

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

**№ 2(10)
2010**

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 2

•
2010

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia, 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

© Odesa National Mechnykov University, 2010

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 2



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

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- A.P. Levitsky, O.K. Vertikova, I.O. Selivansky**
CHLOROGENIC ACID: BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 6

EXPERIMENTAL WORKS

- O.D. Ianieva, G.F. Smyrnova, V.S. Pidgorsky**
ACCUMULATION AND EFFLUX OF COPPER AND CADMIUM IONS
BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* STRAINS 22

- N.V. Limanska, V.O. Ivanytsia, A.G. Gavryk, Zh.Yu. Sergeeva,
F.I. Tovkach**
EFFECT OF *RHIZOBIUM VITIS* BACTERIOCINS
ON EXPERIMENTAL TUMOUR FORMATION IN PLANTS 30

- K.M. Udovychenko, N.V. Tryapitcyna, V.M. Udovychenko,
V.P. Polischuk**
SPREAD OF VIRUSES IN PEAR ORCHARDS IN SOME REGIONS
OF UKRAINE 37

- N.V. Chuiko, Z.T. Bega, L.V. Bulavenko, I.K. Kurdish**
INFLUENCE OF BACTERIAL PREPARATION OF COMPLEX ACTION
ON DECORATIVE PLANTS GROWTH 43

- O.I. Balko, E.A. Kiprianova, A.G. Kovalenko,
V.V. Shepelevych, L.V. Avdeeva**
ANTIPHYTOVIRAL ACTIVITY OF GAUPSIN BIOPREPARATION 51

- O.A. Tanasienko, M.P. Rudyk, G.P. Titova, G.P. Potebnya**
INDUCTION OF ANTICANCER RESISTANCE IN MICE TREATED
WITH LECTIN OF BACTERIAL ORIGIN 59

- A.P. Levitsky, V.V. Vit, Yu.V. Tsyselsky, I.A. Selivansky**
THE INFLUENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDE *ESCHERICHIA COLI*
UPON THE DEGREE OF INTESTINAL DISBIOSIS AND RETINA
STATE IN RATS 67

- N.B. Tkachuk, N.R. Demchenko**
ANTIBACTERIAL ACTION OF QUATERNARY SALTS OF
TRIAZOLOAZEPINIUM TO AMMONIFYING BACTERIA
OF CORROSION-DANGEROUS COMMUNITY 75

- I.V. Strashnova, Z.E. Zacharieva, J.J. Dudenko, A.O. Danilova,
V.O. Ivanytsia**
EFFECT OF DIETARY FIBRES ON MICROBIOTA LARGE INTESTINE
OF SICK AT ALLOXAN DIABETES RATS 81

- ANNIVERSARY DATES 89

- INFORMATION FOR THE AUTHORS 96

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

А.П. Левицький, О.К. Вертикова, І.О. Селіванська
ХЛОРОГЕНОВА КИСЛОТА: БІОХІМІЯ І ФІЗІОЛОГІЯ 6

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

О.Д. Янева, Г.Ф. Смирнова, В.С. Підгорський
АКУМУЛЯЦІЯ ТА ЕФЛЮКС ІОНІВ МІДІ ТА КАДМІЮ ШТАМАМИ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA 22

**Н.В. Ліманська, В.О. Іваниця, А.Г. Гаврик, Ж.Ю. Сергєєва,
Ф.І. Товкач**
ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНІВ *RHIZOBIUM VITIS* НА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ УТВОРЕННЯ ПУХЛИН У РОСЛИН 30

**К.М. Удовиченко, Н.В. Тряпїцина, В.М. Удовиченко,
В.П. Полїшук**
ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ У НАСАДЖЕННЯХ ГРУШІ ДЕЯКИХ
РЕГІОНІВ УКРАЇНИ 37

Н.В. Чуйко, З.Т. Бега, Л.В. Булавенко, І.К. Курдиш
ВПЛИВ БАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ
НА РІСТ ДЕКОРАТИВНИХ РОСЛИН 43

**О.І. Балко, О.А. Кіпріанова, О.Г. Коваленко, В.В. Шепелевич,
Л.В. Авдєєва**
АНТИФІТОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ БІОПРЕПАРАТУ ГАУПСИН 51

О.А. Танасієнко, М.П. Рудик, Г.П. Тітова, Г.П. Потєбня
ІНДУКЦІЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У
МИШЕЙ ЦИТОТОКСИЧНИМ ЛЕКТИНОМ БАКТЕРІАЛЬНОГО
ПОХОДЖЕННЯ 59

А.П. Левицький, В.В. Віт, Ю.В. Цисельський, І.О. Селіванська
ВПЛИВ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ *ESCHERICHIA COLI* НА СТУПІНЬ
КИШКОВОГО ДИСБІОЗУ ТА НА СТАН СІТКІВКИ ОКА ЩУРІВ 67

Н.В. Ткачук, Н.Р. Демченко
АНТИБАКТЕРІАЛЬНА ДІЯ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ
ТРИАЗОЛАЗЕПІНІЮ ЩОДО АМОНІФІКУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ
КОРОЗІЙНО-НЕБЕЗПЕЧНОГО УГРУПОВАННЯ 75

**І.В. Страшнова, З.Є. Захарієва, Ю.Ю. Дуденко, А.О. Данилова,
В.О. Іваниця**
ВПЛИВ ХАРЧОВИХ ВОЛОКОН НА МІКРОБІОТУ ТОВСТОЇ КИШКИ
У ЩУРІВ З АЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ 81

ЮВІЛЕЇ ТА ДАТИ 89

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 92

УДК 613.34.-008.87+616.34-002-022-07:616.31-018.73

А.П. Левицкий^{1,2}, Е.К. Вертикова², И.А. Селиванская¹

¹Институт стоматологии АМН Украины, ул. Ришельевская, 11, Одесса, 65026, Украина, тел.: +38 (048) 728 24 61, e-mail: stomat@paco.net

²Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина

ХЛОРОГЕНОВАЯ КИСЛОТА: БИОХИМИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

Хлорогеновая кислота (C₁₆H₁₈O₉) (ХГК) – сложный эфир кофейной (3,4-диоксикоричной) кислоты и одного из стереоизомеров хинной кислоты, широко распространена в природе и содержится в наибольшем количестве в кофейных зернах, семенах подсолнечника, листьях черники и белого тополя, корне цикория. Биосинтез ХГК происходит исключительно в растениях из фенилаланина через стадию образования шикимовой кислоты. ХГК обладает сильными антиоксидантными, антивирусными, антибактериальными и антигрибковыми свойствами, проявляет гипогликемическое, гипохолестеринемическое, противораковое и гепатопротекторное действие. Установлены ее пребиотические свойства.

К л ю ч е в ы е с л о в а : хлорогеновая кислота, кофейная кислота, биосинтез, биологические свойства, получение, нахождение в природе.

ХГК относится к семейству производных коричной кислоты (циннаматов) (рис. 1). Эти соединения широко распространены в растительном мире, главным образом, в виде конъюгатов [21, 22]. После гидролиза они образуют свободные кислоты, такие, как кофейную (3,4-дигидроксикоричную), феруловую (3-метокси-4-гидроксикоричную), синаповую (3,5-диметокси-4-гидроксикоричную), *p*-кумаровую (4-гидроксикоричную) и ряд других [13].

Из всех конъюгированных циннаматов наиболее известным соединением является хлорогеновая кислота (5-кофеоилхинная). ХГК – это целое семейство сложных эфиров, образованных транс-коричной кислотой и хинной кислотой (1L-1(OH)-3,4,5-тетрагидроксициклогексанкарбоновой кислотой), которая имеет аксиальные гидроксилы у углеродных атомов 1 и 3 и экваториальные гидроксилы у углеродных атомов 4 и 5.



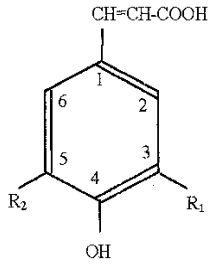


Рис. 1. Гидроксикоричные кислоты (ГКК)

p-кумаровая (4-гидроксикоричная) ($R_1=R_2=H$);
 кофейная (3,4-дигидроксикоричная) ($R_1=OH$; $R_2=H$);
 феруловая (3-метокси-4-гидроксикоричная) ($R_1=OCH_3$; $R_2=H$);
 синаповая (3,5-диметокси-4-гидроксикоричная) ($R_1=R_2=OCH_3$).

Fig. 1. Hydroxycinnamic acids (HCA)

p-coumaric (4-hydroxycinnamic) acid ($R_1=R_2=H$);
 caffeic (3,4-dihydroxycinnamic) acid ($R_1=OH$; $R_2=H$);
 ferulic (3-methoxy, 4-hydroxycinnamic) acid ($R_1=OCH_3$; $R_2=H$);
 sinapic (3,5-dimethoxy, 4-hydroxycinnamic) acid ($R_1=R_2=OCH_3$).

Структура наиболее часто встречающегося изомера ХГК (5-0-кофеоилхинной кислоты) представлена на рис. 2. Ранее ХГК имела другую нумерацию атомов углерода, в соответствии с которой ХГК обозначалась как 3-0-кофеоилхинная.

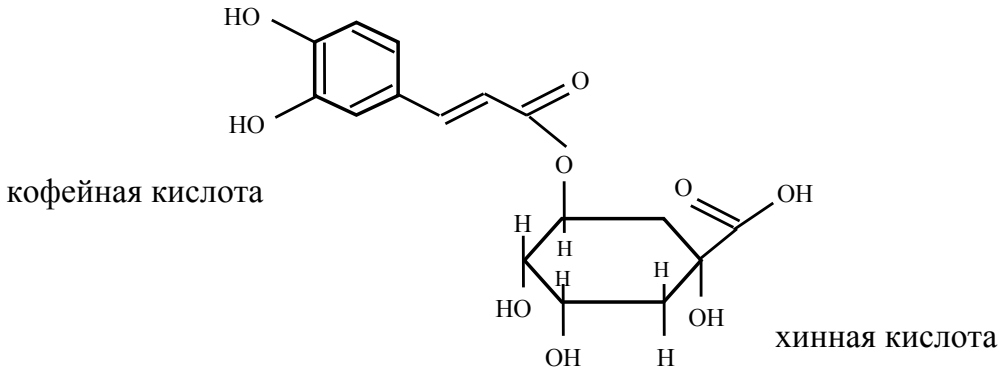


Рис. 2. Хлорогеновая кислота (5-кофеоилхинная)

Fig. 2. Chlorogenic acid (5-caffeoylquinic)

Семейство ХГК в зависимости от вида, числа и положения кислотных остатков может быть разделено на 4 группы [22]:

— моноэфиры хинной кислоты: кофеоилхинная, кумароилхинная и ферулоилхинная кислоты;

— диэфиры, три- и тетраэфиры кофейной кислоты (например, цикориевая, или дикофеоилхинная, кислота);

— смешанные диэфиры кофейной и феруловой кислот (кофеоил-, ферулоилхинная кислоты) или кофейной и синаповой кислот (кофеоил-, синапоилхинная кислоты);

— смешанные эфиры, включающие замену одной или трех остатков кофейной кислоты на один или два остатка двухосновных алифатических кислот (например, глутаровой, щавелевой, янтарной) или различные пере-становки кофейной, синаповой и 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислот.

Этот перечень представителей семейства ХГК можно было бы расширить за счет включения конъюгатов галловой или шикимовой кислот и других дериватов хинной кислоты [16, 24, 25, 30, 42].

ХГК представляет собой бесцветные кристаллы. Брутто-формула: $C_{16}H_{18}O_9$.

Молекулярная масса (Да): 354,4. Температура плавления $t_{пл} = 206–210$ °С. Щелочные растворы ХГК на воздухе зеленеют (отсюда название).

Растворимость: вода: легко растворима; диэтиловый эфир: трудно растворима; хлороформ: не растворима; этанол: легко растворима. Удельное вращение для D-линии натрия: $-31,1$ (вода; 20 °С) [5]. Спектральная характеристика: пики в УФ-области составляют 240, 298 и 325 нм [8].

Качественные реакции: флуоресценция в УФ-свете — голубая, флуоресценция в УФ-свете в парах NH_3 — зеленая, окраска с $FeCl_3$ — зеленая.

Значение R_f в системах: н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) — 0,63; 0,1н соляная кислота — 0,54; 2%-ная уксусная кислота — 0,66; 20%-ный раствор KCl — 0,55 [3].

Отвечает за вкусмодифицирующее действие артишоков. Если экстрактом артишоков прополоскать рот, то сахара, лимонная кислота, хлорид натрия, хининный хлорид вызывают одинаково сладкое вкусовое ощущение. Сладкий вкус сохраняется в течение 4–5 минут [7].

При омылении дает кофейную и хинную кислоты.

Широкое распространение и разнообразные биологические эффекты вызывают потребность количественного анализа ХГК. Для определения ХГК в продуктах с ее высоким содержанием предложены простые и чувствительные спектрофотометрические методы, в основе которых лежит способность ХГК поглощать световые волны в диапазоне 315–364 нм [6, 14, 15]. Обычно используемые в лабораториях фотоколориметры КФК-2 снабжены соответствующими светофильтрами, что делает процедуру анализа доступной для любой биохимической лаборатории.

Известно, что в щелочной среде спектр ХГК смещается в сторону длинных волн, в связи с чем к исследуемым растворам ХГК добавляют 1%-ный раствор тетрабората натрия и пробы снова колориметрируют при тех же длинах волн; при этом обнаружено, что оптическая плотность при 315 нм увеличивается на 24%, а при 364 нм она возрастает в 7–8 раз (молярный коэффициент поглощения достигает величин 8580 ± 1717).



На основании полученных данных строят калибровочные кривые при 315 нм без бората натрия и при 364 нм с добавлением бората натрия. Линейная зависимость экстинкции от концентрации ХГК соблюдается в пределах $1 \cdot 10^{-5}$ – $10 \cdot 10^{-5}$ моль/л [15].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является одним из наиболее эффективных методов анализа таких многокомпонентных смесей, как растительные экстракты. При использовании градиентного элюирования (обычно в метанол-водных подвижных фазах) проблем в разделении изомеров ХГК не возникает [6].

В работе [6] используют хроматографическую систему, которая составлена из насоса Altex 110А, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл. Хроматографическая колонка: 4•50 мм. Диасфер-110-С18, 5 мкм, защищенная предколоночным фильтром. Детектирование осуществляют при длине волны 320 нм (детектор Nicolet L/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм используют ПП МультиХром 1.5.

Для количественного определения ХГК используют подвижную фазу состава 8 об.% ацетонитрила, 2 об.% уксусной кислоты и 0,2 об.% триэтиламина в воде, при скорости подачи 1 мл/мин. Детектирование осуществляют при 325 нм. Диапазон линейности отклика детектора соблюдается, по крайней мере, в диапазоне 0,025–0,25 мг/мл ХГК при вводе пробы объемом 20 мкл [1].

Для определения общего количества фенольных соединений, включая и ХГК, часто используют реакцию с реактивом Фолина [10].

ХГК наряду с другими фенольными соединениями широко распространена в растительном мире [13, 21]. В табл. 1 отображены источники и количественное содержание в них ХГК.

Из представленных данных видно, что наиболее богатым источником ХГК является кофе, который в значительной мере определяет уровень поступления этого полифенола в организм человека. У кофеманов суточное потребление ХГК может достигать до 1000 мг, в отличие от лиц, не злоупотребляющих кофе и в очень малых количествах потребляющих фрукты и овощи (у них суточное потребление ХГК — менее 25 мг) [13].

Богатыми источниками ХГК являются листья черники и стевии, превосходящие по этому показателю кофе [14, 16]. Плоды черники, в отличие от листьев, содержат ХГК в десятки раз меньше.

В корнях и листьях цикория и одуванчиков в большем количестве содержится цикориевая кислота (дикофеоилхинная), причем в листьях существенно больше, чем в корнях [16]. В чае содержание ХГК значительно ниже [13]. В этом продукте кофейная кислота соединена с галловой [13].

Таблица 1
Содержание хлорогеновой кислоты (ХГК) в различных продуктах (г/кг или г/л)Table 1
Contents of chlorogenic acid in various foodstuffs (g/kg or g/l)

Наименование продуктов	ХГК	Ссылка
Кофе — зеленые зерна — жареные зерна — растворимый	60–100	14
	55,4	14
	99	14
Черника — листья воздушно-сухие при 20 °С — листья, высушенные при +100 °С — сухой экстракт из листьев — плоды	10,2–73,4	16
	109,1	16
	147,3–241,5	16
	1,6	16
Стевия — листья сухие — листья сухие	116	14
	37–53	11
Подсолнечник — семена	5,8–45	12
Барбарис — листья — плоды	0,8–6,8	1
	1,0–4,2	1
Голубика — плоды	0,5–2,0	13
Виноград — сок	до 1,35 (кафтаровая кислота)	13
Арахис	1,06	13
Вишня и другие косточковые (слива, персик, абрикос)	0,15–0,6	21
Цикорий — корни — листья	1,0 (ХГК) + 1,2 (цикориевая кислота)	16
	0,5 (ХГК) + 4,7 (цикориевая кислота)	16
Одуванчик — листья — корни	2,2 (ХГК) + 7,7 (цикориевая кислота)	16
	1,6 (ХГК) + 5,1 (цикориевая кислота)	16
Ежевика — плоды	0,42	2
Капуста — краснокочанная — белокочанная	0,37	13
	0,04	13
Морковь — корнеплоды	0,30	13
Свекла красная — корнеплоды	0,27	13
Яблоко — цельное — сок	0,06–0,33	21
	0,06–0,07	26



Особое положение занимают зерновые культуры (кукуруза, пшеница, ячмень, овес), в зерне которых преобладает не кофейная, а феруловая кислота, соединенная не с хинной кислотой, а с арабиноксиланами стенок растительных клеток (в частности, как 5-0-ферулоил-L-арабинофураноза) [13]. Особенно богаты феруловой кислотой отруби злаков. Так, в кукурузных отрубях ее содержание доходит до 31 г/кг [33], в отрубях пшеницы и ржи — 4,2–4,6 г/кг [31]. В муке из цельного зерна этих злаков содержание фенольных кислот в 3,5 раза меньше. Еще меньше фенольных соединений в белом пшеничном хлебе (всего лишь 0,1 г/кг).

Принято считать, что этерификация кофейной кислоты с образованием ХГК значительно снижает ее биодоступность у человека и животных [13]. Низкая биодоступность ХГК по сравнению с кофейной кислотой показана в опытах *in vitro* и *in vivo* [23, 32].

Изучение биодоступности ХГК и кофейной кислоты у человека, проведенное на лицах с илеостомой, показало, что после приема ХГК (1 г) или кофейной кислоты (0,5 г) в тонкой кишке всасывается около 33% ХГК и почти вся ($95 \pm 4\%$) кофейная кислота. 11% введенной с пищей кофейной кислоты экскретируется с мочой, тогда как после приема ХГК в моче определялись лишь ее следы, что авторы объясняют интенсивным метаболизмом этого соединения в организме [36, 37].

Основным местом метаболизма полифенолов, и в том числе ХГК, является печень [22]. Метаболитами ХГК являются кофейная, феруловая, изоферуловая, дигидроферуловая, ванилиновая и другие кислоты. Основные пути метаболизма кофейной кислоты — это метилирование, образование глюкуронидов и сульфатов.

ХГК образуется исключительно в растениях и некоторых микроорганизмах [21, 46]. На основании многолетних наблюдений пришли к выводу, что фенольные соединения (ФС) могут образовываться двумя путями. С одной стороны, они возникают в зеленых листьях при освещении в присутствии CO_2 — это «первичные» ФС. С другой, ФС могут образовываться без участия света, такие ФС — «вторичные». В обоих случаях исходными продуктами для синтеза являются углеводы [19, 28].

Вводя в растения гречихи и табака фенилаланин-2- C^{14} и $\text{C}^{14}\text{H}_3\text{COONa}$, обнаружили, что фенилаланин включается в состав кофейной кислоты без изменения углеродного скелета, а ацетат не используется для ее образования. Исследования подтвердили, что в молодых растениях табака равномерно меченный C^{14} -фенилаланин целиком используется для образования остатка кофейной кислоты в молекуле ХГК [38].

Схема образования ХГК:

углевод → фенилаланин → тирозин → 3,4-диоксифенилаланин →
3,4-диоксифенилпропионовая кислота → кофейная кислота;
кофейная кислота + хинная кислота = ХГК.



Несколько иные результаты были получены другими авторами [4], инкубировавшими диски из клубней картофеля в растворах различных немеченых предшественников и анализировавшими образование ХГК. В их опытах фенилпировиноградная, D,L-фенилмолочная и пара-кумаровая кислоты не вызывали увеличения содержания ХГК. Положительный эффект был получен лишь с D,L-фенилаланином и коричной кислотой. Кофейная кислота не только не включалась в состав ХГК, но была токсичной для ткани. Наиболее эффективным предшественником ХГК оказалась пара-кумарилхинная кислота, образование которой в клубнях было установлено при введении смеси хинной кислоты с фенилаланином, или коричной кислоты. Бесклеточные экстракты клубней картофеля в присутствии аскорбиновой кислоты (для предотвращения образования окисленных продуктов) обладали способностью превращать пара-кумарилхинную кислоту в хлорогеновую. На основании полученных результатов авторы пришли к выводу, что в клубнях картофеля образование ХГК происходит следующим путем:

коричная кислота → хинная кислота → депсид коричной и хинной кислот → пара-кумарилхинная кислота → хлорогеновая кислота.

Поскольку последняя стадия процесса подавлялась тиомочевинной и 4-хлор-резорцином, являющимися сильными ингибиторами полифенолоксидазы, авторы сделали также вывод о способности этого фермента выполнять функцию гидроксилирования, что согласуется с современными представлениями.

В той же работе авторы показали, что при превращении C¹⁴-фенилаланина в пара-кумарилхинную и хлорогеновую кислоты разбавления метки не происходит. Поскольку добавление немеченой хинной кислоты к срезам клубней, находившимся в растворе C¹⁴-фенилаланина, не уменьшало удельную радиоактивность образующейся ХГК, было сделано любопытное заключение о том, что хинная кислота не используется для образования кофейной. Хотя сама шикимовая кислота в качестве предшественника кофейной и хлорогеновой кислот не изучалась, нет оснований сомневаться в том, что биосинтез кофейной кислоты осуществляется по пути через шикимовую кислоту [38]. Схема биосинтеза ХГК представлена на рис. 3.

Биологическое действие ХГК и ее составных частей обусловлено, в первую очередь, ее мощным антиоксидантным действием [22, 38]. Она ингибирует 5,6-эпоксидацию ретиноевой кислоты [22, 43]. Ее содержание коррелирует с антиоксидантной активностью кофе [34, 43] и плодов других растений [35].



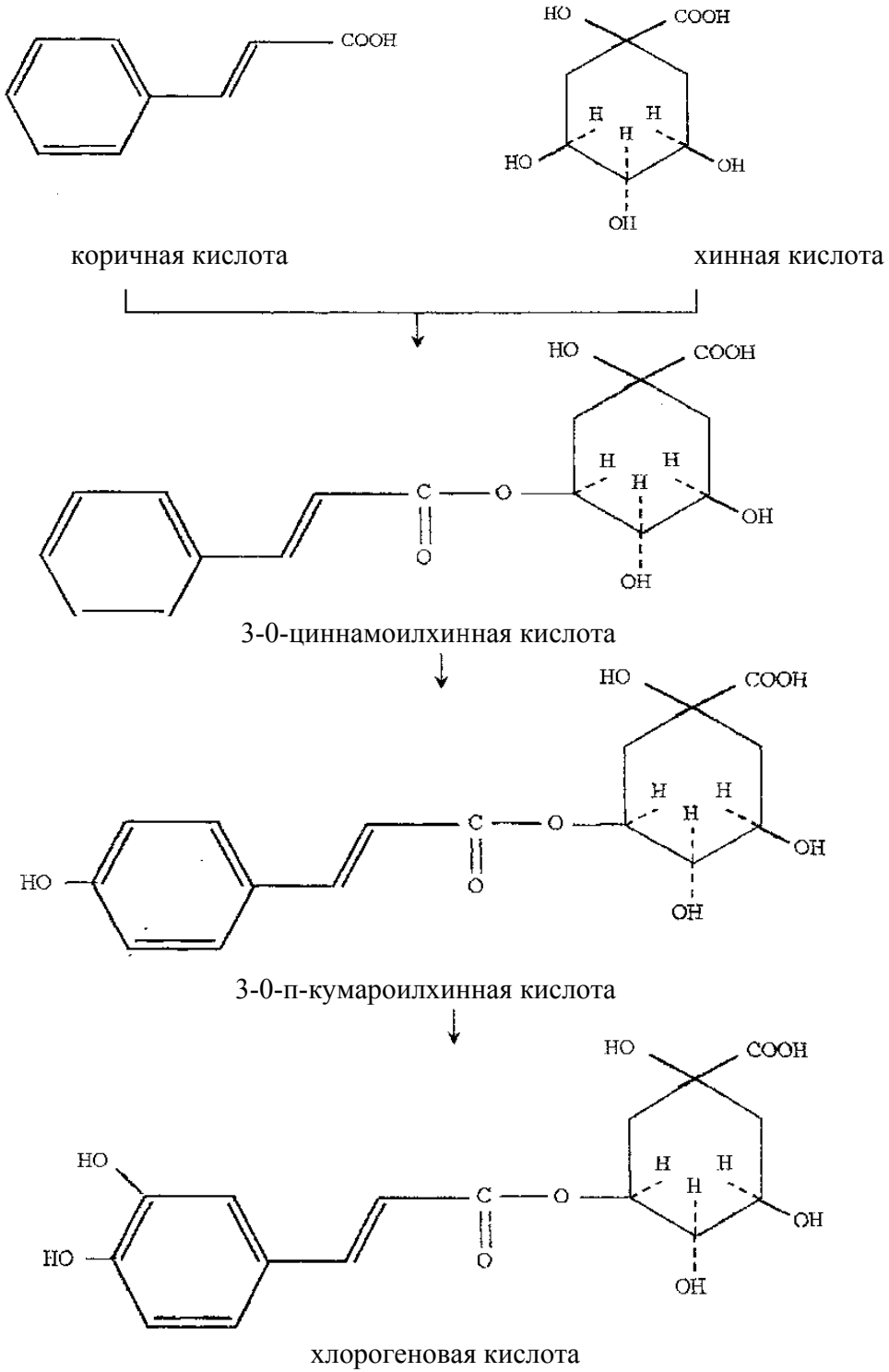


Рис. 3. Биосинтез хлорогеновой кислоты

Fig. 3. Biosynthesis of chlorogenic acid

В опытах на мышах линии C57BL/KsJ-db/db исследовали антиоксидантные свойства кофейной кислоты по таким показателям как активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы и концентрация перекиси водорода и ТБК-активных продуктов [45]. Эти показатели исследовались в эритроцитах и в ткани печени мышей, получавших в течение 5 недель полусинтетическую диету, содержащую 0,02% кофейной кислоты. Соответствующие результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние кофейной кислоты на состояние антиоксидантно-прооксидантной системы эритроцитов и печени мышей линии C57BL/KsJ-db/db (n=10, M±m) [45]

Table 2

The effect of caffeic acid upon the state of erythrocyte antioxidant-prooxidant system and hepatic state in C57BL/KsJ-db/db mice (n=10, M±m) [45]

Показатели	Контроль	Кофейная кислота, 0,02% рациона
Эритроциты		
Супероксиддисмутаза (ед/г Hb)	898,28±16,49	1037,96±16,93 p<0,001
Каталаза (мкмоль/мин · г Hb)	93,40±16,23	143,60±9,57 p<0,05
Глутатионпероксидаза (мкмоль/мин · г Hb)	28,16±1,86	42,55±2,34 p<0,01
H ₂ O ₂ (мкмоль/г Hb)	23,52±0,56	21,68±0,09 p<0,05
ТБК-продукты (мкмоль/г Hb)	2,68±0,01	2,97±0,01 p<0,001
Печень		
Супероксиддисмутаза (ед/мг белка)	7,73±10,57	15,51±0,97 p<0,001
Каталаза (мкмоль/мин · мг белка)	4,79±0,16	5,82±0,28 p<0,05
Глутатионпероксидаза (нмоль/мин · мг белка)	42,22±2,01	57,38±1,80 p<0,001
ц-H ₂ O ₂ (нмоль/мг белка)	7,77±0,32	5,17±0,35 p<0,01
м-H ₂ O ₂ (нмоль/мг белка)	66,32±2,15	52,10±2,26 p<0,01
ТБК-продукты (нмоль/мг печени)	4,88±0,33	2,49±0,42 p<0,01

Примечание: ц-H₂O₂ — цитозольная H₂O₂; м-H₂O₂ — митохондриальная H₂O₂.



Как видно из представленных в табл. 2 данных, включение в рацион в качестве добавки 0,02% кофейной кислоты, достоверно снижает прооксидантную активность тканей, о чем свидетельствует снижение концентрации ТБК-продуктов перекисидации липидов (малоновый диальдегид) и концентрации перекиси водорода (H_2O_2). Напротив, ферменты антиоксидантной системы (СОД, каталаза и глутатионпероксидаза) существенно увеличивают свою активность, причем за счет индукции их биосинтеза.

В опытах *in vitro* на модельной системе дезоксирибоза — Fe^{2+} - H_2O_2 оценивали антиоксидантную (АО) активность ХГК, кофейной кислоты и других фенольных соединений [43]. По этому показателю (в порядке убывания АО-активности) исследованные соединения расположились в следующий ряд:

кофейная кислота > феруловая кислота > хлорогеновая кислота >>
>> нарингенин.

Причем показатель CI_{50} для нарингенина равен 6,7 мкМ, для ХГК — 0,25 мкМ и для кофейной кислоты — 0,12 мкМ.

Иными словами, АО-активность ХГК в 27 раз превышает АО-активность нарингенина (главного биофлаваноида грейпфрута). В такой же ряд располагаются ХГК и кофейная кислота по способности ингибировать ксантиноксидазу — главный генератор супероксидных анионрадикалов в животном организме [20].

ХГК ингибирует биосинтез лейкотриенов, блокируя 5- и 12-липоксигеназы, осуществляющие окисление арахидоновой кислоты [20].

ХГК (в составе кофе) снижает уровень малонового диальдегида в плазме крови и в составе липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [43]. Благодаря умеренному снижению чувствительности ЛПНП к окислению, ХГК может уменьшать степень риска сердечно-сосудистых заболеваний.

В ряде работ показана антивирусная активность ферментативно окисленных форм ХГК в отношении вирусов герпеса типов I и II [16, 44].

Экстракты, содержащие значительное количество ХГК, ингибировали экспрессию обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [27]. ХГК проявляла активность против патогенных штаммов бактерий *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [40].

Цикориевая кислота (2,3-дикофеоилхинная) оказалась сильным ингибитором интегразы ВИЧ типа I (HIV-1) [41]. Интеграза способствует внедрению ВИЧ в геном иммунокомпетентных клеток человека. Цикориевая кислота в концентрации 1–4мкг/мл способна ингибировать данный фермент.

Гипогликемическое действие ХГК представляет значительный интерес в связи с все обостряющейся проблемой сахарного диабета.



Обстоятельные исследования гипогликемического действия кофейной кислоты были проведены группой южнокорейских ученых на мышах линии C57BL/KsJ-db/db [45]. Эти мыши в течение 5 недель получали диету, содержащую 0,02% кофейной кислоты. Оказалось, что кофейная кислота предотвращает развитие гипергликемий у диабетических мышей и способствует росту животных (рис. 4).

Более того, кофейная кислота значительно увеличивала в плазме концентрацию инсулина, С-пептида, лептина, снижала концентрацию глюкагона и гликозилированного гемоглобина, а также достоверно увеличивала концентрацию в печени гликогена (табл. 3). Под действием кофейной кислоты в печени возрастала активность глюкокиназы, и снижалась активность глюкозо-6-фосфатазы и фосфоэнолпируват-карбоксикиназы [45]. Конкурентное и обратимое ингибирование глюкозо-6-фосфатазы под действием ХГК и ее аналогов впервые было установлено Arion et al. [18].

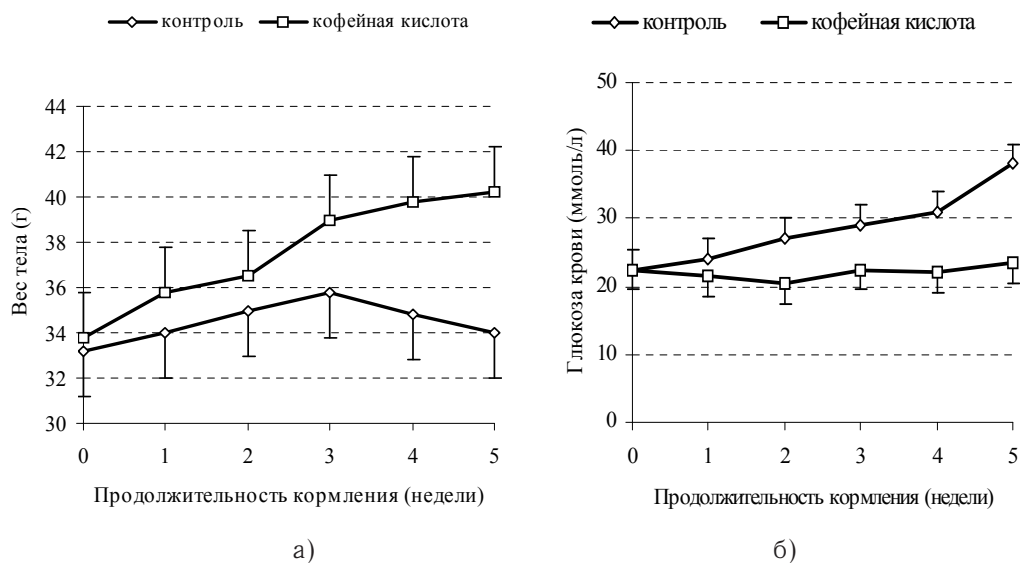


Рис. 4. Изменение веса тела (а) и уровня глюкозы крови (б) у мышей линии C57BL/KsJ-db/db, получавших кофейную кислоту [45]

Fig. 4. Change in body weight (a) and blood glucose level (b) for C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with caffeic acid [45]

В этом же исследовании [45] было показано, что кофейная кислота снижает экспрессию в печени транспортера глюкозы GLUT-2 и увеличивает активность транспортера глюкозы GLUT-4 в жировой ткани. Подобные результаты были получены и другими исследователями [39], которые использовали другое полифенольное соединение (процианидин).

Таблица 3

Влияние кофейной кислоты на уровень регуляторов углеводного обмена у мышей линии C57BL/KsJ-db/db, получавших кофейную кислоту (n=10, M±m) [35]

Table 3

The influence of caffeic acid on the level of carbohydrate metabolism regulators of the line C57BL/KsJ-db/db mice supplemented with caffeic acid (n=10, M±m) [35]

Показатели	Контроль	Кофейная кислота
Инсулин (рМ)	202,10±12,62	328,62±17,04*
С-пептид (рМ)	199,80±2,35	233,10±2,35*
Глюкагон (ng/л)	136,64±3,62	98,46±3,39*
Лептин (мкг/л)	49,10±3,16	77,10±2,78*
Гликозилированный гемоглобин (%)	13,48±0,11	11,11±0,06*
Гликоген печени (мг/г)	56,15±1,51	70,23±0,48*

*p<0,001

Хомяки, получавшие ХГК или кофейную кислоту, были менее чувствительны к действию метилазоксиметанола — мощного индуктора рака толстой кишки [22].

Гепатопротекторное действие кофе было показано при изучении микроядерного теста на костном мозге мышей [17]. Гепатопротекторное действие ХГК и ее производных в опытах *in vivo* усиливалось в присутствии антиоксидантных витаминов [22].

Экстракт из артишоков, богатый ХГК, оказывает мягкое гипохолестеринемическое действие [22]. Кофе влияет на ряд гепато-билиарных процессов, снижает риск желчекаменной болезни, однако не исключено, что это действие обусловлено не ХГК, а кофеином [29]. Регулярное употребление кофе снижает риск развития болезни Паркинсона на 30–50% [16].

ЛИТЕРАТУРА

1. Дейнека В.И., Хлебников В.А., Сорокопудов В.Н., Анисимович И.П. Хлорогеновая кислота плодов и листьев некоторых растений семейства *Berberidaceae* // Химия раст. сырья. — 2008. — № 1. — С. 57–61.



2. *Джабоева А.С., Жилова Р.М.* Фенольный комплекс дикорастущей ежевики // Известия вузов. Пищевая технология. — 2006. — № 1. — С. 31–32.

3. *Драник Л.И.* // Фенольные соединения и их биологические функции. — 1968. — С. 53–60.

4. *Запрометов М.Н.* Биохимия катехинов. — М.: Наука, 1964. — 422 с.

5. *Каррер П.* Курс органической химии / Под ред. М.Н. Колосова. — 2-е изд. — Л.: ГНТИХЛ, 1962. — 667 с.

6. *Ковальов С.В., Єрьоменко Р.Ф., Малоштан Л.М.* Кількісне визначення фенольних сполук у траві люцерни посівної // Фармаком. — 2008. — № 4. — С. 35–38.

7. *Крутошикова А., Угер М.* Природные и синтетические сладкие вещества. — М.: Мир, 1988. — 64 с.

8. *Малий В.В.* Пошук нових вітчизняних рослинних джерел елагової кислоти: Автореф. дис... канд. фарм. наук. Х., 1999. — 18 с.

9. *Масленникова Г.Я., Оганов Р.Г.* Кофе и болезнь Паркинсона // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. — 2006. — № 1. — С. 19–22.

10. *Мушкина О.В., Гурина Н.С.* Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях ольхи черной // Вестник фармации. — 2007. — № 4 (38). — С. 3–10.

11. *Подпорипова Г.К., Жужжалова Т.П., Верзилина Н.Д., Полянский К.К.* Накопление хлорогеновой кислоты в стевии в связи с ее плоидностью // Сахарная свекла. — 2007. — № 6. — С. 36–37.

12. *Степуро М.В., Щербаков В.Г., Лобанов В.Г.* Влияние различных факторов на повышение хлорогеновой и кофейной кислот из семян подсолнечника // Известия вузов. Пищевая технология. — 2006. — № 1. — С. 49–51.

13. *Тутельян В.А., Лашнева Н.В.* Биологически активные вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты: распространенность, пищевые источники, биодоступность // Вопросы питания. — 2008. — т. 77, № 1. — С. 4–19.

14. *Храмов В.А., Дмитренко Н.В.* Хлорогеновая кислота в листьях и лиофилизированных экстрактах стевии // Хим.-фарм. журн. — 2000. — № 11. — С. 34–35.

15. *Храмов В.А., Комарова В.И.* Способ определения хлорогеновой кислоты в растительных объектах // Гигиена и санитария. — 1999. — № 6. — С. 77.

16. *Чхиквишвили И.Д., Харебава Г.И.* Цикориевая и хлорогеновая кислоты в некоторых растениях, произрастающих в Грузии // Прикладная биохимия и микробиология. — 2001. — т. 37, № 2. — С. 214–217.



17. *Abraham S.K.* Anti-genotoxic effects on mice after the interaction between coffee and dietary constituents // *Food. Chem. Toxicol.* — 1996. — V. 34, № 1. — P. 15–20.
18. *Arion W.J., Canfield W.R., Rasnos F.C. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1997. — v. 339, № 2. — P. 315–322.
19. *Baumann T.W., Rohring L.* Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica* // *Phytochemistry.* — 1989. — v. 28. — P. 2667–2669.
20. *Chan W.S., Wen P.C., Chiang H.C.* // *Anticancer Res.* — 1995. — v. 15.—P. 703–707.
21. *Clifford M.N.* Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden // *J. Sci. Food Agric.* — 1999. — v. 79. — P. 362–372.
22. *Clifford M.N.* Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden, absorption and metabolism // *J. Sci. Food and Agric.* [МФІШ]. — 2000. — v. 80, № 7. — P. 1033–1043.
23. *Dupas C, Marsset Baglieri A., Ordonnaud C et al.* // *Mol. Nutr. Res.* — 2006. — v. 50, № 1. — P. 1053–1060.
24. *Fukuoka M.* Chemical and toxicological studies on Bracken Fern (*Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*) VI. Isolation of 5-0-caffeoylshikimic acid as an antihistamine factor // *Chem. Pharmaceut. Bull.* — 1962. — v. 10. — P. 3219–3224.
25. *Goupy P.M., Varoquaux P.J.A., Nicolas J.J., Macheix J.J.* Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from endive (*Cichorium endivia* L. Geante Maraichere / ecaves) // *J. Agric. Food. Chem.* — 1990. — v. 38. — P. 2116–2121.
26. *Kahle K., Kraus M, Richling E.* // *Mol. Food Res.* — 2005. — v. 49, № 8. — P. 797–806.
27. *Kreis W., Kaplan M.H., Freeman J. et al.* // *Antiviral Res.* — 1990. — v. 14, № 1. — P. 323–337.
28. *Kuhnl T., Koch U., Heller W., Wellmann E.* Chlorogenic acid biosynthesis: characterization of a light-induced microsomal 5-0-(4-coumaroyl)-D-quinic/shikimate-3'-hydroxylose from carrot (*Daucus carota* L.) cell suspension cultures // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1987. — V. 258. — P. 226–232.
29. *Leitzmann M.F., Stampfer M.J., Willett W.C. et al.* Coffee intake is associated with lower risk of symptomatic gallstone disease in women // *Gastroenterology.* — 2002. — v. 123, № 6. — P. 1823–1830.
30. *Maier V.P., Metzler D.M., Huber A.F.* 3-0-caffeoylshikimic acid (dactylizic acid) and its isomers, a new class of enzymes browning substrates // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 1964. — v. 14. — P. 124–128.
31. *Manila P., Pihlava J.M., Hellstrom J.* // *J. Agric. Food. Chem.* — 2005. — v. 53, № 21. — P. 8290–8295.



32. *Mateos R., Goya L., Bravo L.* // J. Agric. Food Chem. — 2006. — v. 54, № 23. — P. 8724–8732.

33. *Mathew S., Abraham T.E.* // Crit. Rev. Biotechnol. — 2004. — v. 24, № 23. — P. 59–83.

34. *Moriera D.P., Monteiro M.C., Ribeiro-Alves M. et al.* Contribution of chlorogenic acids to the iron-reducing activity of coffee beverages // J. Agric. Food. Chem. — 2005. — v. 53. — P. 1399–1402.

35. *Nakatani N., Kayano S., Kikuzaki H. et al.* Identification, quantitative determination and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunes domestica L.*) // J. Agric. Food Chem. — 2000. — v. 48. — P. 5512–5516.

36. *Olthof M.R., Hollman P.C., Katan M.B.* // J. Nutr. — 2001. — v. 131. — P. 66–71.

37. *Olthof M.R., Hollman P.C., Zock P.L., Katan M.B.* // Am. J. Clin. Nutr. — 2001. — v. 73, № 3. — P. 532–538.

38. *Parr A.J., Bolwell G.P.* Review: Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile // J. Sci. Food. Agric. — 2000. — v. 80. — P. 985–1012.

39. *Pinent M., Blay M., Blade M.C. et al.* Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines // Endocrinology. — 2004. — v. 145. — P. 4985–4990.

40. *Ravn L., Knudsen A.* // Biochem. Syst. — 1989. — v. 1, № 1. — P. 92–96.

41. *Robinson W.J., Reinecke M.G., Abdel-Malek S. et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1996. — v. 93, № 13. — P. 6326–6331.

42. *Stevenson P.C., Anderson J.C., Blaney M., Simmonds M.S.J.* Developmental inhibition of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae by a novel caffeoylquinine acid from wild ground-nut *Arachis paragnariensis* (Chod. Et Hassl.) // J. Chem. Ecol. — 1993. — v. 19. — P. 2917–2933.

43. *Susin M.F., Souza V., Paulino N., Ribeiro-do-Valle R.M., Ckless K.* Structure-antioxidant activity relationships of phenolic compounds: Abstr. // 9th Bien. Meet. Int. Soc. Free Radic. Res. (San Paulo, 1998). — Rev. farm. e bioquim. Univ. San Paulo. — 1998. — v. 34, Suppl. 1. — P. 202.

44. *Thiel K.D., Helbig B., Klocking R. et al.* // Pharmazie. — 1981. — v. 36, № 1. — P. 50–53.

45. *Un J.J., Mi-Kyung L., Yong B.P. et al.* Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in db/db Mice // J. of Pharmacol. and Exper. Therapeutics. — 2006. — v. 318, № 2. — P. 476–483.

46. *Yuvamoto P.D., Said S.* Germination, duplication cycle and septum formation are altered by caffeine, caffeic acid and cinnamic acid in *Aspergillus nidulans* // Микробиологія. — 2007. — Т. 76, № 6. — С. 830–833.



А.П. Левицький^{1,2}, О.К. Вертикова², І.О. Селіванська¹

¹Інститут стоматології АМН України, вул. Ришельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна, тел.: +38 (048) 728 24 61, e-mail: stomat@paco.net

²Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна

ХЛОРОГЕНОВА КИСЛОТА: БІОХІМІЯ І ФІЗІОЛОГІЯ

Реферат

Хлорогенова кислота ($C_{16}H_{18}O_9$) (ХГК) — це складний ефір кавової (3,4-діоксицинамової) кислоти й одного із стереоізомерів хінної кислоти. Представляє собою білу кристалічну речовину, яка легко розчинна у воді, спирті і практично нерозчинна в неполярних органічних розчинниках. Лужні розчини ХГК на повітрі стають зеленими. ХГК широко розповсюджено у природі і міститься в найбільшій кількості в кавових зернах, насінні соняшника, листях чорниці та білого тополя і корінні цикорію. Біосинтез ХГК відбувається виключно в рослинах із фенілаланіну через стадію утворення шикімової кислоти. ХГК має сильні антиоксидантні, антивірусні, антибактеріальні та антигрибкові властивості, виявляє гіпоглікемічну, гіпохолестеринемічну, протиракову і гепатопротекторну дію.

К л ю ч о в і с л о в а : хлорогенова кислота, кавова кислота, біосинтез, біологічні властивості, отримання, знаходження в природі.

A.P. Levitsky^{1,2}, O.K. Vertikova², I.O. Selivansky¹

¹Institute of Dentistry of the AMS of Ukraine, 11, Rishchevka str., Odesa, 65026, Ukraine, tel.: +38 (048) 728 24 61, e-mail: stomat@paco.net

²Odesa National Academy of Food Technology, 112, Kanatna str., Odesa, 65039, Ukraine

CHLOROGENIC ACID: BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

Summary

Chlorogenic acid ($C_{16}H_{18}O_9$) (CGA) is the ester of caffeic (3,4-dioxycinnamic) acid and one of the stereoisomers of quinic acid. It is the white crystal substance, easy soluble in water, spirit and almost insoluble in nonpolar organic solvents. The alkaline solutions of CGA turn into green colour at the air. CGA is widely spread in Nature and most of all it is contained in coffee beans, seeds of sunflower, leaves of bilberry and white poplar, chicory root. Biosynthesis of CGA occurs only in the plants from phenylalanine through the stage of formation of shikimic acid. CGA possesses strong antioxidant, antiviral, antibacterial and antimycotic characteristics, being of hypoglycemic, hypopolysterynymic, anticancer and hepatoprotective effect.

Key words : chlorogenic acid, caffeic acid, biosynthesis, biological characteristics, obtaining, natural occurrence.



ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

EXPERIMENTAL WORKS

УДК 579.841.11+579.222.4+546.3

O.D. Ianieva, G.F. Smyrnova, V.S. Pidgorsky

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 92 16, e-mail: yandol@ukr.net

**ACCUMULATION AND EFFLUX OF COPPER
AND CADMIUM IONS BY *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* STRAINS**

The ability of Pseudomonas aeruginosa A17, A03 and C25a strains to accumulate and export copper and cadmium ions has been studied. P. aeruginosa strains have been found to bind up to 65% cadmium ions to the cell surface while A03 and C25a cells bound more than 90% copper ions on the cell surface. The inhibitors chloramphenicol and N-N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) inhibited metal accumulation and efflux by P. aeruginosa strains. ATP-driven efflux systems are involved in copper and cadmium resistance mechanisms of the studied P. aeruginosa strains.

Key words: Pseudomonas aeruginosa, accumulation, efflux, heavy metals.

The wide distribution of heavy metals in the environment is the result of many human activities, mostly industrial, although agriculture and municipal wastes also contribute. The search for new technologies of detoxification of these pollutants including biotechnological has direct attention to bacteria-metal interactions. By expanding the knowledge on the defense mechanisms of microorganisms against heavy metals it will be possible in future to develop the new methods of heavy metal bioremediation. Many microorganisms are able to bind heavy metal ions either on the cell surface (the cell wall, the capsule) [3, 6, 15] or inside the cell (sequestration) [8]. A vast number of microbes can export metal ions outside the cell by efflux systems [10].

The purpose of this work was to study accumulation and export of cadmium and copper ions by three multiresistant strains *Pseudomonas aeruginosa* and effect of chloramphenicol and N-N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) inhibitors on these processes.



Materials and methods

Microorganisms and medium. Three strains *P. aeruginosa* A17, A03 і C25a were used in this study. *P. aeruginosa* A17 has been isolated from cow manure, *P. aeruginosa* A03 – from the field soil, *P. aeruginosa* C25a – from the soil at the territory of the machine-building plant [2]. Bacterial cultures were grown in the minimal mineral medium (M) containing the following (g/l): KH_2PO_4 – 0.5, NH_4NO_3 – 0.5, MgSO_4 – 0.1, yeast extract – 0.5, CH_3COONa – 10.

Metal uptake analysis. Copper and cadmium content in the cells was determined by atomic adsorption spectrometry (AAS) using atomic adsorption spectrophotometer Saturn-3 at 324.8 nm and 227.8 nm for copper and cadmium, respectively.

Metal accumulation by bacterial cells was determined as cited in Gelmi et al [7] with some modifications. Bacteria were incubated in the liquid medium M containing 1 g/l Cu^{2+} or 0.5 g/l Cd^{2+} in a rotary shaker (240 rev per min) at 30 °C for 48 h. Cells were centrifuged with 0.9% NaCl solution at 5000 g three times. Then cells were divided into two equal portions. One portion of biomass was dried for 24 h at 80 °C. The rest of biomass was incubated in hypertonic 9% NaCl solution for 12 h to remove metal ions bound to cell wall components. The weight of the dried biomass was measured and after acid digestion metal content was determined by AAS. The amount of metal taken up by the cells was determined on a dry weight basis.

Efflux assay. The efflux assay was performed as described previously [9] with some modifications. To determine export of copper and cadmium ions cells grown for 24 h were harvested by centrifugation (5000 g, 10 min). Cell pellets were washed three times with 0.9% NaCl solution. Cells were added to the medium M containing 1 g/l Cu^{2+} or 0.5 g/l Cd^{2+} and incubated for 1 h at 30 °C. Then cells were divided into two equal portions. One portion was centrifuged and washed three times with 0.9% NaCl solution and dried for 24 h at 80 °C. The other portion of biomass was centrifuged and washed three times with 0.9% NaCl solution and incubated in a metal-free medium for 1 h at 30 °C. Metal content was measured in the dried cells following acid digestion .

Effect of inhibitors. To study the effect of inhibitors on accumulation and efflux of copper and cadmium ions washed cells were pre-incubated for 10–15 min at 30 °C in the liquid medium M containing 100 mg/l chloramphenicol or 200 μM DCCD. The inhibitors were present throughout the assay [9]. The analysis of copper and cadmium content in biomass was conducted as described previously.

Statistical analysis. All the experiments were done as three independent replicates. The values represented are the means plus the standard deviations. Means were compared by the Student t test. A P value of 0.05 was considered significant [1].



Results and discussion

The ability of three multiply metal resistant strains *P. aeruginosa* A17, A03 i C25a to accumulate and export copper and cadmium ions has been assessed (Fig. 1). Following hypertonic solution treatment there was a considerable decrease in copper and cadmium content in bacterial cells. There was 2–3 fold loss of cell-bound cadmium and the resultant metal content was similar for A17, A03 and C25a cells: 25.1, 35.6 and 24.9 mg Cd/g dry cells, respectively. Copper content in A03 and C25a cells decreased 10-fold but there was only 37% loss of cell-bound copper in A17 cells.

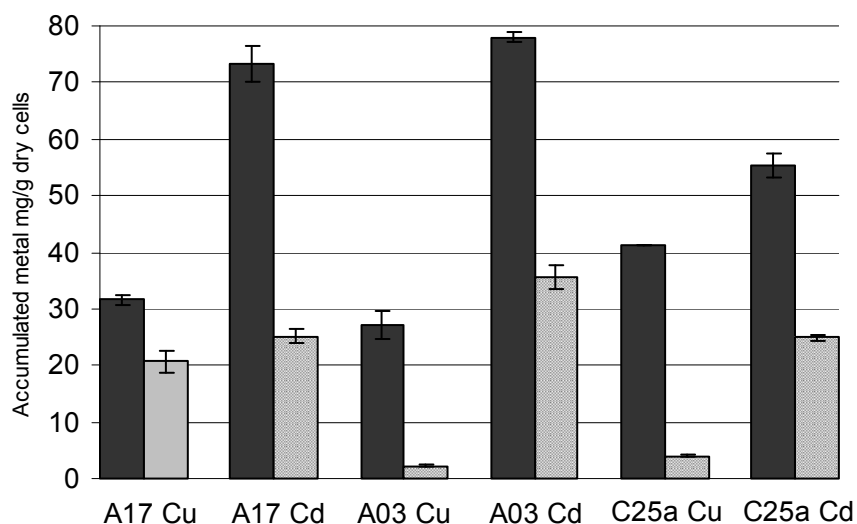


Fig. 1. Accumulation of copper and cadmium by *P. aeruginosa* A17, A03 and C25a. Copper and cadmium content in cells was determined before (black colour) and after (grey colour) hypertonic solution treatment.

As we can conclude, 55–65% cadmium accumulated by A17, A03 and C25a cells was absorbed on the cell surface of the given strains while the percentage of surface-bound copper exceeded 90% of accumulated metal. The ability of strains *P. aeruginosa* A17, A03 and C25a to accumulate copper and cadmium is similar to that reported by other authors [12, 13]. In contrast, some strains *Pseudomonas* are reported to possess both higher [5] and lower metal-binding capacity [4].

The export (efflux) of copper and cadmium ions from A17, A03 and C25a cells has been studied (Fig. 2). After 1 h incubation of A17, A03 and C25a cells in the metal-free medium there was a 80.2, 96.6 and 94% loss of accumulated cadmium, respectively. The efflux of accumulated copper was somewhat slower – 70.3, 47.4 and 38.3%, respectively. Thus it could be concluded that the systems of active transport of metal ions from cells, i.e. the efflux systems, are involved in the resistance mechanisms of A17, A03 and C25a strains against copper and cadmium.



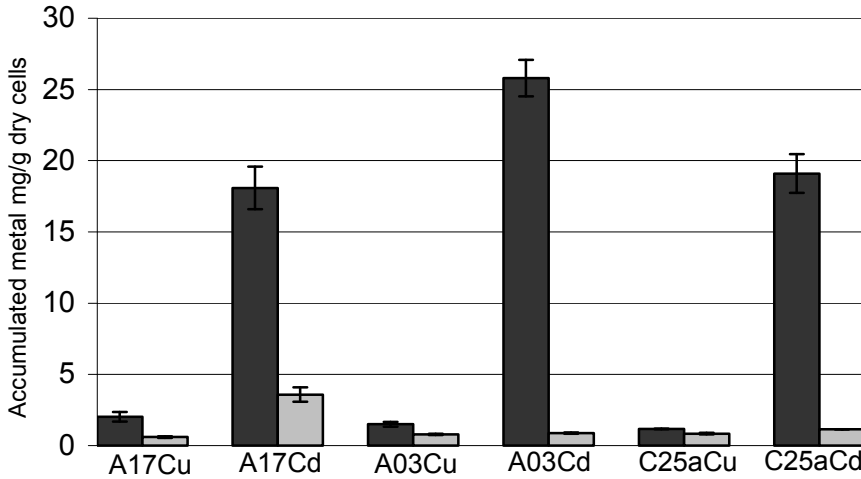


Fig. 2. Copper and cadmium efflux from cells of *P. aeruginosa* A17, A03 and C25a strains

Metal content was determined before (black colour) and after (grey colour) cell incubation in the metal-free medium.

It has been shown that DCCD mostly inhibited both accumulation and efflux of copper and cadmium by A17, A03 and C25a cells, however each strain reacted differently to DCCD treatment. DCCD treatment resulted in 2-fold inhibition of copper accumulation by A17 and C25a strains: in the presence of DCCD A17 and C25a cells accumulated 0.9 and 0.5 mg Cu/g dry cells, respectively (Fig. 3) comparing to 2.0 and 1.2 mg Cu/g dry cells by non-treated cells (Fig. 1).

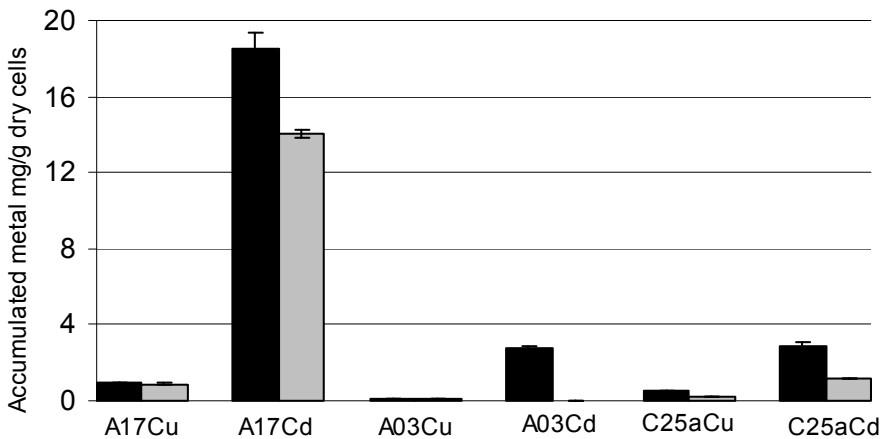


Fig. 3. Effect of DCCD on copper and cadmium efflux by *P. aeruginosa* A17, A03 and C25a strains

Metal content was determined before (black colour) and after (grey colour) cell incubation in the metal-free medium.

DCCD treatment resulted in an almost complete inhibition of copper accumulation by A03 strain. Copper efflux by A17 and A03 cells was completely inhibited. DCCD inhibited cadmium accumulation by A03 and C25a cells. However cells of the strain A17 treated with DCCD retained the same binding capacity as non-treated cells – 18.5 and 18.1 mg Cd/g dry cells, respectively. DCCD also affected cadmium efflux by A17, A03 and C25a cells: cadmium export by A17 and C25a cells comprised 33.9 and 58.9%, respectively, while by non-treated cells – 80.2 and 93.1%, respectively. Cadmium efflux by A03 cells was completely inhibited by DCCD.

Chloramphenicol, similarly fashion to DCCD, inhibited copper accumulation by A17, A03 and C25a cells: the capacity to accumulate copper comprised 23.7, 14.3 and 37.9%, respectively, of that of non-treated cells (Fig. 4). Chloramphenicol also negatively affected copper efflux by A17 and C25a cells.

The chloramphenicol effect on accumulation and efflux of copper and cadmium ions by A17, A03 and C25a cells was less obvious. Chloramphenicol-treated cells of A17 and A03 strains accumulated 36.3 and 57.2% less cadmium, respectively, than the control cells, chloramphenicol had no noticeable effect on copper accumulation by C25a cells. Cadmium efflux by A03 and C25a cells has also been inhibited by chloramphenicol.

The inhibitory effect of DCCD and chloramphenicol on accumulation and efflux of copper and cadmium by strains *P. aeruginosa* A7, A03 and C25a has been shown.

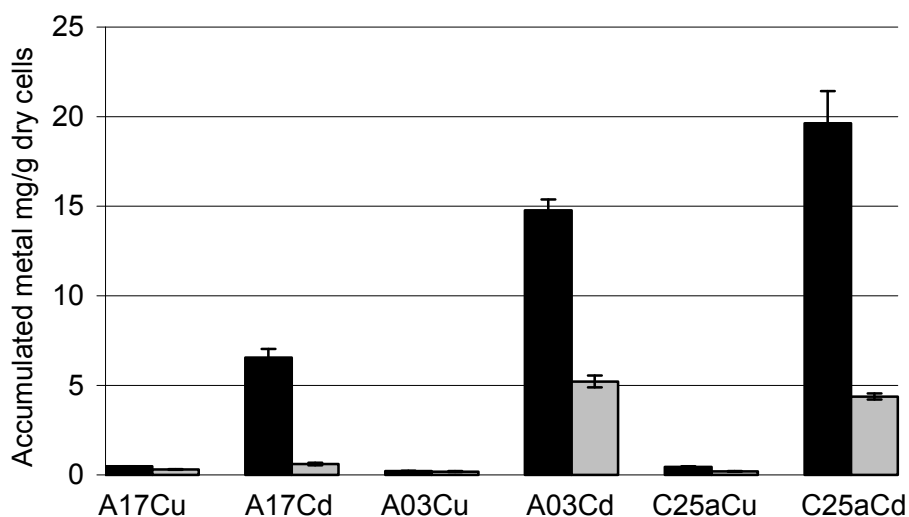


Fig. 4. Effect of chloramphenicol on copper and cadmium efflux by *P. aeruginosa* A17, A03 and C25a strains

Metal content was determined before (black colour) and after (grey colour) cell incubation in the metal-free medium.

As DCCD is a specific inhibitor of ATPase activity in the cell [11] it can be concluded that export of the given metal ions by the studied strains is ATPase-dependent. The involvement of ATPase-driven efflux systems has been shown for a number of bacteria belonging to different taxonomical groups [10, 16] including metal-resistant pseudomonads [9, 14].

However it should be noted that efflux is not the only the system involved in copper and cadmium resistance of strains *P. aeruginosa* A17, A03 and C25a, as the considerable amount of metal and cadmium is absorbed on the cell surface of *P. aeruginosa* strains. The obtained data had led to the conclusion that metal resistance of the studied strains is determined by two different mechanisms – sorption processes on the cell surface and ATP-dependent efflux system.

Conclusions

The ability of three multiresistant *P. aeruginosa* strains to accumulate copper and cadmium ions has been studied. It has been shown that copper and cadmium were mostly bound on the cell surface of the studied strains and were easily removed after hypertonic solution treatment. ATP-driven efflux systems have been involved in copper and cadmium resistance of *P. aeruginosa* strains.

The authors thank Dr A.I. Samchuk (Institute of Geochemistry, Mineralogy and Ore Formation) for assistance with atomic absorption spectrometry.

REFERENCES

- Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая Школа, 1990. — 452 с.
- Янева О.Д., Смирнова Г.Ф., Підгорський В.С. Індукція стійкості до іонів міді і кадмію мультирезистентних штамів роду *Pseudomonas* // Доп. НАН України. — 2007. — № 3. — С. 181–185.
- Bhaskar P.V., Bhosle N.B. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain // Environ. Int. — 2006. — 32, № 2. — P. 191–198.
- Cha J.-S., Cooksey D.A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1991. — 88, № 20. — P. 8915–8919.
- Chang J.S., Law R., Chang C.C. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 // Water Res. — 1997. — 31, № 7. — P. 1651–1658.
- El-Helow E.R., Sabry S.A., Amer R.M. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuriangiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations // BioMetals. — 2000. — 13, № 4. — P. 273–280.



Gelmi M., Apostoli P., Cabibbo E., Porru S., Alessio L., Turano A. Resistance to cadmium salts and metal absorption by different microbial species // *Curr. Microbiol.* — 1994. — V. 28, № 6. — P. 335–341.

Ivanova E.P., Kurilenko V.V., Kurilenko A.V., Gorshkova N.M., Shubin F.N., Nicolau D.V., Chelomin V.P. Tolerance to cadmium of free-living and associated with marine animals and eelgrass marine gamma-proteobacteria // *Curr. Microbiol.* — 2002. — 44, № 4. — P. 357–362.

Mago R., Srivastava S. Uptake of zinc in *Pseudomonas* sp. strain UDG26 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1994. — 60, № 7. — P. 2367–2370.

Nies H.D. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // *FEMS Microbiol. Rev.* — 2003. — 27, № 2–3. — P. 313–339.

Penefsky H.S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphate by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: Relationship to ATP synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1985. — 82, № 6. — P. 1589–1593.

Raja C.E., Anbazhagan K., Selvam G.S. Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — 22, № 6. — P. 577–585.

Savvaidis I., Hughes M., Poole R.K. Copper biosorption by *Pseudomonas cepacia* and other strains // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 2003. — 19, № 2. — P. 117–121.

Saxena D., Joshi N., Srivastava S. Mechanism of copper resistance in a copper mine isolate *Pseudomonas putida* strain S4 // *Curr. Microbiol.* — 2002. — 45, № 6. — P. 410–414.

Taniguchi J., Hemmi H., Tanahashi K., Amano N., Nakayama T., Nishino T. Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. strain HZM-1 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2000. — 54, № 4. — P. 581–588.

Vats N., Lee S.F. Characterization of copper transport operon, copYAZ, from *Streptococcus mutans* // *Microbiology.* — 2001. — 147, № 3. — P. 653–662.



О.Д. Янева, Г.Ф. Смирнова, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 92 16, e-mail: yandol@ukr.net

АКУМУЛЯЦІЯ ТА ЕФЛЮКС ІОНІВ МІДІ ТА КАДМІЮ ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Досліджена здатність штамів *Pseudomonas aeruginosa* до акумуляції та ефлюксу іонів міді та кадмію. Показано, що до 65% іонів кадмію були зв'язані з поверхнею клітин штамів *P. aeruginosa*, більш ніж 90% іонів міді акумулювали на поверхні клітин штами А03 та С25а. Інгібітори хлорамфенікол та N-N-дициклогексилкарбодіімід (ДЦКД) пригнічували акумуляцію та ефлюкс іонів міді та кадмію штамми *P. aeruginosa*. В механізмі стійкості штамів *P. aeruginosa* до іонів міді та кадмію задіяні АТФ-залежні системи ефлюксу.

Ключові слова: *Pseudomonas aeruginosa*, акумуляція, ефлюкс, важкі метали.

О.Д. Янева, Г.Ф. Смирнова, В.С. Подгорский

Інститут микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 92 16, e-mail: yandol@ukr.net

АККУМУЛЯЦИЯ И ЭФФЛЮКС ИОНОВ МЕДИ И КАДМИЯ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Реферат

Изучены аккумуляция и эффлюкс ионов меди и кадмия штаммами *Pseudomonas aeruginosa*. Показано, что до 65% ионов кадмия были связаны с поверхностью клеток штаммов *P. aeruginosa*, и более 90% ионов меди аккумулялировали на поверхности клеток штаммы А03 и С25а. Ингибиторы хлорамфеникол и дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) ингибировали аккумуляцию и эффлюкс меди и кадмия штаммами *P. aeruginosa*. АТФ-зависимые системы эффлюкса принимают участие в механизме устойчивости штаммом *P. aeruginosa* к меди и кадмию.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, аккумуляция, эффлюкс, тяжелые металлы.



УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

Н.В. Ліманська¹, В.О. Іваниця¹, А.Г. Гаврик¹, Ж.Ю. Сергеева¹,
Ф.І. Товкач²

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, e-mail: limanska@gmail.com

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

ВПЛИВ БАКТЕРІОЦИНІВ *RHIZOBIUM VITIS* НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ УТВОРЕННЯ ПУХЛИН У РОСЛИН

Показано, що бактеріоцини 25% досліджених штамів *Rhizobium vitis*, виділених з рослин винограду півдня України, спричиняють *in vitro* лізис бактерій збудників бактеріального раку штаму *Rhizobium radiobacter* C58. Застосування бактеріоцинів трьох досліджених штамів *Rhizobium vitis in vivo* на тест-рослинах каланхое і зелених чубуках винограду значно пригнічує експериментальне утворення пухлин.

Ключові слова: бактеріоцини, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, бактеріальний рак винограду.

Перспективним напрямком захисту рослин, який активно розробляється, є використання бактеріоцинів — речовин, що діють проти бактерій близькоспоріднених штамів [7]. У боротьбі з бактеріальним раком плодів широко відомим є використання агроцину — бактеріоцину, що синтезується штамом *Rhizobium rhizogenes* K84 (*Agrobacterium radiobacter* K84) [10], на основі якого виготовляються біологічні препарати [6]. Даний бактеріоцин, однак, не є дієвим щодо захисту винограду, на якому бактеріальний рак спричиняють *R. vitis* і *R. radiobacter* [4]. Показано, що антагоністичними речовинами, які можуть застосовуватися для захисту винограду, є бактеріоцини, що продукуються штамми *R. radiobacter* HLB-2, *R. vitis* E26 [4, 9]. Оскільки бактеріальний рак спричиняє значні економічні збитки виноградарям України [3], необхідним є пошук продуцентів бактеріоцинів серед місцевих штамів та оцінка можливості їх використання як агентів біологічного захисту рослин. У попередніх дослідженнях нами було вивчено перехресну дію бактеріоцинів штамів збудників бактеріального раку, виділених з рослин винограду півдня України [2]. Метою даної роботи було виявлення штамів-продуцентів бактеріоцинів, активних проти високовірулентного штаму *R. radiobacter* C58.



Матеріали і методи дослідження

Матеріалом дослідження були 20 штамів збудників бактеріального раку, виділених з рослин винограду сорту Каберне Совіньон двох виноградників Одеської області у 2008 та 2010 роках. Ідентифікацію та визначення патогенності штамів здійснювали за допомоги полімеразної ланцюгової реакції [3]. Виявлення бактеріоциногенної активності штамів та отримання бактеріоцинів проводили згідно методу, описаному раніше [2]. Як тест-штам для експериментального утворення пухлин застосовували *R. radiobacter* C58.

Проводили зараження рослин каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill. [1] та зелених чубуків винограду *Vitis vinifera* L. сорту Піно чорний [8]. Зараження здійснювали у трьох повторностях. На листі каланхое робили надрізи завдовжки 2 см, наносили 100 мкл надсадової рідини, яка містила неочищені бактеріоцини, а через 10–15 хвилин проводили зараження суспензією клітин штаму *R. radiobacter* C58 у концентрації $1 \cdot 10^8$ КУО/мл. У контролі замість бактеріоцинів наносили 100 мкл стерильної дистильованої води. Раневі поверхні обгортали вологою ватою та парафільмом на 7 днів, а потім пов'язки знімали. Облік результатів зараження проводили через 30 днів після зараження.

Зелені чубуки винограду стерилізували. Спочатку мили під проточною водою з детергентом, потім витримували 3 хвилини у 1% розчині хлороталонілу (фунгіцид «Браво»), 30 сек у 70° спирті, у стерильній дистильованій воді промивали 3 рази по 3 хвилини. Чубуки поміщали у склянки зі стерильним голодним агаром (0,8%). Зараження проводили так само, як і для рослин каланхое, за виключенням того, що раневими поверхнями слугували проколи стерильною голкою поверхні зрізу міжвузля чубука, а місце зараження не обгортали парафільмом і ватою. Облік результатів проводили через 21 день, оцінюючи розміри пухлин за наступною шкалою: «++++» — добре виражене пухлиноутворення по усій раневій поверхні; «+++» — пухлиноутворення на більшій частині раневої поверхні; «++» — пухлини присутні на половині і менше від площі раневої поверхні; «+» — на раневій поверхні присутні окремі точкові ділянки пухлиноутворення; «—» — відсутність пухлиноутворення.

Результати досліджень та їх обговорення

Із 20 досліджених штамів збудників бактеріального раку бактеріоциногенну активність щодо *R. radiobacter* C58 проявили 5 штамів (табл. 1). Бактеріоцини штамів *R. vitis* 1к, *R. vitis* 5к, *R. vitis* 7к, *R. vitis* 11к і *R. vitis* 29д лізували клітини *R. radiobacter* C58. Діаметр зон лізису складав від 0,6 до 1,9 см.

Отримані результати вказують на те, що антагоністичні речовини штамів збудників бактеріального раку, виділених з одного регіону, мають різний спектр дії і відрізняються за здатністю до лізису клітин певних штамів. На відміну від виду *R. vitis* з вузьким колом рослин-господарів



[4], штами виду *R. radiobacter* уражують велику кількість дводольних рослин [1]. Так, штам *R. radiobacter* C58 було первинно виділено з вишні [5]. Саме тому отримані нами дані є перспективними для розробки біопрепаратів не тільки для захисту винограду [2], а й для боротьби зі збудниками бактеріального раку на інших рослинах.

Таблиця 1

Чутливість штаму *R. radiobacter* C58 до бактеріоцинів із збудників бактеріального раку

Table 1

Sensitivity of *R. radiobacter* C58 strain to bacteriocins of crown gall agent strains

Штам-продуцент	Наявність зон лізису	Штам-продуцент	Наявність зон лізису
<i>R. vitis</i> 1к	+*	<i>R. vitis</i> 1д	—
<i>R. vitis</i> 5к	+	<i>R. vitis</i> 2д	—
<i>R. vitis</i> 6к	—**	<i>R. vitis</i> 3д	—
<i>R. vitis</i> 7к	+	<i>R. vitis</i> 4д	—
<i>R. vitis</i> 8к	—	<i>R. vitis</i> 5д	—
<i>R. vitis</i> 9к	—	<i>R. vitis</i> 29д	+
<i>R. vitis</i> 11к	+	<i>R. vitis</i> 31д	—
<i>R. vitis</i> 13к	—	<i>R. vitis</i> 33д	—
<i>R. vitis</i> 14к	—	<i>R. vitis</i> 48д	—
<i>R. vitis</i> 15к	—	<i>R. vitis</i> 49д	—

Примітка: * — наявність лізису клітин *R. radiobacter* C58, ** — відсутність зони лізису.

Для зараження тест-рослин були обрані штами, бактеріоцини яких давали найбільші діаметри зон лізису, а саме — штами *R. vitis* 5к, *R. vitis* 7к, *R. vitis* 11к і *R. vitis* 29д. Результати зараження рослин каланхое представлені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив бактеріоцинів на утворення пухлин *R. radiobacter* C58 на каланхое

Table 2

Bacteriocin effect on tumour formation by *R. radiobacter* C58 on kalanchoe

Штам-продуцент бактеріоцину	Пухлиноутворення (у трьох повторностях)		
Контроль*	++++	++++	++++
<i>R. vitis</i> 5к	++++	++++	++++
<i>R. vitis</i> 7к	+	—	+
<i>R. vitis</i> 11к	—	±	—
<i>R. vitis</i> 29д	+	+	—

* — замість бактеріоцинів вносили стерильну дистильовану воду



Як видно з наведених даних, бактеріоцини штаму *R. vitis* 5к, дієві *in vitro* проти клітин *R. radiobacter* C58, були нездатними до пригнічення експериментального утворення пухлин на раневих поверхнях рослин каланхое. Бактеріоцини решти продуцентів значно пригнічували процес утворення пухлин, особливо бактеріоцини штаму *R. vitis* 11к, після обробки якими лише у одному повторі спостерігалася одинична горбкуватість, що могла бути наслідком розростання калусу. В інших повторах ранева поверхня залишалась без змін (рис.).

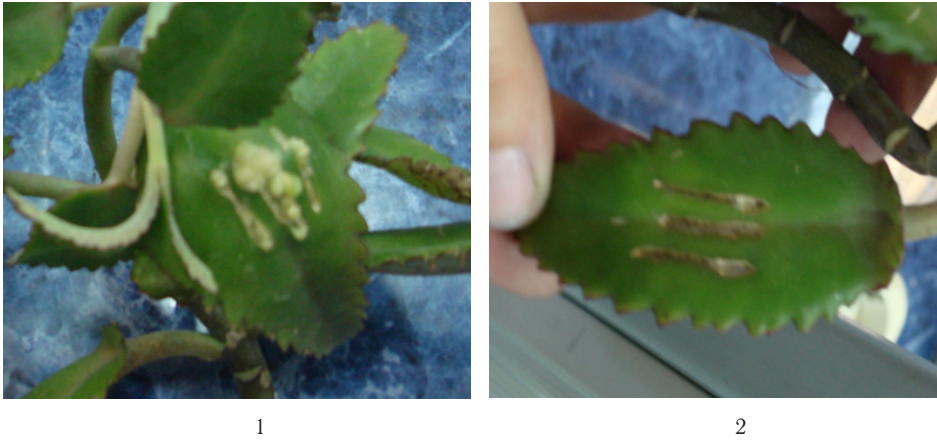


Рис. Зовнішній вигляд місць інфікування каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill. бактеріями штаму *R. radiobacter* C58:

1 – без застосування бактеріоцинів;
2 – з попередньою обробкою бактеріоцинами штаму *R. vitis* 11к.

Fig. Surfaces of *Kalanchoe daigremontiana* Mill. inoculated with *R. radiobacter* C58 bacteria:

1 – without bacteriocin treatment; 2 – precede treatment with *R. vitis* 11к strain bacteriocins.

У подальших дослідженнях бактеріоцини штамів *R. vitis* 7к, *R. vitis* 11к і *R. vitis* 29д були використані для обробки зелених чубуків винограду (табл. 3).

Таблиця 3
Вплив бактеріоцинів на утворення пухлин на зелених чубуках винограду

Table 3
Bacteriocin effect on tumour formation on grapevine green cuttings

Штам-продуцент бактеріоцину	Пухлиноутворення (у трьох повторностях)		
контроль*	++	++	+
<i>R. vitis</i> 7к	—	—	—
<i>R. vitis</i> 11к	—	—	—
<i>R. vitis</i> 29д	—	—	—

* – замість бактеріоцинів вносили стерильну дистильовану воду

При зараженні зелених чубуків винограду пухлиноутворення загалом проявляється не так виразно, як при застосуванні цілої рослини, але дозволяє отримати швидкий результат і тому широко застосовується при тестуванні штамів-антагоністів [8]. Результати наших досліджень показали повну відсутність пухлиноутворення на зелених чубуках винограду під впливом бактеріоцинів досліджених штамів.

Отримані дані свідчать про перспективність використання досліджених штамів-продуцентів бактеріоцинів при створенні біологічних препаратів для захисту рослин від бактеріального раку. Крім того, актуальним постає подальший пошук продуцентів з подібними антагоністичними властивостями серед штамів *R. vitis*, виділених на півдні України.

Робота виконувалась у рамках проекту Міністерства освіти і науки України № НУ/448-2009 від 06.07.2009.

ЛІТЕРАТУРА

1. Байдербек Р. Опухоли растений: Пер. с нем. — М.: Колос, 1981. — С. 114.
2. Лиманская Н.В., Иваница В.А., Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Бактериоциногенная активность штаммов *Rhizobium vitis* и *Pantoeae agglomerans*, выделенных из растений винограда // Микробиол. і біотехн. — 2009. — Т. 8, № 4. — С. 26—32.
3. Мілкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько І.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя // Микробиол. журн. — 2005. — Т. 67, № 1. — С. 41—48.
4. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53—80.
5. Goodner B., Hinkle G., Gattung S., Miller N. et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58 // Science. — 2001. — Vol. 294. — P. 2323—2327.
6. Kerr A. Biological control of crown gall through production of Agrocine 84 // Plant Dis. — 1980. — Vol. 64. — P. 25 — 30.
7. Lavermicocca P., Lonigro S.L., Valerio F., Evidente A., Visconti A. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* // Appl. Environm. Microbiol. — 2002. — Vol. 68, № 3. — P. 1403—1407.
8. Pu X. — A., Goodman R.N. Tumour formation by *Agrobacterium tumefaciens* is suppressed by *Agrobacterium radiobacter* HLB-2 on grapevine plants // Am. J. Enol. Vitic. — 1993. — Vol. 44, № 3. — P. 249—254.
9. Wang H.M., Wang H.X., Ng T.B., Li J.Y. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis*



strain E26 with activity against *A. tumefaciens* // Plant Pathol. — 2003. — Vol. 52. — P. 134–139.

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



Н.В. Лиманская¹, В.А. Иваница¹, А.Г. Гаврик¹, Ж.Ю. Сергеева¹,
Ф.И. Товкач²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса 65082, Украина; e-mail: limanska@gmail.com

²Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОЦИНОВ *RHIZOBIUM VITIS* НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ У РАСТЕНИЙ

Реферат

Показано, что бактериоцины 25% исследованных штаммов *Rhizobium vitis*, выделенных из растений винограда юга Украины, вызывают *in vitro* лизис бактерий возбудителей бактериального рака штамма *Rhizobium radiobacter* C58. Применение бактериоцинов трех исследованных штаммов *Rhizobium vitis* *in vivo* на тест-растениях каланхое и зеленых черенках винограда значительно угнетает образование опухолей в эксперименте.

Ключевые слова: бактериоцины, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, бактериальный рак винограда.

N.V. Limanska¹, V.O. Ivanytsia¹, A.G. Gavryk¹, Zh.Yu. Sergeeva¹,
F.I. Tovkach²

¹Odesa National I.I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, e-mail: limanska@gmail.com

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Academic Zabolotny str., Kyiv, D03680, Ukraine

EFFECT OF *RHIZOBIUM VITIS* BACTERIOCINS ON EXPERIMENTAL TUMOUR FORMATION IN PLANTS

Summary

Bacteriocins of 25% of investigated *Rhizobium vitis* strains isolated from grapevines in southern Ukraine caused *in vitro* lysis of crown gall agents of *Rhizobium radiobacter* C58 strain. Treatment with bacteriocins from three *R. vitis* strains *in vivo* on test-plants kalanchoe and grapevine green cuttings lead to significant decrease in tumour formation.

Key words: bacteriocins, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, crown gall of grapevine.



УДК 632.38:634.13

**K.M. Udovychenko, N.V. Tryapitsyna, V.M. Udovychenko,
V.P. Polischuk**

Institute of Horticulture UAAS,
6, Sadova str., Novosilky, Kyiv, 03027, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 65 97, e-mail: k_udovychenko@rambler.ru

SPREAD OF VIRUSES IN PEAR ORCHARDS IN SOME REGIONS OF UKRAINE

The diagnostics of pear viruses was carried out in three regions of Ukraine. The infection rates of Apple chlorotic leaf spot virus, Apple stem pitting virus, Apple stem grooving virus and Apple mosaic virus in pear orchards were determined by means of ELISA. The tests revealed that the general infection level of these four viruses in pear orchards is 18.1%. Initial virus free clones of pear cultivars and rootstocks were selected.

Key words: pear viruses, virus free planting material, ELISA.

The economical importance and distribution of pear orchards in the structure of all fruit and berry plantings in Ukraine takes the second place after apple. The reason of this is not only the less popularity of a pear comparing to an apple but, first of all, fastidiousness of a pear to planting conditions that significantly reduces its area. In present time Ukraine takes the last but one place in production of pear fruits and leaves behind only Poland [1]. Among factors that cause decrease of pear areal in Ukraine are negative impact of environment, presence of pests and significant spread of causative agents of fungal, bacterial and viral diseases. These factors decline productivity of pear orchards and its profitability and as a consequence make no expediency to create new gardens.

According to European scheme of certification, which estimates quality of planting material of pome cultures regarding to international normative documents of European Plant Protection Organization, among the viral agents that cause viral diseases of fruit cultures the most harmful for pear and quince are three viruses of *Flexiviridae* family: *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem grooving virus* (ASGV) and *Apple stem pitting virus* (ASPV) [3, 5]. These viruses are rather widespread in *Rosaceae* family especially in apple, pear and quince orchards and have rather wide geographical distribution [6, 7]. The average rate of three viruses of pear plantings in Russia is 20% [2]. It is hard to detect infection in time because ACLSV, ASGV and ASPV belong to the group of latent viruses and most



of commercial varieties and rootstocks don't have any visual symptoms. *Apple mosaic virus* (ApMV) is another one virus frequently infecting pear trees.

In this context immunodiagnosics of varieties and rootstocks become very important. It gives the possibility to conduct not only monitoring of viruses but also to select virus free samples and to create the base of virus free mother plants of economically-valuable pear varieties and rootstocks.

During the last years on the base of Department of Virology and Propagation of Fruit and Berry Cultures of Institute of Horticulture the inspections of pear orchards are regularly conducted in different regions of Ukraine. These surveys enable to reveal in time trees infected with the complex of latent viruses and to use in further gardening only virus free material.

Materials and methods

For detection of viral diseases by ELISA we have collected the samples in productive, collection and nursery orchards of pear in 2006–2008 years in the period of intensive growth during May–July, when concentration of virus in plant tissue is the highest [4]. Altogether 224 samples of perspective cultivars included 47 pear varieties were tested. Also 271 samples of pear rootstocks included 20 traditional and new breeding forms of clone rootstock types were investigated. Surveys were conducted in gardens of Institute of Horticulture UAAS, Crimean Research Station of UAAS and Podil Research Station of UAAS. Immunodiagnosics was carried out by classic ELISA and DAS-ELISA. Certified antibodies for ACLSV, ASGV, ASPV and ApMV produced by Loewe Phytodiagnostica, Germany and Bioreba AG, Switzerland, were used for the investigation purposes. The results of the analysis were registered by microplate spectrophotometer STAT FAX 2100, USA.

Percent of samples infected with virus i in the orchards of certain type k was calculated according to the equation:

$$F_{ik} = \frac{N_{ik}}{N_k} 100 \%, \quad (1)$$

where N_k – number of tested samples, N_{ik} - number of samples infected with virus i in the orchards of type k .

The general infection level of virus i in all types of pear orchards (F_{igen}) was calculated according to the equation:

$$F_{igen} = \frac{\sum_1^k N_{ik} \cdot 100\%}{\sum_1^k N_k} \quad (2)$$



Results and discussion

The results of the test revealed high rate of pear viruses spread in different types of the orchards in all the regions where surveys were conducted. The most prevailing was *Apple stem pitting virus* which causes incompatibility of rootstock and scion and leads to low quality of planting material. So among the tested samples of pear varieties rate of ASPV infection was 26%, when infection levels of other three viruses were significantly lower: ACLSV – 8.9%, ASGV – 2.7%, ApMV – 5.8% (Fig. 1).

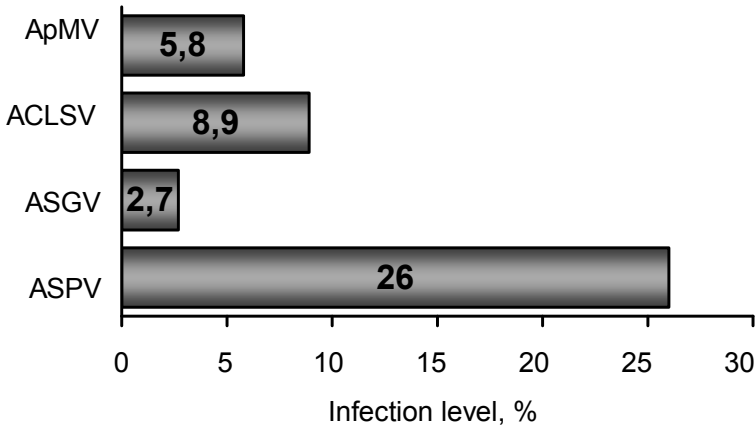


Fig. 1. The level of pear varieties (%) infected with viruses

New varieties of pear intensively propagated in Ukraine were rather frequently infected with the complex of viruses. In these cases the uninspected collection of plantings become the primary source of infection. No samples free from virus infection were found in *Zolota Osin'*, *Jack Tel'ye* and *Dicolor* varieties. The high rates of infected samples had varieties *Vyzhnitsya* and *Stryis'ka* – 62.5 and 42.1% respectively. The test results gave the possibility to choose the virus free samples of 44 pear varieties, from which all the samples of 21 varieties were not infected by any of viruses. Perhaps, we have obtained such results because not long ago the seedlings were used to cultivate on initially virus free seed rootstocks.

During recent years horticulture in Ukraine has started active use of clone rootstocks which are vegetative propagated and can be a permanent source of viruses if phytosanitary control is not conducted. That's why we should pay not the less attention to testing of pear rootstocks. The diagnostics revealed general lower infection level – 10.0% comparing to 29.5% of variety material. Difference was observed also in infection levels of certain viruses. While cultivars were mainly infected with ASPV, rootstocks were frequently infected with ACLSV – 6.3%. Infection rate of ASGV, ASPV and ApMV was – 1.1%, 3.5% 1.5% respectively (Fig. 2).

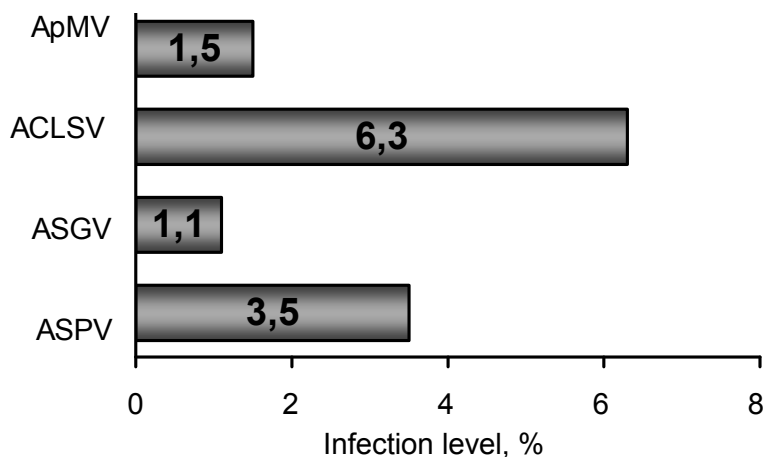


Fig. 2. The level of pear rootstocks (%) infected with viruses

As well as varieties, rootstocks were infected with the complex of two or three viruses. The general lower level of infection can be explained by a short period of use of these rootstock types in Ukraine and planting of their nurseries with tested certified material. In the whole, the virus free clones were selected for all 20 analyzed rootstock types.

Thus we can state the presence of virus infection in all the tested orchards of pear. Viruses ACLSV, ASGV, ASPV and ApMV were detected both in cultivars and rootstocks and composed rather high infection level 18.8% (Fig. 3).

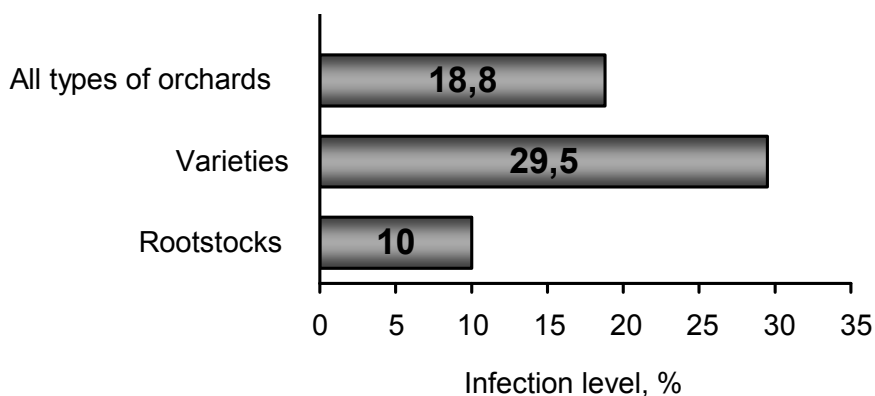


Fig. 3. General phytovirology condition of pear orchards

The results of the tests allowed selecting of 64 virus free cultivars and rootstock types which will be biologically tested on woody indicators and complete fond of virus free pear clones. The tested clones revealed the presence of infection gave us the possibility to continue the investigation of Ukrainian strains of pear viruses. So our further researches will be directed on molecular-biological and phylogenetic analysis of these viruses.

REFERENCES

1. Матвієнко М.В., Бабіна Р.Д., Кондратенко П.В. Груша в Україні. — К.: Аграрна думка, 2006. — С. 49–60.
2. Упадышев М.Т. Вирусные болезни и способы оздоровления посадочного материала груши и нетрадиционных садовых культур // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур (Материалы международной научно-практической конференции 20–22 ноября 2001 г., г. Москва). — 2001. — С. 86–88.
3. Adams M., Antoniw J., Bar-Joseph M. et al. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation // Arch. Virol. — 2004. — V. 149. — P. 1045–1060.
4. Kundu J.K., Svoboda J., Polar J. Detection of Apple stem grooving virus in different tissues through the year // Plant Protect. Sci. — 2003. — V. 39. — P. 93–96.
5. EPPO certification schemes for pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. — EPPO, 2001. — 15 p.
6. Rana T., Chandel V., Hallan V., Zaidi A. *Cydonia oblonga* as reservoir of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus in India // Plant Pathology. — 2008. — V. 156. — P. 382–384.
7. Wood G.A. Viruses and phytoplasma in European pear trees in New Zealand and the role of these pathogens in the compatibility of pear with quince rootstocks // New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. — 1997. — V. 25. — P. 333–340.



К.М. Удовиченко, Н.В. Тряпичина, В.М. Удовиченко, В.П. Поліщук

Інститут садівництва УААН, вул. Садова, 6, Новосілки, Київ, 03027, Україна,
тел.: +38 (044) 526 65 97, e-mail: k_udovychenko@rambler.ru

ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ У НАСАДЖЕННЯХ ГРУШІ ДЕЯКИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ

Реферат

Проведено діагностику вірусів груші у трьох регіонах України. Методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) визначено рівні інфікованості насаджень груші вірусами хлоротичної плямистості листя яблуні, борознистості листя яблуні, ямкуватості деревини яблуні та вірусу мозаїки яблуні. Тестування показало, що загальний рівень інфікування цими чотирма вірусами становить 18,8%. Виділено вихідні безвірусні клони сортів та підщеп груші.

К л ю ч о в і с л о в а : віруси груші, безвірусний садивний матеріал, ELISA.

Е.Н. Удовиченко, Н.В. Тряпичина, В.М. Удовиченко, В.П. Полищук

Інститут садоводства УААН, ул. Садовая, 6, Новоселки, Киев, 03027, Украина,
тел.: +38 (044) 526 65 97, e-mail: k_udovychenko@rambler.ru

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСОВ В НАСАЖДЕНИЯХ ГРУШИ НЕКОТОРЫХ РЕГИОНОВ УКРАИНЫ

Реферат

Проведена диагностика вирусом груши в трех регионах Украины. Методом ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) определены уровни инфицированности насаждений груши вирусами хлоротической пятнистости листьев яблони, бороздчатости древесины яблони, ямчатости древесины яблони и вируса мозаики яблони. Тестирование показало, что общий уровень инфицирования этими четырьмя вирусами составляет 18,8%. Выделено исходные безвирусные клоны сортов и подвоев груши.

К л ю ч е в ы е с л о в а : вирусы груши, безвирусный посадочный материал, ELISA.



УДК 631.847.21:812.12

Н.В. Чуйко, З.Т. Бега, Л.В. Булавенко, І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
вул. Заболотного 154, Київ, МСП, Д03680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 90 11, e-mail: nelvit@ukr.net

ВПЛИВ БАКТЕРІАЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ КОМПЛЕКСНОЇ ДІЇ НА РІСТ ДЕКОРАТИВНИХ РОСЛИН

*Показано позитивний вплив бактеріального препарату комплексної дії на основі азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 на ріст декоративних рослин. Ефективним є застосування як рідкої, так і гранульованої чи суспендованої із гранул форм препарату. За умови внесення препарату в ґрунті прикореневої зони ялини голубої відмічено збільшення чисельності діазоторофних, гетеротрофних бактерій та грибів.*

*Ключові слова: бактеріальний препарат, декоративні, хвойні рослини, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*.*

Декоративне рослинництво займає окрему позицію на ринку аграрного сектору України та інших країн світу, оскільки виконує функцію естетизації інтер'єрів, екстер'єрів та штучних ландшафтних формувань. Для стимуляції розвитку декоративних рослин потрібно застосування водночас безпечних для здоров'я людей, екологічно коректних та ефективних заходів. Саме таким є використання бактеріальних препаратів. В сучасній сільськогосподарській практиці розроблені біодобрива різних препаративних форм [2, 5, 9]. Ефективність застосування того чи іншого препарату залежить як від властивостей його компонентів, так і від виду рослин та конкретних умов навколишнього середовища, в яких він буде діяти [1, 6–8].

Метою наших досліджень було визначення впливу на ріст і розвиток деяких видів декоративних рослин бактеріального препарату комплексної дії на основі азотфіксувальних та фосфатмобілізувальних бактерій.

Матеріали і методи

Бактеріальний препарат комплексної дії створений на основі композиції високоактивних азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 [10] та фосфатмобілізувальних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ



В-7023 [11], які виділені у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Його застосовували у рідкій, гранульованій та суспендованій із гранул формах. Чисельність життєздатних клітин у гранульованих препаратах, які використовували у дослідах, становила для *A. vinelandii* $(1,70/8,75 \pm 0,20/0,40) \cdot 10^8$ кл/г, для *B. subtilis* ІМВ В-7023 – $(1,20/24,00 \pm 0,10/2,00) \cdot 10^8$ кл/г. Кількість життєздатних бактерій у рідкому бактеріальному препараті була для *A. vinelandii* $(1,23 \pm 0,18) \cdot 10^9$ кл/мл, для *B. subtilis* – $(1,73 \pm 0,10) \cdot 10^9$ кл/мл.

Гранульований бактеріальний препарат комплексної дії вносили в кореневу зону хлорофітуму (*Chlorophytum comosum*), ірезине (*Iresine herbstii*), товстянки (*Crassula arborescens*), самшиту (*Buxus L.*), туї (*Thuja occidentalis*), ялини звичайної (*Picea abies*), ялини звичайної з подушковидною кроною, ялівцю козацького (*Juniperus sabina*) на відстані 1 см від стебла на глибину 1–2 см по 1 чи 2 гранули під кожну рослину (маса гранули – 0,25 г). Для обробки ялини голубої (*Picea pungens*) гранульований препарат суспендували у водогінній воді у масовому співвідношенні 1:5, 1:10, 1:20. Отриману суспензію вносили по 1 мл на глибину 1,5–2,0 см в кореневу зону рослин. Проби для аналізу мікробного складу ґрунту кореневої зони відбирали на глибині 3 см та відстані 2–3 см від стебла рослин. Чисельність мікроорганізмів визначали за допомогою висіву із серійних десятикратних розведень на середовище Ешбі з сахарозою для діазотрофних, пептоноглюкозодріжджовий агар для гетеротрофних бактерій, середовище Чапека для грибів.

Рідкий бактеріальний препарат на основі монокультури азотобактера та рідкий препарат комплексної дії розводили водогінною водою у 10 і 50 раз та вносили на глибину 1–2 см в ґрунт на відстані 1 см від стебла хлорофітуму (*Chlorophytum comosum*) і драцени (*Dracena marginata*).

Контролем слугували рослини, в кореневу зону яких препарати не вносили. Через певні проміжки часу проводили замір показників росту, розвитку та продуктивності рослин. Статистичну обробку результатів досліджень проводили із використанням методу варіаційної статистики [4]. При цьому довірча імовірність всіх показників складала 95%.

Результати та їх обговорення

Раніше нами було показано, що обробка бактеріальним препаратом комплексної дії квіткових рослин, зокрема троянд сортів Іліус та Гран-прі, бегоній сортів Індіана рожева та Індіана червона, покращувала морфометричні показники їх росту та квітконосність [3]. В даній роботі позитивний ефект спостерігали за дослідження впливу бактеріальних препаратів на розвиток ряду декоративних рослин. Так, обробка хлорофітуму рідким препаратом комплексної дії у розведенні 1:10 призводила до збільшення кількості молодих пагонів на 10% та довжини листової пластинки на 17% (табл. 1).



Таблиця 1

Вплив рідкого бактеріального препарату комплексної дії на ріст хлорофітуму

Table 1

Influence of liquid bacterial preparation of complex action on *Chlorophytum comosum* growth

Варіант препарату	Кількість пагонів, штук	Кількість листя на одному пагоні, штук	Довжина листової пластинки, см	Ширина листової пластинки, см
Контроль (без препарату)	2,0±0,2	7,0±0,1	9,21±0,43	1,01±0,07
Препарат у розведенні 1:10	2,2±0,1	7,4±0,5	9,19±0,37	1,18±0,05
Препарат у розведенні 1:50	2,1±0,1	7,3±0,3	9,16±0,34	1,11±0,06

Примітка: результати враховували через 1,5 місяці після обробки препаратом.

Під впливом гранульованого препарату довжина листової пластинки хлорофітуму збільшувалась на 8%, а її ширина — на 10% (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив гранульованих бактеріальних препаратів на ріст хлорофітуму

Table 2

Influence of granulated bacterial preparations on *Chlorophytum comosum* growth

Варіант препарату	Кількість пагонів, штук	Довжина листової пластинки, см	Ширина листової пластинки, см
Контроль (без препарату)	1,5±0,2	12,13±0,45	1,27±0,08
<i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076	1,8±0,2	12,28±0,34	1,34±0,08
<i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076 + <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	1,5±0,1	13,13±0,26	1,40±0,17

Примітка: результати враховували через 1,5 місяці після обробки препаратами.

На розвиток драцени помітно впливав рідкий бактеріальний препарат у розведенні 1:50 (табл. 3). Зокрема, на 7% зростала кількість листя на одній рослині та на 17% збільшувалась довжина листової пластинки. Гранульовані бактеріальні препарати також стимулювали ріст ірезине.

Таблиця 3
Вплив рідкого бактеріального препарату комплексної дії на ріст драцениTable 3
Influence of liquid bacterial preparation of complex action on *Dracena marginata* growth

Варіант препарату	Кількість листків на одній рослині, штук	Довжина листової пластинки, см
Контроль (без препарату)	10,7±0,9	43,54±2,46
Препарат у розведенні 1:10	10,4±0,6	47,31±2,41
Препарат у розведенні 1:50	11,5±0,4	50,97±1,14

Примітка: результати враховували через 1,5 місяці після обробки препаратами.

Так, під впливом препарату азотобактера рослини були вищими на 9%, а розмір їх листків збільшувався до 19% за умов внесення як монопрепарату азотобактера, так і їх суміші з бацилами (табл. 4)

Таблиця 4
Вплив гранульованих бактеріальних препаратів на ріст ірезинеTable 4
Influence of granulated bacterial preparations on *Iresine herbstii* growth

Варіант препарату	Висота рослин, см	Довжина листової пластинки, см	Ширина листової пластинки, см
Контроль (без препарату)	9,50±1,08	2,75±0,93	1,89±0,63
<i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076	10,34±1,72	3,09±0,71	2,23±0,71
<i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076 + <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	8,96±1,6	3,08±0,67	2,25±0,46

Примітка: результати враховували через 1,5 місяці після обробки препаратами.

Гранульований бактеріальний препарат комплексної дії помітно стимулював ріст і розвиток рослин товстянки, які розвивались із одного листка. В цьому випадку спостерігали прискорення появи молодих пагонів, а також збільшення висоти рослин до 37% (табл. 5). Гранульований препарат на основі монокультури азотобактера в меншому ступені стимулював ріст рослин цього виду.



Таблиця 5

Вплив гранульованих бактеріальних препаратів на ріст товстянки

Table 5

Influence of granulated bacterial preparations on *Crassula arborescens* growth

Варіант препарату	Кількість рослин, із яких почали проростати молоді пагони, через 1,5 місяці після обробки, штук	Висота рослин через 5,5 місяців після обробки, см
Контроль (без препарату)	5 із 20	8,93±0,79
<i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076	8 із 20	11,50±1,03
<i>Azotobacter vinelandii</i> IMB B-7076 + <i>Bacillus subtilis</i> IMB B-7023	16 із 20	12,21±0,96

Визначено, що за умов внесення гранульованого препарату в кореневу зону саджанці хвойних рослин були вищими порівняно з необробленими варіантами, причому з часом вегетації позитивний ефект збільшувався (табл. 6). Найкращу дію препарату спостерігали на туї (висота оброблених препаратом рослин через 4,5 місяці вегетації була на 17% більше), ялині звичайній (на 15%) та ялівцю (на 22%).

Таблиця 6

Вплив гранульованого бактеріального препарату комплексної дії на ріст деяких хвойних та декоративних рослин

Table 6

Influence of granulated bacterial preparation of complex action on some coniferous and decorative plants growth

Рослина	Висота рослин (см) через			
	2,5 місяці вегетації		4,5 місяці вегетації	
	контрольні	оброблені	контрольні	оброблені
Самшит	37,56±0,76	38,94±0,90	39,92±1,24	41,88±0,89
Туя	12,31±0,27	13,27±0,23	12,46±0,27	14,61±0,32
Ялина звичайна	24,44±0,91	27,75±0,60	27,83±0,95	32,05±0,79
Ялина звичайна з подушко-видною кроною	19,11±40,36	19,6±0,41	19,85±0,38	19,60±0,35
Ялівець козацький	25,22±0,83	26,32±0,98	32,42±1,36	39,50±1,41

Примітка: препарати вносили в кореневу зону однорічних саджанців рослин.



Показано, що під впливом суспензії гранульованого препарату комплексної дії висота рослин ялини голубої зростала у порівнянні з контролем на 14% (табл. 7), а приріст їх пагонів збільшувався на 60% (при розведенні 1:5). Інтродукція в кореневу зону ялин суспендованого із гранул препарату супроводжувалася змінами чисельності в ній мікроорганізмів досліджених еколого-трофічних груп. Зокрема, при застосуванні розведеного 1:20 препарату кількість діазотрофних бактерій збільшувалась на 59%, гетеротрофних мікроорганізмів — на 91%, грибів — на 21% (табл. 7).

Таким чином, застосування бактеріального препарату комплексної дії на основі азотфіксувальних бактерій *A. vinelandii* ІМВ В-7076 та фосфатомобілізувальних бактерій *B. subtilis* ІМВ В-7023 у рідкій, гранульованій та суспендованій із гранул формах дозволило істотно підвищити розвиток декоративних, в тому числі хвойних рослин (хлорофітуму, драцени, ірезене, товстянки, самшиту, туї, ялин, ялівцю).

Таблиця 7

Вплив суспендованого із гранул бактеріального препарату комплексної дії на ріст та мікробний склад ґрунту прикореневої зони ялини голубої

Table 7

Influence of suspended from the granules of bacterial preparation on growth and microbial composition in soil of complex action *Picea pungens* rhizosphere

Варіант	Висота рослин, см	Приріст пагонів, мм	Чисельність мікроорганізмів (КУО/г абсолютно сухого ґрунту)			
			діазотрофні бактерії	гетеротрофні бактерії	гриби	
Контроль (без препарату)	15,4±0,6	42,4±6,5	(1,09±0,11) · 10 ⁷	(7,84±0,21) · 10 ⁴	(1,24±0,09) · 10 ⁴	
Препарат у розведенні	1:5	17,5±1,2	67,7±6,7	(1,57±0,15) · 10 ⁷	(1,10±0,12) · 10 ⁵	(1,24±0,12) · 10 ⁴
	1:10	15,3±0,9	41,3±5,6	(1,32±0,06) · 10 ⁷	(1,04±0,11) · 10 ⁵	(1,92±0,15) · 10 ⁴
	1:20	15,8±1,3	46,4±5,1	(1,73±0,12) · 10 ⁷	(1,50±0,14) · 10 ⁵	(1,50±0,13) · 10 ⁴

Примітки:

1. Чисельність мікроорганізмів визначали через 1 місяць вегетації рослин після внесення препарату, приріст пагонів вимірювали через 6 місяців.
2. Ґрунт містив пісок, торф і супісчаний ґрунт у співвідношеннях 2:1:1.

В ґрунті прикореневої зони ялини голубої за умови внесення препарату відмічено збільшення чисельності мікроорганізмів деяких еколого-трофічних груп. Ймовірно, що застосовані препарати спричиняють



комплексний стимулюючий вплив на ріст рослин завдяки виділенню внесеними мікроорганізмами біологічно активних речовин. Зокрема, *A. vinelandii* ІМВ В-7076 є активним азотфіксатором [10], *B. subtilis* ІМВ В-7023 — фосфатмобілізатором та активним антагоністом фітопатогенів [11]. Застосування даного бактеріального препарату комплексної дії є ефективним у декоративному рослинництві.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волкогон В.В. Мікробіологія у сучасному аграрному виробництві // Сільськогосподарська мікробіологія. — 2005. — Вип.1–2. — С. 7–29.
2. Курдиш І.К. Гранулированые микробные препараты для растениеводства: наука и практика.— К. КВІЦ, 2001.— 142 с.
3. Курдиш І.К., Чуйко Н.В., Булашенко Л.В., Диренко Д.І. Ефективність інтродукції гранульованих бактеріальних препаратів у агроєкоєсистеми квіткових рослин // Збірник наук. праць Уманського державного аграрного університету. Основи формування продуктивності сільськогосподарських культур за інтенсивних технологій вирощування. — 2008.— С. 186–192.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия.— М.: Высш. шк., 1990.— 352 с.
5. Отурина І.П., Калиберденко Е.В., Пархоменко Т.Ю., Шерстобоев Н.К. Влияние микробов-антагонистов рода *Bacillus* на развитие пшеницы в условиях искусственного инфекционного фона // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадського. Серия «Биология, химия». — 2008. — Т. 21 (60), № 1. — С. 87–97.
6. Персикова Т.В. Эффективность бактериальных препаратов под культуры севооборота // Бюл. ВНИИ удобр. и агропочвовед.— 2001.— № 114.— С. 143–144.
7. Полянская Л.М., Озёрская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Головченко А.В., Звягинцев Д.Г. Численность и структура микробных комплексов корневых систем тепличных роз // Микробиология.— 2003.— 72, № 4.— С. 554–562.
8. Суховицкая Л.А. Выживаемость и ростстимулирующая активность внесённых в почву штаммов *Bacillus megaterium* и *Agrobacterium radiobacter* // Прикл. биохим. и микробиол.— 1998.— 34, № 1.— С. 87–90.
9. Шерстобоева О.В. Азотфіксуючі бактерії *Bacillus polymyxa* як основа препарату від грибних захворювань // Аргоеколог. журн.— 2001.— № 2.— С. 55–58.
10. Курдиш І.К., Бега З.Т. Патент України. №72856. Опубл. 15.08.2006. Бюл. № 8.
11. Курдиш І.К., Рой А.О. Патент України №54923А. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.



Н.В. Чуйко, З.Т. Бега, Л.В. Булавенко, І.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д03680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 90 11, e-mail: nelvit@ukr.net

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА КОМПЛЕКСНОГО ДЕЙСТВИЯ НА РОСТ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ

Реферат

Показано положительное влияние бактериального препарата комплексного действия на основе азотфиксирующих бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 и фосфатмобилизирующих бактерий *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 на рост декоративных растений. Эффективным является применение как жидкой, так и гранулированной либо суспендированной из гранул форм препарата. При внесении препарата в почву прикорневой зоны ели голубой отмечено увеличение численности диазотрофных, гетеротрофных бактерий и грибов.

К л ю ч е в ы е с л о в а : бактериальные препараты, декоративные, хвойные растения, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*.

N.V. Chuiko, Z.T. Bega, L.V. Bulavenko, I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny Str., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 90 11, e-mail: nelvit@ukr.net

INFLUENCE OF BACTERIAL PREPARATION OF COMPLEX ACTION ON DECORATIVE PLANTS GROWTH

Summary

Positive influence of bacterial preparation of complex action on the basis of nitrogen fixing bacteria *Azotobacter vinelandii* IMV B-7076 and phosphate mobilizing bacteria *Bacillus subtilis* IMV B-7023 on decorative plants growth is showed. Application of liquid and granular as well as suspended from the granules preparation forms is appeared to be effective. Quantity of diazotrophic, heterotrophic bacteria and fungi increase in soil of *Picea pungens* rhizosphere while using this preparation.

К e y w o r d s : bacterial preparation, decorative, coniferous plants, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis*.



УДК 582.282.23:576.858.8

**О.І. Балко, О.А. Кіпріанова, О.Г. Коваленко, В.В. Шепелевич,
Л.В. Авдєєва**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ ГСП, ДО 3680, Україна,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: aleks-balko@yandex.ru

АНТИФІТОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ БІОПРЕПАРАТУ ГАУПСИН

*Інсектофунгіцидний біопрепарат гаупсин гальмує на 73–100% інфекційність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на рослинах дурману (*Datura stramonium*) та тютюну (*Nicotiana tabacum*). Високу антивірусну активність виявили як самі штами *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 – діючі агенти препарату, так і термостабільні водорозчинні фракції, отримані з їх культуральної рідини шляхом осадження етанолом. Останні гальмували на 86–96% розвиток інфекції, викликаной ВТМ, проте не були здатні підсилювати рослинний імунітет.*

*К л ю ч о в і с л о в а : інсектофунгіцидний препарат гаупсин, *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, вірус тютюнової мозаїки, антифитовірусна активність.*

Вірусні хвороби рослин відзначаються широким розповсюдженням в агро- та біоценозах та високою шкодочинністю і тому викликають значні економічні збитки в рослинництві [2]. Відомі хімічні речовини, здатні пригнічувати розмноження вірусів, як правило, інгібують і нормальні метаболічні процеси в рослинах [8] і відзначаються значною фітотоксичністю, до того ж ускладнюють проблеми екологічної рівноваги в довкіллі.

Отже, проблема терапії і профілактики рослин від вірусних інфекцій все ще залишається не розв'язаною. Одним із підходів до вирішення цієї проблеми є створення комплексних антивірусних препаратів на основі природних сполук, нешкідливих для людей і теплокровних тварин [9]. Перспективним джерелом подібних біопрепаратів є сапрофітні бактерії роду *Pseudomonas*, зокрема представники виду *P. aureofaciens* (згідно сучасній термінології *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*), що належать до найбільш активних продуцентів антибіотиків серед бактерій роду *Pseudomonas* [7]. Поряд з відомими чинниками (наприклад, антибіотиками феназинового ряду), штами цього виду є продуцентами широкого спектру біологічно активних речовин, ще не досліджених з точки зору їхньої захисної дії проти збудників захворювань рослин.

Біопрепарат гаупсин, створений на основі двох штамів *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* і захищений патентом України [11], має поряд з антифунгальною



і антибактеріальною значну ентомопатогенну активність, що забезпечує його широке використання проти шкідників і збудників захворювань рослин. В той же час його вплив на збудників вірусних захворювань рослин досі не був досліджений.

Метою нашої роботи була оцінка протівірусних властивостей препарату гаупсину, штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306, що входять до його складу, та продуктів їх метаболізму на моделі вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) .

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був біопрепарат гаупсин та його діючі агенти — штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306.

Як тест-об'єкт використовували ВТМ (штам U₁). Суспензію вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) в концентрації 2 мг/мл, очищеного методом диференціального центрифугування [3], зберігали при 4 °С в ампулах у 0,01 М фосфатному буфері рН 7,4 та використовували за необхідності.

З метою отримання інсектофунгіцидного біопрепарату гаупсин штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 вирощували на промисловому органі-мінеральному середовищі з мелясою і кукурудзяним екстрактом [11]. Для дослідження антивірусного ефекту використовували не тільки гаупсин, але й метаболіти, отримані з його окремих штамів, вирощених на напівсинтетичному середовищі Кінг А та синтетичному середовищі Козера [7]. Для отримання культуральної рідини із підвищеним вмістом екзополісахаридів типу леванів в поживне середовище вносили 0,1% сахарози, для одержання альгінатів — таку ж кількість глюкози. Культивування бактерій проводили на качалці при 200 об/хв і 28 °С протягом трьох діб.

Метаболіти вилучали з культуральної рідини, звільненої від бактеріальних клітин шляхом центрифугування при 12000 об/хв протягом 20 хв. Супернатант змішували із подвійним об'ємом етанолу і центрифугували при 5000 об/хв протягом 8 хв. Осад розчиняли в дистильованій воді, після чого ліофілізували. Для випробування антивірусної активності одержані препарати розчиняли у стерильній дистильованій воді .

Здатність препарату гаупсин, штамів, що входять до його складу та отриманих позаклітинних речовин гальмувати розвиток вірусної інфекції вивчали на надчутливих до ВТМ рослинах дурману (*Datura stramonium* L.) та тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580, як описано раніше [3]. При цьому використовували два підходи: а) додавання досліджуваних речовин до інокулюму за 30 хв до інокуляції рослин (у контролі до вірусу додавали воду); б) обприскування рослин гаупсином у 3-х розведеннях (нерозведений та розведений 1:10 та 1:100 водою) за одну добу до інокуляції ВТМ. Через 7 діб після інокуляції рослин ВТМ підраховували кількість локальних некротів у досліді та контролі.

Здатність гаупсину індукувати стійкість рослин до ВТМ досліджували на тютюні сорту Імунний 580, як описано в літературі [9]. Водні розчини препарату (1,0 та 2,5 мг/мл) вводили субепідермально в ліві половинки листків, протилежні, праві половинки обробляли в такий же спосіб водою. Через 3 доби обидві половинки листків інокулювали ВТМ (4 мкг/мл), а через 7 діб підраховували кількість некротичних уражень.



Ступінь пригнічення вірусної інфекції (I) розраховували за формулою:

$$I = (1 - D/K) \cdot 100, \%$$

де K — середня кількість некрозів у контролі, D — те ж у досліді.

Отримані результати обробляли статистично з використанням методу парних порівнянь [6].

Результати та їх обговорення

Препарат гаупсин, одержаний сумісним культивуванням штамів УКМ В-111 і УКМ В-306 на органо-мінеральному промисловому середовищі, мав титр $2 \cdot 10^{10}$ КУО в 1 мл і представляв собою суміш клітин псевдомонад, продуктів їх активного синтезу та залишків живильного середовища.

Нерозведений препарат, доданий до інокулюму ВТМ та нанесений на опушене карборундом листя надчутливих рослин дурману та тютюну, гальмував розвиток вірус-індукованих уражень (некрозів) на 80–97% (табл. 1).

Таблиця 1

Активність гаупсину щодо інфекційності ВТМ на двох рослинах-індикаторах, надчутливих до цього вірусу

Table 1

Gaupsin activity against TMV infectivity in two indicative plants hypersensitive to this virus

Рослина-індикатор	Кількість некрозів / лист		Пригнічення, %
	дослід	контроль	
<i>Datura stramonium</i>	35,1	172,7	79,7
<i>Nicotiana tabacum</i> *	0,4	12,3	96,7

* Сорт Імунний 580, надчутливий до ВТМ

Подальше розведення його у 10 та 100 разів водою призводило відповідно до часткового та повного зникнення антивірусної активності (табл. 2).

Таблиця 2

Антивірусна активність різних розведень гаупсину на рослинах дурману, уражених ВТМ

Table 2

Antiviral activity of different gaupsin dilutions in stramonium plants affected with TMV

Розведення гаупсину	Загальна кількість некрозів		Середня кількість некрозів на одній половинці листка		Пригнічення, %
	дослід	контроль	дослід	контроль	
нерозведений	21	300	1,5	21,4	93,0
1:10	140	272	12,7	24,7	48,6
1:100	387	253	38,7	25,3	-46,8*

* стимуляція утворення некрозів, індукованих ВТМ



Застосування гаупсину іншим способом, а саме запобіжним обприскуванням рослин (до штучного зараження) показало більш високу його ефективність (табл. 3). Нерозведений препарат захищав рослини від ураження ВТМ повністю, а розведений у 10 та 100 разів — відповідно на 80 та 44%.

Таблиця 3
Пригнічення розвитку локальної інфекції ВТМ, виявлене при триразовому обприскуванні рослин дурману гаупсином

Table 3
Inhibition of local TMV infection development revealed at three times repeated stramonium spraying by gaupsin

Розведення гаупсину	Загальна кількість некрозів/кількість листків		Середня кількість некрозів на одній половині листка		Пригнічення, %
	дослід	контроль	дослід	контроль	
нерозведений	0	463/27	0	17,1	100
1:10	74/23		3,2		81,3
1:100	303/32		9,5		44,4

Подальші дослідження показали, що окремі штами — компоненти гаупсину, вирощені на промисловому середовищі, теж мали значну активність щодо ВТМ: 96% захисту для штаму В-306 і 94% — для штаму В-111.

Нами було встановлено, що антивірусна дія гаупсину пов'язана з синтезом екзометаболітів, які в процесі ферментації виділяються штамми *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* в культуральне середовище. На основі припущення, що це можуть бути полісахариди або інші біополімери, ми використали для їх одержання загальноприйнятий метод осадження з культурального середовища етанолом. Одержані таким чином з гаупсину термостабільні водорозчинні метаболіти в концентрації 10 мг/мл мали активність щодо ВТМ 84%.

Раніше нами було показано, що феназинові пігменти, що утворюються штамми *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, не мають істотних антивірусних властивостей [7]. В той же час відомо, що представники цього виду є активними продуцентами екзополісахаридів: нейтрального левану та кислих альгінатів. Додаючи в синтетичне середовище сахарозу або глюкозу як єдине джерело вуглецю, ми намагалися створити умови для вибіркового утворення полісахаридів різних класів — леванів або альгінатів [10]. Останні досліджували на наявність антивірусної активності щодо ВТМ. Виявилось, що обробка листків тютюну препаратами, отриманими на середовищі Козера із сахарозою або глюкозою, практично не впливала на розвиток вірусної інфекції.

Співвідношення кількості некрозів, викликаних ВТМ на дослідних та контрольних половинках листків тютюну, коливалось у межах 0,7–1,0. В свою чергу, обробка листя тютюну метаболітами, які утворювались при вирощуванні бактерій на напівсинтетичному середовищі Кінг А, супроводжувалась пригніченням розвитку ВТМ-інфекції на 96,3%. Одержані в цих умовах метаболіти були активнішими навіть за ті, що синтезувались на орґано-



мінеральному промислового середовищі (табл. 4), а їх антивірусний ефект залежав від концентрації (табл. 5).

Таблиця 4
Антивірусна активність метаболітів штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 та УКМ В-306 при сумісному культивуванні на промислового і напівсинтетичному середовищі Кінг А

Table 4
Antiviral activity of strains *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM В-111 and UCM В-306 metabolites at co-cultivation in industrial and semisynthetic medium King А

Середовище	Середня кількість некрозів, індукованих ВТМ на дурмані штук / лист		Пригнічення, %
	дослід	контроль	
Органо-мінеральне промислове	5,9	36,3	83,7
Кінг А	0,4	4,8	91,7

Таблиця 5
Пригнічення інфекції ВТМ на дурмані метаболітами штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* на середовищі Кінг А

Table 5
Inhibition of TMV infection in stramonium by *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* strains metabolites in medium King А

Штам	Концентрація, мг/мл	Кількість некрозів/кількість половинок листків		Середня кількість некрозів на одній половині листа		Пригнічення, %
		дослід	контроль	дослід	контроль	
УКМ В-111	0,1	296/9	321/9	32,9	35,7	8,4
	1,0	138/10	281/10	13,8	28,1	50,9
	10	18/13	304/13	1,4	23,4	94,0
УКМ В-306	0,1	283/11	311/11	25,7	28,3	9,2
	1,0	142/9	279/9	15,8	31,0	49,0
	10	25/14	296/14	1,9	21,1	91,0

Відомо, що полісахариди, продуковані деякими мікроорганізмами, здатні підсилювати захисні механізми рослин. Подібний вплив було обґрунтовано експериментально для аніонних і катіонних глікополімерів [4, 5, 6].

Можливість втручання у вірусіндуковані захисні реакції рослин доведено і для нейтральних полісахаридів. Тому наступним етапом роботи була перевірка здатності препаратів метаболітів, одержаних нами із культуральної рідини

P. chlororaphis subsp. aureofaciens УКМ В-111 та УКМ В-306, індукувати стійкість рослин тютюну до інфекції ВТМ (табл. 6).

Таблиця 6
Вплив метаболітів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111, на стійкість тютюну до ВТМ-інфекції

Table 6
Effect of *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM В-111 strain metabolites on tobacco resistance to TMV-infection

Середовище	Концентрація препарату, мг/мл	Середня кількість некрозів на 1 лист		Відношення досліді до контролю
		дослід	контроль	
Козера з глюкозою	1,0	5,9	7,0	0,84
	2,5	6,9	7,7	0,90
Козера з сахарозою	1,0	55,7	38,3	1,45
	2,5	73,7	78,4	0,94
Кінг А	1,0	36,2	23,8	1,52
	2,5	68,8	47,6	1,44

Встановлено, що незалежно від штаму та середовища культивування, досліджені препарати метаболітів не знижували кількість утворюваних ВТМ некрозів, а в деяких випадках спостерігалось навіть збільшення їх кількості.

Таким чином, метаболіти, одержані з штамів-продуцентів гаупсину, гальмували розвиток інфекції, викликані ВТМ, проте не були здатні підсилювати рослинний імунітет. Склад середовища культивування визначав природу утворюваних речовин і, відповідно, їх антивірусні властивості. Найбільш високий рівень пригнічення ВТМ мали метаболіти, утворювані штамми *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* при культивуванні на середовищі Кінг А, основним джерелом вуглецю і енергії в якому є гліцерин. Хімічна природа утворюваних в цих умовах антивірусних агентів потребує подальших досліджень.

Наведені вище дані свідчать про наявність у штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* і створеного на їх основі біопрепарата гаупсин антифітотвірусного ефекту. Зазначимо, що біологічні засоби захисту рослин, які посідають все більш значне місце на ринку продуктів біотехнології, є, як правило, моновалентними і спрямованими тільки проти одного чи однієї групи шкідників або патогенів рослин. В той же час досить привабливим є створення на основі мікроорганізмів комплексних біопрепаратів, які мають кілька видів біологічної активності.

В попередні роки нами було встановлено що поряд з антибактеріальною, антифунгальною, ентомоцидною (а за деякими даними — і нематоцидною) активністю, штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* гальмують пухлиноутворення, спричинене збудником бактеріального раку *Agrobacterium tumefaciens* [1]. Наведені в цій роботі дані свідчать, що вони є також інгібіторами фітовірусних інфекцій. Цікаво, що цей унікально широкий спектр корисних властивостей,



характерних для представників названого виду, сформований самою природою і є результатом еволюції, а не генетичних маніпуляцій, широко використовуваних в сучасній біотехнології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балко О.І., Авдєєва Л.В. Вплив екзополісахаридів *Pseudomonas aureofaciens* на пухлиноутворення спричинене *Agrobacterium tumefaciens* // Мікробіол. журн. — 2009. — 71, № 3. — С. 15–19.
2. Власов Ю.И. Вирусные и микоплазменные болезни растений. — М.: Колос, 1992. — 208 с.
3. Коваленко А.Г., Щербатенко И.С., Олещенко Л.Т. Инфицирование протопластов мезофилла картофеля вирусом табачной мозаики // Биол. науки. — 1985. — № 2. — С. 42–47.
4. Коваленко О.Г., Телегеева Т.А., Штакун А.М., Погоріла З.О. Вплив деяких моно- і полісахаридів на локалізацію вірусної інфекції та індуквану вірусостійкість у рослин // Біополімери і клітина. — 2000. — 16, № 1. — С. 53–59.
5. Коваленко О.Г., Кириченко А.М., Шепелевич В.В., Баркалова А.О. Комбінована антифитовірусна дія дріжджового манану, деяких антиметаболітів і ксенобіотиків // Допов. НАН України. — 2006. — № 3. — С. 153–157.
6. Молостов А.С. Элементы вариационной статистики. — Киев: Урожай, 1965. — 180 с.
7. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. — 263 с.
8. Hansen A.F. Antiviral chemicals for plant disease control // Critical Reviews in Plant Sciences. — 1989. — № 8. — P. 45–88.
9. Kovalenko O.G., Polishchuk O.M., Wasser S.P. Virus resistance induced by glucuronoxylomannan isolated from submerged cultivated yeast-like cell biomass of medicinal yellow brain mushroom *Tremella mesenterica* Ritz.:Fr. (*Heterobasidiomycetes*) in the hypersensitive host plants // Int. J. Med. Mushrooms. — 2009. — 11, № 2. — P. 199–205.
10. Osman S.F., Fett W.F., Fishman M.L. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* // J. Bacteriol. — 1986. — 166, № 1. — P. 66–71.
11. Пат. 73682 UA, АО 1N 63/00, С 12 N 1/20. Инсектофунгицидный препарат гаупсин для борьбы із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль. — Заявл. 10.03.2004; Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.



**О.И. Балко, Е.А. Киприанова, А.Г. Коваленко, В.В. Шепелевич,
Л.В. Авдеева**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
НАН Украины, ул. Акад. Заболотного, 154, Киев ГСП, ДО 3680, Украина,
тел.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: aleks-balko@yandex.ru

АНТИФИТОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОПРЕПАРАТА ГАУПСИН

Реферат

Инсектофунгицидный биопрепарат гаупсин тормозил на 73–100% инфекционность вируса табачной мозаики (ВТМ) на растениях дурмана (*Datura stramonium*) и табака (*Nicotiana tabacum*).

Высокую активность как продуценты антифитовирусных веществ обнаружили и отдельные штаммы *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 — действующие агенты препарата, а также термостабильные водорастворимые фракции, полученные из их культуральных жидкостей путем осаждения двумя объемами этанола. Последние тормозили на 86–96% развитие инфекции, вызванной ВТМ, однако не были способны усиливать иммунитет растений.

Ключевые слова: инсектофунгицидный препарат гаупсин, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, вирус табачной мозаики, антифитовирусная активность.

**O.I. Balko, E.A. Kiprianova, A.G. Kovalenko, V.V. Shepelevych,
L.V. Avdeeva**

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv GSP DO 3680, Ukraine,
tel.: +38 (044) 526 24 09, e-mail: aleks-balko@yandex.ru

ANTIPHITOVIRAL ACTIVITY OF GAUPSIN BIOPREPARATION

Summary

Insectofungicidal biopreparation gaupsin inhibited for 73–100% the tobacco mosaic virus (TMV) infectivity in thornapple (*Datura stramonium*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants.

The high activity of antiphytoviral substances production has been also shown by separate strains of *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM B-111 and UCM B-306 — the active agents of gaupsin preparation — as well as by the thermostable water-soluble fractions isolated from their cultural fluids using sedimentation by two ethyl alcohol volumes. The latter inhibited for 86–96% infection development caused by TMV but they could not improve the plant immunity.

Key words: insectofungicidal biopreparation gaupsin, *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens*, tobacco mosaic virus, antiphytoviral activity.



УДК: 616-006.04:615.372

О.А. Танасієнко¹, М.П. Рудик², Г.П. Тітова¹, Г.П. Потебня¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна, тел.: +38 (044) 257 90 54, e-mail: iris@onconet.kiev.ua

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна, тел.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: rosiente@gmail.com

ІНДУКЦІЯ ПРОТИПУХЛИННОЇ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У МИШЕЙ ЦИТОТОКСИЧНИМ ЛЕКТИНОМ БАКТЕРІАЛЬНОГО ПОХОДЖЕННЯ

*На моделях експериментальних пухлин – саркоми 37, раку Ерліха та метастазуючої карциноми легені Льюїс – вперше виявлено превентивний протипухлинний ефект цитотоксичного лектину, виділеного із культуральної рідини *Bacillus subtilis* B-7025. Введення лектину інтактним мишам викликає у них протипухлинну резистентність до прищеплених пухлинних клітин, в результаті чого гальмується ріст пухлин та збільшується тривалість життя тварин. Передопераційне введення лектину мишам з прищепленою карциномою легені Льюїс викликає у прооперованих мишей значний антиметастатичний ефект. Одержані результати свідчать про опосередкований активуючий ефект цитотоксичного лектину на систему протипухлинного імунітету мишей.*

Ключові слова: цитотоксичний лектин, експериментальні пухлини, превентивний ефект.

Провідна роль у специфічних процесах розпізнавання молекул і клітин належить вуглеводзв'язуючим білкам — лектинам, які є складовими будь-якої біологічної системи і мають широкий спектр біологічної активності. Ключові механізми біорозпізнавання на різних рівнях організації живих організмів здійснюються завдяки здатності лектинів специфічно і зворотно взаємодіяти з глікокон'югатами, не призводячи до порушення структури останніх. Участь лектинів в процесах регуляції різноманітних міжклітинних взаємодій, які обумовлюють пізнавання біополімерних сполук, вже доведена [9], але молекулярні механізми, які лежать в їх основі, до цього часу невідомі.

Механізм дії лектинів на пухлинні клітини також до кінця не вивчений. Відомо, що біологічні реакції, які проходять за участю лектинів, розділяють на два типи. Перший являє собою взаємодію лектинів з відповідними вуглеводними рецепторами на мембранах пухлинних клітин,

© О.А. Танасієнко, М.П. Рудик, Г.П. Тітова, Г.П. Потебня, 2010



що призводить до реакції аглютинації. За процесом розпізнавання відбувається низка складних метаболічних перетворень в клітині і відповідь організму на дію лектину. Якщо реакції первинного типу доволі добре вивчені для різних типів клітин і лектинів, то дослідження реакцій другого типу тільки починають проводитися. Сигнальна дія бактеріальних лектинів, яка сприяє підвищенню імунореактивності організму, може суттєво впливати на хід пухлинного процесу: не тільки стабілізувати пухлинний процес після хірургічного видалення пухлини, але й протидіяти виникненню і поширенню метастатичного процесу.

Цитотоксичний лектин, виділений із культуральної рідини штаму сапрофітного мікроорганізму *Bacillus subtilis* В-7025 [11], відомий своїми унікальними властивостями не тільки позбавляти пухлинні клітини різного гістогенезу життєздатності, але й модифікувати їх таким чином, що останні набувають властивостей протипухлинних вакцин [2]. Введення їх в організм тварин викликає специфічну протипухлинну відповідь, результатом чого є збільшення середньої тривалості життя останніх. Протипухлинні вакцини можуть застосовуватися в клініці для попередження рецидивів та метастазів у прооперованих онкологічних хворих [4]. В той же час протипухлинний потенціал одержаного лектину, як самостійного препарату, повною мірою ще не вивчений. Тому метою даної роботи було дослідження превентивної протипухлинної дії цитотоксичного лектину, виділеного із продуктів синтезу бактеріальної культури *B. subtilis* В-7025, як основної складової протипухлинної вакцини.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був цитотоксичний лектин (ЦЛ), виділений із культуральної рідини бактеріального штаму *B. subtilis* № В-7025, задепонованого в колекції Інституту мікробіології та вірусології НАН України [10]. Препарат лектину одержували за розробленим нами методом [11].

Дослідження проводили на мишах самках ліній Balb/c та С57В1 2—2,5-місячного віку масою 20—24 г на моделях саркоми 37, раку Ерліха та метастазуючої карциноми легені Льюїс. Досліди проводили за такою схемою: дослідним інтактним мишам підшкірно 4 рази через день вводили лектин у дозах від 1,0 до 10,0 мг/кг маси. Через добу після останнього введення лектину дослідним і контрольним тваринам у м'яз стегна прищеплювали по $0,5 \cdot 10^6$ пухлинних клітин (ПК) саркоми 37 або раку Ерліха. Результати досліду оцінювали, беручи до уваги динаміку росту пухлин, відсоток гальмування росту пухлин (ГРП) та середню тривалість життя (СТЖ). Для порівняльної оцінки впливу досліджуваного лектину на СТЖ використовували індекс модуляції (ІМ) цього показника [1].

В дослідах на метастазуючій карциномі легені Льюїс суспензію клітин в дозі $3,5 \cdot 10^5$ клітин перещеплювали в подушечку стопи миші. За 3 доби до операційного видалення пухлини дослідним мишам підшкірно один раз на добу вводили цитотоксичний лектин у дозі 0,05 мг на мишу, а



контрольним тваринам — фізіологічний розчин. Через добу після останнього введення лектину кінцівку з пухлиною видаляли у місці колінного суглоба під гексеналовим наркозом в стерильних умовах. Мишей забивали при розвинутому метастатичному процесі і оцінювали антиметастатичну ефективність лектину за відсотком мишей, у яких метастази в легенях не були виявлені, за кількістю та об'ємом метастазів на одну мишу та індексом гальмування метастазування (ІГМ) [3]. Результати дослідів оброблені статистично з використанням *t* критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Дослідження динаміки росту солідної саркоми 37 у дослідних мишей, яким вводили ЦЛ до прищеплення пухлини, показало, що впродовж усього часу спостереження ріст пухлин у мишей дослідних груп гальмувався на 60–70% по відношенню до контролю (рис. 1).

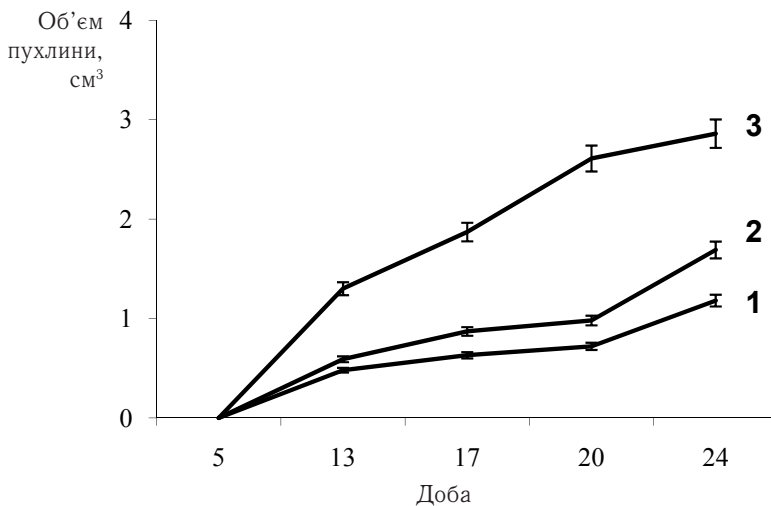


Рис. 1. Динаміка росту солідної саркоми 37 у мишей лінії Balb/c, яким до прищеплення пухлинних клітин вводили цитотоксичний лектин 1, 2 — відповідно 0,05 та 0,1 мг лектину; 3 — контроль.

Fig. 1. Growth dynamics of the solid form of sarcoma-37 in Balb/c mice treated with cytotoxic lectin before tumour transplantation

1 — lectin at the dose of 0.05 mg, 2 — lectin at the dose of 0.1 mg, 3 — untreated control.

СТЖ мишей цих груп значно перевищувала таку контрольних тварин і залежала від дози ЦЛ, яку одержували тварини (табл. 1). При введенні лектину в дозах 0,05 та 0,1 мг на мишу СТЖ в обох дослідних групах була майже однаковою і достовірно вищою ніж у контрольних мишей. При підвищенні дози ЦЛ до 0,2 мг на мишу спостерігали тенденцію до погіршення результату, що виявлялося у зниженні вірогідності відмінностей між дослідом і контролем майже вдвічі. Так, індекс модуляції

СТЖ, який при введенні 0,05 мг лектину складав 54,9% проти 24,1% при введенні 0,2 мг препарату.

Таблиця 1

Вплив лектину на тривалість життя мишей лінії Balb/c з прищепленою саркомою 37

Table 1

Influence of lectin on average survival time of Balb/c mice with transplanted sarcoma-37

Варіант	К-сть мишей	Доза і шлях введення лектину, мг/мишу	Середня тривалість життя мишей, дні	ІМ, %
ЦЛ+ПК	7	0,20, підшкірно	73,0 ± 5,7*	24,1
Контроль	7	-	58,8 ± 1,7	-
ЦЛ+ПК	10	0,10, внутрішньо-черевинно	64,2 ± 4,2**	51,4
	10	0,05, підшкірно	65,7 ± 3,1***	54,9
Контроль	10	-	42,4 ± 3,9	-

Примітка: тут і в табл. 2 і 3 дані достовірні відносно контролю, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

На експериментальній моделі раку Ерліха досліджені і відпрацьовані кількісні оптимальні умови кратності попередніх ін'єкцій лектину, при яких у мишей досягається максимальний превентивний протипухлинний ефект.

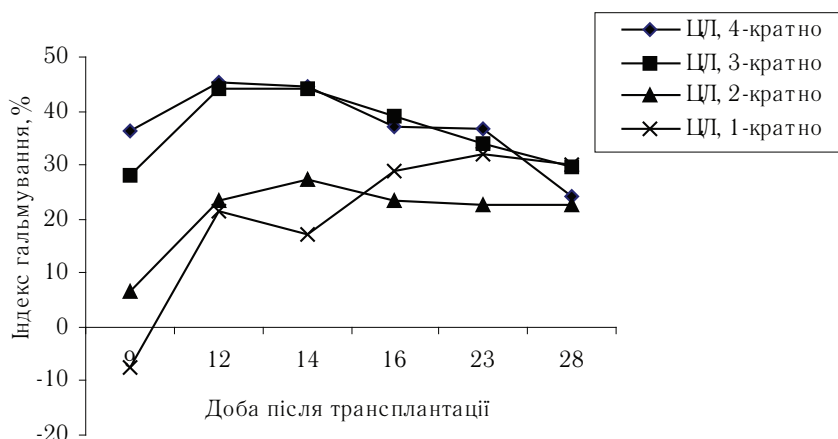


Рис. 2. Гальмування росту солідного раку Ерліха у мишей лінії Balb/c лектином в залежності від кратності ін'єкцій

Fig. 2. Growth inhibition of Ehrlich solid tumour in Balb/c mice depending on multiplicity of preventive cytotoxic lectin injections



Одержані результати (рис. 2) свідчать про чітку залежність гальмування росту аденокарциноми у мишей від кількості ін'єкцій цитотоксичного лектину, особливо на ранніх етапах пухлинного росту (9–16 доба). На етапі розвинутого пухлинного процесу об'єми пухлин у всіх дослідних групах виходили на плато і були майже ідентичними між собою, але на третину відставали від об'єму контрольних мишей: ГРП на 28 добу складало 22–30%.

ГРП у мишей дослідних груп корелює з тривалістю життя останніх (табл. 2). Так, при профілактичному 3- та 4-кратному підшкірному введенні мишам 0,02 мг лектину (1,0 мг/кг маси) ГРП було практично однаковим протягом росту пухлини і складало 36–45%, а СТЖ цих мишей була вірогідно вищою за контрольні показники. В той же час при 1- та 2-кратному профілактичному введенні тих самих доз лектину ГРП було у два рази нижчим за попередні значення, а показники СТЖ, хоч і перевищували контрольні, але були статистично невірогідними. Найбільш ефективним можна вважати 3–4-кратне профілактичне застосування цитотоксичного лектину, при якому спостерігається максимальне гальмування росту пухлини та подовження тривалості життя мишей.

Таблиця 2

Превентивний протипухлинний ефект лектину у мишей лінії Balb/c з прищепленим раком Ерліха

Table 2

The preventive antitumour effect of lectin in Balb/c mice with transplanted *Ehrlich* tumour

Варіант	К-сть мишей	К-сть введень лектину	ГРП, %	Середня тривалість життя мишей, дні
ЦЛ+ПК	7	4-кратно	40,0	54,3 ± 1,7*
ЦЛ+ПК	8	3-кратно	39,8	49,1 ± 1,7*
ЦЛ+ПК	9	2-кратно	20,7	50,1 ± 2,4
ЦЛ+ПК	7	1-кратно	8,4	47,4 ± 2,9
Контроль	10	0	-	43,0 ± 2,6

Для оцінки превентивної дії лектину також була використана експериментальна модель карциноми легені Льюїс, яка найбільш адекватно відображає особливості природного процесу метастазування і вважається найбільш наближеною до клінічної практики [7]. Результати, одержані на моделі метастазуючої карциноми легені Льюїс мишей свідчать про суттєвий вплив лектину на формування та розвиток метастазів в легенях після хірургічного видалення пухлини (табл. 3).

Таблиця 3
Вплив лектину на середню тривалість життя мишей лінії C57Bl з метастазуючою карциномою легені Льюїс

Table 3
Influence of lectin on average survival time of C57Bl mice with metastatic Lewis lung carcinoma

Варіант	К-сть мишей	К-сть мишей без метастазів, %	К-сть метастазів на мишу	Об'єм метастазів на мишу, мм ³
ЦЛ+ПК	7	42,8	3,4±2,2*	101,6±42,2*
Контроль	6	16,6	10,2±2,8	267,6±61,3

Як видно з таблиці 3, введення лектину перед операцією викликає у мишей виражений антиметастатичний ефект: у 42,8% мишей метастазів в легенях не виявлено, а у решти — кількість метастазів у 3 рази, а їх об'єм у 2,6 рази були менші порівняно з контролем. Індекс гальмування метастазування в дослідній групі порівняно з контролем становив 62%.

Таким чином, на експериментальних моделях пухлинного росту виявлено превентивний протипухлинний та антиметастатичний ефект цитотоксичного лектину із *B. subtilis* В-7025. Подовження тривалості життя мишей із прищепленими саркомою 37 або раком Ерліха та гальмування метастазування у оперованих мишей із карциномою легені Льюїс свідчать, скоріш за все, про значний вплив цитотоксичного лектину на систему протипухлинного імунітету мишей. Одержані нами результати та літературні дані з профілактичного застосування рослинного лектину із *Aloe vera* для превентивного протипухлинного ефекту у мишей з асцитним раком Ерліха [5], а також клінічні випробування протипухлинної та антиметастатичної дії лектинів омели [8], можливість блокування адгезії пухлинних клітин за допомогою лектинів [6] свідчать про перспективність цих досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Потебня Г.П., Лісовенко Г.С., Мосієнко В.С., Лісовенко В.Г. Ефективність комплексного застосування протипухлинної вакцини та імуномодуючого препарату бластолен // Укр. хіміотерап. журн. — 2002. — 14, № 2. — С. 60–64.
2. Структура і біологічна активність бактеріальних біополімерів / За ред. В.К. Позура. — К.: Київський університет, 2003. — 305 с.
3. Чердынцева Н.В., Кокорев О.В., Коновалова Н.П., Кагия В.Т. Усиление цитотоксической и цитостатической активности спленоцитов и макрофагов радиосенсибилизатором АК-2123 у мышей с карциномой Льюис при терапии циклофосфаном // Эксперим. Онкол. — 1997. — 19, № 4. — С. 333–337.
4. Чорний В.О., Потебня Г.П., Кірсенко О.В., Лісовенко Г.С., Розумій Д.О., Осинський Д.С., Танасієнко О.А. Імунологічні зміни у хворих на рак шлунка



після введення протипухлинної аутологічної вакцини // Онкологія. — 2003. — 5, № 2. — С. 171—172.

5. Akev N., Turkay G., Can A., Gurel A., Yildiz F., Yardibi H., Ekiz E.E., Uzun H. Tumour preventive effect of Aloe vera leaf pulp lectin (Aloctin I) on Ehrlich ascites tumours in mice // *Phytother. Res.* — 2007. — 21, № 11. — P. 1070—1075.

6. Beuth J., Ko H.L., Pulverer G., Uhlenbruck G., Pichlmaier H. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases // *Glycoconj. J.* — 1995. — 12, № 1. — P. 1—6.

7. Gorelik E., Segal S., Shapiro J., Katzav S., Ron Y., Feldman M. Interactions between the local tumor and its metastases // *Cancer. Metastasis. Rev.* — 1982. — 1, № 1. — P. 83—94.

8. Ma Y.H., Cheng W.Z., Gong F., Ma A.L., Yu Q.W., Zhang J.Y., Hu C.Y., Chen X.H., Zhang D.Q. Active Chinese mistletoe lectin-55 enhances colon cancer surveillance through regulating innate and adaptive immune responses // *World J. Gastroenterol.* — 2008. — 34, № 14. — P. 5274—5281.

9. Sharon N., Lis H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2001. — 491. — P. 1—16.

10. Пат. № 56348, Україна, МПК 7 C12N 1/20. Штам бактерій *Bacillus subtilis* — продуцент протипухлинних цитотоксичних речовин / Г.П. Потебня, Г.С. Лісовенко, Н.Л. Черемшенко, О.А. Танасієнко, В.Ф. Чехун. — № 2001042565; Заявл. 17.04.2001; Опубл. 15.05.2003. Бюл. № 5.

11. Пат. № 59483, Україна, МПК 7 C07K 14/32. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю / Г.П. Потебня, О.А. Танасієнко, Г.С. Лісовенко, Н.Л. Черемшенко, В.Ф. Чехун. — № 2001075155; Заявл. 19.07.2001; Опубл. 15.09.2003. Бюл. № 9.



О.А. Танасієнко¹, М.П. Рудик², Г.П. Тітова¹, Г.П. Потебня¹

¹Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р.Е. Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина, тел.: +38 (044) 257 90 54, e-mail: iris@onconet.kiev.ua

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, тел.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: rosiente@gmail.com

ИНДУКЦИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У МЫШЕЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИМ ЛЕКТИНОМ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Реферат

На моделях экспериментальных опухолей — саркомы 37, рака Эрлиха и метастазирующей карциномы легкого Льюис — впервые выявлено превентивный противоопухолевый эффект цитотоксического лектина, выделенного из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* B-7025. Введение лектина интактным мышам вызывает у них противоопухолевую резистентность к привитым опухолевым клеткам, в результате чего тормозится рост опухолей и увеличивается продолжительность жизни животных. Предоперационное введение лектина мышам с привитой карциномой легкого Льюис вызывает у прооперированных мышей значительный антимастигический эффект. Полученные результаты свидетельствуют об опосредованном активирующем эффекте цитотоксического лектина на систему противоопухолевого иммунитета животных.

К л ю ч е в ы е с л о в а : цитотоксический лектин, экспериментальные опухоли, превентивный эффект.

О.А. Tanasienko¹, M.P. Rudyk², G.P. Titova¹, G.P. Potebnya¹

¹R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NASU, 45, Vasylykivska str., Kyiv, 03022, Ukraine, tel.: +38 (044) 257 90 54, e-mail: iris@onconet.kiev.ua

²T.G. Shevchenko Kyiv National University, 64, Volodymirska str., Kyiv, 01033, Ukraine, tel.: +38 (044) 521 32 31, e-mail: rosiente@gmail.com

INDUCTION OF ANTICANCER RESISTANCE IN MICE TREATED WITH LECTIN OF BACTERIAL ORIGIN

Summary

The preventive antitumor effect of cytotoxic lectin isolated from culture medium *Bacillus subtilis* B-7025 on the models of experimental tumours sarcoma-37, *Ehrlich* carcinoma and metastatic Lewis lung carcinoma was firstly shown. The injection of lectin to intact mice leads to stimulation of anticancer resistance to transplanted tumour cells, tumour growth inhibition and increasing of animal survival. Presurgical injection of lectin to Lewis lung carcinoma bearing mice was found to result in the substantial antimetastatic effect in surgical treated mice. Our results prove that cytotoxic lectin has mediate activating influence on antitumour immunity of animals.

К e y w o r d s : cytotoxic lectin, experimental tumours, preventive effect.



УДК 579+616.34

А.П. Левицкий¹, В.В. Вит², Ю.В. Цисельский³, И.А. Селиванская¹

¹Институт стоматологии АМН Украины, ул. Ришельевская, 11, Одесса, 65026, Украина, тел.: +38 (048) 728 24 61, e-mail: stomat@paso.net

²Институт глазных болезней и тканевой терапии имени В.П.Филатова АМН Украины, Французский б-р, 49/51, Одесса, 65061, Украина

³Одесская областная клиническая больница МОЗ Украины, ул. Заболотного 26/32, Одесса, 65025, Украина, тел.: +38 (048) 755 83 93

ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛІСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI* НА СТЕПЕНЬ КИШЕЧНОГО ДИСБІОЗА И НА СОСТОЯНИЕ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА КРЫС

Введение крысам липополисахарида (ЛПС) E. coli в дозах 6,6 или 200 мкг/кг вызывает развитие дисбиоза в слизистой оболочке тонкой кишки, более выраженного при большой дозе препарата. Гистологическое исследование тканей глаза крыс, получавших ЛПС, свидетельствует о глубоких изменениях сосудов сетчатки, аналогичных тем, что возникают при дисбиозе кишечника.

К л ю ч е в ы е с л о в а : дисбиоз, липополисахарид, кишка, сетчатка глаза.

Более 100 лет тому назад И.И. Мечников предвидел участие микробного фактора в патогенезе неинфекционных заболеваний [9, 12]. В последнее время появилось достаточно много публикаций, в которых показана роль микроорганизмов в развитии атеросклероза [1], сахарного диабета [13], миокардита [2, 12], гастрита [3].

Экспериментальные и клинические исследования показали, что в механизме патогенного действия микроорганизмов, в частности, условно-патогенных, существенная роль принадлежит эндотоксину (липополисахариду) [8, 15]. Он находится в наружной оболочке грамотрицательных бактерий, после отмирания которых высвобождается и сравнительно легко поступает в системный кровоток [14].

Липополисахарид (ЛПС) обладает очень широким спектром биологического действия, вызывая активацию нейтрофилов, купферовских клеток, воздействуя на эндотелиоциты [6]. Прямое и опосредованное действие ЛПС в значительной степени предопределяет характер и тяжесть сосудистых нарушений в организме, которые наблюдаются при дисбактериозах [10]. Сетчатка глаза необычайно чувствительна к микробной интоксикации [4, 11].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния на степень кишечного дисбиоза и на сетчатку глаза крыс различных концентраций препарата ЛПС из *Escherichia coli*.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на 90 крысах самках линии Вистар в возрасте 13 месяцев (живая масса 280–300 г), распределенных на 9 групп: первая группа (1) — интактные (контроль); вторая (2), третья (3), четвертая (4) и пятая (5) группы получали внутримышечно ЛПС в дозе 6,6 мкг/кг ежедневно, шестая (6), седьмая (7), восьмая (8) и девятая (9) группы получали ЛПС в дозе 200 мкг/кг. Использовали ЛПС из *E. coli* 0111:B4, очищенный фенольной экстракцией (производитель «Sigma-Aldrich», США).

Животных умерщвляли под тиопенталовым наркозом через 1 сутки (2 и 6 группы), через 3 суток (3 и 7 группы), через 7 дней (4 и 8 группы) и через 14 дней (5 и 9 группы). Выделяли слизистую оболочку тонкой кишки и замораживали до исследования при температуре минус 30 °С. Энуклеировали глаза и фиксировали их в 10%-ном нейтральном формалине, используя в дальнейшем для гистологического исследования. Глазное яблоко заключали в парафин, парафиновые среды окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон.

Из слизистой оболочки тонкой кишки готовили гомогенат на физрастворе, в котором определяли активность уреазы [5] и лизоцима [7]. По соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима рассчитывали степень дисбиоза (дисбактериоза) [16].

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены результаты определения степени дисбиоза в слизистой тонкой кишки. Из этих данных видно, что большие дозы ЛПС (200 мкг/кг) сразу же (с первого дня) вызывают резкое увеличение степени дисбиоза, определяемое, главным образом, весьма значительным снижением уровня кишечного лизоцима — основного фактора неспецифического иммунитета [15].

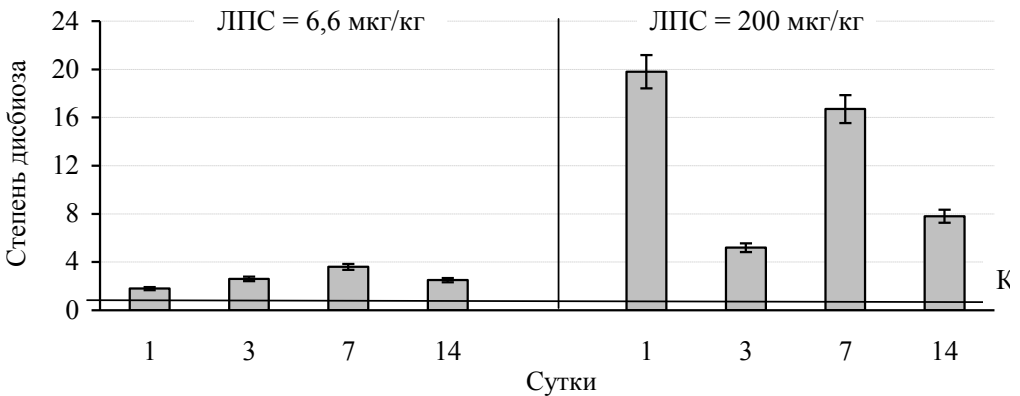


Рис. 1. Влияние ЛПС на степень дисбиоза слизистой оболочки тонкой кишки крыс 1, 3, 7 и 14 — число дней после введения ЛПС; К — контроль.

Fig. 1. LPS influence upon the degree of dysbiosis of mucous membrane of small intestine in rats

1, 3, 7, 14 — number of days after introduction of LPS; К — control.



При гистологическом исследовании тканей глаза, в частности, сетчатой оболочки удалось определить выраженные патологические изменения преимущественно слоя ганглиозных клеток. Характер патологических изменений проявляется развитием интенсивной вакуольной дегенерации ганглиозных клеток, дезинтеграции этого слоя и отеком нервных волокон (рис. 2).

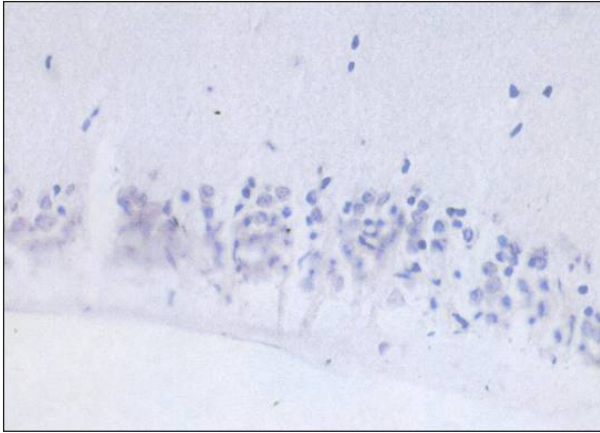


Рис. 2. Интенсивная вакуольная дегенерация ганглиозных клеток, сопровождающаяся дезинтеграцией слоя ганглиозных клеток и отеком нервных волокон.
Гематоксилин-эозин. $\times 400$.

Fig. 2. The intensive vacuole degeneration of ganglionic cells, followed by disintegration of ganglionic cells layer and edema of nerve fibers.
Hematoxylin-eosin. $\times 400$.

Появляются обширные кистевидные полости, заполненные серозным содержимым (рис. 3).

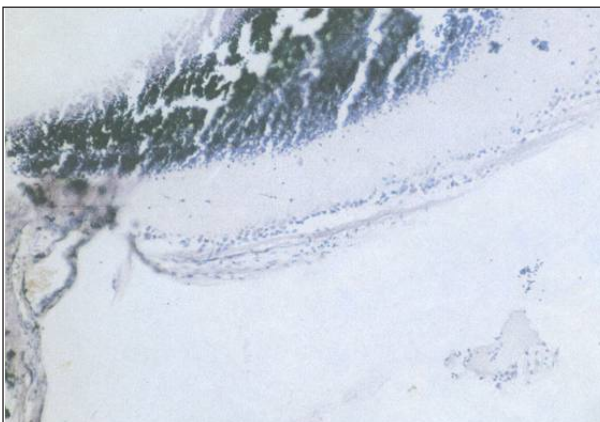


Рис. 3. Кистевидные полости, расслаивающие слой нервных волокон сетчатки и заполненные серозным содержимым.
Гематоксилин-эозин. $\times 400$.

Fig. 3. Cystic cavities, stratifying the nerve fibers retina layer and filled with serous contents. Hematoxylin-eosin. $\times 400$.

При этом определяется клеточный полиморфизм, связанный с кариопикнозом части клеток. Слой нервных волокон приобретает сетчатый вид. В ряде случаев видно расслоение этого слоя, его разрывы. При этом стекловидное тело проникает между слоями сетчатки (рис. 4 и 5).

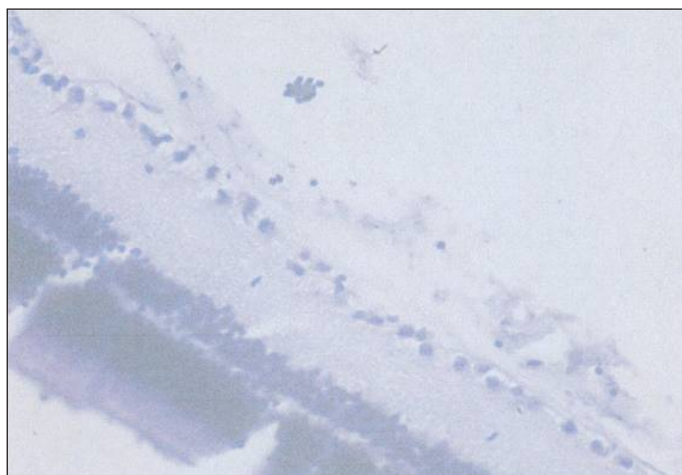


Рис. 4. Расслоение слоя нервных волокон, его разрыв.
Деструктивные изменения преретинальных слоев стекловидного тела.
Гематоксилин-эозин. $\times 180$.

Fig.4. Stratifying of the nerve fibers layer, its rupture.
The destructive changes of preretinal layers of vitreous body.
Hematoxylin-eosin. $\times 180$.

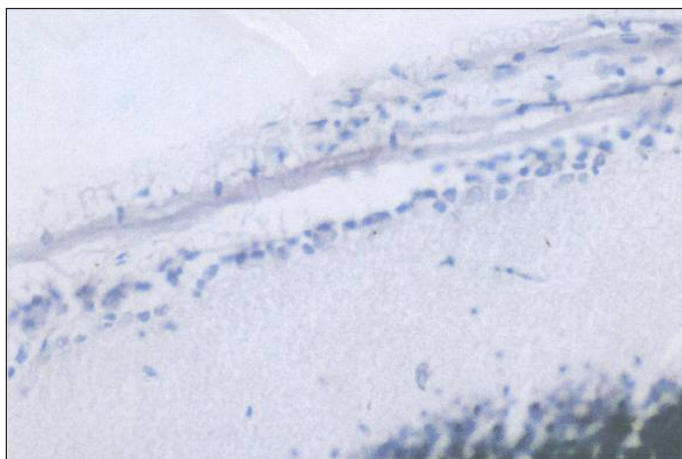
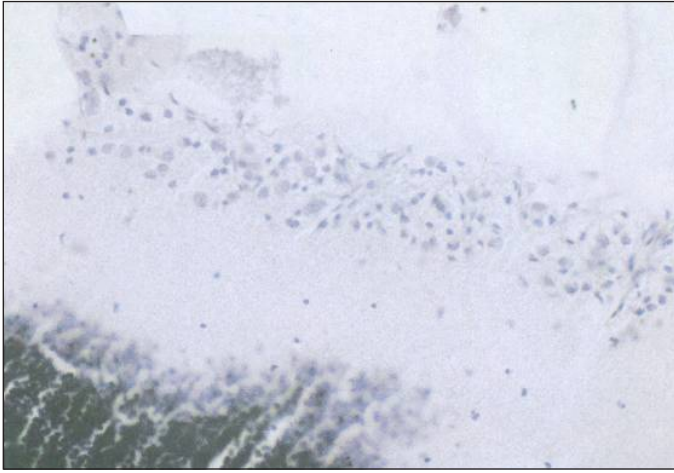


Рис. 5. Глубокая вакуольная дегенерация ганглиозных клеток сетчатой оболочки, расслоение слоя нервных волокон.
Гематоксилин-эозин. $\times 180$.

Fig. 5. Deep vacuole degeneration of retina ganglionic cells, stratifying of the nerve fibers layer.
Hematoxylin-eosin. $\times 180$.

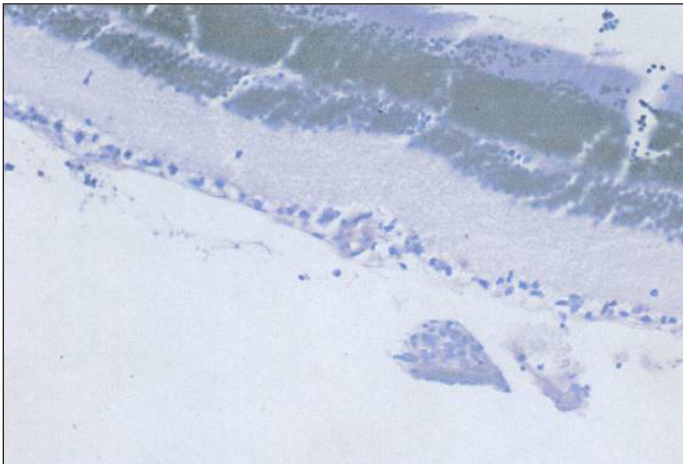
Изменения проявляются в преретинальных слоях стекловидного тела. Сводятся они к конденсации стекловидного тела, появлению в нем клеточных элементов, при этом исчезает внутренняя пограничная мембрана (рис. 6).



**Рис. 6. Конденсации стекловидного тела и появление в нем клеточных элементов.
Деструкция внутренней пограничной мембраны.
Гематоксилин-эозин. $\times 180$.**

**Fig. 6. Condensation of vitreous body and appearance of cellular elements in it.
Destruction of inner limiting membrane. Hematoxylin-eosin. $\times 180$.**

Патологические изменения выявляются и в кровеносных сосудах сетчатки. Стенка части сосудов гомогенизирована, исчезает эндотелиальная выстилка. В просветах некоторых сосудов определяются тромбы (рис. 7 и 8).



**Рис. 7. Гомогенизация стенки артериолы сетчатки, сопровождающаяся
исчезновением эндотелиальной выстилки.
Тромбирование просвета сосуда. Гематоксилин-эозин. $\times 180$.**

**Fig. 7. Homogenization of the arteriole retina wall, accompanied by disappearance
of endothelial lining. Thrombosing of vascular lumen.
Hematoxylin-eosin. $\times 180$.**

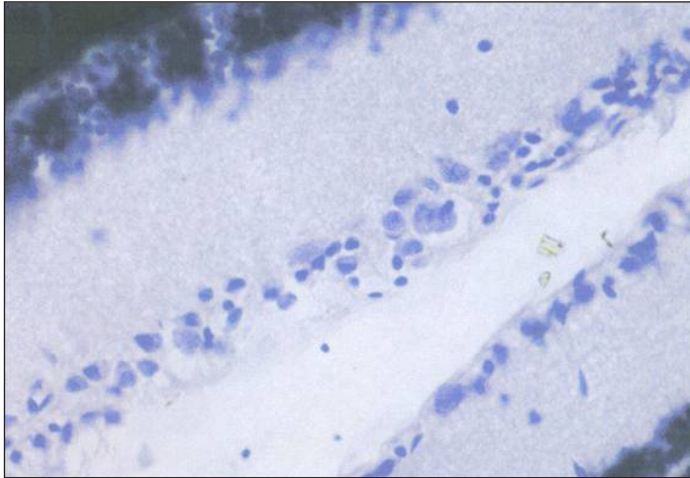


Рис. 8. Вакуольная дегенерация ганглиозных клеток сетчатой оболочки, тромбоз кровеносного сосуда, сопровождающийся деструкцией стенки сосуда. Гематоксилин-эозин. х400.

Fig. 8. The vacuole degeneration of ganglionic cells of retinal membrane, thrombosis of blood vessel, accompanied by destruction of vascular wall. Hematoxylin-eosin. x400.

Для гистологического исследования были использованы глаза животных 5-й группы (6,6 мкг/кг ЛПС, 14-й день) и 9-й группы (200 мкг/кг ЛПС, 14-й день). К нашему удивлению, гистологическая картина нарушений оказалась весьма сходной для этих двух разных концентраций эндотоксина.

Таким образом, внутримышечное введение ЛПС из *E. coli* вызывает развитие дисбиоза в слизистой тонкой кишки, значительно более выраженное при большой дозе препарата.

Гистологическое исследование показывает глубокие изменения в глазу, проявляющиеся отеком, сосудистыми расстройствами, изменениями стекловидного тела, причем не выявлено существенных различий в зависимости от дозы эндотоксина. Можно полагать, что дисбиотические нарушения в глазу определяются, в основном, действием липополисахарида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алибек К., Гречаный Л., Клименко Т., Пашкова А. Пятая революция в медицине: о роли инфекций в патогенезе старения и хронических болезней человека // Лікарська справа. Врачебное дело. — 2008. — № 1–2. — С. 3–30.

2. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации // ЖМЭИ. — 2010. — № 1. — С. 92–100.

3. Бродов Л.Е., Кареткина Г.Н., Ющук Н.Д. и др. Пищевые токсико-инфекции у больных сахарным диабетом // Терапевтический архив. — 1986. — Т. 58, № 10. — С. 48–51.

4. *Вышегуров Я.Х., Аниховская И.А., Батманов Ю.Е., Яковлев М.Ю.* Кишечный эндотоксин в патогенезе воспалительной патологии глаз и антиэндотоксиновая составляющая ее лечения // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2007. — № 1. — С. 12–14.
5. *Гаврикова Л.М., Сегень И.Т.* Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области // Стоматология. — 1996. — Спец. вып. — С. 49–50.
6. *Леванова Л.А., Алешкин В.А., Воробьев А.А. и др.* Особенности биологических свойств условно-патогенных бактерий, определяющих характер дисбиотических нарушений в составе нормальной микрофлоры толстой кишки // ЖМЭИ. — 2002. — № 5. — С. 48–53.
7. *Левицкий А.П.* Лизоцим вместо антибиотиков. — Одесса: КП ОГТ, 2005. — 74 с.
8. *Лыкова Е.А., Бондаренко В.М., Воробьев А.А., Суджан Е.В., Минаев В.И., Маликов В.Е.* Бактериальная эндотоксинемия у детей с дисбиозом кишечника // ЖМЭИ. — 1999. — № 3. — С. 67–70.
9. *Парфенов А.И.* Системные проявления болезни кишечника // Клиническая медицина. — 2001. — № 4. — С. 9–12.
10. *Петухов В.А.* Дисбиоз, эндотоксиновая агрессия, нарушение функций печени и дисфункция эндотелия в хирургии. Современный взгляд на проблему // Трудный пациент (архив). — 2006. — № 4. — С. 25.
11. *Порядин Г.В., Обрубков М.А., Беспалюк Ю.Г. и др.* Патофизиологические механизмы и особенности патологии глаз при системных заболеваниях кишечника // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2008. — № 4. — С. 28–31.
12. *Семенов Б.Ф., Зверев В.В.* Вакцинопрофилактика обострений хронической соматической патологии в группах риска // ЖМЭИ. — 2010. — № 1. — С. 86–92.
13. *Смирнов В.В., Карраа Л., Кукса В.П.* Катамнестическая характеристика детей, заболевших инсулинозависимым сахарным диабетом в раннем возрасте // Медицинский научный и учебно-методический журнал. — 2007. — № 38. — С. 126–141.
14. *Яковлев М.Ю.* Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека // Физиология человека. — 2003. — Т. 29, № 4. — С. 98–109.
15. *Янковский Д.С.* Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления. — К.: Эксперт ЛТД, 2005. — 362 с.
16. *Пат.* 43140 Україна, МПК (2009) G 01 N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / А.П. Левицький, О.В. Деньга, І.О. Селіванська [та ін.]. — № U200815092, заявл. 26.12.2008; опубл. 10.08.2009, Бюл. № 15.

А.П. Левицький¹, В.В. Віт², Ю.В. Цисельський³, І.О. Селіванська¹

¹Інститут стоматології АМН України, вул. Ришельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна, тел.: +38 (048) 728 24 61, e-mail: stomat@paco.net

²Інститут очних хвороб і тканинної терапії імені В.П. Філатова АМН України, Французький б-р, 49/51, Одеса, 65061, Україна

³Одеська обласна клінічна лікарня МОЗ України, вул. Заболотного 26/32, Одеса, 65025, Україна, тел.: +38 (048) 755 83 93

ВПЛИВ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ *ESCHERICHIA COLI* НА СТУПІНЬ КИШКОВОГО ДИСБІОЗУ ТА НА СТАН СІТКІВКИ ОКА ЩУРІВ

Реферат

Введення щурам ліпополісахариду (ЛПС) *E. coli* в дозах 6,6 і 200 мкг/кг викликає розвиток дисбіозу в слизовій оболонці тонкої кишки, більш вираженого за великої дози препарату. Гістологічне дослідження тканин ока щурів, які отримували ЛПС, свідчить про глибокі зміни судин сітківки, аналогічні тим, що виникають за кишкового дисбіозу.

К л ю ч о в і с л о в а : дисбіоз, ліпополісахарид, кишка, сітківка ока.

A.P. Levitsky¹, V.V. Vit², Yu.V. Tsyselsky³, I.A. Selivansky¹

¹The Institute of Dentistry of the AMS of Ukraine, 11, Rischelevska Str., Odesa, 65026, Ukraine, tel.: +38 (048) 728 24 61, e-mail: stomat@paco.net

²The Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy after Filatov V.P. of the AMS of Ukraine, 49/51, Frantsuzskij Blvrd, Odesa, 65061, Ukraine

³Odesa Regional Clinical Hospital of MH of Ukraine, 26/32, Zabolotnogo Str., Odesa, 65025, Ukraine, tel.: +38 (048) 755 83 93

THE INFLUENCE OF LIPOPOLYSACCHARIDE *ESCHERICHIA COLI* UPON THE DEGREE OF INTESTINAL DISBIOSIS AND RETINA STATE IN RATS

Summary

The intramuscular introduction to rats of lipopolysaccharide (LPS) *E. coli* dosed by 6.6 or 200 mkg/kg causes the development of disbiosis in mucous membrane of small intestine, more expressed at the high dose of preparation. The histological study of the retina tissues of rats received LPS, testifies to the deep changes in retina vessels similar to the ones appearing at disbiosis of the intestine.

K e y w o r d s : disbiosis, lipopolysaccharide, intestine, retina.



УДК 579.26:[631.461+661.16]:620.193.92+620.197.3

Н.В. Ткачук, Н.Р. Демченко

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

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА ДІЯ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ ТРИАЗОЛОАЗЕПІНІЮ ЩОДО АМОНІФІКУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ КОРОЗІЙНО-НЕБЕЗПЕЧНОГО УГРУПОВАННЯ

Досліджено антибактеріальні властивості четвертинних солей триазолоазепінію до амоніфікувальних бактерій, виділених з феросфери – зони безпосереднього прилягання ґрунту до поверхні металу підземної конструкції. Встановлено високу токсичну дію похідного з пара-метоксифенацильним фрагментом в першому положенні гетероциклічної системи та пара-броманіліновим фрагментом в третьому положенні.

Ключові слова: амоніфікувальні бактерії, біоциди, четвертинні солі триазолоазепінію.

Важливим чинником руйнування металів є мікроорганізми корозійно-небезпечних угруповань. Формування корозійно активного мікробного угруповання відбувається у феросфері – зоні ґрунту завтовшки 1 мм, що безпосередньо контактує з поверхнею металу підземної конструкції [6]. Згідно із сучасними уявленнями, мікробна корозія здійснюється у біоплівках [6, 10]. Відомо, що одними з перших металеву поверхню колонізують амоніфікувальні бактерії (АМБ), які продукують значну кількість екзополімерів. Це сприяє як формуванню структури біоплівки, так і створенню анаеробних умов для подальшого розвитку бактерій інших груп [7].

Для захисту матеріалів від мікробного пошкодження використовують четвертинні солі нітрогенвмісних гетероциклічних сполук [1]. Зокрема досліджено пригнічення корозійно-небезпечних угруповань сульфатвідновлювальних та залізівідновлювальних бактерій солями триазолоазепінію [2].

Тому метою роботи було дослідження антибактеріальних властивостей деяких четвертинних солей триазолоазепінію щодо амоніфікувальних бактерій корозійно-небезпечного угруповання.



Матеріали і методи

В дослідженнях використали накопичувальну культуру АМБ (після п'яти пасажів на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) за умов періодичного культивування [8]), отриману нами з феросфери сталльної труби, що кородувала. Титр бактерій складав 10^5 кл/мл середовища. Чутливість тест-культури АМБ до сполук досліджували методом дифузії в агар з використанням стерильних паперових дисків [4], змочених 0,05%, 0,1%, 0,2% та 1,0%-ними спиртовими розчинами четвертинних солей триазолоазепінію. За діаметром зони пригнічення росту мікроорганізмів визначали їх чутливість до досліджуваних сполук. Обрані концентрації застосовуються при вивченні біоцидних властивостей органічних сполук і зумовлені їх розчинністю.

Для визначення токсичної дії похідних щодо культури АМБ, використали метод серійних розведень [4]. Розведення здійснювали в МПБ. В пробірки з розведеннями досліджуваних сполук (в 100 та 200 разів меншими за 1,0%-ний розчин: 0,01% та 0,005%, відповідно) вносили по 0,5 мл 4-х добової культури АМБ з титром 10^5 кл/мл середовища і інкубували протягом 4-х діб в термостаті за температури 28 °С. По закінченню інкубації в контролі та дослідних пробірках чашковим методом визначали чисельність бактерій та відсоток життєздатних мікроорганізмів, що характеризує ступінь токсичності присутніх у розчині органічних сполук [9].

Четвертинні триазолоазепінієві солі (табл. 1) отримано на кафедрі хімії Чернігівського державного педагогічного університету імені Т.Г. Шевченка під керівництвом д. фарм. н. Демченка А.М. [3]. Склад та будова сполук підтверджені сучасними методами фізико-хімічного аналізу.

При обробці одержаних даних використали методи математичної статистики [5]. Чисельність мікроорганізмів на рідкому поживному середовищі визначали за допомогою таблиць Мак-Креді [8]. Діаметр зон пригнічення росту бактерій визначали з урахуванням середнього квадратичного відхилення [5]. Відносна похибка представлених даних не перевищує 10%.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження антибактеріальних властивостей четвертинних солей триазолоазепінію до накопичувальної культури амоніфікувальних бактерій наведено в таблиці 1 та на рисунку 1.

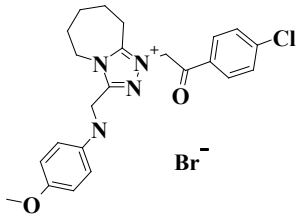
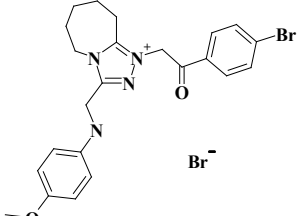
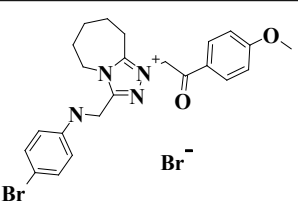
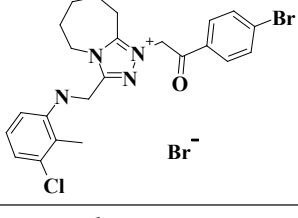
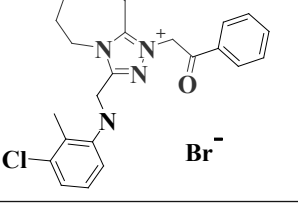
Сполука I, яка містить пара-хлорфенацильний фрагмент та параметоксианілінометильний фрагмент, в концентраціях досліджених за диско-дифузійним методом, не пригнічує ріст АМБ.



Таблиця 1
Антимікробна дія четвертинних солей триазолоазепінію (диско-дифузійний метод)

Table 1

Antimicrobial action of quaternary salts of triazoloazepinium
(the method of disk-diffusion)

Сполука		Діаметр зон пригнічення росту (мм) при відповідній концентрації речовини				
По- зна- чен- ня	Формула	Назва	0,05%	0,1%	0,2%	1,0%
I		Бромід 1-[2-(4-хлорофеніл)-2-оксоетил]-3-(4-метоксианілінометил)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,5-а]азепінію-1	*	*	*	—
II		Бромід 1-[2-(4-бромфеніл)-2-оксоетил]-3-(4-метоксианілінометил)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,5-а]азепінію-1	10,0±0,4	14,5±0,9	—	10,3±0,7
III		Бромід 3-(4-бromoанілінометил)-1-[2-(4-метоксифеніл)-2-оксоетил]-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,5-а]азепінію-1	—	11,0±0,1	34,0±1,3	28,3±1,2
IV		Бромід 1-[2-(4-бромфеніл)-2-оксоетил]-3-(3-хлоро-2-метиланілінометил)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,5-а]азепінію-1	*	*	**11,0±0,9	**38,3±3,2
V		Бромід 3-(3-хлоро-2-метиланілінометил)-1-(2-оксо-2-фенілетил)-6,7,8,9-тетрагідро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,5-а]азепінію-1	13,3±0,8	13,7±0,7	—	—

Примітка: * — ріст бактерій не пригнічений;

** — в зоні пригнічення окремі колонії;

— — дослідження не проводились.



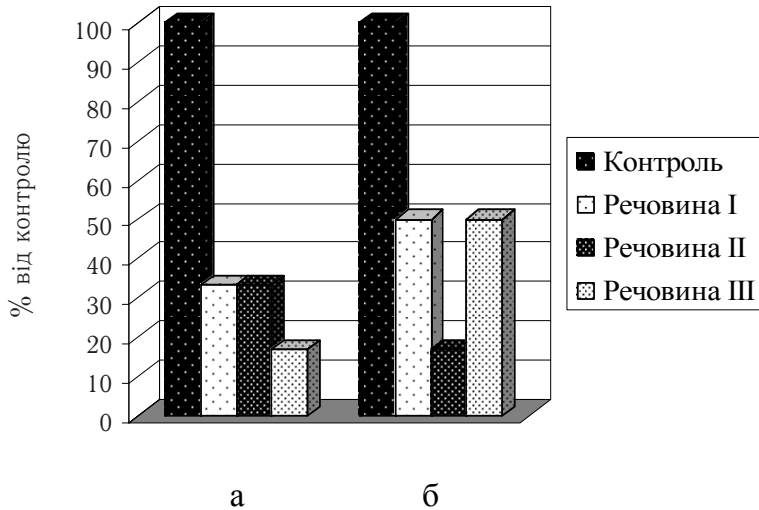


Рис. 1. Вживання амоніфікувальних бактерій корозійно небезпечного угруповання при дії четвертинних солей триазолоазепінію
а) концентрація 0,01%; б) концентрація 0,005%.

Fig. 1. Survival of ammonifying bacteria of corrosion-dangerous community under action of quaternary salts of triazoloazepinium
а) concentration 0,01%; б) concentration 0,005%

Але методом серійних розведень визначено, що виживання бактерій при дії похідного в концентрації 0,01% становить 33,3%, а в концентрації 0,005% — 50,0%.

Заміна пара-хлорфенацильного фрагмента на пара-бромфенацильний (сполука II) забезпечує незначне посилення біоцидних властивостей. Так, АМБ проявили слабку чутливість до сполуки II. Діаметр зони пригнічення росту бактерій становить 10,0–14,5 мм. При цьому збільшення концентрації речовини не підвищує бактерицидну дію сполуки. Виживання бактерій тест-культури при концентрації сполуки 0,01% становить 33,3%, а при 0,005% — 16,7%.

Біоцидна дія похідних залежить від положення замісників. Так, стереоізомером сполуки II є сполука III, яка містить пара-метоксифенацильний фрагмент та пара-броманіліновий фрагмент. Сполука III проявляє значні біоцидні властивості щодо АМБ — при концентраціях 0,2% та 1,0% діаметр зони пригнічення росту бактерій становить $34,0 \pm 1,3$ мм та $28,3 \pm 1,2$ мм, відповідно. Виживання бактерій при концентрації сполуки 114,0 мкг/мл — 16,7%, а при концентрації 56,8 мкг/мл — 50%.

Порівняльний аналіз антибактеріальних властивостей сполук-аналогів IV та V показав, що введення бром у пара-положення фенацильного фрагменту та 2-метил-3-хлоранілінового фрагменту в третє положення гетероциклічної системи посилює біоцидні властивості речовини щодо АМБ. Так, діаметр зони пригнічення росту АМБ речовиною IV в

концентрації 1,0% становить $38,3 \pm 3,2$ мм, хоча в зоні пригнічення є поодинокі колонії. Це вказує на бактеріостатичну дію сполуки.

Таким чином, антибактеріальні властивості четвертинних триазолоазепінієвих солей щодо амоніфікувальних бактерій, виділених з феросфери, максимальні у випадку введення до гетероциклічної системи пара-метоксифенацильного фрагменту в перше положення та пара-броманілінового фрагменту в третє положення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Герасименко А.А. Защита машин от биоповреждений / А.А. Герасименко— М.: Машиностроение, 1984. — 112 с.
2. Демченко Н.Р. Біоцидна дія четвертинних триазолоазепінієвих солей на корозійно небезпечні мікробні угруповання / Н.Р. Демченко, І.М. Курмакова, О.П. Третяк // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Біологія. — 2007. — Випуск 20. — С. 18–21.
3. Демченко Н.Р. Синтез и противокоррозионное действие четвертичных солей [1,2,4]триазоло[4,3-а]азепиния / Н.Р. Демченко, В.А. Серый, А.П. Третяк, А.М. Демченко // XXI Українська конференція з органічної хімії. Тези доповідей. Чернігів, 1–5 жовтня 2007 р. — С. 142.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках / Н.С. Егоров — М.: Высш. шк., 1969. — 479 с.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин — М.: Высш. шк., 1973. — 343 с.
6. Мікробна корозія підземних споруд / [К.І. Андреюк, І.П. Козлова, Ж.П. Коптева та ін.] — Київ: Наукова думка, 2005. — 260 с.
7. Пуріш Л.М. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі / Л.М. Пуріш, Л.Г. Асауленко // Мікробіол. журн. — 2007. — Т. 69, № 6. — С. 19–25.
8. Романенко В.И. Экология микроорганизмов пресных водоёмов / В.И. Романенко, С.И. Кузнецов — Л.: Наука, 1974. — 193 с.
9. Ямборко Н.А. Стійкість мікробних угруповань ґрунту до генотоксичного впливу деяких пестицидів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / Н.А. Ямборко — Київ, 2005. — 22 с.
10. Lewandowski Z. Structure and Function of Biofilms / Z. Lewandowski // Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control / Ed. by L.V. Evans. — Harwood: Harwood Acad. Publ., 2000. — P. 1–17.

Н.В. Ткачук, Н.Р. Демченко

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

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЧЕТВЕРТИЧНЫХ СОЛЕЙ ТРИАЗОЛОАЗЕПИНИЯ НА АММОНИФИЦИРУЮЩИЕ БАКТЕРИИ КОРРОЗИОННО-ОПАСНОГО СООБЩЕСТВА

Реферат

Исследовано антибактериальные свойства четвертичных солей триазолоазепиния к аммонифицирующим бактериям, выделенным из ферросферы — зоны непосредственного прилегания почвы к поверхности металла подземной конструкции. Установлено высокое токсическое действие производного с пара-метоксифенацильным фрагментом в первом положении гетероциклической системы и пара-броманилиновым фрагментом в третьем положении.

К л ю ч е в ы е с л о в а : аммонифицирующие бактерии, биоциды, четвертичные соли триазолоазепиния.

N.B. Tkachuk, N.R. Demchenko

Chernigiv National Pedagogical University,
53, G. Polubotka Str., Chernihiv, 14013, Ukraine,
tel.: +38 (04622) 3 21 06, e-mail: smykun_nata@list.ru

ANTIBACTERIAL ACTION OF QUATERNARY SALTS OF TRIAZOLOAZEPINIUM TO AMMONIFYING BACTERIA OF CORROSION-DANGEROUS COMMUNITY

Summary

Antibacterial action of some quaternary salts of triazoloazepinium to ammonifying bacteria isolated from ferrosphere — the zone of directly soil adjoining to the metal surface of underground construction has been investigated. It was determined a high toxical influence of the derivative with para-metoxifenacil fragment in the first regulation of heterocyclic system and with para-bromaniline fragment on the third regulation of the system.

Key words : ammonifying bacteria, biocides, quaternary salts of triazoloazepinium.



УДК 57.083.18:57.085.2:591.29:664—405

**І.В. Страшнова, З.Є. Захарієва, Ю.Ю. Дуденко, А.О. Данилова,
В.О. Іваниця**

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

ВПЛИВ ХАРЧОВИХ ВОЛОКОН НА МІКРОБІОТУ ТОВСТОЇ КИШКИ У ЩУРІВ З АЛОКСАНОВИМ ДІАБЕТОМ

*Встановлено, що таксономічний склад мікробіоти товстої кишки здорових щурів і щурів з алоксановим діабетом представлений мікроорганізмами родів *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* і *Candida*. Кількість бактерій родів *Lactobacillus* і *Escherichia* у товстій кишці здорових щурів була вищою, ніж у тварин з алоксановим діабетом, у яких у більшій кількості виявлено мікроорганізми родів *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*. За споживання харчових волокон із бурякового жому як у здорових щурів, так і у щурів з алоксановим діабетом спостерігалось збільшення кількості бактерій родів *Lactobacillus* і *Escherichia*.*

Ключові слова: мікроорганізми, товста кишка, щурі, алоксановий діабет, харчові волокна.

У хворих цукровим діабетом досить часто спостерігаються різні клінічні прояви, пов'язані із ураженнями шлунково-кишкового тракту (ШКТ), у тому числі із розвитком дисбактеріозу. Для усунення дисбактеріозу необхідна корекція мікробіоти кишечника [1, 3, 4].

У цьому аспекті важливу роль відіграють про- і пребіотичні препарати. Стимулювання ними біохімічної активності біоценозу кишечника здатне індукувати корисні ефекти не тільки на рівні ШКТ, але й на рівні організму загалом, тобто викликати системні ефекти і нормалізувати співвідношення мікроорганізмів [5, 12, 13]. Споживання пребіотиків, до яких відносяться і харчові волокна (ХВ), вибірково стимулює розвиток корисних для організму представників кишкової мікробіоти, до яких, у першу чергу, відносяться біфідобактерії і лактобацили [2, 7].

Відомо, що тварини, у тому числі і щурі, є моделлю для проведення багатьох експериментальних досліджень, результати яких потім екстраполюються на людей [9].



Метою роботи було дослідити вплив харчових волокон із буряково-го жому на кількісний і таксономічний склад мікробіоти товстої кишки фізіологічно здорових щурів і щурів з алоксановим діабетом.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були білі лабораторні щурі. Всі дослідження проводили згідно норм, встановлених законом України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та норм, прийнятих Європейською конвенцією по захисту хребетних тварин, що використовуються з експериментальною та науковою метою від 20.09.1985 [10].

Усі експериментальні тварини були розділені на 4 групи і утримувалися на стандартному збалансованому раціоні віварію. Перша група (контрольна) була представлена здоровими тваринами ($n = 10$), другу групу склали щурі з алоксановим діабетом ($n = 10$), третю — здорові щурі, які отримували протягом чотирьох тижнів, окрім стандартного корму, ХВ ($n = 40$), четверту — щурі з алоксановим діабетом, які разом зі стандартним раціоном отримували протягом чотирьох тижнів ХВ ($n = 40$).

Алоксановий діабет є однією з експериментальних моделей інсулін-залежного цукрового діабету і широко використовується для вивчення різних порушень при даній патології [9].

Експериментальну гіперглікемію моделювали внутрішньочеревним введенням 1% водного розчину алоксангідрату у дозі 10 мг/100 г для індукування слабкого цукрового діабету, через три тижні повторно вводили 1,5% водний розчин алоксангідрату у дозі 15 мг/100 г для індукування діабету середньої важкості з поступовим розвитком важкої форми діабету.

ХВ попередньо дробно стерилізували при 50–60 °С протягом семи днів. Додавали до основної їжі у кількості 5% від маси раціону.

Посівним матеріалом були зразки змивів з товстої кишки щурів. Для цього стерильними ножицями відрізали 20 см дистального відділу кишки, подрібнювали на шматочки розмірами 1 см і переносили у 20 мл стерильного фізіологічного розчину. Перемішували протягом 10–15 хв. при кімнатній температурі. Після цього готували серію розведень до 10^{-7} .

Посіви проводили на середовища: МПА — для обліку загального мікробного числа (ЗМЧ), Ендо — для виявлення бактерій групи кишкової палички (БГКП), MRS — молочнокислих бактерій (МКБ). На МПА посіви проводили із розведень 10^{-7} , на середовища Ендо і MRS — із розведень 10^{-5} . Усі посіви були зроблені у трьох повторах і культивувалися при 37–39 °С протягом 1–3 діб з щоденним обліком результатів.

Кількісний склад мікроорганізмів визначали за формулою:

$$M = \bar{a} \cdot 10^n / V, \text{ де}$$



M — кількість колонієутворюючих одиниць мікроорганізмів у мілілітрі змиву з кишки (КУО/мл); \bar{a} — середнє число колоній на паралельних чашках; 10^n — розведення; V — об'єм посівного матеріалу.

Після отримання чистих культур виділених мікроорганізмів вивчали їх основні біологічні властивості і проводили ідентифікацію [8, 11].

Отримані дані статистично обробляли з використанням програми «Excel XP» за загальноприйнятими методиками з урахуванням t -критерію Стьюдента, рівень вірогідності становив 95%, $n = 3$ [6].

Результати та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що як ЗМЧ, так і кількість БГКП і МКБ у здорових щурів була більшою, ніж у щурів з алоксановим діабетом. При цьому ЗМЧ і кількість БГКП була більшою приблизно на 3 порядки, а кількість МКБ — на 2 порядки (табл. 1).

Таблиця 1
Кількісний склад мікробіоти товстої кишки щурів, Іг КУО/мл

Table 1
The quantities composition of the microbiota of rats large intestine, Іg CFU/ml

Група мікроорганізмів	Здорові щурі	Щурі з алоксановим діабетом
ЗМЧ	11,96±0,04	8,90±0,12
БГКП	8,90±1,02	5,96±0,38
МКБ	6,91±0,44	4,89±1,22

Дослідження таксономічного складу мікробіоти товстої кишки щурів показало, що вона представлена бактеріями родів *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* і дріжджеподібними грибами роду *Candida* (табл. 2).

Таблиця 2
Таксономічний склад мікробіоти товстої кишки щурів

Table 2
The taxonomic composition of the microbiota of rats large intestine

Рід	Кількість мікроорганізмів, Іг КУО/мл	
	Здорові щурі	Щурі з алоксановим діабетом
<i>Lactobacillus</i>	5,69±0,12	3,17±0,36
<i>Escherichia</i>	6,35±0,28	4,75±0,12
<i>Enterococcus</i>	1,50±0,32	1,80±0,24
<i>Enterobacter</i>	1,51±0,41	0,00
<i>Staphylococcus</i>	1,54±0,22	0,84±0,14
<i>Proteus</i>	1,39±0,30	1,53±0,52
<i>Bacillus</i>	1,53±0,27	2,06±0,44
<i>Candida</i>	1,34±0,21	1,79±0,48

Таксономічний склад мікробіоти як здорових тварин, так і тварин з алоксановим діабетом був майже однаковим (виключення склали представники роду *Enterobacter*, які із товстої кишки тварин з алоксановим діабетом не виділялися).

Основні відмінності виявилися у кількісному співвідношенні виділених мікроорганізмів. У тварин з алоксановим діабетом у значно меншій кількості у кишечнику виявлені представники нормальної мікробіоти (бактерії родів *Lactobacillus* і *Escherichia*). Якщо у здорових щурів бактерії цих родів були виявлені у кількості $5,69 \pm 0,12$ lg КУО/мл і $6,35 \pm 0,28$ lg КУО/мл, відповідно, то у тварин з алоксановим діабетом — $3,17 \pm 0,36$ lg КУО/мл і $4,75 \pm 0,12$ lg КУО/мл, відповідно. Привертає увагу, що у щурів з алоксановим діабетом спостерігали у більшій кількості умовно-патогенні мікроорганізми (представники родів *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*).

Можливо, зменшення кількості представників нормобіоти у товстій кишці щурів з алоксановим діабетом пов'язано як з порушенням обміну речовин (зокрема вуглеводного обміну), так і з порушеннями цілісності і деформацією слизової оболонки, які мають місце за даної патології, що є сприятливим фактором для розмноження умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів.

Дані літератури свідчать, що споживання ХВ підвищує опірність організму до екстремальних впливів довкілля, покращує моторну діяльність кишечника і стан мікробіоценозу у ньому [5, 7, 13].

При додаванні ХВ із жому до основного раціону щурів відмічали збільшення основних мікробіологічних показників: ЗМЧ, БГКП і МКБ (рис. а, б).

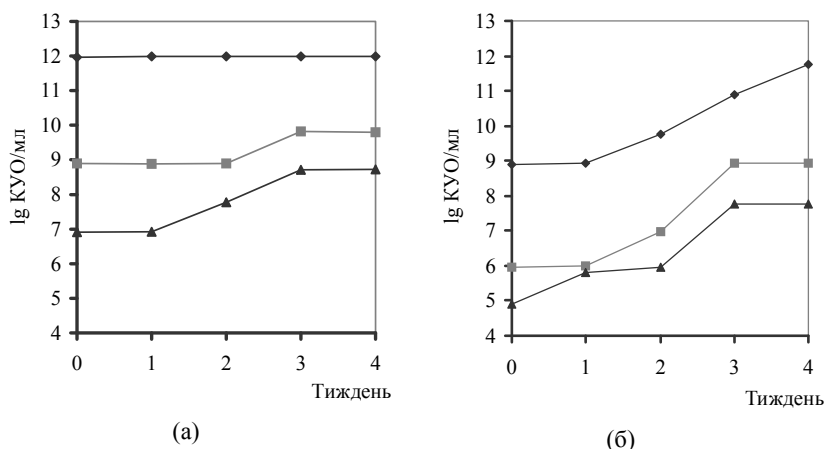


Рис. Зміна кількісного складу мікробіоти товстої кишки фізіологічно здорових щурів (а) і щурів з алоксановим діабетом (б) під впливом харчових волокон

Fig. Change the quantities composition of the microbiota of large intestine of physiologically healthy rats (a) and rats with alloxan diabetes (b) rats under the influence of dietary fibres



У здорових щурів протягом всього терміну експерименту (чотири тижні) додавання волокон майже не вплинуло на ЗМЧ. Якщо до вживання цієї добавки ЗМЧ становило $11,96 \pm 0,04$ lg КУО/мл, то через тиждень споживання — $11,98 \pm 0,60$ lg КУО/мл, а через чотири тижні — $11,99 \pm 0,60$ lg КУО/мл (рис. а).

Кількість БГКП протягом двох тижнів споживання здоровими щурами ХВ практично була такою самою, як у здорових щурів, у раціон яких вони не додавалися (рис. а). Кількість БГКП почала збільшуватися, починаючи з третього тижня експерименту.

Кількість МКБ після тижня годівлі щурів волокнами практично не змінилась у порівнянні з кількістю цих мікроорганізмів, що була визначена при споживанні щурами стандартного корму (рис. а). Однак, починаючи з другого тижня, кількість МКБ поступово почала збільшуватися і після четвертого тижня вживання волокон склала $8,72 \pm 0,25$ lg КУО/мл.

Отже, при вживанні здоровими щурами ХВ спостерігалось збільшення кількості МКБ і БГКП, починаючи з другого і третього тижня експерименту, відповідно. При цьому кількість цих мікроорганізмів не перевищувала допустимі для щурів норми [8].

У тварин з алоксановим діабетом, вживання ХВ протягом першого тижня не призвело до суттєвих змін ЗМЧ (рис. б). Але під час подальшого проведення експерименту спостерігали збільшення ЗМЧ кожного наступного тижня. Через чотири тижні цей показник збільшився до $11,77 \pm 0,10$ lg КУО/мл.

Для БГКП у товстій кишці щурів з алоксановим діабетом, які вживали волокна, відмічено подібну закономірність, як і для ЗМЧ. Кількість бактерій цієї групи, як і ЗМЧ, почала збільшуватися з другого тижня вживання цієї добавки і через чотири тижні визначена на рівні $8,94 \pm 0,21$ lg КУО/мл.

Відносно МКБ, то їх кількість почала збільшуватися вже через тиждень вживання волокон. Через тиждень кількість МКБ у товстій кишці тварин з алоксановим діабетом становила $5,80 \pm 0,21$ lg КУО/мл (рис. б), що на порядок вище, ніж цей же показник хворих щурів, які знаходились на звичайному годуванні. Вже після четвертого тижня цей показник збільшився до $7,78 \pm 0,19$ lg КУО/мл.

Отже, вживання щурами з алоксановим діабетом біологічно активних добавок у вигляді ХВ із бурякового жому сприяло збільшенню ЗМЧ, МКБ та помірного збільшенню БГКП.

Визначення таксономічного складу мікроорганізмів товстої кишки проводили через чотири тижні введення до раціону щурів ХВ із жому.

Таксономічний склад мікробіоти товстої кишки як хворих, так і здорових щурів за умови вживання волокон був представлений у значній кількості бактеріями родів *Escherichia* і *Lactobacillus* (табл. 3).

Таблиця 3

Таксономічний склад мікробіоти щурів
після 4-х тижневого вживання харчових волокон

Table 3

The taxonomic composition of the microbiota of rats
after 4-week consumption of dietary fibres

Рід	Кількість мікроорганізмів, Іг КУО/мл	
	Здорові щурі	Щурі з алоксановим діабетом
<i>Lactobacillus</i>	7,37±0,12	6,31±0,10
<i>Escherichia</i>	8,72±0,22	6,88±1,15
<i>Enterococcus</i>	1,46±0,10	1,59±0,13
<i>Enterobacter</i>	1,06±0,12	1,05±0,14
<i>Proteus</i>	0,00	0,45±0,06
<i>Bacillus</i>	2,54±0,11	2,70±0,30
<i>Candida</i>	0,00	0,45±0,07

Бактерії інших родів були виявлені у незначній кількості. У здорових щурів, на відміну від хворих на алоксановий діабет, не були виявлені бактерії роду *Proteus* і гриби роду *Candida*. Вживання волокон призвело до зникнення у товстій кишці як здорових, так і хворих щурів бактерій роду *Staphylococcus*.

Порівнюючи отримані дані щодо таксономічного складу мікробіоти товстої кишки у здорових і хворих щурів, в раціон яких було введено харчові волокна (табл. 3), зі складом мікроорганізмів щурів на стандартному раціоні (табл. 2), можна відмітити, що додавання волокон призвело до збільшення кількості бактерій нормальної мікробіоти (*Lactobacillus* та *Escherichia*), які є природними мешканцями товстої кишки і відіграють велику роль у формуванні складу нормобіоти і підтримуванні загального стану організму через нормалізацію роботи ШКТ і імунної системи. Таким чином, у результаті проведених досліджень показано позитивний вплив ХВ із бурякового жому на склад мікробіоти товстої кишки щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воронин А. А., Тараненко Л. А., Сидоренко С. В. Лечение дисбактериоза кишечника у детей, больных сахарным диабетом // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — № 3. — С. 22–24.

2. Ипатов А. Г., Кочеткова А. А., Нечаев А. П., Тарасова В. В., Филатова А. А. Пищевые волокна в продуктах питания // Пищевая промышленность. — 2007. — № 5. — С. 8–10.



3. *Касаткина Э. П.*, Воронин А. А., Тараненко Л. А. Особенности микробиоценоза кишечника у детей, больных сахарным диабетом // Журн. микробиол. — 1996. — № 6. — С. 84–85.

4. *Козыренко Ю. В.* Фармакологическая коррекция нарушений биоценоза кишечника у больных сахарным диабетом 2 типа: Дис... канд. мед. наук. — Волгоград, 2009. — 107 с.

5. *Коршунов В. М.*, Ефимов Б. А., Пикина А. П. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционального питания и коррекции микрофлоры кишечника // Журн. микробиол. — 2000. — 3. — С. 86–91.

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

7. *Малкоц А. В.*, Бельшер С. В. Пребиотики и их роль в формировании кишечной микрофлоры // Педиатрия. — 2009. — т. 87, № 4. — С. 34–41.

8. *Методы* общей бактериологии: В 3 т. / Пер. с англ. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1983. — 264 с.

9. *Пальчикова Н. А.*, Бгатова Н. П. Влияние приема пробиотика «Биовестин — лакто» на течение аллоксанового диабета и структуру слизистой оболочки экспериментальных животных // Бюллетень СО РАМН. — 2006. — т. 119, № 1. — С. 67–71.

10. *Резніков О.* Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5–7.

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

12. *Floch M. H.*, Hong-Curtiss J. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders // Curr. Gastroenterol. Rep. — 2001. — 3, № 4. — P. 343–350.

13. *Roberfroid M. B.* Prebiotics: preferential substrates for specific germs? // Am. J. Clin.Nutr. — 2001. — 73 (suppl). — P. 406–409.

И.В. Страшнова, З.Е. Захариева, Ю.Ю. Дуденко, А.О. Данилова, В.А. Иваниця

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

ВЛИЯНИЕ ПИЩЕВЫХ ВОЛОКОН НА МИКРОБИОТУ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Реферат

Показано, что таксономический состав микробиоты толстой кишки здоровых крыс и крыс с аллоксановым диабетом был представлен микроорганизмами родов *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* и *Candida*. Количество бактерий родов *Lactobacillus* и *Escherichia* в толстой кишке здоровых крыс было больше, чем у животных с аллоксановым диабетом, у которых в большем количестве выявлены микроорганизмы родов *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*. Употребление пищевых волокон из сахарной свеклы положительно повлияло на увеличение количества бактерий родов *Lactobacillus* и *Escherichia* как у здоровых крыс, так и у крыс с аллоксановым диабетом.

Ключевые слова: микроорганизмы, толстая кишка, крысы, аллоксановый диабет, пищевые волокна.

I.V. Strashnova, Z.E. Zacharieva, J.J. Dudenko, A.O. Danilova, V.O. Ivanytsia

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

EFFECT OF DIETARY FIBRES ON MICROBIOTA LARGE INTESTINE OF SICK AT ALLOXAN DIABETES RATS

Summary

It was shown that the taxonomic composition of the large intestine of healthy rats and rats with alloxan diabetes was presented by microorganisms genera *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus* and *Candida*. The number of bacteria genera *Lactobacillus* and *Escherichia* in the intestine of healthy rats was higher than animals with alloxan diabetes in the intestine which in large quantities identified bacteria of genera *Staphylococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Candida*. Use of dietary fibers from sugar beet had a positive impact on increasing the number of bacteria genera *Lactobacillus* and *Escherichia* both healthy rats and rats with alloxan diabetes.

Key words: microorganisms, large intestine, rats, alloxan diabetes, dietary fibers.



ЮВІЛЕЇ ТА ДАТИ

ANNIVERSARY DATES



ВІТАЄМО З ЮВІЛЕЄМ!

Доктору біологічних наук, професору кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова, провідному вченому в галузі імунології та фармакології Тетяні Олегівні Філіповій у червні 2010 року виповнилося 60 років від дня народження. Т.О. Філіпова є заступником головного редактора наукового журналу «Мікробіологія і біотехнологія», вченим секретарем спеціалізованої ради по захисту докторських дисертацій за спеціальностями «Біохімія», «Екологія», «Біотехнологія».

Народилася Тетяна Олегівна у родині військовослужбовців. Після закінчення середньої школи у 1967 р. з золотою медаллю вступила до Одеського державного університету імені І.І.Мечникова, який закінчила з відзнакою. Весь подальший творчий шлях Тетяни Олегівни від аспірантських досліджень до наукових вершин пов'язаний з цим університетом. У 1975 р. вона була прийнята на роботу молодшим науковим співробітником кафедри біохімії, потім вступила до аспірантури. Дослідження імуномодулюючої дії тілорону і низки хімічно споріднених сполук стали підґрунтям для кандидатської дисертації, яку вона захистила в 1983 р. у Москві. Займаючись питаннями імунофармакології нових синтетичних імуномодуляторів, у 1996 р. Тетяна Олегівна здобула вчений ступінь доктора біологічних наук. Весь цей час вона працювала у Проблемній



науково-дослідній лабораторії синтезу нових лікарських препаратів, зростаючи від молодшого до провідного наукового співробітника. Захоплена романтикою наукового пізнання глибинних механізмів впливу лікарських препаратів на клітинному рівні, з часом Тетяна Олегівна поширює коло своїх наукових інтересів, переходячи від макрооб'єктів до мікроорганізмів. З 2000 р. обіймає посаду професора кафедри мікробіології і вірусології. Т.О. Філіпова — визнаний викладач-новатор та вихователь молоді, нею розроблено спеціальні курси: «Основи фармакології», «Вакцини і сироватки», «Клінічна імунологія», «Основи наукових досліджень», курс «Імунологія для біологів». Педагогічна діяльність Т.О. Філіпової оцінена нагородами, їй присвоєно почесне звання «Відмінник освіти». Водночас з педагогічною практикою Тетяна Олегівна приділяє багато уваги науковій діяльності та підготовці наукових кадрів. Під її керівництвом захищено 5 кандидатських дисертацій, а також низка магістерських та кваліфікаційних робіт.

Вона є автором понад 150 наукових праць, серед яких 8 авторських свідоцтв і 2 патенти. За цими цифрами — натхнення і кропітка праця, роздуми й міркування, наукові узагальнення.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова для Тетяни Олегівни — це не тільки робота, але й рідний дім, в який вона несе свій ентузіазм, невичерпну енергію, де ділить зі своїми колегами труднощі й радощі. За це ті, хто працює і спілкується з нею, віддячують щирою повагою та любов'ю.

Тетяна Олегівна має заслужений авторитет серед колег і студентів, є всебічно ерудованою людиною, у якій поєднується талант педагога й організатора з такими людськими рисами, як скромність, працелюбність, порядність та доброзичливість.

Щиро вітаємо Тетяну Олегівну Філіпову з ювілеєм і бажаємо невичерпної енергії, міцного здоров'я, творчого натхнення та подальших успіхів.

*Редколегія та редакція журналу
«Мікробіологія і біотехнологія»,
колектив кафедри мікробіології і вірусології
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова,
колектив Біотехнологічного
науково-навчального Центру*



ВІТАЄМО З ЮВІЛЕЄМ!



Редколегія та редакція наукового журналу «Мікробіологія і біотехнологія», колектив кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова щиро вітають з ювілеєм випускницю кафедри

Людмилу Дмитрівну Варбанець

завідувача відділу біохімії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, доктора біологічних наук, професора, лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки, лауреата премії імені Д.К. Заболотного. Ваші наукові праці широко відомі не тільки в Україні, але й за її межами. Ви зробили вагомий внесок у розвиток досліджень у галузі біохімії мікроорганізмів.

Висловлюємо Вам свою повагу і бажаємо щастя, міцного здоров'я, творчої наснаги. Так нехай і надалі мудрість та ентузіазм, невтомність та наполегливість сприяють реалізації усіх Ваших задумів та здійсненню мрій і сподівань на благо України.



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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

До друку приймаються статті (2 примірники) обсягом не більше 10 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації,



реферату, списку літератури), огляди — до 15 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

До рукопису додається електронний варіант статті на дискеті або дисконі (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 аббревіатури 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.

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

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

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

На тези доповідей



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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



INFORMATION FOR THE AUTHORS

Scientific journal «Microbiology and biotechnology» invites you to spotlight

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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



- short communications — at most 2 pages.

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

Contents of manuscript

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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



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

Books

Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. — 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

