Проблемы биоконверсии растительного сырья. М.: Наука, 1986. — С. 165—191.
6. Махсумханов А.А., Якубов И.Т., Давранов К.Д. Условия культивирования и биосинтез липаз грибом *Penicillium melinii* УзЛМ-4 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2003. — Т. 39, № 1. — С. 47—51.
7. Мухамеджанова Т.Г., Безбородов А.М. Влияние источника азота и углерода на накопление липазы грибом *Rizopus oryzae* 1414 // Прикладная биохимия и микробиология. — 1982. — Т. 18, в. 1. — С. 16—22.
8. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А. Стимуляция роста и спорообразования *Bacillus subtilis* оптимизацией углеводного питания при глубинном культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. — 1997. — 33, № 3. — С. 321—324.
9. Рухлядева А.П., Полюгалова Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легк. и пищ. Промышленность, 1981. — 288 с.
10. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Гончарук Ю.Н., Дробот Е.И. и др. Кислородзависимая и нитроксидзависимая ферментная системы макрофагов при стафилококовой и листериозной инфекциях // ЖМЭИ. — 2006. — № 3. — С. 39—43.
11. Теоретические и прикладные аспекты синтеза ферментов микроорганизмами. Под ред. М.В. Залашко. Минск: Наука и техника, 1982. — С. 121—133.
12. Штейн И.В., Арендс И.М., Сорокина Т.А., Горшкова Е.В., Калуняц К.А. Отбор микроорганизмов, синтезирующих щелочную липазу // Биотехнология. — 1989. — Т. 5, № 2. — С. 133—136.
13. Ota V., Yamada Y. Lipase from *Candida paraliopolytica*. Part 1. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol // Agric. Biol. Chem. — 1966. — V. 30, № 4. — P. 351—358.



УДК 579.152.3

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

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

СИНТЕЗ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ У БАЦИЛЛ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Реферат

Усовершенствована питательная среда для биосинтеза разного типа гидролаз бактериями рода *Bacillus*, а также изучена активность синтеза ими сложной системы гидролитических ферментов, что связано с особенностями состава питательной среды. Не меняя качественный состав среды для культивирования, оптимизированы соотношения ее компонентов, обеспечивающие повышенный биосинтез и активность внеклеточных ферментов сложного гидролитического комплекса. Установлено, что для бацилл при повышении их гидролазной активности наиболее значимым является сочетание неорганического и органического источников азота.

К л ю ч е в ы е с л о в а : гидролазы, бактерии рода *Bacillus*, питательная среда.

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

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, 154, Zabolotny str., Kyiv,
D 03680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 29, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

SYNTHESIS OF HYDROLYTIC BACILLI ENZYMES DEPENDING ON NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION

Summary

Nutrient medium for the biosynthesis of different hydrolases type by bacteria of genus *Bacillus* has been improved. Activity of synthesis by bacilli strains of the complex system of hydrolases relating with the peculiarity of nutrient medium composition has been studied. The nutrient proportion of growth medium has been optimized for providing the increasing biosynthesis and activity of extracellular enzymatic hydrolytic complex. It was established that the most significant for increasing of bacilli hydrolase activity was combination of inorganic and organic nitrogen sources.

К e y w o r d s : hydrolases, bacteria of genus *Bacillus*, nutrient medium.



О.В. Левицька, М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,
тел.: +38 (066) 663 64 06, e-mail: o_levytska@yahoo.com

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ ТА УТВОРЕННЯ ГЛІКОГЕНУ В КЛІТИНАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA*

Досліджено здатність зелених фотосинтезувальних сіркобактерій Chlorobium limicola Ya-2002 засвоювати різні джерела азоту. Бактерії використовують амонійний, амінний та молекулярний азот. Найкращий ріст бактерій спостерігався у середовищі з солями амонію. Окремі амінокислоти – аспарагін, пролін, триптофан та глутамін – забезпечували ріст культури, а тирозин, триптофан, фенілаланін і серин не використовувалися як джерела азоту. Нітрати не використовувалися C. limicola і виявляли інгібуючий вплив на засвоєння інших форм азоту. Показано, що дефіцит амонійного азоту і/або наявність нітрату у середовищі стимулюють утворення глікогену.

Ключові слова: зелені сіркобактерії, Chlorobium limicola, азотфіксація, глікоген, джерела азоту.

Фотосинтезувальні зелені бактерії родини *Chlorobiaceae* є облігатними анаеробами, для яких характерний фотолітоавтотрофний тип живлення. Як донори електронів в процесі аноксигенного фотосинтезу вони використовують відновлені сполуки сірки (найчастіше H_2S) [9]. Представники цієї родини не засвоюють органічні сполуки як джерело вуглецю. Основним джерелом вуглецю для *C. limicola* є діоксид карбону. Подібно до інших фотосинтезувальних прокариот вони використовують ацетат і піруват як допоміжні джерела вуглецю [10]. Засвоєння цих органічних кислот відбувається лише за наявності CO_2 [4]. Представники *Chlorobium* суттєво різняться за здатністю утилізувати різні джерела азоту [12]. В клітинах бактерій за певних умов культивування нагромаджується глікоген. Умови біосинтезу глікогену в клітинах фотосинтезувальних зелених сіркобактерій та механізми його регуляції досліджені недостатньо [11]. Зелені сіркобактерії можуть виявитися джерелом дешевого органічного карбону, тому питання умов нагромадження глікогену має теоретичне і практичне значення.

Метою цієї роботи було дослідити здатність фотосинтезувальних зелених сіркових бактерій використовувати різні джерела азоту та їх вплив на біосинтез глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002.

Матеріали та методи

В досліді використовували штам зелених фотосинтезувальних бактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002, виділений із водойм Яворівського сіркового родовища [2, 3]. Бактерії вирощували за анаеробних умов у рідкому середовищі для зелених



сіркобактерій GSB (green sulfur bacteria) [14] протягом 7–8 діб при температурі 24–25 °С. До середовища культивування вносили натрію сульфід дев'ятиводний (4 мМ), натрію гідрокарбонат (18 мМ) та натрію ацетат і натрію піруват як додаткові джерела вуглецю (4,5 та 6,1 мМ, відповідно). Наведені концентрації є кінцевими для цих сполук у середовищі культивування. Культуру освітлювали променями з довжиною хвилі 700–800 нм інтенсивністю 40 лк [4]. Бактерії вирощували в анаеростатах Genbox Jar 7.0 L. France, для поглинання кисню використовували генератори для анаеробів Genbox anaer (фірми Biomerieux). Амінокислоти додавали у концентрації 0,05%. Біомасу визначали фотоелектроколориметрично ($\lambda=450$ нм, довжина оптичного шляху 3 мм, фотометр КФК-3). Клітини осаджували центрифугуванням при 8000 об/хв. Концентрацію гідроген сульфід у середовищі визначали фотоелектроколориметрично після його взаємодії з *n*-амінодиметиланіліном [17]. Клітини міроскопували за допомоги електронного мікроскопа УЕМВ-100Б. Безклітинні екстракти отримували шляхом руйнування попередньо відмитих клітин за допомоги ультразвукового дезінтегратора УЗДН-2Т при температурі 4 °С. Гідроліз глікогену безклітинних екстрактів проводили кип'ятінням протягом трьох годин з 1н сірчаною кислотою. Вміст глюкози в екстрактах до і після гідролізу визначали ферментативно за допомоги аналітичного набору «Діаглюк» [1]. Побудову графіків та статистичну обробку даних [5] здійснювали за допомоги комп'ютерної програми Origin 6.1.

Результати та їх обговорення

На початку роботи дослідили закономірності росту *C. limicola* за наявності в середовищі різних концентрацій CO_2 та донора електронів Na_2S , а також використання ним натрію пірувату і натрію ацетату. Початковий рівень діоксиду вуглецю та натрію сульфід у вихідному середовищі забезпечують утворення відносно невеликої біомаси клітин (рис. 1).

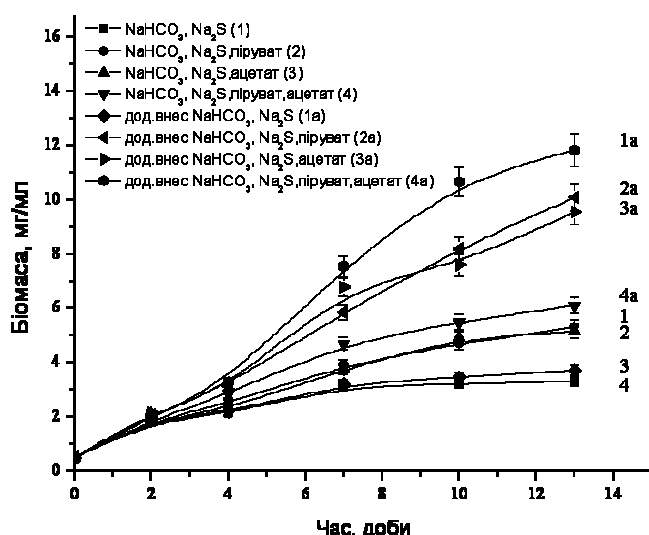


Рис. 1. Ріст *C. limicola* Ya-2002 у середовищі GSB з додатковим внесенням джерел вуглецю і донора електронів

Fig. 1. The growth of *C. limicola* Ya-2002 in the medium GSB with addition of carbon sources and electron donor



На цьому добу культивування її максимальний рівень складав приблизно 2,5 мг/мл. Додаткове внесення до середовища натрію пірувату і натрію ацетату сприяло незначному підвищенню рівня біомаси (в 1,3–1,8 раза, відповідно). Одночасне внесення пірувату і ацетату було більш ефективним і сприяло збільшенню біомаси в два рази. Можна припустити, що додавання до середовища ацетату стимулювало реакцію його карбоксилювання і перетворення до пірувату, який в подальшому використовується для синтезу фосфоенолпірувату (ФЕП) — акцептора CO_2 . Продуктом цієї реакції є оксалоацетат — один із ключових метаболітів відновного циклу трикарбонових кислот, який забезпечує біосинтетичні процеси клітини необхідними метаболітами. З іншого боку, ФЕП є проміжним метаболітом, який використовується для біосинтезу глікогену [15]. В процесі росту *C. limicola* рівень діоксиду вуглецю та натрію сульфідів в середовищі постійно знижується [2], тому доцільно було перевірити, як впливає на ріст цих бактерій додаткове внесення джерел вуглецевого живлення і донора електронів. Додаткове внесення цих сполук здійснювали на п'яту та десятю доби культивування для другої половини варіантів. Виявилось (рис. 1), що збільшення концентрацій натрій гідрокарбонату (джерела карбону) і натрій сульфідів (донора електронів) помітно не впливало на ріст бактерій (рис. 1, 4а). Однак, якщо разом із додатковим внесенням джерела вуглецю і донора електронів до середовища додавали натрію піруват і натрію ацетат, то біомаса зростала у 3–4 рази (рис. 1, 2а–3а). Таким чином, додаткове внесення до середовища пірувату і ацетату позитивно впливало на біосинтетичні процеси бактерій, що необхідно враховувати при оптимізації середовища для вирощування *C. limicola* Ya-2002. Виходячи з цього, в наступних експериментах бактерії вирощували у середовищі, що містило натрію піруват і натрію ацетат.

Природа джерел азоту, закономірності їхнього використання та вплив на утворення глікогену описані лише для одного представника *Chlorobiaceae* — *C. thiosulfatophylum* [12]. В наступному експерименті дослідили здатність *C. limicola* Ya-2002 використовувати різні джерела азоту (рис. 2). Виявилось, що досліджувані бактерії подібно до *C. thiosulfatophylum* найкраще ростуть у середовищі, що містить солі амонію (амонію хлорид у концентрації $6,4 \cdot 10^{-3}\text{M}$, що відповідає складу середовища GSB). За наявності амоній хлориду біомаса культури на 14 добу складала 7,7 мг/мл. У середовищі, до якого не вносили жодних джерел азоту, бактерії росли і нагромаджували відносно велику біомасу (рис. 2), що свідчить, очевидно, про здатність *C. limicola* Ya-2002 фіксувати атмосферний азот. Ця властивість широко розповсюджена серед представників *Chlorobiaceae* [5, 12, 16]. У середовищі з нітратами помітного росту клітин не спостерігалось (рис. 2), що свідчить про те, що *C. limicola* не використовують нітрати як джерело азотного живлення. А оскільки ці бактерії здатні до азотфіксації (в середовищі без додавання джерел азоту спостерігався доволі значний ріст, приблизно 80% від контролю), то з цього випливає, що нітрати не тільки не використовуються як джерело азоту, а й інгібують використання інших форм азоту, в тому числі й молекулярного. Крім солей амонію бактерії добре використовують амінний азот. У середовищі з аспарагіном біомаса клітин була лише на 30% меншою, ніж у середовищі з амонієм.

Крім того, дослідили, як *C. limicola* використовують інші амінокислоти, зокрема фенілаланін, пролін, треонін, триптофан, тирозин, серин та глутамін. Виявилось, що пролін, триптофан і глутамін забезпечували нагромадження приблизно такої ж біомаси, як у середовищі з аспарагіном, а фенілаланін, тирозин, треонін і серин



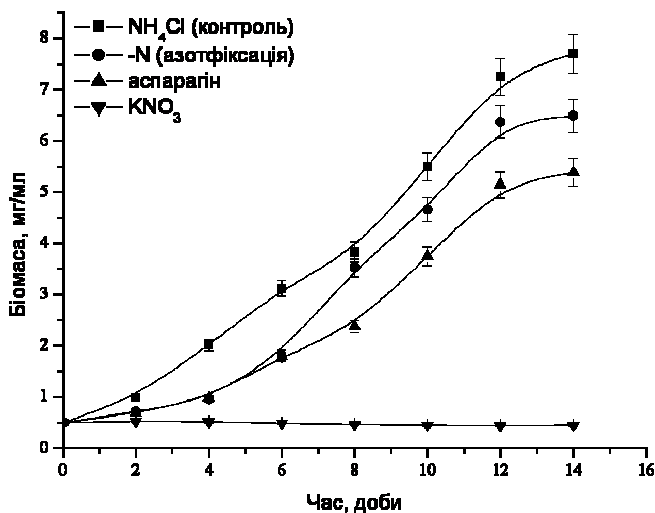


Рис. 2. Ріст *C. limicola* Ya-2002 у середовищах з різними джерелами азоту
 Fig. 2. The growth of *C. limicola* Ya-2002 in the media with various nitrogen sources

пригнічували ріст культури. Про подібні результати впливу амінокислот на ріст *C. thiosulfatophylum* повідомляли Kelly D.P. et al [13]. Калію нітрат у концентрації 4 mM не засвоювався *C. limicola*.

На рис. 3 представлені дані про ріст *C. limicola* у середовищах з різними джерелами азоту в присутності калію нітрату. У всіх випадках нітрати інгібують ріст бактерій.

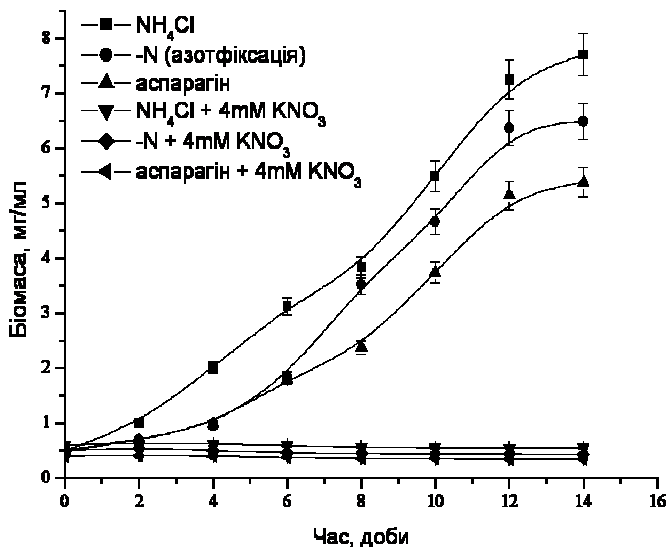


Рис. 3. Нагромадження біомаси *C. limicola* Ya-2002 у середовищах з різними джерелами азоту за наявності нітратів
 Fig. 3. Biomass accumulation by *C. limicola* Ya-2002 in the media with various nitrogen sources and nitrate addition



Згідно з даними Dietzler D. et al. дефіцит азоту в середовищі стимулює нагромадження глікогену в клітинах *E. coli* [7, 8]. Здатність *C. limicola* Ya-2002 до азотфіксації затрудняє вивчення цього процесу у досліджуваних бактерій.

Тому для дослідження впливу різних джерел азоту на синтез глікогену застосували встановлену нами властивість нітратів інгібувати засвоєння інших форм азоту для створення його дефіциту в клітинах (рис. 3). Експериментально показано, що концентрації нітрату 4мМ і вище практично повністю інгібували ріст культури. При нижчих концентраціях цієї сполуки бактерії нагромаджували незначну біомасу. Концентрацію нітратів 4 мМ (найменшу концентрацію, що інгібувала ріст культури) використовували в подальших експериментах для створення дефіциту азоту.

Відомо, що для більшості бактерій, які синтезують глікоген, найвищий рівень його в клітинах спостерігається, як правило, у стаціонарній фазі росту. Для встановлення часу культивування, необхідного для максимального нагромадження глікогену в клітинах, використали електронну мікроскопію та визначили ендогенний рівень глікогену. Із електронномікроскопічних фотографій клітин з різних фаз росту (рис. 4) видно, що на 4 добу культивування в клітинах ще не помітно сформованих гранул глікогену.

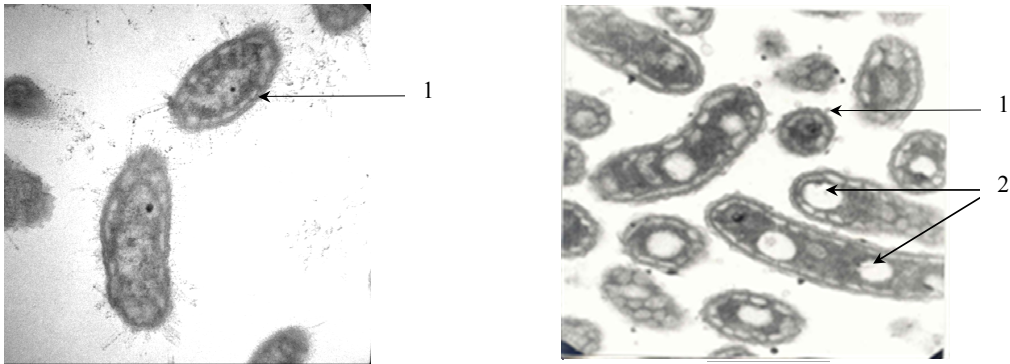


Рис. 4. Електронні мікрофотографії клітин *C. limicola* Ya-2002 ($\cdot 15000$) із логарифмічної та стаціонарної фаз росту
1 — хлоросоми; 2 — гранули глікогену

Fig. 4. Electrone micrograph of the cells of *C. limicola* Ya-2002 ($\cdot 15000$) from logarithmic and exponential growth phase
1 — chlorosome; 2 — glycogen granules

Вони є досить чіткими на мікрофотографіях клітин із стаціонарної фази росту. З цими даними узгоджуються результати аналізу вмісту глікогену в клітинах, що приведені на рис. 5. Зростання рівня глікогену в клітинах спостерігається вже на 7 добу культивування і досягає максимуму на 12 добу, після чого рівень глікогену починає знижуватися.

C. limicola здатні фіксувати молекулярний азот. Його засвоєння, як було показано вище (рис. 2), повністю інгібується нітратом. Для вивчення впливу дефіциту азоту на синтез глікогену у *C. limicola* Ya-2002 відмиті клітини бактерій інкубували у середовищі GSB, до якого додавали нітрат у концентрації 4 мМ. На рис. 6 показано утворення глікогену відмитими клітинами *C. limicola* Ya-2002. У випадку інкубування клітин з амонійним азотом (рис. 6а) вміст глікогену в них

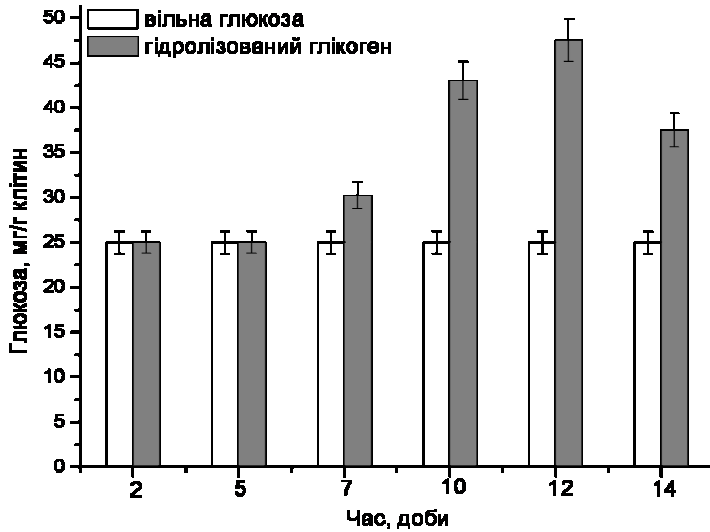


Рис. 5. Нагромадження глікогену у клітинах *C. limicola* Ya-2002

Fig. 5. Intracellular glycogen accumulation by *C. limicola* Ya-2002

після дводобового інкубування (рівень глікогену на другу добу інкубування був максимальним) зростав на 30% порівняно з вихідними клітинами, а додавання нітрату до середовища з амонієм сприяло зростанню вмісту глікогену на 76% порівняно з відмитими вихідними клітинами і на 46% порівняно з клітинами, інкубованими у середовищі з амонієм. Подібні результати отримано з відмитими клітинами, які інкубували у середовищі GSB без азоту (умови азотфіксації) (рис. 6б).

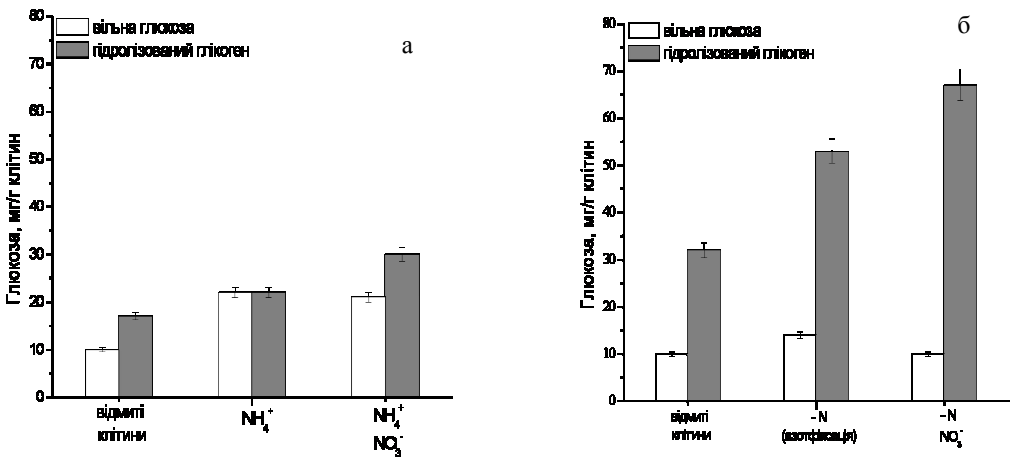


Рис. 6. Рівень вільної глюкози та глікогену у клітинах *C. limicola* Ya-2002 за умов засвоєння амонійної (а), молекулярної форм азоту та дефіциту азоту у середовищі (б)

Fig. 6. Free glucose and glycogen levels in the cells of *C. limicola* Ya-2002 under the conditions of utilization of ammonia (a), molecular nitrogen and nitrogen deficiency of amino group (b)



Інкубування клітин у середовищі без додавання солей амонію (умови азотфіксації) збільшувало рівень внутрішньоклітинного глікогену на 70%, а додавання до такого середовища 4 mM калію нітрату сприяло зростанню нагромадження глікогену на 120%. Отже, додавання до середовища інгібуючої концентрації нітратів (умови дефіциту азоту) сприяє значній стимуляції нагромадження глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002 за умов різного забезпечення азотом. Це можна пояснити функціонуванням лише тієї частини відновного ЦТК, що відповідає за перетворення ацетату і пірувату до глюкози і далі — до глікогену.

Таким чином, дослідження впливу різних джерел азоту на ріст і синтез глікогену у клітинах *C. limicola* Ya-2002 показало, що найбільш оптимальним джерелом азоту для росту цих бактерій є солі амонію. Дещо нижчий рівень нагромадження біомаси забезпечував аминний азот аспарагіну, проліну, триптофану і глутаміну. Не всі амінокислоти як джерело азоту були рівноцінними, зокрема тирозин, триптофан фенілаланін і серин інгібували ріст культури. У середовищі без внесення джерела азоту бактерії нагромаджували доволі високу біомасу, що була лише на 16% нижчою, ніж у середовищі з амонієм. Це, очевидно, свідчить про те, що, подібно до інших представників *Chlorobiaceae*, *C. limicola* Ya-2002 здатний фіксувати атмосферний азот. У всіх випадках зниження концентрації азоту в середовищі спостерігається зростання рівня глікогену в клітинах. Нітрати не використовуються як джерело азоту *C. limicola*, а в концентрації 4 mM і більше інгібують засвоєння інших форм азоту. Ця властивість нітратів може бути використана для вивчення механізмів регуляції біосинтезу глікогену в клітинах *C. limicola* Ya-2002.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гончар М.В. Чутливий метод кількісного визначення пероксиду водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах // Укр. біохім. журн. — 1998. — Т. 70, № 5. — С. 157–163.
2. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Вплив факторів середовища на швидкість використання H_2S *Chlorobium limicola* // Агроекологічний журнал. — 2007. — № 4. — С. 65–67.
3. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: автореф. дис. на здобуття ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.16. (екологія). / Горішний Мирослав Богданович. — Київ, 2008. — С. 18.
4. Горішний М., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм глюкози та глікогену у клітинах зелених фотосинтезувальних сіркобактерій *Chlorobium limicola* // Вісн. Львів.ун-ту, Сер. біол. — 2008. — Вип. 46. — С. 129–136.
5. Лакін Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
6. Bergstein T., Henis Y., Cavari B.Z. Nitrogen fixation by the photosynthetic sulfur bacterium *Chlorobium phaeobacteroides* from the lake Kinneret // Applied and environmental microbiology. — 1981. — Vol. 41. — P. 8288–8294.
7. Dietzler D., Leckie M., Lais C. Periodic inventory review as a strategy for survival in *Escherichia coli* // JBC. — 1979. — Vol. 254. — P. 8288–8294.
8. Dietzler D., Leckie M., Sternheim W. Regulation of glycogen synthesis and glucose utilization in *Escherichia coli* during maintenance of energy charge // JBC. — 1979. — Vol. 254. — P. 8276–8287.
9. Eisen J.A., Nelson K.E. et al. The complete genome sequence of *Chlorobium tepidum* TLS, a photosynthetic, anaerobic, green-sulfur bacterium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2002. — Vol. 99, № 14. — P. 9509–9514.
10. Frigaard N., Chew A., Li H., Maresca J. A., Bryant D.A. *Chlorobium tepidum*: insights into the structure, physiology, and metabolism of a green sulfur bacterium derived from the complete genome sequence // *Photosynthesis Research*. — 2003. — Vol. 78. — P. 93–117.



11. Hara F., Akazawa T., Kojima K. Glycogen biosynthesis in *Chromatium* strain D: I. Characterization of glycogen // *Plant and Cell Physiology*. — 1973. — V. 14, N. 4. — P.737–745.
12. Heda G.D., Madigan M.T. Aspects of nitrogen fixation in *Chlorobium* // *Arch Microbiol*. — 1986. — Vol. 143. — P. 330–336.
13. Kelly P.D. Growth and metabolism of the obligate photolithotroph *Chlorobium thiosulfatophilum* in the presence of added organic nutrients // *Arch Microbiol*. — 1974. — Vol. 100. — P. 163–178.
14. Overmann J. Green sulfur bacteria // *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, 2nd edn. V. 1 / Eds. Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G.M. New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. — P. 601–605.
15. Reidun Sireveg. Carbon Metabolism in Green Bacteria / eds. Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. Anoxygenic photosynthetic bacteria: Kluwer academic publishers, 1995. — P. 871–883.
16. Rodionov Y.V., Lebedeva N.V., Kondratieva E.N. Ammonia inhibition of nitrogenase activity in purple and green bacteria // *Arch Microbiol*. — 1986. — Vol. 143. — P. 345–347.
17. Truper H.G., Schlegel H.G. Sulphur metabolism in Thiorhodaceae. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 1964. — Vol. 30. — P. 225–238.

О.В. Левицька, М.Б. Горішний, С.П. Гудзь

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

ВЗАИМОСВЯЗЬ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ ГЛИКОГЕНА В КЛЕТКАХ *CHLOROBIVM LIMICOLA*

Реферат

Исследована способность зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola* Ya-2002 ассимилировать разные источники азота. *Chlorobium* утилизирует аммонийный, аминный и молекулярный азот. Аммоний оказался наиболее доступным источником азота. Некоторые аминокислоты L-конформации, включая аспарагин, пролин, триптофан и глутамин, стимулировали рост бактерий, в то время, как фенилаланин, серин, тирозин и треонин угнетали его. Нитраты не усваиваются *C. limicola* и ингибируют поглощение других форм азота. Дефицит аммония и/или нитраты в среде стимулируют накопление гликогена в клетках.

К л ю ч е в ы е с л о в а : зеленые серные бактерии, *Chlorobium limicola*, азотфиксация, гликоген, источники азота.



O.V. Levytska, M.B. Gorishniy, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Grushevskiy str., Lviv, 79005, Ukraine,
e-mail: o_levytska@yahoo.com

INTERRELATION OF NITROGEN NUTRITION AND GLYCOGEN ACCUMULATION IN THE CELLS OF *CHLOROBBIUM LIMICOLA*

Summary

Ability of green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 to assimilate various nitrogen sources was investigated. It was shown that *Chlorobium* utilize nitrogen of ammonium, amino group and fixes molecular nitrogen. Nitrogen of ammonium was found to be the most suitable for these bacteria. Addition of several amino acids of L-conformation including asparagine, proline, tryptophane and glutamine as nitrogen sources substantially increased the growth rate of *C. limicola*. On the other hand phenylalanine, serine, tyrosine and threonine inhibited the growth of bacteria. We also showed that nitric acid salts could not be used as nitrogen source by *C. limicola* and inhibited uptake of other nitrogen forms. We showed that ammonia deficiency and/or nitrate addition to the medium stimulate the intracellular glycogen accumulation.

Key words: green sulfur bacteria, *Chlorobium limicola*, nitrogen fixation, glycogen, nitrogen sources.



**К.С. Коробкова¹, Л.П. Панченко¹, А.М. Онищенко¹,
А.М. Остапчук¹, О.О. Панюта²**

¹Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154., Київ, МСП 680, Україна, тел.: +38 (044) 526 23 09,
e-mail: kkorobkova@ukr.net

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська,
60, Київ, 01033, Україна, e-mail: panyuta@ukr.net

ВПЛИВ МІКОПЛАЗМОВОЇ ІНФЕКЦІЇ НА ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЗАГАЛЬНИХ ЛІПІДІВ ТА МОРФОЛОГІЮ КЛІТИН КАЛЮСІВ ПШЕНИЦІ

*Створено експериментальну модель мікоплазмової інфекції рослин з використанням фітопатогенного молікута *Acholeplasma laidlawii* var. *granulatum* шт. 118 і калюсних тканин пшениці. У інфікованому ахолеплазмами матеріалі відбувалися як зміни морфології рослинних клітин, так і зміни у складі жирних кислот їх загальних ліпідів, що свідчить про активну життєдіяльність фітопатогенних ахолеплазм у калюсних тканинах рослини і включення захисних механізмів рослини у відповідь на стрес.*

К л ю ч о в і с л о в а : молікути, фітопатогенез, калюс, стрес.

Мікоплазмози рослин широко розповсюджені в регіонах інтенсивного землеробства, а за шкідливістю хвороби рослин мікоплазмової етіології відносять до катастрофічних хвороб, які можуть набувати характер епіфітотій. Пригнічення і контроль мікоплазмозних інфекцій рослин є проблемою, вирішення якої пов'язано з вивченням молекулярних механізмів взаємодії мікоплазм (молікутів) з рослинними клітинами, закономірностями персистенції цих мікроорганізмів і обумовлений ними фітопатогенез. Всебічне вивчення двох складових інфекційного процесу — патогена і клітин організму-живителя у динаміці їх взаємодії у випадку мікоплазмозу рослин можливе із застосуванням методу сумісного культивування фітопатогенних мікоплазм і рослинних клітин (або інфікування в умовах *in vitro*), яке є найбільш спрощеною модельною системою для дослідження стосунків хазяїна і паразита [2, 5].

З огляду на те, що одним з проявів взаємодії рослини і фітопатогенного організму є реакція рослинних клітин на стрес у вигляді включення сигнальних механізмів, зокрема, ліпооксигеназної системи [1, 8], метою роботи було дослідити зміни у складі жирних кислот ліпідів калюсів пшениці, що відбуваються під впливом інфікування фітопатогенним представником класу Mollicutes. Крім того, цікавим було дослідити фітопатогенез мікоплазмозу пшениці на клітинному рівні, для чого використовували спрощену модель впливу патогенної ахолеплазми на морфологію калюсних клітин.



Матеріали і методи

Калюсні культури отримували з експлантів вирощених *in vitro* рослин озимої пшениці сортів Роазон і Магістр, як описано раніше [2] і культивували на середовищі МС (з додаванням 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти). Молікут *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт. 118, що спричиняє блідо-зелену карликовість пшениці (отриманий з Національної колекції мікроорганізмів України і зберігається у відділі мікоплазмології Інституту мікробіології і вірусології НАН України), культивували на штучному середовищі СМ ІМВ-72 [7]. Інокуляцію калюсів проводили стерильними шприцями на 7, 14, 21, 28 добу пасажу, шляхом пошкодження і внесення культури ахолеплазм стерильним шприцом [3].

Для визначення клітинних жирних кислот використовували 500–600 мг сирого рослинного матеріалу. Метиллові ефіри жирних кислот одержували шляхом гідролізу досліджуваних зразків калюсів у 1%-ому розчині H_2SO_4 в метанолі протягом 1 год при 80 °С. Ефіри екстрагували двічі сумішшю ефір-гексан (1:1) [6]. Склад метилових ефірів жирних кислот аналізували за допомоги газового хроматографу Hewlett-Packard 6890 та мас-спектрометру Hewlett-Packard 5973. Метиллові ефіри ідентифікували за тривалістю утримання їх порівняно з стандартами (Supelco). Вміст жирних кислот у відсотках від загальної площі піків визначали за допомоги програмного забезпечення Chem Station. Для вивчення змін морфології клітин калюсу пшениці під впливом *A. laidlawii var. granulum* шт. 118 застосовували метод давлених препаратів [4], світлову мікроскопію проводили за допомоги мікроскопу Ломо (Санкт-Петербург, Росія). Дослідження виконували у трьох повторностях.

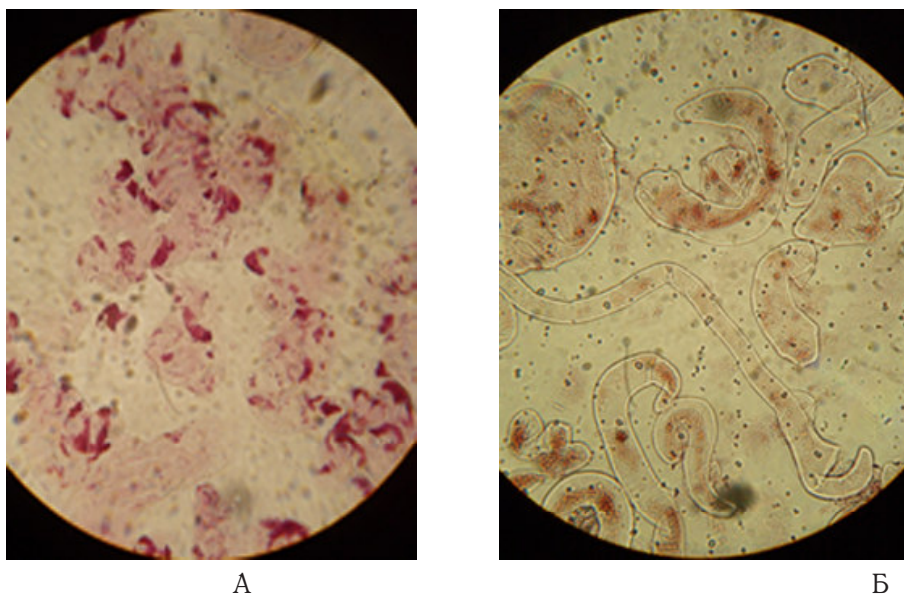
Результати та їх обговорення

Встановлено, що найбільш активно калюсні культури пшениці уражуються фітопатогенними ахолеплазмами на 14 добу після перенесення на свіже культуральне середовище. Калюсні культури іншого віку виявились менш чутливими до інфекції. Згідно спостережень, калюси, інфіковані молікутами, росли більш інтенсивно, до того ж клітини їх були значно більшими порівняно із контрольними (рис.), що узгоджується з даними Петру з співавт. [11, 12], який досліджував калюси, отримані з інфікованих рослин.

При дослідженні калюсів пшениці, інфікованих *A. laidlawii var. granulum* шт. 118, методом світлової мікроскопії було виявлено ряд специфічних особливостей рослинного матеріалу, зокрема, наявність великих міжклітинників, надмірна вакуолізація тощо. Встановлено, що під впливом інфекції фітопатогенними ахолеплазмами клітини калюсів змінюють свою форму з округлої до надмірно витягнутої, підвищується інтенсивність утворення поліплоїдних форм, розташованих групами у полі зору з більшою частотою порівняно з неінфікованими варіантами. Така реакція уражених калюсних клітин в культурі *in vitro* є проявом мутагенного впливу молікутів на генетичний апарат клітин рослини, що в природі призводить до утворення типових симптомів мікоплазмозів на рослинах у вигляді потворних форм — «відьминих мітел», карликовості тощо [1, 10].

Відомо, що інфікування рослин фітопатогенами призводить до підвищення вмісту в їх клітинах активних метаболітів кисню, інтенсифікацією деградації біополімерів і ліпідів тощо [8, 9]. Слід відзначити, що у наших дослідженнях у інфікованому ахолеплазмами матеріалі спостерігалися як зміни морфології рослинних клітин, так і зміни у складі жирних кислот їх загальних ліпідів, що свідчить





А

Б

Рис. Клітини калюсів пшениці: А – контроль, неінфіковані; Б – уражені фітопатогенним молікутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 (x400)

Fig. Callus cells of wheat: А – uninfected control; Б – infected by plant pathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str. 118 (x400)

про активну життєдіяльність фітопатогенних ахолеплазм у калюсних тканинах рослини і включення захисних механізмів рослини (ліпооксигеназний сигнальний шлях). При вивченні складу жирних кислот загальних ліпідів калюсів пшениці як стерильних, так і інфікованих, встановлено наявність $C_{14:0}$ (тетрадеканової), $C_{16:0}$ (гексадеканової), $C_{18:0}$ (октадеканової), та $C_{18:1}$ (октадеценаної) кислот. Між калюсами різних сортів пшениці розбіжностей за складом жирних кислот загальних ліпідів не виявлено, проте під впливом мікоплазмової інфекції спостерігалися деякі зміни у їх співвідношенні (табл).

Для калюсів пшениці сортів Магістр і Роазон встановлено значний вміст насичених жирних кислот (до 83,63%). Звертає на себе увагу той факт, що у обох досліджуваних сортів пшениці переважає гексадеканова кислота, частка якої складає 51,89–63,07% від загальної кількості жирних кислот.

У інфікованих культурах *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 калюсах пшениці сорту Магістр, на відміну від стерильних, спостерігали зменшення кількості октадеценаної і збільшення вмісту октадеканової кислот. Ці зміни у сорту Магістр зумовили збільшення співвідношення насичених до ненасичених жирних кислот у 1,4 раза. Вміст жирних кислот калюсів пшениці сорту Роазон під впливом мікоплазмової інфекції також дещо змінювався: відзначено збільшення майже на 10% октадеценаної та зменшення вмісту (також на 10%) гексадеканової кислот. Внаслідок цих змін відбулося зниження співвідношення насичені/ненасичені жирних кислот порівняно з контролем. Слід відзначити, що сорт Роазон було створено як стійкий відносно збудника церкоспорельозу пшениці *Pseudocercospora herpotrichoides*. Вважають, що збільшення кількості ненасичених жирних кислот пов'язано з формуванням відповіді рослини на вторгнення патогена, оскільки відомо, що в основі механізму

адаптації рослин до стресу є здатність до регуляції ступеня ненасиченості ліпідів мембран рослинних клітин.

Таблиця
Жирнокислотний склад загальних ліпідів калюсів пшениці, інфікованих
Acholeplasma laidlawii var. granulum шт. 118

Table
Fatty acid composition of common lipids of wheat calluses infected by
Acholeplasma laidlawii var. granulum str.118

Варіант досліджу	Вміст жирних кислот, % від загальної кількості				Жирні кислоти		Відношення насичені/ненасичені жирні кислоти
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	насичені	ненасичені	
МАГІСТР							
Контроль	4,85±0,3	51,89±0,1	20,9±0,4	22,36±0,2	77,64±0,3	22,36±0,2	3,5
Дослід	4,82±0,3	53,75±0,2	25,11±0,2	16,32±0,3	83,68±0,2	16,32±0,3	5,1
РОАЗОН							
Контроль	4,77±0,3	63,07±0,4	11,34±0,3	20,82±0,1	79,18±0,3	20,82±0,1	3,8
Дослід	4,35±0,2	52,97±0,2	12,44±0,3	30,24±0,4	69,76±0,2	30,24±0,4	2,3

Примітка: Жирні кислоти – C_{14:0} – тетрадеканова, C_{16:0} – гексадеканова,

C_{18:0} – октадеканова, C_{18:1} – октадеценена

Note: Fatty acids – C_{14:0} – tetradecanoic, C_{16:0} – hexadecanoic,

C_{18:0} – octadecanoic, C_{18:1} – octadecenoic

При цьому збільшується кількість ненасичених жирних кислот, вміст яких, за даними літератури, у більш стійких рослин є дещо вищим, ніж у сприйнятливих [9]. Те, що зараження молікутами призводить до різниці у реакції між сортами, відмінними за чутливістю до хвороби грибною етіологією, вірогідно, свідчить про аналогічну різницю у їх сприйнятливості до мікоплазм.

З огляду на те, що мікоплазмові інфекції індують включення сигнальних систем рослин, які визначають неспецифічну фітореактивність, спрямовану на пригнічення патогенних мікроорганізмів [1, 9], можливо зробити висновок, що зміни у вмісті жирних кислот інфікованих фітопатогенними молікутами калюсів, як і перетворення у морфології клітин, є проявами відповіді клітин рослини на біотичний стрес.

ЛІТЕРАТУРА

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазми. – С.-П.: Наука, 2002. – 319 с.

2. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрোকлонального размножения растений – К.: Наук.думка, 1992. – 232 с.

3. Коробкова К.С., Онищенко А.М., Панченко Л.П., Мамчур О.Є., Дмитрук О.О., Редько В.І. Створення модельної системи *in vitro* для вивчення взаємодії фітопатогенних молікутів з клітинами рослин // Мікробіол. журн. – 2009. – 71, № 4. – С. 58–62.



4. Кунах В.А., Левенко Б.А. Модификация метода давлений препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика. — 1975. — IX, № 1. — С. 56–58.

5. Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В. Культура клеток и тканей в изучении взаимоотношения патогена и растения-хозяина // Биологические науки. — 1990. — № 2. — С. 6–21.

6. Синяк К., Хеден Г., Рихаге Р., Фри Г., Мэрде М. Газовая хроматография липидов клеток животных и возможности этого метода для идентификации лабораторных линий животных // Вопр. вирусол. — 1972. — № 2. — С. 228–235.

7. Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. — 1984. — 46. — № 2. — С. 71–75.

8. Таран Н.Ю., Оканенко О.А., Светлова Н.Б., Мусієнко М.М. Жирні кислоти гліколіпідів хлоропластів у передачі стрес-сигналу та формуванні загальної адаптивної відповіді на посуху // Доповіді Національної академії наук України. — 2002. — № 6. — С. 171–175.

9. Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. — М.: Наука, 2002. — 296 с.

10. Чернов В.М., Чернова О.А. Микоплазменные инфекции как возможный фактор генетических изменений в клетках высших эукариот // Цитология. — 1996. — 38, № 2. — С. 107–114.

11. Petru E., Limberk J., Ulrychova M., Break J. Growth and infectivity of callus cultures of tomato plants infected with a mycoplasma disease-potato witches broom // Biol. plant., 1971. — 13, N 5/6. — P. 391–395.

12. Petru E., Ulrychova M. Persistence and spread of mycoplasma in axenic callus tissue cultures of tobacco (*Nicotiana glauca* Qrah.) in the presence of kinetin and IAA in nutrient medium // Biol. plant. — 1975. — 17, N 5. — P. 352–356.

Е.С. Коробкова¹, Л.П. Панченко¹, А.Н. Онищенко¹, А.Н. Остапчук¹, О.А. Панюта²

¹Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП 680, Украина

тел.: +38 (044) 526 23 09, e-mail: kkorobkova@ukr.net

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 60, Киев, 01033, Украина, e-mail: panyuta@ukr.net

ВЛИЯНИЕ МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ОБЩИХ ЛИПИДОВ И МОРФОЛОГИЮ КЛЕТОК КАЛЛУСОВ ПШЕНИЦЫ

Реферат

Создана экспериментальная модель микоплазменной (молликутной) инфекции растений с использованием фитопатогенного молликута *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118 и каллусных тканей пшеницы. В инфицированных ахолеплазмами каллусах происходили изменения как морфологии клеток, так и в жирнокислотном составе их общих липидов, что свидетельствует об активной жизнедеятельности фитопатогенных ахолеплазм и о включении защитных механизмов каллусных клеток пшеницы в ответ на стресс.

К л ю ч е в ы е с л о в а : молликуты, фитопатогенез, каллусы, стресс.



**K.S. Korobkova¹, L.P. Panchenko¹, A.M. Onischenko¹, A.M. Ostapchuk¹,
O.O. Panuta²**

¹D.K. Zabolotny Institute of microbiology and virology NASU, 154, Zabolotny str.,
Kyiv, MSP 680, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 23 09, e-mail: kkorobkova@ukr.net

²Kyiv National Taras Shevchenko University, 60, Volodymyrska str., Kyiv, 01033,
Ukraine, e-mail: panyuta@ukr.net

MYCOPLASMA INFECTION EFFECT TO FATTY ACID COMPOSITION OF COMMON LIPIDS AND TO WHEAT CALLUS CELLS MORPHOLOGY

Summary

It was created the experimental model of mycoplasma (mollicute) infection of plants by using of the plant pathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str. 118 and callus tissue of wheat. In the acholeplasma infected calluses the cell morphology and lipid composition were changed that evidences to life activity of plant pathogenic acholeplasmas and to the activation of protect mechanisms in wheat callus cells as the answer to stress.

Key words : mollicutes, plant pathogenesis, calluses, stress.



К.В. Лаврентьева, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені О. Гончара,
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
e-mail: k_lavrentyeva@mail.ru

ЗДАТНІСТЬ ГРУНТОВИХ ФОСФАТМОБІЛІЗУЮЧИХ БАКТЕРІЙ ДО КОЛОНІЗАЦІЇ КОРЕНІВ ПШЕНИЦІ

*В умовах мікровегетаційного досліджу на проростках озимої пшениці встановлено, що ступінь виживання фосфатмобілізуєчих бактерій *Enterobacter dissolvens* і *Pseudomonas putida* при культивуванні їх у середовищі із слабкорозчинним трикальційфосфатом є значно вищим, у порівнянні з середовищем із розчинним фосфатом (KH_2PO_4). Дослідним культурам властива висока адгезивна здатність до коренів пшениці, вони накопичуються у титрах, більших за 5,7 Іг КУО на 1 г коренів. Встановлено, що штам *P. putida* більш активно колонізував корені проростків пшениці, ніж *E. dissolvens*, що характерно для бактерій цього роду.*

К л ю ч о в і с л о в а : фосфатмобілізуєчі бактерії, мікровегетаційний метод, колонізація коренів.

Однією з умов підвищення продуктивності культурних рослин є поліпшення їх фосфорного живлення. Проблему забезпечення рослин фосфором значною мірою можна вирішити шляхом використання ґрунтових мікроорганізмів, що покращують засвоюваність рослинами слабкорозчинних фосфатів ґрунту. Це особливо важливо в сучасних умовах, коли хімічна промисловість не може задовольнити потреби сільського господарства у фосфорних добривах. З метою підвищення продуктивності культурних рослин, в Україні та за її межами, розробляються біопрепарати на основі ризосферних фосфатмобілізуєчих бактерій. Для розробки такого високоєфективного біопрепарату, окрім вивчення біологічних властивостей мікроорганізмів, що входять до їх складу, насамперед, є необхідним дослідити процес взаємодії мікробних об'єктів із сільськогосподарськими рослинами. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було визначення ступеню виживання штамів фосфатмобілізуєчих бактерій у ризосферній зоні проростків пшениці та дослідити їх здатність до колонізації коренів рослин.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були два штами ґрунтових фосфатмобілізуєчих бактерій *Pseudomonas putida* та *Enterobacter dissolvens* з колекції культур кафедри мікробіології та вірусології ДНУ. Визначення ступеню виживання штамів у прикореневій зоні культурних рослин та здатності до колонізації їх коренів досліджували при постановці мікровегетаційного досліджу з озимою пшеницею сорту «Лада Одеська». Досліди проводили у двох варіантах із використанням рідкого середовища Менкінної [4] з рН 7,0, до якого у першому варіанті експерименту як



єдине джерело фосфору вносили розчинний фосфат у вигляді KH_2PO_4 в концентрації 1,2 г/л, а в другому — фосфат у вигляді слабкорозчинного трикальційфосфату в концентрації 1,55 г/л. Саме у такій кількості внесених фосфатів концентрація фосфору складає 10 ммоль, яка є оптимальною для розвитку рослин [5]. Штами вирощували у м'ясопептонному бульйоні при 28 °С і 200 об/хв до моменту досягнення культурами стаціонарної фази росту. Потім по 1 мл бульйонних культур вносили до 9 мл середовищ з розчинним і слабкорозчинним фосфатами і робили висів на м'ясопептонний агар (МПА) для визначення в них початкової концентрації життєздатних клітин. Далі проводили бактеризацію коренів проростків пшениці. Для цього зерно пшениці обробляли протягом 10 хв слабким розчином марганцевокислого калію та пророщували у чашках Петрі при 22 °С протягом 2 діб до появи перших корінців. Потім кожен пророщену зернину поміщали на стерильний фільтрувальний папір, зігнутий лійкою зі зрізаним центром, і обережно опускали у пробірку з середовищем так, щоб фільтрувальний папір знаходився над рідиною, але не торкався її. Зерно пророщували у пробірках протягом 7 діб. При цьому насіння знаходилось у фільтрувальному папері над середовищем, а корінці проростали через зрізану частину фільтра до середовища.

По закінченню терміну культивування для оцінки ступеню виживання штамів у ризосферній зоні рослин було визначено кількість життєздатних клітин в обох культуральних середовищах шляхом висіву їх на МПА. Для дослідження колонізувальної здатності штамів *P. putida* та *E. dissolvens* з кожного варіанту досліду відбирали по 3 проростки, відділяли корені, визначали їх вагу, розтирали у ступці з 10 мл фізіологічного розчину, робили ряд розведень та висівали на МПА з ністатином із концентрацією 50 мг/мл для пригнічення росту грибів. Чашки інкубували в термостаті при 28 °С 24 години та робили підрахунок числа КУО [1]. Колонізувальну здатність штамів оцінювали за кількістю КУО бактерій на 1 г коренів. Статистичне опрацювання 3-х експериментальних серій досліджень проводили стандартними методами з визначенням t-критерія Стьюдента на 5% рівні значущості [3].

Результати та їх обговорення

Порівняння кількості життєздатних клітин штамів *E. dissolvens* і *P. putida* в культуральному середовищі з розчинним фосфатом із кількістю життєздатних клітин тих же штамів у середовищі зі слабкорозчинним фосфатом показало, що ступінь виживання обох культур у другому варіанті є значно вищим (табл. 1).

На кінець терміну культивування рослин кількість життєздатних клітин штамів *E. dissolvens* та *P. putida* в середовищі зі слабкорозчинним фосфатом складала відповідно 16,2% і 5,5% від початкової кількості клітин, тоді як у середовищі з розчинним фосфатом лише 0,52% і 0,05%. При цьому рН середовища зі слабкорозчинним трикальційфосфатом знизився відповідно до 4,3 і 4,9, а рН середовища з розчинним фосфатом — до 5,2 і 5,4. Більше зниження кількості життєздатних клітин обох штамів у середовищі із розчинним фосфатом наприкінці терміну культивування рослин можна пояснити тим, що оптимальна для проростків пшениці концентрація розчинного фосфату в середовищі (10 ммоль) пригнічувала ріст мікроорганізмів. Подібні результати відносно негативного впливу розчинного фосфату на активність і розвиток фосфатомобілізуючих бактерій отримано в роботі Міканової [6].



Таблиця 1

Ступінь виживання *E. dissolvens* та *P. putida* у ризосферній зоні проростків пшениці (n=3)

Table 1

Survival degree of *E. dissolvens* and *P. putida* strains in rhizosphere zone of wheat germ (n=3)

Штами	Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині на початку досліду, lg КУО/10 мл		Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині через 7 діб, lg КУО/10 мл	
	Середовище із KH_2PO_4	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Середовище із KH_2PO_4	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<i>P. putida</i>	7,83±6,59	7,82±6,61	4,49±3,26*	6,56±5,21*
<i>E. dissolvens</i>	8,12±7,09	8,13±7,16	5,84±4,67*	7,34±6,07*

* результати достовірні на 5% рівні значущості

Більш високий відсоток виживання обох досліджених культур у середовищі зі слабкорозчинним трикальційфосфатом, можливо, пов'язаний з їх здатністю самостійно «регулювати» процес звільнення фосфору з трикальційфосфату, підтримуючи необхідну і достатню для їх росту і росту рослин концентрацію розчинного фосфору в середовищі.

Тим самим можна пояснити і різницю в здатності штамів до колонізації коренів пшениці при вирощуванні їх у середовищах із розчинним і слабкорозчинним фосфатами (табл. 2). Так, для штамів *E. dissolvens* і *P. putida* через 7 діб вирощування проростків у 10 мл середовища із трикальційфосфатом на 1 г коренів пшениці було адсорбовано клітин відповідно у 3,6 і 2,5 рази більше, ніж у середовищі із розчинним фосфатом.

Таблиця 2

Колонізувальна активність штамів *E. dissolvens* та *P. putida* у розрахунку на 1 г коренів (n=3)

Table 2

Colonizing activity of *E. dissolvens* and *P. putida* strains in recalculation per 1 g of wheat roots (n=3)

Штами	Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині на початку досліду, lg КУО/10мл		Кількість життєздатних клітин на 1г коренів пшениці через 7 діб, lg КУО	
	Середовище із KH_2PO_4	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Середовище із KH_2PO_4	Середовище із $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
<i>P. putida</i>	7,83±6,59	7,82±6,61	5,8±5,00*	6,2±5,15*
<i>E. dissolvens</i>	8,12±7,09	8,13±7,16	5,23±4,17*	5,79±4,98*

* результати достовірні на 5% рівні значущості



На відміну від *E. dissolvens* штам *P. putida* активніше колонізував корені проростків пшениці (табл. 2). Через 7 діб вирощування проростків на 1 г коренів пшениці у середовищі із трикальційфосфатом було адсорбовано у 2,57 раза більше клітин штаму *P. putida*, ніж *E. dissolvens*, а у середовищі із розчинним фосфатом — у 3,8 раза. Це можна пояснити тим, що культура має високу адгезивну здатність, що характерно для бактерій цього роду.

Незважаючи на різницю ступенів адгезії клітин штамів *E. dissolvens* і *P. putida*, їх обох можна вважати активними колонізаторами, так як у перерахунку на 1 г коренів вони накопичуються у титрах, більших за 5,7 lg КУО. Згідно з літературними даними такий рівень колонізації оцінюється як достатньо високий [1].

Таким чином, отримані нами дані свідчать про те, що в модельному експерименті обидва досліджені штами здатні до активної колонізації ризосфери проростків пшениці та формування з культурними рослинами тісної асоціації. Враховуючи встановлену раніше високу фосфатмобілізуючу активність цих штамів у відношенні трикальційфосфату [2], їх можна вважати перспективними і рекомендувати для розробки біопрепаратів для покращення фосфорного живлення сільськогосподарських рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гарагуля А.Д., Бабич Л.В., Киприанова Е.А., Смирнов В.В. Способность различных видов бактерий рода *Pseudomonas* к колонизации корней пшеницы // Микробиологический журнал. — 1988. — т. 50. — № 6. — С. 77–81.
2. Лаврентьева К.В., Черевач Н.В., Винников А.І. Динаміка мобілізації фосфату штамми *Enterobacter dissolvens* і *Pseudomonas putida* з трикальційфосфату // Микробиологічний журнал. — 2008. — т. 70. — № 1. — С. 25–30.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия. — Москва: Высш. шк., 1990. — 352 с.
4. Рой А.А., Булавенко Л.В., Курдиш И.К. Новые штаммы бацилл, минерализующие органические соединения фосфора // Микробиологічний журнал. — 2001. — Т. 63, № 4. — С. 9–14.
5. Швартау В.В., Стахів М.П. Вплив ортофосфату на активність кислих фосфатаз коренів проростків озимої пшениці // Физиология и биохимия культурных растений. — 2007. — т. 39, № 3. — С. 207–211.
6. Mikanova O., Novakova J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate // Rostlinna vyroba. — 2002. — Vol. 48, № 9. — P. 379–400.



Е.В. Лаврентьева, Н.В. Черевач, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени О. Гончара,
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,
e-mail: k_lavrentyeva@mail.ru

СПОСОБНОСТЬ ПОЧВЕННЫХ ФОСФАТМОБИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ К КОЛОНИЗАЦИИ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ

Реферат

В условиях микровегетационного опыта на проростках озимой пшеницы установлено, что выживаемость фосфатмобилизирующих бактерий *Enterobacter dissolvens* и *Pseudomonas putida* при культивировании их в среде со слаборастворимым трикальцийфосфатом значительно выше, чем в среде с растворимым фосфатом (KH_2PO_4). Культурамам свойственна высокая адгезивная способность к корням пшеницы, они накапливаются в титрах, больших, чем $5,7 \lg$ КОЕ на 1 г корней. Штамм *P. putida* более активно колонизировал корни проростков пшеницы, чем *E. dissolvens*, что характерно для бактерий этого рода.

К л ю ч е в ы е с л о в а : фосфатмобилизирующие бактерии, микровегетационный метод, колонизация корней.

K.V. Lavrentyeva, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov

Oles Gonchar Dnepropetrovsk National University,
72, Gagarina str., Dnepropetrovsk, 49050, Ukraine,
e-mail: k_lavrentyeva@mail.ru

CAPABILITY OF SOIL PHOSPHATE-SOLUBILIZING BACTERIAL STRAINS TO COLONIZE WHEAT ROOTS

Summary

During microvegetative investigation at wheat plants it was shown that *Enterobacter dissolvens* and *Pseudomonas putida* strains survive better in the media with insoluble tricalciumphosphate in contrast to medium with phosphate ion content. The strains of soil bacteria have high adhesive features to the plant roots as 1g of wheat root contains more than $5.7 \lg$ of colony forming units. It was shown that the strains of *P. putida* colonize wheat roots more actively than *E. dissolvens* strains, that is characteristically for this genus of bacteria.

К e y w o r d s : phosphate-solubilizing bacteria, microvegetative investigation, root colonization.



Т.Ю. Степанова, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін

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

ВПЛИВ ТІЛОРОНУ НА ВМІСТ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ ТА СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ У МИШЕЙ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ АЛЕРГІЧНИМ ЕНЦЕФАЛОМІЄЛИТОМ

Встановлено, що за експериментального алергічного енцефаломієліту (ЕАЕ) у мишей змінюється вміст основних популяцій лімфоцитів та їх розподіл за субпопуляціями. Показано, що тілорон нормалізує вміст та співвідношення В- і Т-лімфоцитів, а також їх субпопуляцій на всіх досліджених строках після індукції захворювання. Встановлена здатність тілорону активувати Т-супресори, що частково пояснює терапевтичний ефект препарату за ЕАЕ.

Ключові слова: експериментальний алергічний енцефаломієліт, тілорон, Т- та В-лімфоцити.

Механізм порушень за розсіяного склерозу та його експериментальною моделлю — експериментальним алергічним енцефаломієлітом (ЕАЕ) — полягає у тому, що антиген у складі головного комплексу гістосумісності розпізнається CD8 клітинами, основною функцією яких є гальмування аутоімунного процесу на початку його проявлення. Внаслідок системної імунологічної дисфункції цей процес порушується, виникає трансформація CD8-індукторів у цитотоксичні CD8-ефектори. Вони, у свою чергу, стимулюють аутореактивні Th1-клітини з подальшим запуском аутоімунного процесу та продукцією прозапальних цитокінів: IFN- γ , TNF- α [1].

Каскад цих перетворень призводить до порушення гематоенцефалічного бар'єра. Внаслідок цього аутореактивні Т-лімфоцити CD4 до антигена — загального білка мієліна — потрапляють у ЦНС. Вважається, що тригерним механізмом демієлінізації в ЦНС є саме аутореактивні CD4-лімфоцити. В тканині мозку вони реактивуються цитотоксичними Т-лімфоцитами, В-лімфоцитами, гліальними клітинами та макрофагами й запускають каскад імунних реакцій: продукцію аутоантитіл, протеїназ, хемокінів, вільних радикалів, NO.

Терапія за аутоімунної демієлінізації — складний процес, який спрямовано в першу чергу на зниження важкості та виразності загострень та сповільнення інвалідизації. До групи лікувальних засобів, що використовуються для патогенетичної терапії, відносяться імуномодуючі препарати. Одним з таких препаратів є тілорон («Аміксин»).

Враховуючи важливу роль різних імуноцитів у розвитку ЕАЕ, метою даної роботи було встановлення співвідношення між популяціями і субпопуляціями лімфоцитів у мишей у динаміці захворювання та за впливу тілорону.



Матеріали і методи

В експерименті використовували білих нелінійних мишей-самців масою 18–20 г, які утримувалися в стандартних умовах віварію з постійним доступом до води. ЕАЕ відтворювалася введенням енцефалітогенної емульсії (ЕГЕ) у подушечки задніх лапок мишей підшкірно. ЕГЕ складалася з 50% гомогенату гомологічної тканини мозку у фізіологічному розчині й повного ад'юванта Фрейнда [2].

Тілорон вводили перорально у водному розчині в дозі 50 мг/кг маси тварини одноразово за 30 хвилин до індукції ЕАЕ.

Клітини для визначення основних популяцій і субпопуляцій лімфоцитів (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19) виділялися з пахвових лімфовузлів стандартним методом. Отримані клітини забарвлювалися антиCD-антитілами з використанням наборів Anti-mouse Ready-Set-Go! Kit фірми «eBioscience», США, інкубувалися 30 хв, триразово відмивалися фосфатно-сольовим буфером згідно інструкції. Далі проби аналізувалися на протоковому цитофлуориметрі.

Обробку отриманих результатів здійснювали відповідно до алгоритмів, описаних в посібниках [3]. При порівняльному аналізі результатів використовували параметричний критерій Стьюдента, що розраховувався з використанням програми Excel-2000. Довірчий інтервал розраховувався при рівні значимості $p \leq 0,05$, що гарантує вірогідність результатів з імовірністю 0,95 [4].

Результати та їх обговорення

Оцінка впливу тілорону на чисельність популяцій та субпопуляцій лімфоцитів проводилася на 3, 7 та 14 добу після індукції ЕАЕ. Вибір строків базувався на даних [2] про динаміку розвитку експериментальної моделі розсіяного склерозу у мишей та на власних дослідженнях, що були підтверджені гістологічно, а також за спостереженням за змінами активності деяких імунних процесів.

В нормі (у інтактних тварин) вміст В-лімфоцитів (CD19) складає 17,6% від загального числа, Т-лімфоцитів (CD3) — 73,8%, натуральних кілерів (CD16) — 8,6%. Співвідношення Т/В лімфоцитів становить $4,19 \pm 0,39$. Розподіл Т-лімфоцитів за субпопуляціями CD4 і CD8 складає 48 і 25,8%, відповідно, а індекс CD4/CD8 — $1,86 \pm 0,17$ (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у інтактних мишей
($M \pm m$, $n=10$, %)

Table 1

Main lymphocyte populations and sub-populations in intact mice

В(CD19)	Т(CD3)	НК(CD16)	Т(CD4)	Т(CD 8)
$17,6 \pm 1,5$	$73,8 \pm 7,2$	$8,6 \pm 0,9$	$48,0 \pm 5,1$	$25,8 \pm 2,4$

Пероральне однократне введення тілорону здоровим мишам призвело до зміни нормальних показників вже через добу. Так, відносний вміст В-лімфоцитів збільшився на 8,1%, а Т-лімфоцитів — знизився на 5,9%. Співвідношення Т/В лімфоцитів при цьому склало 3,65. Більш значні зміни спостерігалися в розподілі Т-лімфоцитів по субпопуляціях. Вміст CD 4-клітин практично не змінився (96,5%), а CD 8-лімфоцитів — збільшився на 30%. При цьому індекс CD4/CD8 недостовірно знизився й склав $1,38 \pm 0,12$ (рис. 1).



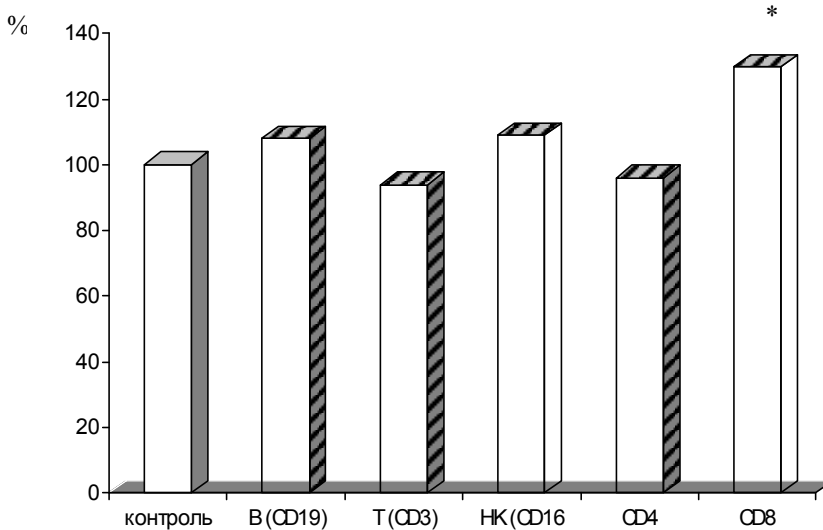


Рис. 1. Вплив тілорону на вміст основних популяцій і субпопуляцій лімфоцитів у здорових мишей (n=10)

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

Fig. 1. Tilorone effect on main lymphocyte populations and sub-populations in intact mice (n=10)

Note: * – statistically reliable compared to control

Підвищення рівня Т-лімфоцитів супресорів, що спостерігається, є характерною рисою дії тілорону й пов'язано, імовірно, зі здатністю препарату змінювати деякі властивості імунокомпетентних клітин [9].

На фоні експериментального алергійного енцефаломієліту рядом авторів було відмічено характерні зміни вмісту В- та Т-лімфоцитів [11, 12]. Вивчення динаміки змін при ЕАЕ в зазначені строки дозволило виявити деякі закономірності, що підтверджують існуючі вказівки на клітинну природу імунологічних порушень при досліджуваному захворюванні.

Так, при ЕАЕ спостерігається збільшення кількості В-лімфоцитів у динаміці розвитку захворювання. На 3-ю добу кількість CD19-клітин збільшується на 30% і зберігається на цьому рівні і на 7-у добу. До 14 дня після індукції ЕАЕ показник троху знижується (рис. 2).

Тілорон у дозі 50 мг/кг, введений мишам з ЕАЕ в день індукції захворювання, незначно знижує вміст В-лімфоцитів у лімфовузлах (у середньому на 10%) на усіх строках захворювання. При цьому незначно знижена кількість Т-лімфоцитів не змінюється під дією препарату.

Такі зміни знаходять своє відображення в індексі співвідношення Т- і В-лімфоцитів (табл. 2).

У тварин з ЕАЕ Т/В індекс знижений в усі терміни захворювання. Тілорон підвищує цей показник, а до 14-ої доби доводить його до контрольного рівня. Вивчення розподілу Т-лімфоцитів по субпопуляціях показало, що при ЕАЕ спостерігається підвищення рівня CD4-лімфоцитів, яким за даними літератури належить критична роль у патогенезі РС і ЕАЕ [2].

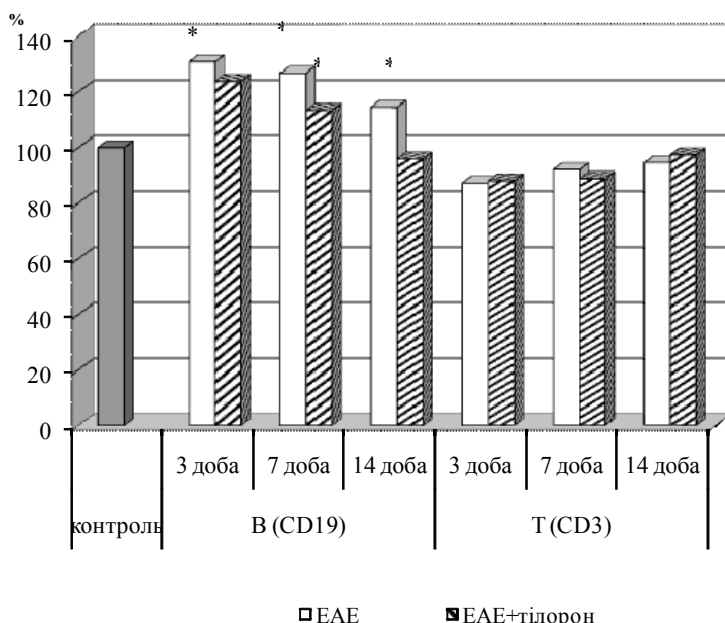


Рис. 2. Вплив тілорону (50 мг/кг) на вміст Т- і В-лімфоцитів у лімфовузлах мишей з ЕАЕ (n=20)

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Fig. 2. Tilorone effect (50 mg/kg) on T- and B- lymphocytes in EAE mice lymphnodes (n=20)

Note: * - statistically reliable compared to control

До 7-ої доби цей показник підвищується в середньому на 40%, а до 14-ої трохи знижується, усе ще перевищуючи контрольні значення. Рівень CD8-клітин при експериментальній патології на 3-ю добу знижений на 23%, що може слугувати свідченням підгострої стадії захворювання.

Таблиця 2

Зміна співвідношення Т- і В-лімфоцитів у лімфовузлах мишей з ЕАЕ під дією тілорону (50 мг/кг), ($M \pm m$, n=20)

Table 2

Effect of tilorone (50 mg/kg) on T/B index in EAE mice lymphnodes, ($M \pm m$, n=20)

Варіант	3 доба	7 доба	14 доба
ЕАЕ	2,92±0,14*	3,17±0,19*	3,61±0,41
ЕАЕ+тілорон	3,11±0,51	3,43±0,31	4,44±0,57
контроль	4,37±0,39		

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Note: * – statistically reliable compared to control

У динаміці розвитку ЕАЕ кількість CD8-лімфоцитів поступово зростає й перевищує контрольні показники (рис. 3).



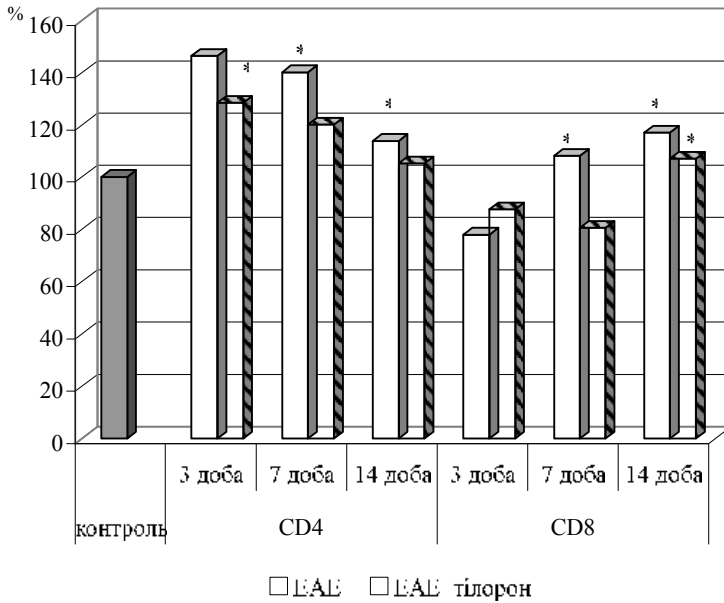


Рис. 3. Вплив тілорону (50 мг/кг) на вміст CD4 і CD8 лімфоцитів у лімфовузлах мишей з ЕАЕ (n=20)

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Fig. 3. Tilorone effect (50 mg/kg) on CD4 and CD8 lymphocytes in eumphnodes of EAE mice (n=20)

Note: * – statistically reliable compared to control.

Введення мишам тілорону в дозі 50 мг/кг викликає достовірне зниження рівня CD4-лімфоцитів (у середньому на 20%). Тілорон знижує підвищений вміст CD4-лімфоцитів на 7-у і 14-у добу, наближаючи його до нормального значення. При цьому спостерігається зворотна залежність у зміні кількості CD4 і CD8 клітин при ЕАЕ, тобто збільшення числа CD4 призводить до пропорційного зниження рівня CD8.

Це впливає на імунорегуляторний індекс, що на третю добу захворювання перевищує контрольне значення у 2 рази, а на сьому – в 1,5 рази (табл. 3).

Таблиця 3

Зміна співвідношення CD4 і CD8 лімфоцитів лімфовузлів мишей з ЕАЕ під дією тілорону в дозі 50 мг/кг (M±m, n=20)

Table 3

Tilorone (50 mg/kg) effect on CD4/CD8 index of eumphnodes lymphocytes in mice with EAE (M±m, n=20)

Варіант	3 доба	7 доба	14 доба
ЕАЕ	3,50±0,23*	2,41±0,22*	1,81±0,19
ЕАЕ+тілорон	2,73±0,27	2,77±0,31	1,83±0,21
контроль	1,86±0,17		

Примітка: * – розбіжність вірогідна у порівнянні з контролем (p≤0,05).

Note: * – statistically reliable compared to control.



Тілорон знижує ці значення на даних строках захворювання. На 14-у добу спостерігається нормалізація співвідношення CD4/CD8, що корелює з описаною картиною ремісії.

Зазначене в роботі підвищення вмісту В-лімфоцитів може бути пов'язане з роллю цих клітин у розвитку аутоімунної патології. Так, В-клітини сприяють так званому «поширенню репертуару епітопів». Слід зазначити, що В-лімфоцити регулюють лімфоїдний ограногенез, диференціацію Т-ефекторних клітин, антигенпрезентувальну функцію дендритних клітин та цитокиновий профіль у тканинах [11]. Порушення цих функцій може призвести до індукції або розвитку аутоімунного процесу. Таким чином, зазначене збільшення вмісту В-лімфоцитів може бути свідченням порушення регуляції Т-клітинної ланки імунітету. Це є ще одним фактом, який пояснює зростання рівня В-лімфоцитів у перші дні після індукції ЕАЕ. Адже, як відомо, ключова роль у патогенезі РС і ЕАЕ належить Т-лімфоцитам [12]. Дію тілорону на розподіл субпопуляцій Т-лімфоцитів можна класифікувати як протизапальну, що опосередкована зміною рівня про- і протизапальних цитокинів. Зазначена для тілорону здатність активувати Т-супресори, підтверджена дослідженнями ряду авторів [5, 7, 8], повною мірою реалізує очікуваний терапевтичний ефект препарату при патології, пов'язаній з розвитком алергічного аутоімунного ушкодження нервової тканини по типу гіперчутливості уповільненого типу [6, 10].

ЛІТЕРАТУРА

1. Виничук С.М. Рассеянный склероз: спорные и нерешенные вопросы этиологии и патогенеза // Здоров'я України. — 2003. — № 4 (65). — С. 3.
2. Заргарова Т.А., Фаворова О.О. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит — модель рассеянного склероза // Иммунология. — 1999. — № 2. — С. 5—9.
3. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 408 с.
4. Методы обработки медицинской информации: учеб. пособие / О.П. Минцев, Б.Н. Угаров, В.В. Власов — К.: Вища школа, 1991. — 271 с.
5. Отчет об изучении действия препарата Амиксин на лимфоциты человека. Институт биоорганической химии РАН, Институт биологии гена РАН. Москва — 2001. — 45 с.
6. Павлова Н.А. Рассеянный склероз, диагностика и лечение с позиций доказательной медицины // Иммунология. — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 65—73.
7. Результаты клинического изучения амиксина / Шмельков Ю.А., Григорян С.С., Чижов Н.П. и др. // II Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство» (Москва, 10—15 апр. 1995 г.). — М., 1995. — С. 193—194.
8. Селькова Е.П., Семененко Т.А., Носик Н.Н. Влияния амиксина — отечественного аналога тілорона — на показатели интерферонового и иммунного статуса человека // Журнал медицинской микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2001. — Т. 1, № 2. — С. 31—36.
9. Филиппова Т.О., Головенко Н.Я. Тілорон: профиль биологической активности. I. Фармакологические свойства // Интегративна антропология. — 2006. — № 1. — С. 18—23.
10. Carton H., Laos R., Paolet J. Utilisation and cost of professional care and assistance according to disability of patients with multiple sclerosis in Flanders (Belgium) // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 1998. — V. 64, № 4. — P. 444—500.
11. Inhibitory role of CD19 in the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating cytokine response / Matsushita T., Fujimoto M., Hasegawa M. et al // Am. J. Path. — 2006. — V. 168, № 3. — P. 812—821.
12. Polyclonal expansion of regulatory T cells interferes with effector cell migration in a model of multiple sclerosis / Tischner D., Weishaupt A., van den Brandt J. et al. // Brain. — 2006. — V. 129, № 10. — P. 2635—2647.



Т.Ю. Степанова, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин

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

**ВЛИЯНИЕ ТИЛОРОНА НА СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ
ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У МЫШЕЙ
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ
ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТОМ**

Реферат

Установлено, что экспериментальный аллергический энцефаломиелит (ЭАЭ) у мышей сопровождается изменением содержания основных популяций лимфоцитов и их распределения по субпопуляциям. Показано, что тилорон нормализует содержание и соотношение В- и Т-лимфоцитов, а также их субпопуляций на все сроки после индукции заболевания. Установленная способность тилорона активировать Т-супрессоры частично объясняет терапевтический эффект препарата при ЭАЭ.

К л ю ч е в ы е с л о в а : экспериментальный аллергический энцефаломиелит, тилорон, Т- и В-лимфоциты.

T.Yu. Stepanova, T.O. Filipova, B.M. Galkin

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

**EFFECT OF TILORONE ON MAIN LYMPHOCYTE POPULATIONS
AND SUB-POPULATIONS IN MICE WITH EXPERIMENTAL
ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS**

Summary

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice is characterized with changes in main lymphocyte populations and sub-populations. It was shown that tilorone normolizes the level of T- and B-lymphocytes, T/B ratio, and distribution into sub-populations at all studied terms of the disease. The activation of T-suppressors with tilorone fully implements an expected therapeutic effect of this medicine at EAE.

Key words: experimental allergic encephalomyelitis, tilorone, T- and B-lymphocytes.



Є.П. Копилов¹, С.П. Надкерничний¹, Л.О. Білявська²,
О.В. Голубець³

¹Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченко, 97, Чернігів, Україна, тел.: +38 (0462) 23 70 38,
e-mail: evhenyukopilov@ Rambler.ru

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна

³Науково-дослідний центр випробувань продукції ДП Укрметтестстандарт,
вул. Метрологічна, 10, Київ, Україна

ІНДУКУВАННЯ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ПШЕНИЦІ ЯРОЇ ДО ЗБУДНИКІВ КОРЕНЕВИХ ГНИЛЕЙ ЗА СПРИЯННЯ ГРИБА *CHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISER

Показано ефективність використання сапрофітного гриба *Chaetomium cochliodes* 3250 як засобу індукування стійкості рослин пшениці ярої до збудників кореневих гнилей. Вивчено жирнокислотний склад культурального середовища гриба і встановлено, що *C. cochliodes* 3250 утворює арахідонову кислоту, яка нагромаджується в культуральному середовищі. Арахідонова кислота є біогенним еліситором і в тканинах рослин індукує системну імунну відповідь на дію патогенів і несприятливих умов.

Ключові слова: *C. cochliodes* 3250, еліситори, арахідонова кислота, кореневі гнилі.

Раніше нами було показано, що ґрунтовий сапрофітний гриб *Chaetomium cochliodes* 3250 характеризується високою антагоністичною активністю щодо фітопатогенних грибів — збудників кореневих гнилей багатьох сільськогосподарських культур, що і спричинило створення на його основі мікробного препарату Хетоміка [4, 5, 8]. Було встановлено, що *C. cochliodes* 3250, інтродукований в ґрунт з насінням пшениці ярої, здатний приживатися в кореневій зоні, активно колонізувати кореневу систему, витискаючи з неї збудників кореневих гнилей. Приживаючись у ризосферному ґрунті пшениці ярої, *C. cochliodes* 3250 виявляв антифунгальну дію. Нами було показано механізм взаємодії, яка виникає між інтродукованим у кореневу зону пшениці ярої *C. cochliodes* 3250 і аборигенними ґрунтовими грибами, який базується на принципі конкурентного виключення, відомого в екології як принцип Гаузе. Згідно цього принципу більш конкурентоспроможний вид, в даному випадку гриб-антагоніст *C. cochliodes* пригнічує розвиток фітопатогенних грибів, які виявилися слабкішими у цьому змаганні видів. Такий тип взаємовідносин може бути ефективно використаний в боротьбі зі збудниками захворювань рослин [7].

Відомо також, що стійкість рослин до збудників хвороб може викликатися біологічно активними речовинами-еліситорами. Еліситори здатні включати різні сигнальні системи рослинних клітин, що приводить до експресії захисних генів, синтезу відповідних білків, утворенню фітоалексинів і, зрештою, формуванню



імунітету рослин щодо патогенів [9]. Як еліситори вивчаються певні класи хімічних сполук біогенного походження, зокрема, органічні кислоти: аміномасляна, арахідонова, жасмонова, шавлева та інші. У цьому зв'язку становило інтерес дослідити здатність *S. cochliodes* 3250 утворювати біологічно активні речовини, які можуть викликати системну стійкість рослин до дії патогенів.

Метою досліджень було вивчити ефективність використання *S. cochliodes* 3250 як засобу підвищення стійкості рослин пшениці ярої до збудників кореневих гнилей та збільшення урожайності культури.

Матеріали і методи

Chaetomium cochliodes 3250 вирощували на рідкому поживному середовищі Ролена-Тома, поверхнево, за температури 26–27 °С впродовж 7–8 діб. Культуральну рідину відфільтровували і пропускали крізь мембранні фільтри. Ефективність гриба вивчали за умов польового досліду на чорноземі вилугованому слабogleюватуому легкосуглинковому на лесі (дослідне поле Інституту сільськогосподарської мікробіології), який характеризувався такими агрохімічними показниками: вміст гумусу в орному шарі становив 3,56%; рН_{сольовий} – 5,2–5,5; сума ввібраних основ – 12,5–14,0 мг-екв. на 100 г ґрунту; азот, що легко гідролізується (за Корнфільдом) – 95–100 мг; рухомих форм фосфору (за Кірсановим) – 251–256 мг P₂O₅; обмінного калію (за Кірсановим) – 108–111 мг K₂O на 1 кг ґрунту. Площа облікової ділянки – 15 м², повторність досліду 4-разова. У досліді використано сорт пшениці ярої Краса Полісся. Норма висіву насіння становила 5 млн. зерен на 1 га. Агротехніка вирощування загальноприйнята для зони Полісся. Мінеральні добрива вносили в дозі N₄₅P₃₀K₄₅. Дослід закладали за схемою: 1 – без внесення хімічних і мікробних препаратів (контроль); 2 – передпосівна обробка насіння Вітаваксом 200 ФФ; 3 – передпосівна обробка насіння Хетоміком (біоагент *S. cochliodes* 3250), 4 – передпосівна обробка насіння культуральним середовищем (КС) *S. cochliodes* 3250, розбавленим водою у співвідношенні 1:100. Передпосівну обробку насіння КС *S. cochliodes* 3250, розбавленим водою у співвідношенні 1:100, здійснювали з розрахунку 1% від маси насіння, Вітаваксом 200 ФФ – 3 кг/т, Хетоміком – 2,5 кг/т насіння, що становило 45–50 тисяч сумкоспор гриба на одну насінину. При закладці і проведенні досліду використовували методику Доспехова [4].

У дослідних варіантах визначали ураженість рослин за фазами розвитку кореневими гнилями, вміст хлорофілів *a* і *b* в листках пшениці ярої та урожайність. Для обліку ураженості рослин кореневими гнилями використовували бальну оцінку за розробленою шкалою і формулами [6].

Вміст хлорофілів *a* і *b* у листках пшениці ярої визначали спектрофотометричним методом [2]. Для цього відбирали зразки листків з верхнього ярусу рослини у п'ятиразовій повторності під час цвітіння. Кожен зразок аналізували у 4-х кратних аналітичних повтореннях.

Для визначення жирнокислотного складу КС *S. cochliodes* 3250 здійснювали метаноліз на водяній бані впродовж однієї години за температури 80 °С. Жирні кислоти екстрагували сумішшю ефір-гексан (1:1). Екстракти поєднували і випаровували на вакуумно-ротаторному випаровувачі [3]. Одержані зразки аналізували на газовому хроматографі HP 6890: аналітична колонка FFAP 30 см, d – 32 мм, газ-носії – гелій; швидкість потоку – 30 мл/хв, t-150-250 °С, кількість проби – 1 мкл [1].



Результати та їх обговорення

Результати вивчення видового складу грибів, виділених з уражених кореневими гнилями рослин пшениці ярої, засвідчили, що в патогенному комплексі переважали представники роду *Fusarium*, а саме: *Fusarium culmorum* (W.G.Sm) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyd.et Hans., *F. oxysporum* var. *orthoceras* (Appl.et Wr.) Bilai, *F. heterosporum* Nees, *F. sambucinum* var. *minus* Wr. Траплялися також *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (syn. *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram, *Helminthosporium sativum* Pammel, King et Bakke) і, зрідка, *Pseudocercospora herpotrichoides* (From) Deighton.

Отже, пшениця яра в досліді була уражена звичайною (гельмінтоспоріозною) і фузаріозною кореневими гнилями.

Ураженість рослин пшениці ярої кореневими гнилями показано на рис. 1.

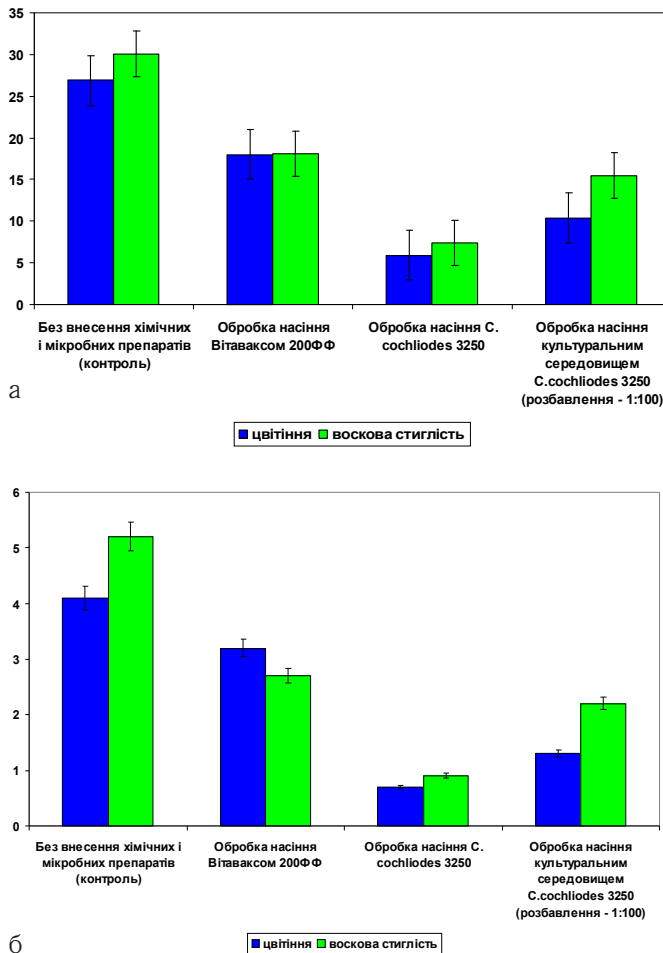


Рис 1. Вплив *C. cochlidiodes* 3250 на поширення і розвиток корневих гнилей пшениці ярої сорту Краса Полісся

(а — поширення хвороби, б — розвиток хвороби)

Fig. 1. Effect *C. cochlidiodes* 3250 on root rots widespreading and development of spring wheat of Krasa Polyssia cultivar

(a — widespreading of disease, b — development of disease)



Наведені дані свідчать про високу ефективність використання *C. cochliodes* 3250 як засобу, що сприяє підвищенню стійкості пшениці ярої до фітопатогенних грибів, при чому ефективним виявилось застосування не тільки гриба *C. cochliodes* 3250, а й культурального середовища мікрOMICETA. Так, у варіанті, де використовували культуральне середовище *C. cochliodes* 3250, рослини значно менше уражувалися кореневою гниллю (поширення хвороби — 10,4–15,5%, розвиток хвороби — 1,3–2,2% залежно від фаз розвитку рослин), ніж в контрольному варіанті (поширення хвороби — 26,9–30,1%, розвиток хвороби — 4,1–5,2%).

Тобто, поширення хвороби зменшилось у середньому в 1,9–2,6 раза, а інтенсивність прояву — в 2,3–3,2 раза. Біологічна ефективність застосування культурального середовища *C. cochliodes* 3250 проти корневих гнилей досягала 57,7–68,3%, що є вище, ніж за використання Вітаваксу 200 ФФ, біологічна ефективність якого становила в середньому 34,5%.

Обмеження розвитку корневих гнилей пшениці ярої при застосуванні КС *C. cochliodes* 3250 можна пояснити здатністю гриба утворювати або антибіотичні речовини, що накопичуються в культуральному середовищі, або ж біологічно активні речовини-індуктори (елісатори) стійкості рослин до захворювань. Вивчення антибіотичної активності КС *C. cochliodes* 3250 показало, що гриб не утворює речовини антибіотичної дії щодо зазначених вище збудників корневих гнилей пшениці ярої. Тому подальші наші дослідження були спрямовані на виявлення в культуральному середовищі *C. cochliodes* 3250 біологічно активних речовин-елісаторів.

Проведений з використанням газової хроматографії аналіз жирнокислотного складу культурального середовища *C. cochliodes* 3250 засвідчив, що він містить жирні кислоти з різним числом вуглецевих атомів (табл. 1) і, що особливо важливо, в культуральному середовищі гриба була виявлена арахідонова (ейкозатетраєнова) кислота (1,42% від загального вмісту жирних кислот), яку відносять до біогенних елісаторів. Вона є активним індуктором окиснювального вибуху, синтезу рослинних антибіотиків (фенолів, фітоалексинів) і реакції надчутливості. У тканинах рослин арахідонова кислота, проявляючи властивості елісаторів, індукує системну імунну відповідь на дію несприятливих факторів.

Отже, зменшення ураженості рослин пшениці ярої корневими гнилями під впливом *C. cochliodes* 3250 можна пояснити як високою антагоністичною активністю гриба відносно фітопатогенних грибів, встановленою попередніми дослідженнями, так і здатністю утворювати арахідонову кислоту, яка є активною речовиною-елісатором і сприяє підвищенню стійкості рослин до збудників хвороб.

Використання як живої культури *C. cochliodes* 3250, так і культурального середовища суттєво впливало на біосинтез хлорофілу в листках пшениці ярої (табл. 2). Так, у варіантах, де проводили передпосівну обробку насіння КС гриба, розбавленого водою у співвідношенні 1:100, вміст хлорофілу *a* збільшився відповідно на 14,8, хлорофілу *b* — на 14,0% у порівнянні з контрольним варіантом. Відомо, що вміст хлорофілу *a* в хлоропластах рослин значно перевищує міст хлорофілу *b*, а за дії стресових факторів різної природи зменшується вміст саме хлорофілу *a*, тому його збільшення під впливом культурального середовища *C. cochliodes* 3250 сприяє підвищенню стійкості рослин до несприятливих умов навколишнього середовища.



Таблиця 1
Жирнокислотний склад культурального середовища *C. cochliodes* 3250

Table 1

Fatty-acid content of cultural medium *C. cochliodes* 3250

Назва кислоти	Число атомів вуглецю	Вміст, % від загальної суми
Лауринова	C ₁₂ :0	0,50
Міристинова	C ₁₄ :0	1,27
Ізо-міристинова	Ізо-C ₁₄ :0	2,03
12-Метилтетрадецена	Антеізо-C ₁₄ :0	10,67
Пентадеканова	C ₁₅ :0	0,74
12-Метилтетрадеканова	Антеізо-C ₁₅ :0	6,79
Пальмітинова	C ₁₆ :0	11,94
Пальмітоолеїнова	C ₁₆ :1	1,67
15-Метилгексадецена	Ізо-C ₁₇ :0	0,85
14-Метилгексадеканова	Антеізо-C ₁₇ :0	9,05
Маргарина	C ₁₇ :0	0,35
Гептадецена	C ₁₇ :1	0,66
Стеаринова	C ₁₈ :0	3,89
Олеїнова	C ₁₈ :1	13,02
Елаїдинова	C ₁₈ :1	1,10
Лінолева	C ₁₈ :2	24,06
<i>Цис-транс</i> -октадекадієн-9,11-ова	C ₁₈ :2	0,94
<i>Цис-цис</i> -октадекадієн-11,13-ова	C ₁₈ :2	2,10
Ліноленова	C ₁₈ :3	3,09
Арахінова	C ₂₀ :0	0,32
Галдолеїнова	C ₂₀ :1	0,41
<i>Цис-цис</i> -ейкозадієн-11,14-ова	C ₂₀ :2	0,18
Дигомо-γ-ліноленова	C ₂₀ :3	0,26
Арахідонова	C ₂₀ :4	1,42
Бегенова	C ₂₂ :0	0,35
Докозадієнова	C ₂₂ :2	2,34



Таблиця 2

Вміст хлорофілів (*a* і *b*) в листках пшениці ярої сорту Краса Полісся у фазу цвітіння (польовий дослід, 2008 р.)

Table 2

Chlorophyll content (*a* and *b*) in the leaves of cultivar Krasa Polyssia spring wheat (field research, 2008)

Варіант досліджу	Концентрація хлорофілів, мг/100 г листків		
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a+b</i>
Без внесення препаратів	409,3	77,7	487,0
Обробка насіння Вітаваксом 200ФФ	453,0	84,6	537,6
Обробка насіння Хетоміком	534,2	128,4	662,6
Обробка насіння КС <i>C. cochlodes</i> 3250	469,8	88,6	558,4
НІР ₀₅	9,95	5,44	12,30

Значне зменшення ураженості пшениці ярої кореневими гнилями, підвищення інтенсивності фізіолого-біохімічних процесів під впливом *C. cochlodes* 3250, а саме зростання вмісту хлорофілу в листках забезпечило суттєвий приріст урожаю культури – 13,1% (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив *C. cochlodes* 3250 на урожайність пшениці ярої сорту Краса Полісся (польовий дослід, 2008 р.)

Table 3

Effect of *C. cochlodes* 3250 on productivity of cultivar Krasa Polyssia spring wheat (field research, 2008)

Варіант досліджу	Урожай, ц/га	Приріст урожаю	
		ц/га	%
Без внесення препаратів	41,1	-	-
Обробка насіння Вітаваксом 200ФФ	44,5	3,4	8,3
Обробка насіння <i>C. cochlodes</i> 3250	50,2	9,1	22,1
Обробка насіння КС <i>C. cochlodes</i> 3250	46,5	5,4	13,1
НІР ₀₅	2,0		

Застосування КС *C. cochlodes* 3250 виявилось ефективнішим, ніж застосування хімічного препарату Вітаваксу 200 ФФ, який сприяв збільшенню урожайності лише на 8,3%. Аналіз структури урожаю пшениці ярої показав (табл. 4), що передпосівна обробка насіння культуральним середовищем *C. cochlodes* 3250 позитивно впливала на такі елементи, як довжина колосу, кількість зерен у колосі, маса зерна в колосі та маса 1000 насінин.



Таблиця 4
Структура врожаю пшениці ярої сорту Краса Полісся під впливом *C. cochlidos* 3250 (польовий дослід, 2008)

Table 4
Spring wheat crop structure of cultivar Krasa Polyssia under the influence of *C. cochlidos* 3250 (field research, 2008)

Варіант дослідю	Довжина колосу, см	Кількість зерен в колосі, шт.	Маса зерен з одного колосу, г	Маса 1000 насінин, г
Без внесення препаратів	6,2±0,09	31,9±0,75	1,12±0,04	35,0±0,53
Обробка насіння Вітаваксом 200ФФ	6,5±0,06	34,5±0,67	1,25±0,02	36,2±0,26
Обробка насіння Хетоміком	7,2±0,12	39,5±1,83	1,48±0,06	37,6±0,23
Обробка насіння КС <i>C. cochlidos</i> 3250	6,9±0,06	36,7±1,47	1,37±0,05	37,1±0,26

Проведеними дослідженнями показано високу ефективність використання сапрофітного гриба *C. cochlidos* 3250 як засобу індукування стійкості рослин пшениці ярої до збудників корневих гнилей. При взаємодії зазначеного гриба з рослинами важлива роль може належати речовині-елісатору арахідонової кислоти, яка утворюється *C. cochlidos* 3250 і нагромаджується у його культуральному середовищі.

ЛІТЕРАТУРА

1. ГОСТ Р 1486-99. Получение метиловых эфиров жирных кислот. Введ.01.01.01. — М. — Гос. стандарт. Рос. Федерации, 2001. — С. 2—3.
2. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физиологии растений. — Киев: Наук. думка, 1973. — 567 с.
3. Жеребило О.Е., Вишталюк Н.М. Жирнокислотный состав клеточных липидов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* в сравнении с типовыми представителями рода и семейства // Микробиол. журн. — 1991. — 53, № 4. — С. 26—33.
4. Копилов Є.П. Здатність аскоміцета *Chaetomium cochlidos* Palliser вступати в тісні симбіотичні взаємовідносини з рослинами пшениці ярої // Агроєкологічний журнал. — 2008. — Червень. — С. 111—114.
5. Копылов Е.П. Биоконтроль возбудителей корневых гнилей яровой пшеницы // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: Междунар. научн. конф. (Минск-Раков, 1—2 июня 2006 г.): Материалы Межд. научн. конф. — Минск-Раков, 2006. — С. 267—270.
6. Коршунова А.Ф., Чумаков А.С., Шекочихина Р.И. Защита пшеницы от корневых гнилей. — Ленинград: Колос, 1976. — 184 с.
7. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика: Монографія / За ред. В.В. Вологона. — К.: Аграрна наука, 2006. — 311 с.
8. Патица В.П., Копилов Є.П., Надкерничний С.П. Вплив *Chaetomium cochlidos* Palliser на мікроміцети кореневої зони ярого ячменю // Микробиол. журн. — 2001. — Т. 63, № 5. — С. 3—9.
9. Тарчевский И.А. Элиситор-индуцируемые сигнальные системы клеток растений // Физиология растений. — 2000. — Т. 47, № 2. — С. 321—332.



Е.П. Копылов¹, С.П. Надкерничный¹, Л.А. Белявская², О.В. Голубец³

¹Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
ул. Шевченко, 97, Чернигов, Украина, тел.: +38 (0462) 23 70 38,
e-mail: evhenyukopilov@rambler.ru

²Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина

³Научно-исследовательский центр испытаний продукции ГП Укрметтестстандарт,
ул. Метрологическая, 10, Киев, Украина

ИНДУЦИРОВАНИЕ СТОЙКОСТИ РАСТЕНИЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ КОРНЕВЫХ ГНІЛЕЙ ПРИ СОДЕЙСТВИИ ГРИБА *CHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISER

Реферат

Показана эффективность использования сапрофитного гриба *Chaetomium cochliodes* 3250 в качестве индуктора стойкости растений яровой пшеницы к возбудителям корневых гнилей. Изучен жирнокислотный состав культуральной среды гриба и установлено, что *C. cochliodes* 3250 синтезирует арахидоновую кислоту, накапливающуюся в культуральной среде. Арахидоновая кислота является биогенным элиситором, индуцируя в тканях растений иммунный ответ на действие патогенов и неблагоприятных условий. Способность *C. cochliodes* 3250 продуцировать арахидоновую кислоту является одним из факторов повышения стойкости растений яровой пшеницы к возбудителям корневых гнилей при его использовании.

Ключевые слова: *Chaetomium cochliodes* 3250, элиситоры, яровая пшеница, корневые гнили, арахидоновая кислота.

Е.Р. Копылов¹, S.P. Nadkernychny¹, L.O. Belavskaya², O.V. Golubets³

¹The Institute Of Agriculture Microbiology UAAS, 97Shevchenko str., Chernigov, Ukraine, tel.: +38 (0462) 23 70 38, e-mail: evhenyukopilov@rambler.ru

²Zabolonty Institute Of Microbiology And Virology, NAAS of Ukraine,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, G03680, Ukraine

³Research center of product testing DP Ukemettteststandard,
10 Metrologichna str., Kyiv, Ukraine

THE INDUCTION OF SPRING WHEAT RESISTANCE TO ROOT ROTS AGENTS UNDER THE INFLUENCE OF FUNGUS *CHAETOMIUM COCHLIODES* PALLISER

Summary

The effectiveness of saprophyte fungus *Chaetomium cochliodes* 3250 usage as an inductor of spring wheat plants resistance to root rots agents was achieved. The content of fatty acids in cultural medium was investigated. It was found out that *C. cochliodes* 3250 produced arachidonic acid accumulating it in cultural medium. Arachidonic acid is a biogenic elicitor which induces an immune answer in plants tissues in response to pathogenes action and unfavourable environment. The ability of *C. cochliodes* 3250 to produce arachidonic acid is one of the factors of rising up spring wheat plants resistance to root rot agents during its usage.

Key words: *Chaetomium cochliodes* 3250, elicitors, spring wheat, root rots, arachidonic acid.



**М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Л.М. Вострова, Т.О. Філіпова,
М.В. Гренадьорова**

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

АКТИВНІСТЬ ІЗАТИНОВОГО ГІДРАЗИДА ФЕНОКСИОЦТОВОЇ КИСЛОТИ ЩОДО ДЕЯКИХ ШТАМІВ *FUSARIUM SPP.*

Вивчено протифузаріозну активність 2,3-індоліндіонового гідрозиду 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти. Максимальний рівень дії на штами мікроміцетів спостерігався для 1,0 мМ даної сполуки. Визначено, що фунгіцидна активність досліджуваного гідрозиду визначається наявністю ізатинового (2,3-індоліндіонового) компоненту молекули.

Ключові слова: ізатиновий гідрозид феноксиоцтової кислоти, Fusarium spp., фунгіцидна активність.

Захворювання рослин є одним із факторів, який істотно обмежує продуктивність сільського господарства. Щорічний збиток від фітопатогенних мікроорганізмів, значна частина яких належить до паразитичних грибів, становить від 15 до 20% загальної продуктивності світового рослинництва [5, 7].

Сьогодні хімічні пестициди є найбільш затребуваним інструментом для захисту рослин [2]. Токсичність даних сполук для навколишнього середовища, а також споживача продукції, загальновідома та спричиняє серйозне занепокоєння [4]. Обмеження, що були введені Європейським Союзом, щодо використання хімічних пестицидів стимулюють пошук нових засобів боротьби із захворюваннями рослин [6]. Одним із його напрямів є розробка фунгіцидних препаратів на основі сполук, що вже використовуються в сільському господарстві та є нешкідливими для навколишнього середовища і споживача [8, 9].

Матеріали та методи

У роботі були використані штами 3 видів грибів роду *Fusarium*: *F. sporotrichiella* var. *roae* ПНДЛ-1, *F. graminearum* ПНДЛ-2 і *F. oxysporum* ПНДЛ-3 (з колекції ІП «Біотехніка»). Зберігання та вирощування культур проводилося при температурі 5 °С та 22 °С, відповідно, на скошеному картопляному агарі (КА), що містить 2% D-глюкози [1].

Досліджувана речовина є 2,3-індоліндіоновим гідрозидом 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти — (сполука I, рис. 1). Дане похідне було синтезоване з ізатину (2,3-індоліндіону) та гідрозину 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (сполуки II та III, рис. 1) в Проблемній лабораторії синтезу лікарських препаратів Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Робочі розчини речовин



(10^{-5} – 10^{-3} М), які були отримані з використанням диметилсульфоксиду (ДМСО), автоклаували при 0,5 атм [9].

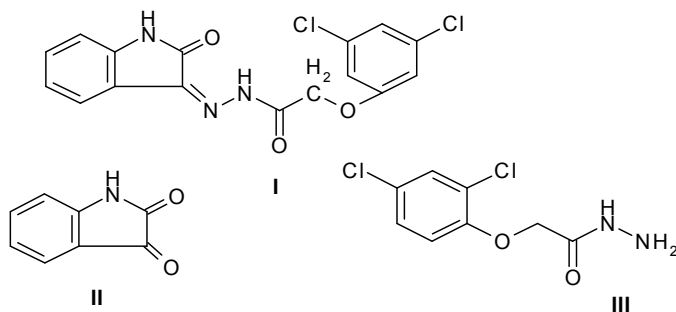


Рис. 1. Структура досліджуваних сполук

Fig. 1. The studied compound structure

Фунгіцидну активність визначали методом агарових блоків [1, 5]. Облік результатів провадили, реєструючи діаметр зони відсутності росту мікроміцетів (в мм), за 24 години культивування *Fusarium spp.* при 22 °С. Отримані дані порівнювали зі значеннями контролів: негативним (-К) – ДМСО та позитивним (+К) – тетраметилтіурамидсульфід (ТМТД) [6]. Кількість повторів для кожної концентрації складала 5.

В подальшому для виявлення діючого компоненту досліджуваної сполуки було проведено серію експериментів, в яких визначали швидкість росту *Fusarium spp.* у присутності самого гідразиду (I), ізатину (II), гідразину 2,4-дихлорфеноксицтової кислоти (III), а також суміші двох останніх речовин (II+III). На поверхні КА, який містив досліджувані сполуки, розміщували диск з 7-добовою культурою *Fusarium spp.* Швидкість росту визначали кожні 24 години протягом 12 діб, вимірюючи діаметр колонії. Величину діаметру (в мм) розраховували як середнє арифметичне трьох вимірів випадково обраних проекцій. Для кожного варіанту кількість повторів складала 5.

Статистичне опрацювання результатів, що були отримані в ході експериментів, провадили з використанням критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

На рис. 2 представлені результати, що були отримані під час вивчення фунгіцидної активності 0,01–1,0 мМ 2,3-індоліндіонового гідразиду. Показано, що досліджувані мікроорганізми чутливі до дії даної речовини. Найбільш чутливим виявився штам *F. sporotrichiella var. poae* ПНДЛ-1.

Ізатиновий гідразид (I) більш активно пригнічував ріст мікроміцетів, ніж ТМТД (+К). Максимальна протифузаріозна активність спостерігалася для 1,0 мМ сполуки I. Діаметр зони відсутності росту культур знаходився в межах 18–22 мм.

За даними літератури відомо, що активність гідразидів феноксицтової кислоти обумовлена вивільненням компонентів даних сполук після гідролізу С=N-зв'язку молекул [7, 10]. В подальшому було проведено вивчення активного компоненту дослідженого гідразиду щодо кожного штаму *Fusarium spp.*

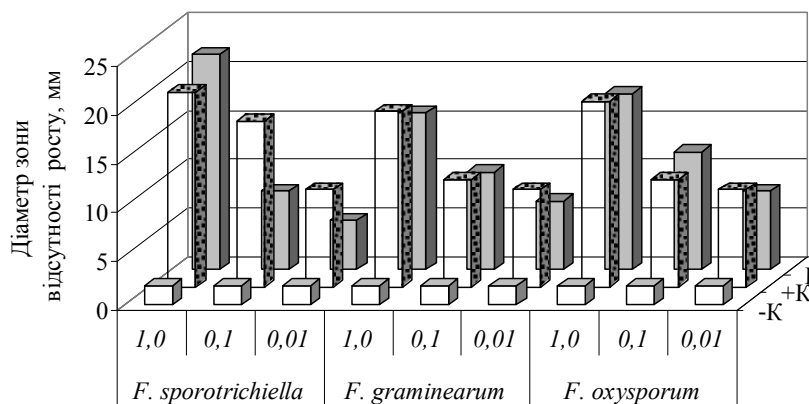


Рис. 2. Рівень активності ізатинового гідразиду щодо досліджуваних культур *Fusarium spp.*

вісь абсцис – концентрація сполук, мМ; -К – негативний контроль; +К – позитивний контроль; I – ізатиновий гідразид

Fig. 2. The isatin hydrazide activity level in the *Fusarium spp.* researched cultures

x-axis – the substance concentration, mM; -K – the negative control; +K – the positive control; I – isatin hydrazide

Як видно з рис. 3, додавання будь-якої з досліджуваних речовин, а також суміші ізатину (сполука II) та гідразину 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (сполука III), спричинило затримку росту *F. sporotrichiella*. Найбільші відмінності фунгіцидної активності були визначені на четверту добу та зберігалися такими до кінця культивування. В присутності гідразиду (сполука I) діаметр колонії мікроміцету був на 20 мм меншим за контрольне значення. За рівнем протифузаріозного впливу на *F. sporotrichiella* речовини II та III, а також їх суміші (II+III), розташовуються таким чином: II > (II+III) > III.

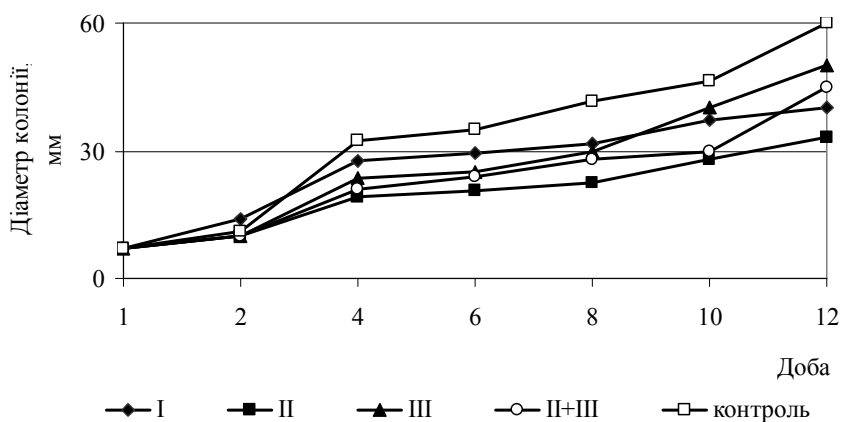


Рис. 3. Ріст *F. sporotrichiella var. poae* ПНДЛ-1 за присутності досліджуваних сполук

Fig. 3. The *F. sporotrichiella var. poae* PSRL-1 growth in the researched substance presence



На відміну від попереднього штаму швидкість росту *F. graminearum* була нижчою. Діаметр колоній у контролі на дванадцять добу досягав лише 50 мм (рис. 4). Всі речовини, за винятком ізатину (сполука II), стимулювали розвиток даного мікроміцету. Найбільш вираженим цей вплив був для гідразиду (сполука I). Протягом всього періоду культивування швидкість росту *F. graminearum* практично в 3 рази перевищувала контрольне значення. Сполука II виявляла фунгістатичний ефект. Починаючи з четвертої доби діаметр колонії не змінювався, сягнувши 30 мм.

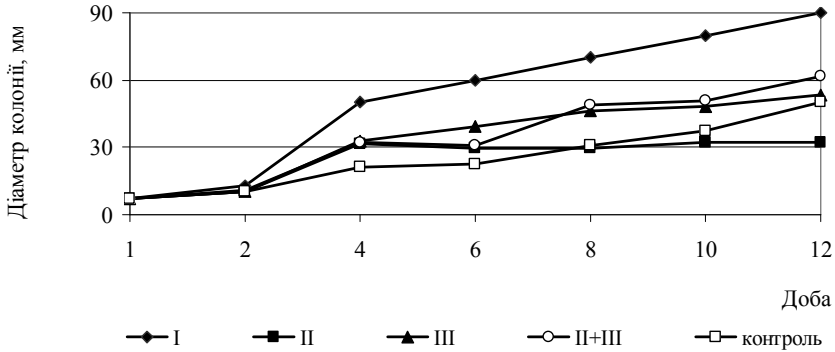


Рис. 4. Ріст *F. graminearum* ПНДЛ-2 за присутності досліджуваних сполук

Fig. 4. The characteristics of *F. graminearum* PSRL-2 growth in the researched substance presence

Протягом перших шести діб культивування досліджувані сполуки не впливали на ріст *F. oxysporum* (рис. 5).

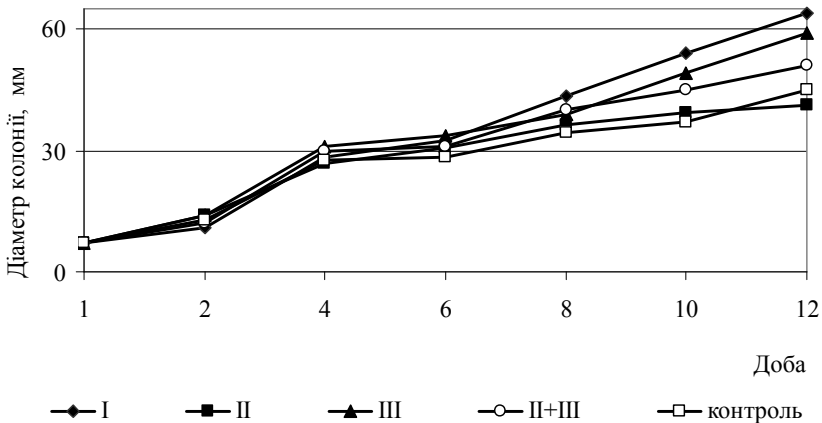


Рис. 5. Ріст *F. oxysporum* ПНДЛ-3 за присутності досліджуваних сполук

Fig. 5. The characteristics of *F. oxysporum* PSRL-3 growth in the researched substance presence

В подальшому сполуки I та II сприяли збільшенню розміру колоній, діаметр яких на 5–20 мм перевищував контрольні значення. У порівнянні з попередніми

похідними речовина II (ізатин) викликала уповільнення зростання *F. oxysporum*, завдяки чому швидкість росту культури залишалася на рівні контролю.

Таким чином, чутливість досліджуваних штамів *Fusarium spp.* до ізатинового гідразиду 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти залежала, перш за все, від виду мікроміцетів. Максимальний фунгіцидний вплив встановлено для концентрації 1,0 мМ. Можна припустити, що протифузаріозна активність ізатинового гідразиду 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти була обумовлена саме 2,3-індоліндіоном, який входить до складу молекули даної сполуки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. — М., 1988. — 230 с.
2. Допустимі дози, концентрації, кількості та рівні вмісту пестицидів у сільськогосподарській сировині, харчових продуктах, повітрі робочої зони, атмосферному повітрі, воді водоймищ, ґрунті: ДСанПіН 8.8.1.2.3.4-000-2001 затв. 20.09.01 / М-во охорони здоров'я України. — К., 2001. — 245 с.
3. Куликов С.Н., Алімова Ф.К., Захарова Н.Г. и др. Биопрепараты с разным механизмом действия для борьбы с грибными болезнями картофеля // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, № 1. — С. 86–92.
4. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні (офіційне видання). — К.: Юнівест Маркетинг, 2003. — 352 с.
5. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. — М., 1992. — 245 с.
6. Пестициди. Класифікація за ступенем небезпечності: ДСанПіН 8.8.1.002-98 / Зб. важливих офіційних матеріалів з санітарних і протиепідемічних питань. — Київ, 2000. — Т. 9, Ч. 1. — С. 249–266.
7. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, 1992. — 590 p.
8. Chohan Z.H., Praveen M., Sherazi S.K.A. Studies on some biologically cobalt(II), copper(II) and zinc(II) complexes with ONO, NNO and SNO donor pyrazinoylhydrazine-derived ligands // Metal-Based Drugs. — 1998. — V. 5, № 5. — P. 267–274.
9. Chohan Z.H., Sherazi S.K.A. Biological role of cobalt (II), copper (II) and nickel (II) metal ions on the antibacterial properties of some nicotinoyl-hydrazine derived compounds // Metal-Based Drugs. — 1997. — V. 4, № 2. — P. 69–74.
10. Garg Y., Samota M.K., Seth G. Synthesis and antifungal activity of some metal complexes of 2-(2-hydroxybenzylidene)aminophenyl benzimidazole // Journal of Chemistry. — 2005. — V. 17, № 1. — P. 615–617.
11. Ram K.A., Deepak S., Lakshman S. et al. Synthesis, Biological, Spectral, and Thermal Investigations of Cobalt(II) and Nickel(II) Complexes of N-Isonicotinamido-2',4'-Dichlorobenzalalidine // Bioinorganic Chemistry and Applications. — 2006. — V. 5, № 4. — P. 1–9.



**М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, Л.Н. Вострова, Т.О. Филиппова,
М.В. Гренадерова**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 57 61, e-mail: rusamariya@yandex.ru

**АКТИВНОСТЬ ИЗАТИНОВОГО ГИДРАЗИДА ФЕНОКСИУКСУСНОЙ
КИСЛОТЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕКОТОРЫМ ШТАММАМ
*FUSARIUM SPP.***

Реферат

Изучена противофузариозная активность 2,3-индолиндионового гидразида 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Максимальный уровень воздействия на штаммы микромицетов наблюдался для 1,0 мМ данного вещества. Определено, что фунгицидная активность исследуемого гидразида определяется наличием изатинового (2,3-индолиндионового) компонента молекулы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: изатиновый гидразид феноксиуксусной кислоты, *Fusarium spp.*, фунгицидная активность.

**M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, L.M. Vostrova, T.O. Filipova,
M.V. Grenaderova**

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

**THE ISATIN PHENOXYACETIC ACID HYDRAZIDE ACTIVITY
RELATIVELY TO SOME *FUSARIUM SPP.* STRAINS**

Summary

The antifusarial activity of 2,3-indolindion 2,4-dichlorophenoxyacetic acid hydrazide was studied. The highest action level to micromycete strains was assigned for 1.0 mM of this substance. The fungicidal activity of the researched hydrazide was determined by isatin (2,3-indolindion) molecule component.

К e y w o r d s: isatin phenoxyacetic acid hydrazide, *Fusarium spp.*, fungicidal activity.



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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;



- прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон, електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);

- назва статті великими літерами;
- анотація із зазначенням новизни результатів дослідження (до 200 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графі, 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.

Андрейко 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 Е // 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 амилалитической активности. — М.: Изд-во стандартов, 1989. — 17 с.



На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



INFORMATION FOR THE AUTHORS

Scientific journal «Microbiology and biotechnology» invites you to spotlight

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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

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

Contents of manuscript

- UDC index on the first page top left;
- author(s) full name(s) in source language, name(s) of institution(s), institution postal address (in international format), contact phone number, e-mail address.



Authors names and institutions they represent should be clearly stated by using superscript numbers;

- article title uppercase;
- article abstract (should not exceed 200 words);
- key words pertaining to the subject matter (5 maximum).

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

Abstracts in source language, Ukrainian/Russian (depending on article language) and English (each one on single page) should be attached to every copy of an article.

Author(s) name(s), institution(s) and article title should be followed by word «Abstract», abstract itself and key words (new paragraph).

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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

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

Books

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

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

Journals

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



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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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

Наукове видання

«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

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 22.03.2010. Формат 70x108/16.
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

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