

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

**№ 3(11)
2010**

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 3

•
2010

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsia

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

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

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

PUBLISHERS

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

A d d r e s s:

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

www.mbt.onu.edu.ua

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 3



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. Патика, В.С. Підгорський, В.К. Позур, В.П. Поліщук, А.А. Сибірний, Ю.М. Сиволап, І.Г. Скрипаль, М.Я. Співак, Ф.І. Товкач, В.М. Тоцький, В.О. Федоренко, І.С. Щербатенко

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

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

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

ВИДАВЦІ

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

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

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

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39, 748-11-01

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

www.mbt.onu.edu.ua

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- B.N. Galkin, T.O. Filipova**
CYTOCHROME P-450S: I. GENERAL AND EVOLUTIONARY ASPECTS.. 8

EXPERIMENTAL WORKS

- L.A. Babenko, A.Iu. Skorobogatov, A.L. Dubrovsky,
O.I. Kornelyuk**
BACTERIAL EXPRESSION OPTIMISATION OF ANTITUMOR
CYTOKINE EMAP II IN *ESCHERICHIA COLI BL21(DE3) PLYSE
CELLS* 21
- I.O. Maliarchyk, T.O. Filipova, B.M. Galkin**
BIOFILM FORMATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
SALMONELLA ENTERITIDIS AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
IN PRESENCE OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-BENZENSULFONAMIDE
DERIVATIVES 32
- L.V. Avdeeva, A.I. Osadcha, L.A. Safronova, V.M. Ilyash,
M.A. Kharkhota**
LIPASES BACTERIA ACTIVITY OF GENUS *BACILLUS* 41
- M.B. Galkin, S.V. Vodsinsky, F.M. Kirichenko, V.O. Ivanytsia**
THE PECULIARITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853
BIOFILM FORMATION AT THE DARK OR PHOTOINDUCED ACTION
OF BISMUTH-CONTAINING PORPHYRINS 51
- I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush**
PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS OF GREEN SULFUR BACTERIA
OF *CHLOROBIUM LIMICOLA* YA-2002 UNDER THE INFLUENCE
OF HEAVY METALS SALTS..... 61
- L.V. Avdeeva, A.I. Osadchaya, L.A. Safronova, V.M. Ilyash,
M.A. Kharkhota**
PECTOLITIC BACTERIA ACTIVITY OF GENUS *BACILLUS*..... 71
- S.V. Prichodko, E.S. Bondar, I.N. Kurmakova, A.P. Tretyak**
GROWTH OF CORROSIVE DANGEROUS BACTERIA
IN THE PRESENCE OF THE 2,4-D PESTICIDE..... 79
- T. Krivitska, O. Bagaeva, S. Uzhevskaya, N. Nepomyascha,
V. Ivanytsia**
THE CHARACTERISTIC OF BACTERIAL STRAINS OF GENUS
BACILLUS WITH LARVAECYDE ACTION TO *FUNGUS MIDGES
BRADYSIA PILISTRIATA* FREY (SCIARIDAE) 86

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

ЦИТОХРОМИ P-450: І. ЗАГАЛЬНІ І ЕВОЛЮЦІЙНІ АСПЕКТИ..... 8

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

Л.А. Бабенко, О.Ю. Скоробогатов, О.Л. Дубровський,

О.І. Корнелюк

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ПРОТИПУХЛИННОГО
ЦИТОКІНА ЕМАР ІІ В КЛІТИНАХ *ESCHERICHIA COLI BL21 (DE3)*
PLYSE 21

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

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
SALMONELLA ENTERITIDIS І *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
ЗА ПРИСУТНОСТІ ПОХІДНИХ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-
БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ 32

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

М.А. Хархота

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ..41

М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, Г.М. Кириченко, В.О. Іваниця

ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA ATCC 27853 ПРИ ТЕМНОВОМУ ТА
ФОТОІНДУКОВАНОМУ ВПЛИВІ ВІСМУТ-МІСТКИХ
ПОРФІРИНІВ 51

І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш

ПІГМЕНТИ ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ЗЕЛЕНИХ СІРКОБАКТЕРІЙ
CHLOROBIVUM LIMICOLA YA-2002 ЗА ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ
МЕТАЛІВ 61

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

М.А. Хархота

ПЕКТОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДА *BACILLUS*..... 71

С.В. Приходько, О.С. Бондар, І.М. Курмакова, О.П. Третьак

РІСТ КОРОЗІЙНО НЕБЕЗПЕЧНИХ БАКТЕРІЙ ЗА ПРИСУТНОСТІ
ПЕСТИЦИДУ 2,4-Д..... 79

Т.М. Кривицька, О.С. Багаєва, С.П. Ужевська, Н.М. Непомяща,

В.О. Іваниця

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*
З ЛАРВІЦИДНОЮ АКТИВНІСТЮ ДО ГРИБНИХ КОМАРИКІВ
BRADYSIA PILISTRATA FREY (SCIARIDAE) 86

PAGES OF HISTORY

V. O. Kuznetsov

A.A. VERIGO SCIENTIFIC ACTIVITY IN THE FIELD OF MICROBIOLOGY IN THE UNIVERSITY OF ODESSA (NOVOROSIYSKY UNIVERSITY) (1837–1905)	95
--	----

THE CHRONICLE OF A SCIENTIFIC LIFE

V SUMMER SCHOOL «MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY» IN ODESA NATIONAL MECHNIKOV UNIVERSITY	105
IN MEMORY OF KOZHANOVA GALYNA ANDRIYVNA	107
INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	110

СТОРІНКИ ІСТОРІЇ

В.О. Кузнецов

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОФЕСОРА О.А. ВЕРІГО (1837—1905) В ОДЕСЬКОМУ (НОВОРОСІЙСЬКОМУ) УНІВЕРСИТЕТІ.....	95
---	----

ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

V ЛІТНЯ ШКОЛА «МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» В ОДЕСЬКОМУ НАЦІОНАЛЬНОМУ УНІВЕРСИТЕТІ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА.....	105
ПАМ'ЯТІ ГАЛИНИ АНДРІЇВНИ КОЖАНОВОЇ.....	107
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	110

УДК 577.151.3

Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова

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

ЦИТОХРОМИ P-450: I. ЗАГАЛЬНІ І ЕВОЛЮЦІЙНІ АСПЕКТИ

У статті представлено огляд сучасних наукових публікацій, в яких наведені дані про молекулярну структуру, механізми монооксигеназного каталізу, генетику, систематику, еволюційне походження родин цитохромів P-450 у різних видів прокаріот і еукаріот і їх біологічні функції. Проведено порівняльний аналіз родин цитохромів P-450.

Ключові слова: цитохром P-450, монооксигенази, гени CYP, НАДФН-цитохром P-450 редуктаза, ферредоксини, НАДН-ферредоксин редуктаза.

Дещо більше ніж п'ятдесят років тому був відкритий цитохром P-450. Вченими Гарфінкелем і Кліненбергом [16, 21] було встановлено, що ендоплазматичний ретикулум печінки експериментальних тварин містить невідому пігментну речовину, яка, відновлюючись, приєднує окис вуглецю і утворює комплекс з максимумом поглинання при 450 нм. У 1962–1964 роках японськими вченими Омура і Сато також був знайдений та виділений цей пігмент [30, 31]. Пізніше така структура була названа P-450, а після визначення її гемопротейнової природи — цитохромом P-450. Свою назву він отримав наступним чином: латинська літера P означає, що цей пігмент був вперше знайдений у Філадельфії (Philadelphia), але літеру h було відкинуто; цифра 450 відображає максимум поглинання відновленої форми пігменту з монооксидом вуглецю. За класифікацією цей гемопротейд відноситься до цитохромів групи b. Цитохроми b містять в собі протопорфірин IX. Згодом виявилось, що цитохром P-450 є термінальною оксидазою групи ферментних комплексів, які належать до монооксигеназ (гідроксилаз). Вони поширені у живій природі, оскільки виявлені у різних живих істот від бактерій до людини [3].

Найбільш дивовижною властивістю цитохром P-450 залежних ферментів є те, що вони окиснюють велике коло природних субстратів [4, 24] і практично всі ксенобіотики [1]. Тому цитохром P-450 вивчають біохіміки,



генетики, мікробіологи, екологи, токсикологи та фармакологи. Деякий час усі монооксигенази, залежні від цитохрому P-450, які каталізували гідроксилування найрізноманітніших сполук, називалися оксидазами змішаних функцій [10].

Цитохром P-450 залежні ферменти відносяться до класу оксидоредуктаз, підкласу монооксигеназ, тому що вони каталізують пряму реакцію між своїми субстратами та киснем. Цитохром P-450 залежні ферменти приєднують один атом кисню до субстрату, другий відновлюють до води. Такі ензими називають монооксигеназами. Простетичною групою цих ферментів є гем (протогем). У гемі 4 лігандних групи порфірину утворюють комплекс із залізом, і він має плоску будову, а 5 і 6 координаційні зв'язки розташовані перпендикулярно до площини порфіринового кільця. Наприклад, у гемоглобіні 5 положення зайнято імідазольною групою гістидину, а 6 залишається незаміщеним, або заміщується киснем. Природа 5 і 6 лігандів у цитохрому P-450 остаточно не з'ясована. Відомо, що хімічні моделі ферменту, де 5 лігандом є атом сірки, а 6 — азот імідазолу, краще за все моделюють властивості цього гемопротейну. Тому, будучи за структурою гему цитохромом групи b, він відрізняється, як вже зазначалося вище, 5 аксіальним лігандом, яким є сірка цистеїну [2, 9]. Таким чином, ми бачимо, що цитохром P-450 за своїми функціями не відповідає класу цитохромів, тому Номенклатурною Комісією Міжнародного Союзу біохіміків та молекулярних біологів (NC-IUBMB) рекомендовано цей фермент називати гем-тіолатний протеїн P-450 замість цитохром P-450 [29].

Білкова частина різних ізоформ цитохрому P-450 відрізняється амінокислотним складом, але всі вони мають консервативну ділянку у кінцевій карбоксильній групі, що містить 26 амінокислотних залишків.

Існують відмінності в електрон-транспортній системі цитохрому P-450. Одні використовують НАДФН-цитохром P-450 редуктазу — це печінкові цитохроми ссавців і вони, як правило, пов'язані з катаболічними процесами. Інші використовують FAD-місткі редуктази, залізо-сірчані ферредоксини і вони, як правило, пов'язані з наднирковими залозами (мітохондріальні форми P450), що беруть участь у біосинтезі стероїдів (анаболічні процеси). Усі, крім одного з відомих бактеріальних P-450, використовують аналогічну систему. Винятком є P-450 BM-3 з *Bacillus megaterium*, що використовує НАДФН-цитохром P-450 редуктазу, яка аналогічна печінковим цитохромам ссавців [15].

Незважаючи на те, що цитохром P-450 залежні ферменти з різноманітних біологічних джерел відрізняються один від одного, існує певна послідовність реакцій, за яких гемопротейни взаємодіють з субстратами, киснем та донорами електронів [2]. Цей процес можливо уявити, як коло п'яти послідовних реакцій:

1. Взаємодія форми цитохрому P-450 (Fe^{3+}) з субстратом;



2. Відновлення утворюваного фермент-субстратного комплексу в НАДФН — специфічній системі переносу електронів;

3. Взаємодія атмосферного кисню з комплексом цитохром Р-450 (Fe^{2+}) — субстрат та утворення потрійного комплексу цитохром Р-450 (Fe^{2+}) — субстрат — O_2 ;

4. Активація молекулярного кисню в окисненому комплексі шляхом його відновлення;

5. Розпад комплексу на окисний цитохром Р-450 і окисний субстрат.

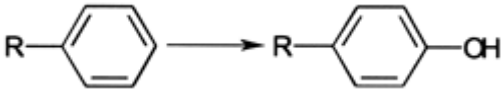
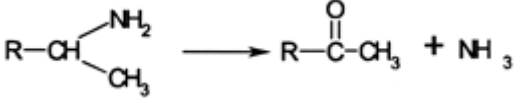
Кількість субстратів, які залучаються до монооксигеназного каталізу дуже велика, тому прийнято їх підрозділяти на певні типи реакцій (табл. 1) [7].

Таблиця 1

Типи реакцій монооксигеназного каталізу [7]

Table 1

Types of monoxygenes catalysis reactions [7]

Аліфатичне гідроксинювання	$\text{R-CH}_3 \rightarrow \text{R-CH}_2\text{OH}$
Епоксидування	$\text{R-CH=CH-R} \longrightarrow \text{R-CH(O)-CH-R}$
Ароматичне гідроксинювання	
Окиснювальне дезалкілювання	
N-деалкілювання	$\text{R-NHCH}_3 \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{CH}_2\text{O}$
O-деалкілювання	$\text{R-O-CH}_3 \rightarrow \text{R-OH} + \text{CH}_2\text{O}$
S-деалкілювання	$\text{R-S-CH}_3 \rightarrow \text{R-SH} + \text{CH}_2\text{O}$
N — окиснення	
Первинні аміни	$\text{R-NH}_2 \rightarrow \text{RNHOH}$
Вторинні аміни	$\text{R}_1\text{R}_2\text{-NH} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{-NOH}$
Третинні аміни	$\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{-N} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{-N=O}$
S-окиснення	$\text{R}_1\text{R}_2\text{-S} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{-S=O}$
Дезамінування	
Десульфурвання	$\text{R}_1\text{R}_2\text{-C=S} \rightarrow \text{R}_1\text{R}_2\text{-C=O}$
Дегалогенування	$\text{R-CH}_2\text{Cl} \rightarrow \text{R-CH}_2\text{OH}$



Виходячи з хімічної структури субстратів та продуктів їх окиснення (метаболітів), очевидно, що такі реакції можуть здійснюватися, як з ендогенними, так і з чужорідними (ксенобіотиками) сполуками. До ендогенних сполук відносяться стероїди, жовчні кислоти, жирні кислоти, простагландини, лейкотрієни, біогенні аміни, ретиноїди, гідропероксили ліпідів [4, 6, 24].

У рослин цитохром P-450 каталізує реакції окиснення ендогенних сполук, які відповідають за смак, запах та забарвлення (пігмент) квіток [3].

Цитохром P-450 метаболізує практично усі ксенобіотики. З фізіологічної точки зору, реакції гідроксилування ксенобіотиків спрямовані на захист живих систем від накопичення в них гідрофобних сполук.

Проте в багатьох випадках ці процеси призводять до появи проміжних реакційно активних метаболітів, продуктів неповного відновлення кисню, які хімічно модифікують макромолекули і стимулюють реакції перекисного окиснення ліпідів. Усе це є причиною прояву різних видів токсичності, канцерогенезу та мутагенезу [5]. Виходячи з вище написаного, можна зробити висновок, що цитохром P-450 відіграє велику роль у метаболізмі клітин живих істот.

Основним постулатом ферментативної теорії є субстратна специфічність ферментів. Вона може бути абсолютною, чи відносно широкою. Все ж таки, важко припустити, що каталітичне окиснення різних за хімічною структурою сполук може здійснюватися одним цитохромом P-450 залежним ферментом. Для доказу існування цитохрому P-450 в різних ізоформах були використані його індуктори. Першою хімічною сполукою, яка потім стала класичним індуктором цитохрому P-450, є фенобарбітал (клас барбітуратів). Він активував не тільки монооксигеназні реакції, залежні від гемопротейду, але і посилював синтез самого цитохрому P-450. Потім з'ясувалося, що не всі монооксигеназні реакції активуються за тривалої дії фенобарбіталу. Наприклад, ферментні реакції, які метаболізують поліциклічні вуглеводні (бензопірен, метилхолантрен та ін.), не активуються при дії цього барбітурату, але за тривалого введення 3-метилхолантрени метаболізм поліциклічних вуглеводнів прискорювався у 2–3 рази. При цьому в мікросомах печінки експериментальних тварин з'являвся новий пігмент, який у відновленій формі зв'язувався з монооксидом вуглецю і мав максимум поглинання при 446–448 нм. Крім того, у цих форм була різна молекулярна маса. Цей новий цитохром отримав назву цитохром P-448 [8]. У подальшому було встановлено, що індукцію монооксигеназ викликає велика кількість хімічних сполук, які відносяться до різних класів органічних речовин, але всі вони мали одну властивість: усі ці сполуки були гідрофобними, тому у значних кількостях накопичувались у клітинах. Таким чином, тривалий контакт субстрату і ферменту призводить до індукції цього ензиму. Було зроблено припущення, що індукція в своїй основі носить пристосувальний характер, оскільки призводить до збільшення швидкості метаболізму ксенобіотиків, тобто до прискорення



їх елімінації з клітин [7]. Надалі було показано, що цитохром P-450 існує у множинних формах, а ці форми, в порівнянні з іншими ферментами, мають відносно невисоку субстратну специфічність. З кожним роком кількість відомих ізоформ цитохрому P-450 збільшувалась і автори, які відкривали нові форми гемопротейну, давали їм різні назви. Причому, одна і та ж ізоформа цитохрому P-450 у різних авторів носила різні найменування. Така ситуація дуже ускладнювала дослідження в цій галузі науки. Тому у кінці 80-х — на початку 90-х років XX століття за допомогою сучасних методів молекулярної біології і молекулярної генетики була створена уніфікована класифікація ізоформ цитохрому P-450 [17, 29]. Ця молекулярна класифікація не тільки дозволила навести лад у назвах ізоформ цитохрому P-450, але і вивчити еволюцію родин цитохромів P-450. За основу класифікації ізоформ гемопротейнів був прийнятий постулат молекулярної біології „один ген — один білок”, який в ензимології звучить як „один ген — один фермент”. Із цього постулату випливає, що всі ізоформи цитохрому P-450 кодуються різними генами, але всі гени мають спільне історичне походження. Незважаючи на те, що ізоформи цитохрому P-450 мають різні амінокислотні послідовності, все ж існують основні принципи схожості складу білкової молекули, тому ці закономірності були використані для сучасної класифікації цитохромів P-450.

Причому, певні форми P-450 можуть бути конститутивними, а інші індукцибельними. Для ізоформ цитохрому P-450 характерною особливістю є експресія генів. Методами білкової хімії (очищення ферментів, визначення їх амінокислотного складу та ін.), а також молекулярної біології (імунохімічних методів), генної інженерії (перенос гену у *E. coli* і суперекспресія, яка дає змогу накопичувати фермент для аналізу) в даний час встановлена велика кількість ізоформ цитохрому P-450 і їх генів (табл. 2).

Для позначення цитохромів P-450 використовують аббревіатуру CYP (cytochrom P-450). Гени і продукти їх експресії (mRNA, cDNA) також позначаються CYP. Усі цитохроми P-450 називаються надродиною, яка підрозділяється на родини. Сюди входять білки, які мають близько 40% подібності амінокислотного складу і позначаються цифрою (1, 2, 3 і т. ін.). Підродини — білки з амінокислотною подібністю 65%. Для їх позначення використовують літери латинського алфавіту (A, B, C і т. ін.).

Всередині підродини білки мають схожість більш ніж на 65% і це, як правило, індивідуальні ферменти (ізоформи). Вони позначаються цифрою, що стоїть після літери (1A1; 3B3; 3C4 тощо). До теперішнього моменту відомо більш ніж 175 родин цитохромів P-450 [29]. З точки зору філогенезу ця класифікація не дуже справедлива, тому що родини цитохромів P-450 хребетних отримали перші номери. Наприклад, CYP1, CYP2, CYP3, а родини бактерій отримали останні номери CYP101-175, при цьому прокаріоти більш давні організми, ніж рослини, безхребетні та хребетні.



Кількість родин цитохромів P-450

The number of cytochrome P-450 families

Таксономічна одиниця	Кількість видів	Кількість родин цитохромів P-450	Підродини цитохромів P-450
Хребетні	1607	69	169
Безхребетні	1675	59	338
Рослини	4266	126	464
Гриби	2570	459	1011
Протисти	247	62	119
Бактерії	905	196	409
Археї	22	12	14
Віруси	2 (мінівіруси)	2	2
Загальна	11294	977	2519

Усі родини цитохромів P-450 виконують у клітинах різних організмів свої специфічні функції. Від метаболізму ксенобіотиків до синтезу ендогенних регуляторів. Наприклад, CYP1 — знайдений у більшості хребетних, каталізує реакції метаболізму поліциклічних вуглеводнів, ароматичних амінів та індукується диоксином, метилхолантреном; CYP2 — знайдений у хребетних та безхребетних (комах), каталізує різні чужорідні сполуки; CYP3 — знайдений у хребетних, каталізує метаболізм ліків та ксенобіотиків; CYP4 — метаболізує жирні кислоти у хребетних, а у комах його функція ще досі не вивчена; CYP5 — у хребетних бере участь у біосинтезі тромбоксану A_2 , одного з регуляторів системи коагуляції крові, а у комах каталізує метаболізм речовин рослинного походження; CYP11, 17, 19, 21, 24, 27 — беруть участь у синтезі та метаболізмі гормонів; CYP51–CYP62 — знайдені у мікроскопічних та макроскопічних грибів; CYP101–196 знайдені у різних видів прокариот. Більш детальну інформацію про функції родин цитохромів P-450 можна отримати у статті М.Я. Головенко [7]. Існують також різні ресурси в Інтернеті, на яких дана повна молекулярна структура всіх відомих на сьогодні родин цитохромів P-450. Структури і функції бактеріальних цитохромів P-450 будуть розглянуті і проаналізовані у наступній статті.

Успіхи у сучасній класифікації родин цитохромів P-450, яка спирається на молекулярно-біологічну і молекулярно-генетичну базу, дозволили створити філогенетичне дерево еволюції цитохромів P-450. Відомо, що функціонально подібні ферменти у філогенетично віддалених видів зберігають загальні елементи структури, але у них можуть істотно розрізнятися

послідовності. Проте загальною властивістю для таких білків є те, що вони не мають змін у амінокислотній послідовності в області активного центру. Ймовірно, будь-яка заміна на цій ділянці або змінює здатність цього ферменту до зв'язування субстрату, або призводить до втрати цього сайту, який бере участь у каталітичному процесі. Отже, передачу ознак з модифікацією можна легко оцінити за дивергенцією амінокислотної послідовності гомологічних білків, тобто на основі обчисленої кількості мутацій у кодонах. Темпи таких мутацій, які змінюють амінокислотні послідовності, різні для окремих родин. Існує багато схем, які визначають спорідненість окремих родин цитохромів Р-450. [12, 26, 28]. Найбільш відомою є схема, в якій основні родини або окремі ізоформи розбиті на вісім (I–VIII) груп. Вони послідовно пов'язані один з одним. Поділ на групи базується на гомології у поліпептидних ланцюгах. До I групи (5 генів) відносяться гемопротейни, чотири з них присутні в організмах хребетних тварин, а СYP18 виявлений тільки у комах. Група II представлена кластером із 13 генів, що зустрічаються у рослин. Група III складається із 6 генів, і вона характерна для безхребетних тварин. До групи IV входять 5 генів, до них відносяться цитохроми Р-450, що каталізують окислення жирних кислот в організмах прокариотів і еукаріотів. Сім генів групи V кодують мітохондріальні цитохроми Р-450, що забезпечують окиснення стероїдів. Чотири гени, які відносяться до групи VI, знайдені у рослинах і є рослинними цитохромами Р-450. Шість генів групи VII були знайдені тільки у грибів. В групі VIII знаходяться 7 генів, це цитохроми Р-450, що відносяться до різних таксономічних розділів [26, 28].

Як вже було зазначено вище, цитохром Р-450 залежні монооксигенази відносяться до класу оксидоредуктаз і є ферментами аеробного метаболізму. Тому історично він міг з'явитися тільки тоді, коли у прокариотів виник аеробний обмін речовин. Найдавніша форма цитохрому Р-450 виникла десь 1 млрд. 360 млн. років тому в протерозойську еру в мезопротерозойський період [28]. Це був цитохром Р-450 ціанобактерій, який є найбільш стародавнім гемопротейном у надродині цитохрому Р-450 [35]. В цьому періоді вміст кисню в атмосфері становив приблизно 1%. Це є так звана „точка Пастера”. Вважається, що така концентрація кисню достатня для того, щоб забезпечити стійку життєдіяльність одноклітинних аеробних організмів. Основними живими істотами в цей період були бактерії, ціанобактерії та нижчі гриби. Крім того, вже стали виникати еукаріотні клітини. Автори [26] роблять припущення, що у цьому періоді цитохром Р-450 використовувався для метаболізму холестерину в ендоплазматичному ретикулумі та мітохондріях. У прокариот немає мембранної системи і практично відсутня ця речовина, але є холестериноподібні сполуки, які носять назву гопаноїдів. В еукаріотних клітинах вже з'являється мембранна система, а мітохондрії, з точки зору симбіотичної теорії виникнення еукаріот, є предками бактерій [22]. Приблизно 900 млн. років тому з'явилися форми цитохрому Р-450, які почали брати участь у метаболізмі



ксенобіотиків. Ці ферменти носять назву мікосомальних монооксигеназ, тому що вони розташовані в ендоплазматичному ретикулумі. Приблизно 800 млн. років тому мікосомальні ферменти поділилися на дві родини: CYP1A — індуктором цієї родини є 3-метилхолантрен, бензопірен та терахлордиоксин [19]; CYP2B — індуктором цієї родини є фенобарбітал та інші барбітурати [11]. Перше прискорення темпів еволюції цитохрому P-450 відбулося десь у кінці мезозойської ери, коли виникли птахи та ссавці. Друге і останнє прискорення еволюції цього ферменту відбулося десь 65 млн. років тому у кайнозойську еру, в палеогенному періоді. Це пов'язано з бурхливим розквітом ссавців.

Цитохром P-450-залежні монооксигеназні системи можна розділити на два основних типи: мікосомальні і бактеріальні/мітохондріальні [14]. З іншого боку, класифікацію цитохром P-450-залежних систем, можна створити, виходячи з кількості їх білкових компонентів (рис.) [12]. Мітохондріальна і більша частина бактеріальних цитохром P-450- залежних систем складається з трьох білкових компонентів: флавопротеїд, в якому міститься ФАД (НАДН, НАДФН залежна редуктаза), залізо-сірчані білки (ферредоксини) і цитохром P-450. Еукаріотні мікосомальні системи цитохрому P-450 складаються тільки з двох компонентів, флавопротеїду, що містять ФАД і ФМН (НАДФН-залежна P-450 редуктаза) і цитохром P-450. Прокаріотна 2-компонентна монооксигеназна система цитохрому P-450 є у *Streptomyces carbophilus* [34]. Ця система складається з гемопротеїну P-450 і НАДН-залежної P-450 редуктази, яка містить ФАД і ФМН. Розчинна бактеріальна 1-компонентна монооксигеназна система залежна від цитохрому P-450 ВМ-3 (CYP102) з *Bacillus megaterium* існує як єдиний поліпептидний ланцюг з 2 функціональними доменами гему і флавіну [13]. При порівнянні амінокислотної послідовності цього поліпептидного ланцюга з функцією цієї системи було встановлено, що ці два домени більш схожі на 2-компонентну систему мікосомальних еукаріотних монооксигеназ цитохрому P-450, ніж на прокаріотну 3-компонентну систему [25].

Слід зазначити, що ця схема не враховує цитохром b₅, що входить в електрон-переносний ланцюг цитохром P-450 залежної монооксигеназної системи і служить ефектором і донором електронів [20]. Таким чином, всі ці різноманітні системи мають загальну архітектуру “окиснювально-відновного домену”. Було висловлено припущення, що домен ферменту НАДФН-P-450 редуктази виник під час злиття генів флаводоксину, який є гомологічним ФМН зв'язаному сайту, і доменом ферредоксин-НАДФ⁺ редуктази, що зв'язує НАДФН і ФАД [23]. Всі ці системи побудовані за принципами функціональної аналогії. (Fe-S залізо-сірчані білки і ФМН-зв'язуючі домени флаводоксину типу). Таким чином, предками 2-компонентної P-450 монооксигеназної системи могли бути щонайменше три різних білка.



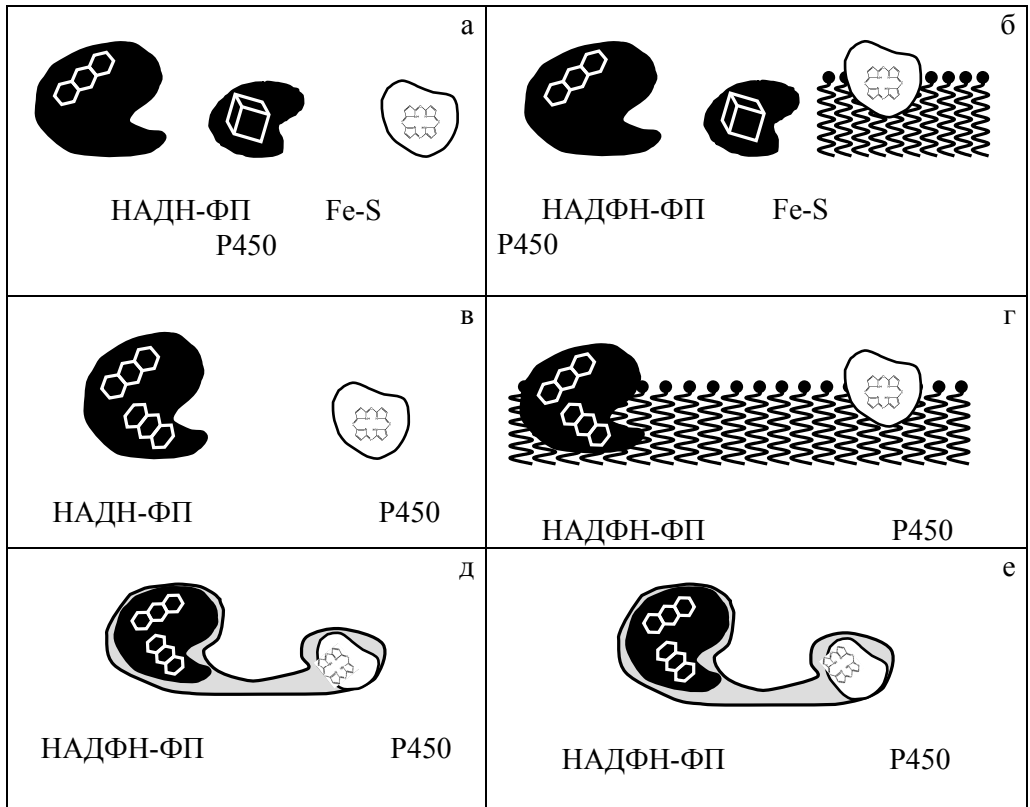


Рис. Класифікація монооксигеназних систем, що містять P-450 [15]

(а) Бактеріальна трьохкомпонентна система (*Pseudomonas putida*); (б) мітохондріальна трьохкомпонентна система; (в) бактеріальна двокомпонентна P-450 монооксигеназна система (*Streptomyces carbophilus*); (г) мікосомальна двокомпонентна P-450 монооксигеназна система; (д) бактеріальна однокомпонентна P-450 монооксигеназна система (*Bacillus megaterium* P-450_{BM-3}); (е) розчинна однокомпонентна P-450-подібна система (NO-синтаза). НАДН-ФП, НАДФН-ФП – НАДН-, НАДФН- залежні флавопротеїни, відповідно; Fe-S – залізо-сульфурний протеїн.

Fig. Classification of P450-containing monooxygenase systems [15]

(a) Bacterial three-component system (*Pseudomonas putida*); (b) mitochondrial three-component system; (c) bacterial two-component P-450 monooxygenase system (*Streptomyces carbophilus*); (d) microsomal two-component P-450 monooxygenase system; (e) bacterial one-component P-450 monooxygenase system (*Bacillus megaterium* P-450_{BM-3}); (f) soluble one-component P-450-like system (nitric oxide synthase). NADH-FP, NADPH-FP – NADH-, NADPH-dependent flavoproteins, respectively; Fe-S – iron-sulfur protein.

Злиття кодонів P-450 і P-450 НАДФН-редуктази, може призвести до появи 1-компонентної системи. Таким чином, система P-450_{BM-3}, повинна бути еволюційно найбільш «прогресивною». На базі цих даних можна зробити висновок, що еволюція монооксигеназної системи йшла шляхом зменшення кількості білків у цій системі. Механізми злиття прилеглих

генів предків легко собі уявити [18]. Наприклад, у *Pseudomonas sp.* гени, які кодують цитохром P-450, путідаредоксин і путідадоксин редуктазу прилягають один до одного [32]. Злиття сусідніх генів монофункціональних білків пов'язано з втратами інтронів у геномі еукаріот [27]. У ранніх предків в гені P-450 могло міститись більш ніж 100 міні-екзонів, які потім були перетворені, оскільки у древніх еукаріотних генів було встановлено 33 екзони. Показано, що існує взаємозв'язок між екзонами структурних областей НАДФН-редуктази і цитохрому P-450 [33]. В процесі еволюції, можливо, відбулася втрата деяких інтронів у цьому гені.

Встановлено, що структура НАДФН-редуктази більш консервативна, в той час, як структура ізоформ цитохромів P-450 менш консервативна.

При вивченні локалізації цитохром P-450 монооксигеназної системи також можна простежити певну еволюцію цієї системи. Так, за локалізацією у клітинах організмів цитохром P-450 монооксигеназну систему можна розділити на три групи:

1. Мікросоми печінки НАДФН—>Флавонопротеїд II—>Негеміновий Fe-білок—>Цитохром P-450—>O₂

2. Мітохондрії наднирок НАДФН—>Флавонопротеїд III—>Адрендоксин > Цитохром P-450—>O₂

3. Бактеріальні монооксигенази НАДФН—>Флавонопротеїд III—>Путідаредоксин—>Цитохром P-450—>O₂.

Усі компоненти першої групи зв'язані з мембраною. Компоненти другої групи, крім цитохрому P-450, розчинні компоненти. Усі компоненти третьої групи розчинні.

Виходячи із вище викладеного, можна зробити наступні висновки, що цитохром P-450 монооксигеназні ферменти є одними з найдревніших видів дихальних систем. Завдяки своїм властивостям вони відіграють велику роль у обміні речовин у клітинах (від бактерій до людини). Слід зазначити, що крім друкованої інформації за даною проблемою, існують також і спеціалізовані веб-ресурси, на яких можна отримати як загальні дані, так і дані по окремим ізоформам цитохрому P-450. Найбільш інформативним є сайт <http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>.

ЛІТЕРАТУРА

1. Арчаков А.И. Микросомальное окисление. — М.: Наука, 1975. — 327 с.
2. Головенко Н.Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. — К.: Наукова думка, 1981. — 220 с.
3. Головенко Н.Я., Карасева Т.Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. — К.: Наукова думка, 1983. — 200 с.
4. Головенко Н.Я., Галкин Б.Н. Цитохром P-450 зависимый путь окисления арахидоновой кислоты и ее метаболитов // Укр. биохим. ж. — 1985. — Т. 58, № 2. — С. 104–116.



5. Головенко М.Я. Ксенобіохімія — новий ступінь пізнання природи // Вісн. АН УРСР. — 1985. — № 6. — С. 24—33.

6. Головенко Н.Я., Галкін Б.Н. Биохимические механизмы простагландинсинтезазного окисления ксенобиотиков // Вопр. мед.хим. — 1986. — Т. 32, № 2. — С. 9—16.

7. Головенко Н.Я. Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P-450 // Проблемы современной токсикологии. — 2001. — Т. 4, № 3. — С. 32—40.

8. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. — Новосибирск: Наука, 1981. — 240 с.

9. Метелица Д.И. Активация кислорода ферментными системами. — М.: Наука, 1982. — 256 с.

10. Парк В.Ф. Биохимия чужеродных соединений. — М.: Медицина, 1973. — 287 с.

11. Agrawal A.K., Shapiro B.H. Phenobarbital-Imprinted Overinduction of Adult Constituent CYP Isoforms // Pharmacology. — 2003. — V. 68, № 4. — P. 204—215.

12. Archakov A., Zisitsa A., Zgoda V. et al. Censterization of P 450 superfamily using the objective pair alignment method and UPGMA program // Mol. Model. — 1998. — 28, № 4. — P. 153—158.

13. Boddupalli S.S., Estabrook R.W., Julian A. Peterson J.A. Fatty Acid Monooxygenation by Cytochrome P-450BM₃ // J. Biol. Chem. — 1990. — V. 265, № 8. — P. 4233—4239.

14. Coon M.J., White R.E. Dioxygen Binding and Activation by Metal Centers. — Wiley, New York, 1980. — P. 73—123.

15. Degtyarenko K.N., Archakov A.I. Molecular evolution of P450 superfamily and monooxygenase systems P450-containing // FEBS Letters. — 1993. — V. 332, № 1—2. — P. 1—8.

16. Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes // Arch. Biochem. and Biophys. — 1958. — V. 77, № 3. — P. 493—509.

17. Gonzalez F.J. The molecular biology of cytochrome P-450s // Pharmacol. Rev. — 1988. — V. 40, № 4. — P. 243—288.

18. Hardie D.G., Coggins J.R. In: Multidomain Proteins: Structure and Evolution. — Elsevier, Amsterdam, 1986. — P. 333—344.

19. Jones S.N., Jones P.G., Ibarguen H., et al. Induction of the Cypla-1 dioxin-responsive enhancer in transgenic mice // Nucleic Acids Research. — 1991. — V. 19, № 23. — P. 6547—6551.

20. Kanaeva I.P., Dedinskii I.R., Skotselyas E.D., Bachmanova G.I. Archakov A.I. Comparative study of monomeric reconstituted and membrane microsomal monooxygenase systems of the rabbit liver : I. Properties of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 LM2 (2B4) monomers // Arch. Biochem. and Biophys. — 1992. — V. 298, № 2. — P. 395—402.

21. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes // Arch. Biochem. and Biophys. — 1958. — V. 75, № 2. — P. 376—386.



22. *Kurland C.G., Andersson S.G.E.* Origin and Evolution of the Mitochondrial Proteome // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* — 2000. — V. 64, № 4. — P. 786–820.

23. *Miles J.S.* Structurally and functionally conserved regions of cytochrome P-450 reductase as targets for DNA amplification by the polymerase chain reaction. Cloning and nucleotide sequence of the *Schizosaccharomyces pombe* cDNA // *Biochem J.* — 1992. — V. 287, № 1. — P. 195–200.

24. *Murray M.* Microsomal cytochrome P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver // *Th J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.* — 1991. — V. 38, № 5. — P. 611–619.

25. *Narhi L.O., Fulco A.J.* Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* // *J. Biol. Chem.* — 1987. — V. 262, № 14. — P. 6683–6690.

26. *Nebert D.W., Gonzales F.J.* P 450 genes: Structure, evolution and regulation // *Annu. Rev. Biochem.* — 1987. — V. 56, № 3. — P. 572–593.

27. *Nebert D.W., Jones J.E, Owens J., Puga A.* In: *IOxidases and Related Redox Systems.* — Liss, New York, 1988. — P. 557–576.

28. *Nelson D.R., Strobel H.W.* Evolution of cytochrome P-450 proteins // *Mol. Biol. Evol.* — 1987. — V. 4, № 2. — P. 572–593.

29. *Nelson D., Koymans Z., Kamataki T., et al.* P 450 superfamily: update on new sequence, gene mapping, accession numbers and nomenclature // *Pharmacogenetics.* — 1996. — V. 6, № 1. — P. 1–42.

30. *Omura T., Sato R.* A new cytochrome on liver microsomes // *J. Biol. Chem.* — 1962. — V. 237, № 4. — P. 1375–1376.

31. *Omura T., Sato R.* The carbon monoxide-binding pigment on liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties // *J. Biol. Chem.* — 1964. — V. 239, № 7. — P. 2379–2385.

31. *Peterson J.A., Lu J-Y, Geisselsoderj J., Graham-Lorencell S. et al.* Cytochrome P-450_{tep}. Isolation and purification of the protein and cloning and sequencing of its operon // *J. Biol. Chem.* — 1992. — V. 267, № 20. — P. 14193–14203.

32. *Porter T.D. Beck T.W., Kasper Ch.B.* NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase gene organization correlates with structural domains of the protein // *Biochem.* — 1990. — V. 29, № 42. — P. 9814–9818.

33. *Serizawa N., Matsuoka T.* A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — V. 1084, № 1. — P. 35–40.

34. *Torres S., Fjetland C.R., Lammers P.J.* Alkane-induced expression, substrate binding profile, and immunolocalization of a cytochrome P450 encoded on the *nifD* excision element of *Anabaena 7120* // *BMC Microbiology.* — 2005. — V. 16, № 5. — P. 1–12.



Б.Н. Галкин, Т.О. Филипова

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

ЦИТОХРОМЫ P-450: I. ОБЩИЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ

Реферат

В статье представлен обзор современных научных публикаций, в которых приведены данные о молекулярной структуре, механизмах монооксигеназного катализа, генетике, систематике, эволюционном происхождении семейств цитохромов P-450 у разных видов прокариот и эукариот, а также их биологические функции. Проведён сравнительный анализ семейств цитохромов P-450.

Ключевые слова: цитохром P-450, монооксигеназы, гены CYP, НАДФН-цитохром P-450 редуктаза, ферредоксины, НАДН-ферредоксин редуктаза.

B.N. Galkin, T.O. Filipova

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

CYTOCHROME P-450S: I. GENERAL AND EVOLUTIONARY ASPECTS

Summary

The article provided the overview of current scientific publications, in which data on the molecular structure, monooxygenase catalysis mechanisms, genetics, systematics, evolutionary genesis of cytochrome P-450 families in different prokaryotes and eukaryotes species and their biological functions were presented. A comparative analysis of cytochrome P-450 families was shown.

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



УДК 579.222:577.217

Л.А. Бабенко^{1,2}, О.Ю. Скоробогатов², О.Л. Дубровський¹,
О.І. Корнелюк¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР ІІ В КЛІТИНАХ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)PLYSE

*ЕМАР ІІ (ендотеліальний моноцитаактивуючий поліпептид ІІ) – новий прозапальний антиангіогенний цитокін, який має протипухлинну дію. З метою розробки генно-інженерної технології отримання ЕМАР ІІ проведена оптимізація умов бактеріальної експресії клонованого в складі вектора рЕТ30а гена, що кодує ЕМАР ІІ. Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу ІПТГ цільового білка на його кінцевий вихід, встановлено оптимальний час культивування бактеріальної культури до та після додавання індуктора. Запропоновано схему культивування *E. coli* BL21(DE3)pLysE для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного цитокіна ЕМАР ІІ на рівні 110 мг з 1 л бактеріальної культури.*

Ключові слова: ЕМАР ІІ, бактеріальна система експресії, оптимізація експресії, антипухлинний цитокін.

Сучасні генно-інженерні біотехнології широко використовуються для отримання рекомбінантних білків в препаративних кількостях як нових терапевтичних препаратів для медицини. Для досягнення ефективної експресії рекомбінантних білків в прокаріотних системах необхідна розробка оптимальної системи експресії для кожного білка, оскільки універсальної стратегії оптимізації експресії клонованих генів не існує [1]. Незважаючи на значні успіхи молекулярної біотехнології в отриманні рекомбінантних терапевтичних білків, іде постійний пошук нових білків – кандидатів для застосування в біомедицині. Першочерговою задачею є необхідність

розробки нових антипухлинних препаратів з низькою токсичністю для застосування в клінічній онкології.

EMAP II (endothelial monocyte-activating polypeptide-II) — це мультифункціональний цитокін, який утворюється в злоякісних пухлинах ссавців завдяки посттрансляційному процесингу білка р43. Вперше він був виділений з фібросаркоми мишей, індукованою метилхолантреном [2, 3]. Виявлена здатність EMAP II пригнічувати міграцію ендотеліальних клітин, стимулювати їх апоптоз, впливати на активність моноцитів, нейтрофілів і макрофагів, сприяючи запальним процесам в пухлинах [3, 4]. На експериментальних моделях гліоми, саркоми, раки шлунку і підшлункової залози отримані докази його протипухлинної активності, що автори пояснюють перш за все антиангіогенними властивостями [4–6]. Виявлено також ефект гальмування рекомбінантним EMAP II росту ксенографтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей [7, 8]. Потенційна здатність EMAP II інгібувати неоангіогенез та стимулювати апоптоз ракових клітин є основою для його дослідження в якості нового протипухлинного лікарського засобу.

Метою даного дослідження було встановити умови високого рівня експресії рекомбінантного цитокіна EMAP II людини в бактеріальній системі шляхом здійснення підбору оптимальних умов культивування *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE та експресії цільового білка.

Матеріали і методи

Для суперпродукції цільового білка в роботі використаний штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. Штам трансформовано за загальноприйнятою методикою [9] сконструйованим нами плазмідним вектором рЕТ30а-EMAP II, у якого під контролем промотора фага T7 міститься ген, що кодує синтез цільового білка EMAP II. Генетичним маркером плазміди рЕТ30а є ген *kan*, що забезпечує стійкість трансформованих клітин до канаміцину.

Одиничну колонію штама-продуцента інокулювали в середовище Luria-Bertani (LB), яке містить 5 г дріжджового екстракту, 10 г триптон, 10 г NaCl в 1 л з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої концентрації в розчині 30 мкг/мл та нарощували протягом ночі. Нарощену культуру інокулювали в свіже середовище LB та культивували при температурі 37 °C та інтенсивній аерації (150 об/хв) до досягнення нею оптичної густини 0,6–1,3 (залежно від часу культивування культури). Оптичну густину ($ОГ_{600}$) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр Bio-Mate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Індукцію експресії рекомбінантного білка з промотора lacUV5 здійснювали шляхом додавання в культуральне середовище ізопропіл- β -тіогалактопіранозиду (ІПТГ) в концентраціях 0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ,



1,25 мМ та 1,5 мМ. Визначали час культивування бактеріальної культури до індукції (1, 2, 3 год) та після індукції експресії (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 год). Для підбору оптимального середовища культивування бактеріальної культури тестували такі середовища: середовище Luria-Bertani, м'ясо-пептонний бульйон (пептон, суміш амінокислот, Na_2CO_3 , NaCl) та мінімальне середовище А (глюкоза, тіамін, біотин, MgSO_4 , CaCl_2 , NH_4Cl , NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , солі заліза, цинку, міді, кобальту, бору, марганцю у якості мікроелементів).

Виділення та очистка рекомбінантного білка з клітин *E. coli*. На ультразвуковому дезінтеграторі проводили руйнування бактеріальних клітин (6 циклів: 20 сек сонікація, 20 сек перерва). Цільовий рекомбінантний білок ЕМАР II отримували із супернатанту лізованих клітин (буфер для лізису: 50 мМ Na-фосфат, 500 мМ NaCl , 10 мМ імідазол, 5 мМ β -меркаптоетанол). Очистку рекомбінантного білка проводили методом металхелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA-агарозою. Супернатант наносили на колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, США), цільовий білок елюювали буфером для елюції (50 мМ Na-фосфатний буфер, 150 мМ NaCl , 200 мМ імідазолу, 5 мМ β -меркаптоетанолу). Для фракцій, що містили цільовий білок, проводили діаліз.

Концентрацію очищеного білка визначали на спектрофотометрі BioMate-5, коефіцієнт оптичного поглинання рекомбінантного ЕМАР II на довжині хвилі 280 нм складає $8730 \text{ см}^{-1}\text{моль}^{-1}$ (0,377 мл/мг). Коефіцієнт оптичного поглинання визначали за даними амінокислотного аналізу за допомогою програми ProtParam (<http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

Аналіз бактеріальних білків проводили з допомогою SDS-гель-електрофорезу за методом Леммлі в денатуруючих умовах, використовуючи для їх розділення 12%-й поліакриламідний гель із 0,1% додецилсульфату натрію [10], використовуючи суміш маркерних білків фірми Fermentas (Литва). Гелі фарбували барвником Coomassie blue R-250. Вміст білків визначали денситометрично (денситометр LKB UltroScan XL, Швеція). При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0. Одержані результати представлені у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.

Отриманий рекомбінантний білок ЕМАР II (212 амінокислот, молекулярна маса 23 304 Da) розщеплювали специфічно ентерокиназою та очищали ЕМАР II від відщепленого фрагмента додатковим етапом металхелатуючої хроматографії на Ni-NTA-агарозі. В результаті отримували високочищений препарат ЕМАР II (169 а.з., молекулярна маса 18 535 Da) з чистотою біля 98% згідно даним електрофоретичного аналізу. Ізoeлектрична точка ЕМАР II складає $pI=6.36$, коефіцієнт оптичного поглинання на довжині хвилі 280 нм складає $8730 \text{ см}^{-1}\text{моль}^{-1}$ (0,471 мл/мг).

Результати та їх обговорення

Оптимізація умов культивування штамів-продуцентів рекомбінантних білків є важливою проблемою сучасної молекулярної біотехнології. Однчасне використання традиційних методів оптимізації зі специфічними підходами, які застосовуються для рекомбінантних штамів може суттєво підвищити вихід цільового продукту. Бактеріальні системи експресії найбільш широко використовуються серед інших систем білкової експресії завдяки їх простоті та дешевизні. Серед переваг бактеріальних систем зазначаються проста фізіологія, короткі проміжки між 2 поділами бактеріальних клітин — швидкий ріст та розмноження, високий вихід цільового продукту.

Система експресії на основі РНК-полімерази фага T7 є однією з найбільш ефективних прокариотних систем. На відміну від більшості бактеріальних та еукаріотних РНК-полімераз, T7 РНК полімераза складається з однієї субодиниці, і в той же час здатна здійснювати повний цикл транскрипції при відсутності додаткових білкових факторів. Найчастіше в ролі продуцента в таких системах виступає штам *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE* [9].

Ген РНК-полімерази фага T7 під контролем *lac* UV5 промотора локалізується в бактеріальній хромосомі, куди він інтегрований в складі фага λ . Індукція синтезу фагового фрагмента та наступна високоефективна транскрипція цільового гену в складі рекомбінантної плазміди спостерігаються після додавання в середовище культивування індуктора експресії ІПТГ [12, 13].

При проведенні оптимізації умов культивування штаму-продуценту цитокіна ЕМАР II ми враховували такі фактори, як концентрацію індуктора (ІПТГ), фазу росту клітин штаму-продуцента, часу додавання індуктора, склад культурального середовища, час культивування штаму-продуцента після додавання індуктора ІПТГ. Однією з проблем при експресії білків є підбір оптимального часу індукції, оскільки рання індукція призводить до більш низького виходу біомаси та цільового продукту. При пізній індукції спостерігається високий вихід біомаси та низький рівень накопичення рекомбінантного білка.

Не менш важливу роль відіграє і концентрація індуктора, що додається.

Для експресії цитокіна ЕМАР II максимальна кількість білка спостерігалась за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($OG_{600}=0,7-0,9$), що пояснюється ймовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази росту — логарифмічної фази росту (рис. 1).

Нами проведено дослідження рівня бактеріальної експресії білка ЕМАР II в залежності від концентрації індуктора ІПТГ та часу культивування культури *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysE* після індукції.



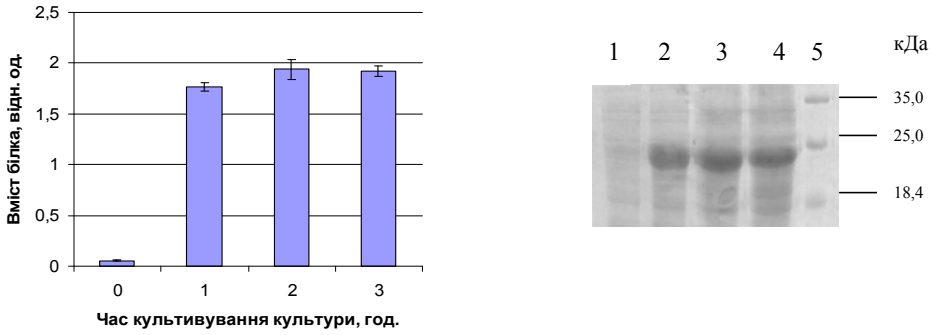


Рис. 1. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування бактеріальної культури до індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих при різному часі культивування. 1–4 – лізати до індукції (0, 1, 2, 3 год. культивування до індукції, відповідно); 5 – білковий маркер молекулярної маси («Fermentas», Литва).

Fig. 1. The level of expression of EMAP II protein depending on the time of cultivation of bacterial culture to the induction of: a) the dependence output protein of time of cultivation; b) electrophoretograms of proteins, obtained at different times of cultivation. 1 – without inducer; 2–4 – after induction (1, 2, 3 h of cultivation with inducer, respectively); 5 – protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania).

При підвищенні концентрації індуктора до 1,25 мМ спостерігалось зростання рівня експресії цільового білка, проте при подальшому збільшенні кількості ІПТГ ця тенденція втрачалась і спостерігався спад рівня експресії (рис. 2).

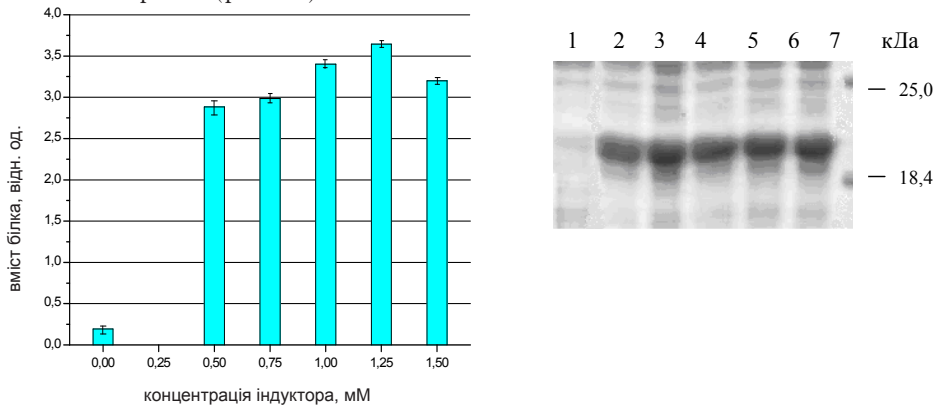


Рис. 2. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від кількості ІПТГ: а) залежність виходу білка від кількості індуктора; б) електрофореграма білків, отриманих при додаванні різної кількості ІПТГ. 1 – лізат до індукції; 2–6 – лізати після індукції (0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ, 1,25 мМ, 1,5 мМ ІПТГ, відповідно, 7 – білковий маркер молекулярної маси («Fermentas», Литва).

Fig. 2. The level of expression of EMAP II protein depending on the concentration IPTG: a) the dependence output protein of concentration of inducer; b) electrophoretograms of proteins, obtained by adding different amount of IPTG. 1 – without inducer; 2–6 – induced with 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM IPTG respectively; 7-protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania).

При дослідженні рівня експресії ЕМАР II в залежності від часу культивування культури після індукції нами встановлено, що найбільший приріст експресії цільового білка спостерігався при культивуванні культури 4,5 год. Подальше культивування бактеріальної культури приводило до незначного зниження біосинтезу цільового білка та суттєвого збільшення синтезу бактеріальних білків (рис. 3).

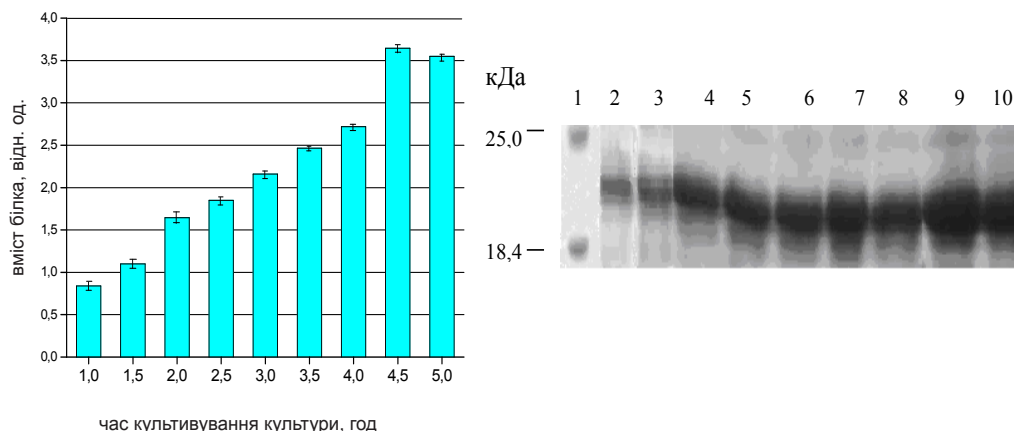


Рис. 3. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від часу культивування культури після індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих при різному часі культивування. 1 — білковий маркер молекулярної маси (“Fermentas”, Литва); 2–10 — лізати після індукції (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 год. культивування після індукції, відповідно).

Fig. 3. The level of expression of EMAP II protein depending on the time of cultivation of bacterial culture after induction: a) the dependence output protein of time of cultivation; b) electrophoretograms of proteins, obtained at different times of cultivation. 1 — protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania); 2–10 — after induction (1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 h of cultivation with inductor, respectively).

Слід зазначити, що накопичення в біомасі клітин цільового продукту при культивуванні рекомбінантних штамів-продуцентів залежить великою мірою від якості та складу субстратів. Якщо ростове середовище для бактеріальної культури підбрано оптимально, це дозволяє отримати найбільш високий рівень виходу цільового білка.

Нами проведено культивування бактерій на різних поживних середовищах В результаті проведеного дослідження встановлено, що найвищий рівень експресії рекомбінантного білка ЕМАР II спостерігався при вирощуванні на мінімальному середовищі А (рис. 4). Це дуже вигідно при культивуванні штама-продуцента у великих кількостях та промислового культивуванні. Найнижчий рівень експресії цільового продукту спостерігався при культивуванні штаму-продуценту на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) (рис. 4).

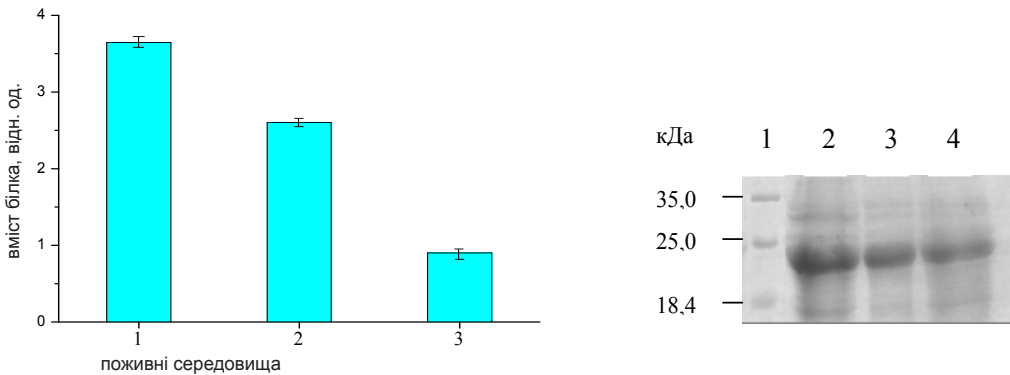


Рис. 4. Рівень експресії білка ЕМАР II залежно від середовища культивування бактеріальної культури: а) залежність виходу білка від середовища культивування: 1 – мінімальне середовище А; 2 – середовище LB; 3 – МПБ; б) електрофореграма білків, отриманих з різних середовищ: 1 – білковий маркер молекулярної маси (“Fermentas”, Литва); 2 – мінімальне середовище А; 3 – середовище LB; 4 – МПБ.

Fig. 4. The level of expression of EMAP II protein depending on cultivation medium: a) dependence of protein yield on cultivation medium: 1 – minimal medium A; 2 – LB; 3 – beef-extract agar; b) protein electroforetograms, obtained from different cultivation mediums: 1 – protein molecular weight marker (“Fermentas”, Lithuania); 2 – minimal medium A, 3 – LB, 4 – beef-extract agar.

Після проведення бактеріальної експресії здійснювали афінну очистку рекомбінантного білка ЕМАР II металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA агарозі. Концентрація білка після хроматографічного очищення складала 1,112 мг/мл для білка ЕМАР II із чистотою 95–98%. Вимір проводили у кварцевих кюветах з довжиною оптичного шляху 1 см. Коефіцієнт екстинкції визначали за даними амінокислотного аналізу за допомогою програми ProtParam (<http://expasy.ch/cgi-bin/protparam>).

Підвищено рівень експресії рекомбінантного цитокіна ЕМАР II шляхом здійснення підбору оптимальних умов культивування бактеріальної культури. Отримано рекомбінантний цитокін ЕМАР II високого рівня чистоти (рис. 5).

Отриманий рекомбінантний білок ЕМАР II специфічно розщеплювали ентерокиназою та додатково очищали ЕМАР II від відщепленого фрагмента металхелатуючою хроматографією на Ni-NTA-агарозі. В результаті отримували високоочищений препарат ЕМАР II, який використовували в біомедичних дослідженнях, в тому числі для інгібування росту ксенорафтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей [7, 8].

Таким чином, в результаті проведених досліджень досягнуто оптимізації бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II. Встановлено, що оптимальна кількість індуктора ІПТГ для експресії ЕМАР II становить 1,25 мМ, час культивування бактеріальної культури до та після індукції

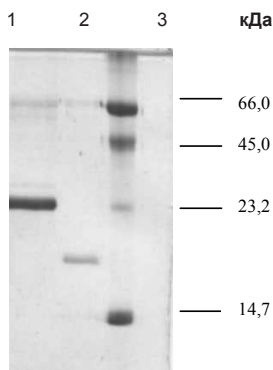


Рис. 5. Електрофоретичний контроль чистоти білка ЕМАР II (12%-ий розділяючий гель)

1 – рекомбінантний білок ЕМАР II; 2 – ЕМАР II після розщеплення ентерокиназою; 3 – білковий маркер (лізоцим, ЕМАР II, овальбумін, бичачий сивороточний альбумін).

Fig. 5. Electrophoretic control of protein EMAP II purity (SDS-12% PAGE):

1 – protein EMAP II; 2 – EMAP II after enterokinase cleavage; 3 – protein molecular weight marker (Lysozyme, EMAP II, ovalbuminum, Bovine Serum Albumin).

синтезу цільового білка становить 2 та 4,5 години, відповідно. Найбільш оптимальним середовищем для культивування є мінімальне середовище А. Вихід цільового білка – рекомбінантного ЕМАР II при бактеріальній експресії в культурі клітин *E. coli BL21(DE3)pLysE* складає близько 110 мг з 1 л культуральної рідини. Після розщеплення рекомбінантного ЕМАР II ентерокиназою та додаткового етапу хроматографічної очистки отримали 73,42 мг кінцевого продукту.

Отже, в роботі нами розроблена вітчизняна генно-інженерна технологія отримання протипухлинного цитокіна ЕМАР II в препаративних кількостях. Слід зазначити, що цитокін ЕМАР II є перспективним генно-інженерним біотехнологічним продуктом. Біотехнологічне виробництво цього цитокіну є необхідним для проведення експериментальних досліджень впливу цитокіна на клітинні процеси (індукція апоптозу, вплив на ангіогенез і т.д.), а в перспективі після його впровадження як нового лікарського препарату для інгібування пухлинного росту. Технологія виробництва нового цитокіна ЕМАР II з широким спектром застосування в біології і медицині може в перспективі дати значний економічний ефект після впровадження розробки у біотехнологічне виробництво.

ЛІТЕРАТУРА

1. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир. – 2002, – 589 с.

2. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y.G., Godman G., Familletti P.C., Wang F., Pan Y.C. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumour-derived polypeptide that activates host-response mechanisms. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — 267, N 28. — P. 20239–20247.

3. Ivakhno S.S., Kornelyuk A.I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // *Experim. Oncol.* — 2004. — 26, N 4. — P. 250–255.

4. Schwarz M.A., Kandel J., Brett J., Li J., Hayward J., Schwarz R.E., Chappey O., Wautier J.L., Chabot J., Gerfo P.L., Stern D. Endothelial-monocyte activating polypeptide II. A novel antitumour cytokine that suppresses primary and metastatic tumour growth and induces apoptosis in growing endothelial cells // *J. Exp. Med.* — 1999. — 190, N 3. — P. 341–354.

5. Schwarz R.E., Schwarz M.A. In vivo therapy of local tumour progression by targeting vascular endothelium with EMAP II // *J. Surg. Res.* — 2004. — 120. — P. 64–72.

6. Schwarz R.E., Awasthi N., Konduri S., Cafasso D., Schwarz M.A. EMAP II-based antiangiogenic-antiendothelial in vivo combination therapy of pancreatic cancer. // *Am. Surg. Oncol.* — 2010. — 17.— P. 1442–1452.

7. Reznikov A.G., Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Kornelyuk A.I. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // *Exper. Oncol.* — 2007. — 29, N 4. — P. 267–271.

8. Возианов А.Ф., Резников А.Г., Корнелюк А.И., Романенко А.М., Чайковская Л.В., Полякова Л.И., Григоренко В.Н. Влияние препаратов рекомбинантного белка ЕМАР II на рост, гистологические и гистохимические характеристики гетеротрансплантантов рака простаты человека // *Короткі повідомлення.* — 2008. — Т. 14, № 4. — С. 719–729.

9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984, — 479 с.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — 277. — № 259. — P. 680–685.

11. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A.L., Murray J.C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // *Биополімери і клітка.* — 1999. — 15, № 2. — P. 168–172.

12. Славченко И.В., Борейко Е.В. Фенотипическое проявление особенностей метаболизма клеток *Escherichia coli* BL 21(DE3) при выращивании на средах, содержащих разные источники углерода // *Биополімери і клітина.* — 2002. — Т. 18. — № 3. — С. 232–236.

13. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // *J. Mol. Biol.* — 1986. — 189D, № 1. — P. 113–130.

Л.А. Бабенко^{1,2}, А.Ю. Скоробогатов², А.Л. Дубровский¹, А.И. Корнелюк¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

² Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01601, Украина, e-mail: babenko_lesia@ukr.net

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА ЕМАР II В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI BL21 (DE3) PLYSE*

Реферат

ЕМАР II (эндотелиальный и моноцитактивирующий полипептид II) — новый провоспалительный антиангиогенный цитокин, проявляющий противоопухолевое действие. С целью разработки генно-инженерной технологии получения ЕМАР II проведена оптимизация условий бактериальной экспрессии клонированного в составе вектора рЕТ30а гена, кодирующего ЕМАР II. Исследовано влияние концентрации индуктора синтеза ИПТГ целевого белка на его конечный выход, установлено оптимальное время культивирования бактериальной культуры до и после добавления индуктора. Предложено схему культивирования культуры *E. coli BL21 (DE3) pLysE* для достижения высокого уровня выхода рекомбинантного цитокина ЕМАР II на уровне 110 мг с 1 л бактериальной культуры.

К л ю ч е в ы е с л о в а : ЕМАР II, бактериальная система экспрессии, оптимизация экспрессии, противоопухолевый цитокин.

L.A. Babenko^{1,2}, A.Iu. Skorobogatov², A.L. Dubrovsky¹, O.I. Kornelyuk¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150, Zabolotny str.,
Kyiv, 03143, Ukraine

²National Taras Shevchenko University of Kyiv, Ukraine,
e-mail: babenko_lesia@ukr.net

BACTERIAL EXPRESSION OPTIMISATION OF ANTITUMOR CYTOKINE EMAR II IN *ESCHERICHIA COLI* *BL21 (DE3) PLYSE* CELLS

Summary

EMAR II (Endothelial Monocyte-Activating Polypeptide) — a new anti-angiogenic proinflammatory cytokine that exhibits antitumor activity. In order to develop genetically engineered technology for EMAR II optimization



of bacterial expression conditions within pET30a vector encoded EMAP II was carried out. Both the influence of target protein synthesis inductor IPTG concentration on its overall yield and optimal bacterial cultivation time before and after inductor addition were estimated. There was a proposed scheme for the cultivation of culture *E. coli* BL21(DE3)pLysE to achieve high yield of recombinant cytokine EMAP II at the level of 110 mg from 1 liter of bacterial culture.

Key words: EMAP II, bacterial expression system, expression optimization, antitumor cytokine.



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

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: igormal85@mail.ru

УТВОРЕННЯ БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *SALMONELLA ENTERITIDIS* І *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЗА ПРИСУТНОСТІ ПОХІДНИХ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ

Показано, що накопичення біомаси Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis і Pseudomonas aeruginosa у планктонних культурах і формування ними біоплівки дозо-залежно зменшується в присутності N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів (сполука I) та його похідних з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV). Утворення біоплівки стафілококом однаково гальмується всіма сполуками незалежно від їх структури. У той же час, аналоги з нуклеофільними замісниками були більш активними у порівнянні зі сполукою I щодо грамнегативних бактерій. Найбільш висока активність сполук III і IV зареєстрована при їх використанні у концентрації 80 мкМ. При цьому формування біоплівки S. aureus гальмується у 5,4 разу, P. aeruginosa – у 8,4 разу, S. enteritidis – у 4,9 разу.

Ключові слова: біоплівка, біомаса планктонної культури, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід, похідні з нуклеофільними замісниками.

Виявлення в останні часи нових видів активності у сульфаніламідів поновило інтерес до цієї групи антимікробних засобів. Сьогодні у світі численні лабораторії синтезують та вивчають властивості нових аналогів цих препаратів, що є свідченням актуальності цієї проблеми [4, 8–10].

Раніше нами була встановлена антимікробна дія нових аналогів сульфаніламідів, а саме N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних з нуклеофільними замісниками у фенільному кільці [2]. Крім того, було показано, що *para*-амінобензойна кислота практично не зменшує антимікробний ефект цих сполук. Ці результати свідчать про наявність у похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів інших механізмів дії, ніж притаманна відомим препаратам здатність конкурентно інгібувати бактеріальну дегідроптероатсинтазу [3, 7]. Ймовірною мішенню може виступати система quorum sensing, яка контролює множинні фактори патогенності, міжклітинну комунікацію, утворення біоплівки тощо [6].



Метою даної роботи було дослідження формування біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa* за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізми використовували колекційні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Salmonella enteritidis* var. Isatchenko ВНИИСХМ 18/1 отримані з колекції культур кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Зберігання тест-штамів проводили на поверхні скошеного м'ясопептонного агару (МПА) при температурі 4 °С. Для експерименту використовувались добові культури, що вирощувались у пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Інкубацію усіх культур проводили у 48-лункових планшетах для культури тканин фірми "Nunclon". У кожену лунку додавали по 1 мл суспензії клітин, яка містила 10^3 КУО/мл. Через 24 години з кожної лунки ретельно відбирали планктонні культури і спектрофотометрично оцінювали накопичення в них біомаси при 540 нм. Біоплівки на дні лунок відмивали фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом на протязі 10 хв. Біоплівки забарвлювали водними розчинами кристалічного фіолетового на протязі 5 хв при кімнатній температурі. Планшети із забарвленою біоплівкою підсушували 24 години за кімнатної температури та заливали лізуючим розчином, що містив 0,1 N NaOH і 1% SDS, по 1 мл у кожену лунку. Планшети витримували 1,5–2 години до повного лізису біоплівки за кімнатної температури. Інтенсивність формування біоплівки визначали шляхом вимірювання оптичної густини дослідних та контрольних зразків на спектрофотометрі "Spekol-10" при довжині хвилі 592 нм [5].

Про інгібування утворення біоплівки тест-штамами судили по наявності різниці оптичної густини між дослідними і контрольними зразками з подальшим розрахунком *biofilm index* (BI) за формулою [11]:

$$BI = OD_{592}(\text{кристалічний фіолетовий}) \cdot \frac{OD_{592}(\text{планктон})}{OD_{592}(\text{посівна доза})}$$

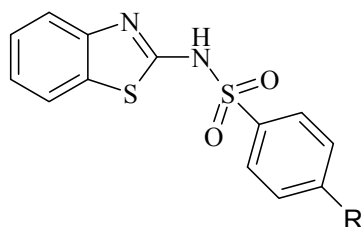
У роботі як планктонні позначені культури, що знаходилися у рідкому середовищі над біоплівкою. Суспензійними вважали рідкі культури, які вирощувались у пробірках і не утворювали біоплівки.

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



Результати та їх обговорення

У роботі використовували синтезовані в Проблемній науково-дослідній лабораторії № 5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід (сполука I, R=H) та його похідні з нуклеофільними замісниками: R=Cl (II), R=F (III), R=NO₂ (IV):



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

При вивченні дії нових аналогів сульфаніламідів використовували три штами бактерій — *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa*, з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ.

Отримані результати (табл.) свідчать, що усі досліджувані сполуки здатні інгібувати накопичення біомаси тест-мікроорганізмів у планктоні при їх культивуванні в умовах, які забезпечують утворення біоплівки. Причому спрямованість цих змін в залежності від концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду була подібна до тієї, що спостерігалася у суспензійних культурах [2].

Для *S. aureus* встановлено залежне від концентрації зниження накопичення біомаси в присутності усіх похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду. При цьому для сполук II, III, IV, які містять нуклеофільні замісники, не спостерігалася значних відмінностей у рівні антимікробної дії в порівнянні зі сполукою I. За найменшої з використаних концентрацій (0,4 мкМ) інгібуючий ефект складав 25–35%. За присутності досліджуваних похідних у концентрації 80 мкМ кількість біомаси стафілококу зменшувалася у 2,2–2,8 разів.

Для грамнегативних бактерій спостерігалася інша картина. У цих випадках, особливо при високих концентраціях, виявлено більш значне пригнічення накопичення біомаси за дії похідних з нуклеофільними замісниками. Кількість біомаси *P. aeruginosa* за дії сполуки I у концентрації 80 мкМ була нижчою у порівнянні з контролем в 1,76 разу, а за дії сполук II, III і IV — у 3,34, 5,55 та 6,26 разу, відповідно.

Для *S. enteritidis* встановлено таку саму закономірність, хоча її чутливість до досліджених похідних бензотіазолу була дещо нижчою у порівнянні з *P. aeruginosa*: накопичення біомаси стримувалося за присутності більшої концентрації сполук I–IV у 1,7, 2,2, 2,57 і 2,79 разів.



Таблиця

Накопичення біомаси ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$) у планктонних культурах за присутності похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Table

Biomass accumulation ($OD_{540} \cdot 10^{-3}$) in planktonic cultures in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Мікро-організм	Сполука	Концентрація, мкМ			
		0,4	4,0	40,0	80,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	К	542±29	542±29	542±29	542±29
	I	407±38	358±33	255±28*	189±23*
	II	352±40	309±34	217±26*	228±35*
	III	358±37	293±32	233±28*	216±25*
	IV	357±35	282±30	249±31*	238±22*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	К	1815±103	1815±103	1815±103	1815±103
	I	1325±126	1144±121	1016±134	1029±127
	II	1129±130	944±105	871±86*	544±67*
	III	1071±119	889±93	617±76*	327±45*
	IV	1068±126	780±83	545±66*	290±37*
<i>Salmonella enteritidis</i>	К	734±38	734±38	734±38	734±38
	I	624±58	484±50	455±42	433±39
	II	565±61	462±52	408±48*	334±47*
	III	440±43	382±38	330±38*	286±31*
	IV	536±60	404±45	272±33*	263±27*

Примітка: К – контроль; * – різниця у порівнянні з контролем вірогідна
 Note: К – control; * – significant different from control

Однак аналоги з нуклеофільними замісниками і в цьому випадку виявилися більш ефективними (на 15–25%), ніж N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід.

Результати визначення впливу похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів на утворення досліджуваними бактеріями біоплівки наведені на рис. 1–3. Отримані дані показали, що досліджувані мікроорганізми відрізняються один від одного не тільки накопиченням біомаси (табл.), але й інтенсивністю формування біоплівки. Відповідні індекси

дорівнюють: $4,3 \pm 0,3$ для *S. aureus*, $6,7 \pm 0,5$ для *P. aeruginosa* і $5,4 \pm 0,5$ для *S. enteritidis*.

Вже за меншої концентрації досліджуваних сполук спостерігається інгібування утворення біоплівки. Кількісні зміни в залежності від структури сполук становлять 26–35% у разі стафілококу, 16–36% — псевдомонади, 10–35% — сальмонели. Зростання концентрацій призводить до сповільнення процесу формування біоплівки і починаючи з концентрації сполук 4 мкМ результати вірогідно відрізняються від показників контролю для кожного з мікроорганізмів. Для *S. aureus* практично не спостерігається відмінностей між ефектами N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду та його похідних при одній і тій же концентрації (рис. 1).

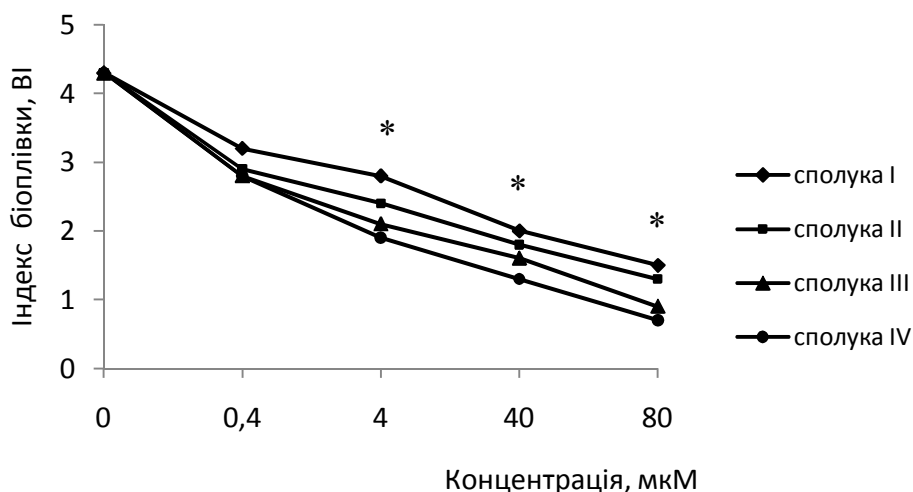


Рис. 1. Утворення біоплівки *Staphylococcus aureus* за присутності різних концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонаміду
Примітка: К — контроль; * — різниця у порівнянні з контролем вірогідна для усіх сполук

Fig. 1. *Staphylococcus aureus* biofilm formation in presence of N-benzothiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K — control; * — significant different from control for all compounds

На відміну від стафілококу для двох інших мікроорганізмів встановлена різна чутливість процесу утворення біоплівки до дії різних сполук. Так, починаючи з концентрації 4 мкМ сполуки III і IV виявляють більш високу активність у порівнянні зі сполуками I і II (рис. 2 і 3). Подальше підвищення концентрацій викликає ще більші відмінності і ефекти III і IV вірогідно відрізняються від дії сполуки I.



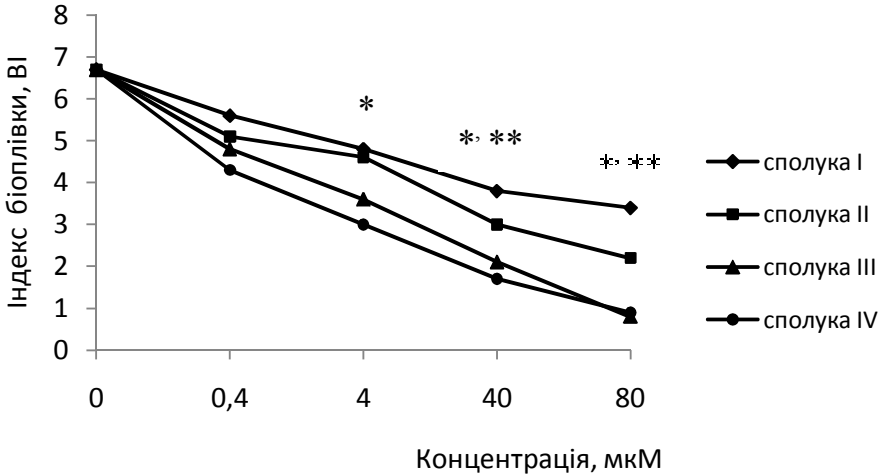


Рис. 2. Утворення біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* за присутності різних концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів
Примітка: К – контроль; * – різниця у порівнянні з контролем вірогідна для усіх сполук; ** – різниця для сполук III і IV вірогідна у порівнянні зі сполукою I

Fig. 2. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K – control; * – significant different from control for all compounds; ** – data for compounds III and IV significant different from data for compound I

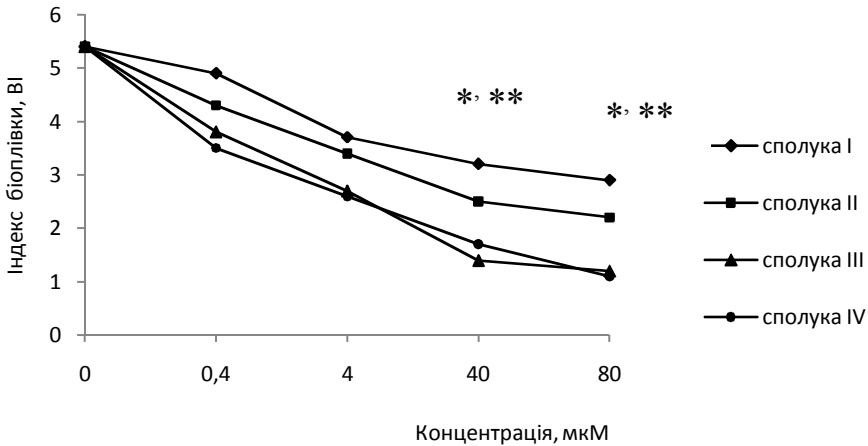


Рис. 3. Утворення біоплівки *Salmonella enteritidis* за присутності різних концентрацій похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів

Примітка: К – контроль; * – різниця у порівнянні з контролем вірогідна для усіх сполук;

** – різниця для сполук III і IV вірогідна у порівнянні зі сполукою I

Fig. 3. *Salmonella enteritidis* biofilm formation in presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives

Note: K – control; * - significant different from control for all compounds; ** – data for compounds III and IV significant different from data for compound I

П'ятдесятивідсоткове пригнічення формування біоплівки сполуками III і IV досягається вже при їх концентрації 4 мкМ. Для двох інших сполук воно спостерігається при більших концентраціях. Слід відмітити, що *S. aureus* виявив більш значну чутливість до сполуки I в порівнянні з грамнегативними бактеріями. Процес утворення біоплівки стафілококом при максимальній з досліджених концентрацій цієї сполуки гальмується майже у 3 рази, тоді як у псевдомонади и сальмонели лише удвічі.

Найбільш висока активність сполук III і IV зареєстрована при їх використанні у концентрації 80 мкМ. При цьому формування біоплівки *S. aureus* гальмується у 5,4 разу, *P. aeruginosa* — у 8,4 разу, *S. enteritidis* — у 4,9 разу.

Таким чином, отримані результати, на прикладі пригнічення похідними N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів процесу утворення біоплівки, показали, що можливим механізмом дії цих сполук є вплив на систему quorum sensing. Для остаточного вирішення цього питання доцільно встановити зміни у досліджуваних мікроорганізмів також інших властивостей, що контролюються цією системою.

ЛІТЕРАТУРА

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

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

3. Падейская Е.Н. Комбинированные антибактериальные препараты на основе производных сульфаниламида и диаминопиримидина // Новые лекарственные препараты, сб. трудов ВНИХФИ. — 1991. — С. 94–104.

4. Bergan T., Ortengren B., Westerlund D. Clinical pharmacokinetics of co-trimazine // Clin. Pharmacokinet. — 1986. — V. 11. — P. 372–386.

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

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

7. Ives H.E. Basic and clinical pharmacology // Lange Basic Science — New York, 2004. — P. 241–259.

8. Mengelers M.J., Hougee P.E., Janssen L.H., Van Miert A.S. Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemi-



cal properties of sulfonamides // *Vet. Pharmacol. Ther. J.* — 1997. — V. 20, № 4. — P. 276–283.

9. *Rana A., Siddiqui N., Khan S.A.* Benzothiazoles: A new profile of biological activities // *Indian J. Pharm. Sci.* — 2007. — V. 69. — P. 10–17.

10. *Richards R.M, Taylor R.B, Zhu Z.Y.* Mechanism for synergism between sulphonamides and trimethoprim clarified // *Pharm. Pharmacol. J.* — 1996. — V. 48, № 9. — P. 981–984.

11. *Tolker-Nielsen T.* Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms // *J. Bacteriol.* — 2000. — V. 182. — P. 6482–6489.

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

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: igormal85@mail.ru

ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *SALMONELLA ENTERITIDIS* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В ПРИСУТСТВИИ ПРОИЗВОДНЫХ N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОАМИДА

Реферат

Показано, что накопление биомассы *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* и *Pseudomonas aeruginosa* в планктонных культурах и формирование ими биопленки дозо-зависимо уменьшается в присутствии N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамида (соединение I) и его производных с нуклеофильными заместителями (соединения II, III и IV). Образование биопленки стафилококком одинаково подавляется всеми соединениями независимо от их структуры. В то же время, аналоги с нуклеофильными заместителями были более активными по сравнению с соединением I в отношении грамотрицательных бактерий. Наибольшая активность соединений III и IV зарегистрирована при концентрации 80 мкМ. При этом формирование биопленки *S. aureus* подавляется в 5,4 раза, *P. aeruginosa* — в 8,4 раза, *S. enteritidis* — в 4,9 раза.

К л ю ч е в ы е с л о в а : биопленка, биомасса планктона, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид, производные с нуклеофильными заместителями.



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

Odesa Mechnykov National University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: igormal85@mail.ru

**BIOFILM FORMATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*,
SALMONELLA ENTERITIDIS AND *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA IN PRESENCE
OF N-BENZOTIAZOL-2-YL-BENZENSULFONAMIDE
DERIVATIVES**

Summary

It was shown that the growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa* decreased in the presence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide (compound I) and its derivatives with nucleophylic radicals (compounds II, III and IV) in depending on a dose manner. The inhibitory effect of these compounds on *S. aureus* did not depend on their structures. At the same time, the derivatives with nucleophylic radicals were more effective against gram-negative bacteria then compound I. Biofilm formation by *S. aureus* was inhibited by all the compounds and was not dependent on their structure. In the same time analogs with nucleophylic derivatives showed higher activity on gram-negative bacteria biofilm instead compound I. The highest activity for compounds III and IV were detected in concentration of 80 mkM. In this case *S. aureus* biofilm was inhibited by the 5.4 times, *P. aeruginosa* – by 8.4 times, *S. enteritidis* – by 4.9 times.

Key words: biofilm, plankton biomass, N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide, derivatives with nucleophylic radicals.



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

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

ЛИПОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Проведен поиск продуцентов экзолипаз среди 353 штаммов бактерий рода Bacillus. Показано, что 62,0% штаммов бацилл способны к гидролизу оливкового масла и твинов. Лучшие всего гидролизовали эти субстраты штаммы видов B. subtilis, B. licheniformis, B. cereus и B. megaterium. У видов B. brevis, B. bombycis, B. lentus эта способность отсутствовала вообще. Однако только 19,5% штаммов гидролизовали оливковое масло. Исходя из различной субстратной специфичности, условно выделены 4 группы штаммов бактерий. Наиболее перспективными и наиболее продуктивными представляются третья группа – штаммы, способные гидролизовать твины и оливковое масло, и четвертая группа – штаммы, эффективно гидролизующие только оливковое масло. Показано, что оливковое масло в концентрации 0,5% способно усиливать рост и накопление биомассы бактерий, но резко снижать их липазную активность. Действие синтетических твинов на липазную активность бактерий неоднозначно: у одних штаммов оно стимулирующее, у других – ингибирующее.

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

Микробные липазы являются обширной, крайне разнообразной по своим свойствам группой промышленно важных ферментов. Кроме общебиологического, они имеют большое практическое значение при решении широкого спектра задач в промышленности и здравоохранении: в процессах модификации и переэтерификации жиров, синтеза сложных эфиров, для удаления маслянистых веществ в сточных водах, в производстве моющих средств, для улучшения усвояемости кормов, при лечении расстройств пищеварения, при заболеваниях печени, желчного пузыря, поджелудочной железы [1, 2, 4, 6, 8, 9]. И хотя изучению липаз посвящено немало работ [3, 7, 8, 10, 11, 13, 14], продолжается поиск высокоэффективных продуцентов этих ферментов среди микроорганизмов различных систематических групп, в том числе среди бактерий рода *Bacillus*.



Цель настоящей работы заключалась в поиске активных продуцентов липаз среди бактерий рода *Bacillus*, отборе наиболее перспективных штаммов для возможного использования в различных отраслях народного хозяйства, а также изучение их активности при выращивании в глубинных условиях на различных субстратах.

Материалы и методы

Объектом исследований липолитической активности были 353 штамма 23 видов бактерий рода *Bacillus* из коллекции отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, изолированных из различных эконисш (почвы, лечебные грязи, желудочно-кишечный тракт животных и людей и другие).

Скрининг активных по липазам культур проводили в два этапа. Первый этап заключался в прямом отборе активных культур разных видов бактерий из их посевов на поверхность агаризованной среды со специфическим для них субстратом в качестве источника углерода. Образование и активность ферментов липолитического комплекса оценивали по появлению отчетливых зон деэтерифицированного субстрата: оливкового масла или твинов 40 и 80 (по 0,5%), после 2-суточного инкубирования при 37 °С на МПА с добавлением CaCl_2 [12].

Потенциальными продуцентами липаз считали те культуры бактерий, которые при росте на агаризованной среде образовывали вокруг колоний непрозрачный ореол, появляющийся за счет кристаллов нерастворимых кальциевых солей жирных кислот, освобождаемых из субстрата в процессе липолиза. По размерам зон гидролиза субстрата (в мм по диаметру) судили об активности ферментов, образуемых бациллами на соответствующих субстратах. Специфичность действия липаз отражалась на характере образования зон, что выражалось в различной степени помутнения и появления характерного для каждого субстрата рисунка на агаризованных средах: для твина 40 — игольчатые ореолы; для твина 80 и оливкового масла — в виде веточек, точек и т. п.

Для исследования ферментативной активности штаммов, отобранных в результате первого этапа, бактериальные культуры выращивали в колбах емкостью 750 мл в условиях аэрации на качалке (200 об/мин) при 37 °С в течение двух суток с 50 мл жидкой синтетической среды следующего состава (в г/л): натрия цитрат — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75; KH_2PO_4 — 9,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, рН среды — $7,0 \pm 0,2$ с добавлением оливкового масла или твинов (0,5% в 1/15 М фосфатном буфере, рН 7,0). По окончании ферментации в бесклеточном фильтрате определяли активность липаз титрометрическим методом с использованием 40% эмульсии оливкового масла в 2% водном растворе поливинилового спирта [12]. Реакционная смесь содержала 1 мл супернатанта культуральной жидкости, 2 мл 1/15 М фосфатного буфера с рН 7,0 и 2,5 мл эмульсии оливкового масла. Реакцию проводили при перемешивании в течение 1 ч



при 37 °С. Для прекращения гидролиза в среду вносили 15 мл этанола. Продукты гидролиза оттитровывали 0,05 н раствором NaOH до pH 9,0 с использованием потенциометра.

Липазную активность (ЛА) рассчитывали по формуле:

$$ЛА = (A - A_1) \cdot 50 / B,$$

где A и A_1 — количество мл 0,05 н NaOH, пошедшей на титрование опытного и контрольного образца соответственно; B — количество фермента (в виде культуральной жидкости) в реакционной смеси, мл; 50 — коэффициент для пересчета миллилитров щелочи в микромоли олеиновой кислоты, найденный расчетным путем [12]. Липазную активность выражали в ед/мл (1 ед=1 мкмоль олеиновой кислоты).

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью компьютерной программы Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты показали, что способность гидролизовать исследуемые субстраты свойственна далеко не всем исследуемым видам бацилл. Из числа проверенных штаммов бактерий только 62,0% (218 штаммов) были способны к гидролизу исследуемых субстратов. 33,7% проявляли способность к гидролизу твина 40, 29,7% — твина 80 и лишь 19,5% — оливкового масла. Лучше всего гидролизовали эти субстраты штаммы видов *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. circulans*, и *B. megaterium*. У культур остальных видов прослеживалась невысокая липазная активность, а у видов *B. brevis*, *B. bombycis*, *B. lentus*, *B. alvei*, *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *B. firmus*, *B. pasteurii*, *B. pulvifaciens*, *B. oligonitrofilus* и *B. silvestris* — способность к гидролизу этих субстратов вообще отсутствовала.

Из всех субстратов слабее всего бациллы гидролизовали оливковое масло, лучше всего — твин 40 (эфир пальмитиновой кислоты) и твин 80 (эфир олеиновой кислоты), что по данным некоторых исследователей зависит от длины углеродной цепочки и степени насыщенности жирных кислот в их составе [10]. Такие отличия в липазной специфичности микроорганизмов в литературе объясняются различной проницаемостью клеточных стенок под действием испытываемых субстратов и отсюда различным выходом низкомолекулярных веществ в окружающую среду [3, 6].

Полученные экспериментальные результаты по первичному скринингу позволили из наиболее активных штаммов (141 штамм) условно выделить несколько групп бактерий, способных расщеплять одновременно несколько субстратов (табл.). Один и тот же штамм мог войти в разные или только в одну группы.

К первой группе отнесены 17% от всех активных на этих субстратах штаммов, которые способны гидролизовать только твины 40 и 80. Из них 87,5% штаммов относились к виду *B. subtilis*, которые на этих субстратах

образовывали зоны гидролиза, в основном, диаметром 10–20 мм, и лишь 9 штаммов из них — зоны выше 20 мм.

Ко второй группе отнесены 16 штаммов, которые способны гидролизовать оливковое масло и твин 80 и образовывать зоны гидролиза до 20 мм, и лишь 4 штамма — зоны выше 20 мм.

Таблица

Бактерии рода *Bacillus*, наиболее активные по липазе

Table

Bacteria of genus *Bacillus* the most active of lipases

Вид <i>Bacillus</i>	Абсолютное количество штаммов в группах							
	I твин 40 и 80		II твин 80 и оливковое масло		III твины и оливковое масло		IV оливковое масло	
	диаметр зон просветления, мм							
	до 20	выше 20	до 20	выше 20	до 20	выше 20	до 20	выше 20
<i>B. subtilis</i>	15	6	6	-	3	7	21	5
<i>B. licheniformis</i>	-	-	6	2	3	5	3	15
<i>B. cereus</i>	-	-	-	2	-	6	1	9
<i>B. megaterium</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	-	-	3	-	2	-	3	1
<i>B. circulans</i>	-	-	-	-	-	1	1	2
<i>B. alvei</i>	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>B. coagulans</i>	-	-	-	-	1	-	2	-
<i>B. firmus</i>	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>B. lateresporus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. badius</i>	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Bacillus spp.</i>	-	1	-	-	-	-	3	-
Всего	15	9	16	4	9	19	35	34

Примечание: «—» — способность к гидролизу отсутствует.

The note: “—” — the ability of hydrolysis is absent.

В третью группу вошли штаммы разных видов бацилл, способные гидролизовать все исследуемые субстраты. Эта группа, по нашему мнению, представляется наиболее перспективной и наиболее продуктивной. В нее вошли 19,8% штаммов: 9, которые образовывали зоны просветления до 20 мм, и 19 штаммов — зоны выше 20 мм.

Немаловажное значение имела также четвертая группа, куда отнесены штаммы, способные гидролизовать только оливковое масло. Ферменты, синтезируемые на этом субстрате, принято называть истинными липазами [5]. Таких штаммов среди бацилл обнаружено 49% от всех активных. Наиболее активными продуцентами истинных липаз среди исследуемых были 26 штаммов *B. subtilis* из 228, 18 штаммов *B. licheniformis* из 25, 10 штаммов *B. cereus* из 24, 4 штамма *B. pumilus* из 14, 3 штамма



B. circulans из 4, 3 штамма *Bacillus spp.* из 15, 2 штамма *B. coagulans* и по 1 штамму *B. firmus* и *B.adius*.

Можно предположить, что те представители бацилл, которые вошли в IV и III группы, и могут стать потенциальными продуцентами липолитических ферментов на субстратах, содержащих олеиновую кислоту [1, 9].

Таким образом, данные, полученные в результате первого этапа скрининга, позволяют отметить присутствие различной специфичности экзолипаз у бактерий рода *Bacillus*. Не исключено, что способность внеклеточных липаз расщеплять те или иные субстраты или несколько различающихся по жирнокислотному составу субстратов, может быть следствием сложности состава липазного комплекса, то есть наличия у бацилл нескольких типов липаз с разными свойствами и разных по действию [14].

Учитывая то, что размеры зон гидролиза могут зависеть не только от активности секретируемых в среду ферментов, но и от скорости диффузии их в среду, от типа субстрата и ряда других факторов, были выбраны штаммы, которые характеризовались наибольшей активностью гидролиза исследуемых субстратов, для последующей количественной оценки липазной активности их при глубинных условиях культивирования на жидких средах.

Проверенно 146 штаммов, способных образовывать зоны гидролиза тех или иных субстратов. Между величиной зон гидролиза на плотной среде и активностью культур на жидкой среде не всегда наблюдалась корреляция. Возможно, что положительный результат при качественном анализе в некоторых случаях может объясняться дополнительным действием неспецифических эстераз, активность которых в жидких средах не определялась.

Несмотря на то, что внимание многих исследователей все больше привлекает направленный микробный биосинтез ферментов, действие таких субстратов как природные масла и различные твины на рост и образование липаз бациллами мало изучено. Механизмы индукции и регуляции активности липаз до конца не выяснены. В то же время имеются данные о том, что такие субстраты могут оказывать не только стимулирующее, но и ингибирующее действие на рост и липазную активность у микроорганизмов [1, 6, 12].

В результате изучения влияния оливкового масла, являющегося одним из наиболее характерных субстратов липолитических ферментов, показано, что оливковое масло в концентрации 0,5% усиливало накопление биомассы в 2 раза (рис. 1). В то же время, этот субстрат оказывал ингибирующее действие на синтез липаз. По сравнению с активностью бактерий, выращенных на среде с другими субстратами, относительная липазная активность в присутствии масла снижалась в среднем на 30% и более (рис. 2). Видимо, в результате гидролиза оливкового масла, ко-



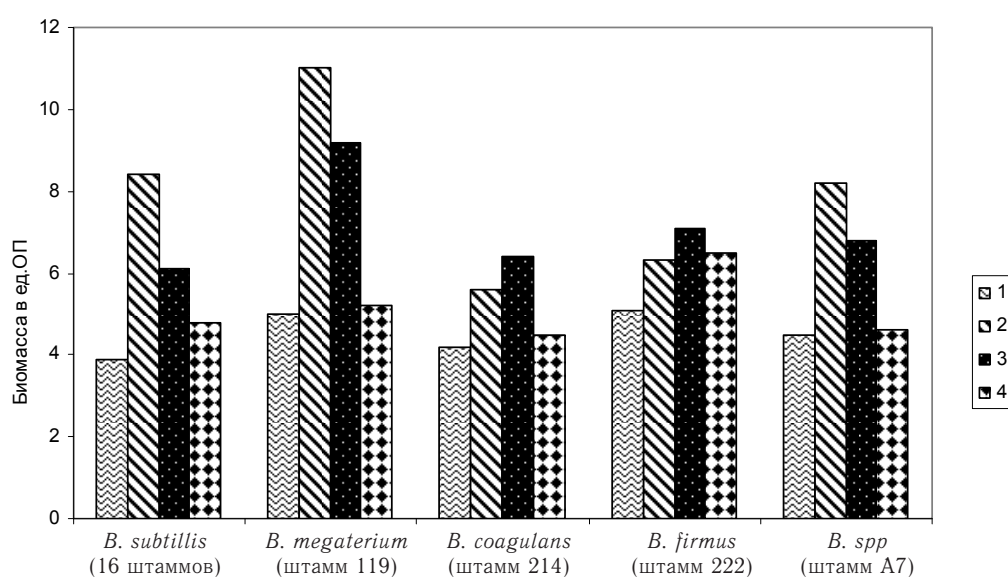


Рис. 1. Влияние оливкового масла и твинов в питательной среде на рост бацилл
 Обозначения: 1 – среда без субстратов (контроль), 2 – среда с оливковым маслом,
 3 – среда с твином 40, 4 – среда с твином 80.

Fig. 1. Influence of olive oil and twins on bacilli growth in a nutrient medium
 Designations: 1 – medium without substrata (control), 2 – medium with olive oil,
 3 – medium with twin 40, 4 – medium with twin 80.

торое состоит из 85% ненасыщенных кислот, в частности олеиновой, в среде, в основном, накапливается олеиновая кислота, которая и ингибирует синтез липазы. Отсутствие стимулирующего действия оливкового масла на активность липазы было отмечено для других микроорганизмов, причем степень ингибирования возрастала по мере увеличения длины углеродной цепи жирной кислоты [1, 6].

Полученные результаты указывают на неоднозначность действия твинов на липазную активность бактерий рода *Bacillus*, что многими исследователями связывается, в основном, с изменением клеточных мембран под их влиянием и связанным с этим повышенным выходом ферментов в культуральную жидкость. Как видно из рис. 2, твин 80 у одних видов исследуемых бактерий (*B. coagulans*, *Bacillus spp.*) повышал активность липазы на 40–150%, у других *B. megaterium*, *B. firmus* – снижал ее до 30%. Такое различие в действии особенно четко наблюдается среди 16 изучаемых штаммов *B. subtilis*: 11 из них способны разлагать твин 80 с активностью, на 50% превышающей контроль, другие же 5 штаммов с активностью, ниже на 30%.

У штаммов *B. megaterium*, *B. firmus* и меньшей части культур *B. subtilis* активность липаз подавлялась на 20–30% по сравнению с контрольной средой. У штаммов *B. coagulans*, *Bacillus spp.* и большинства

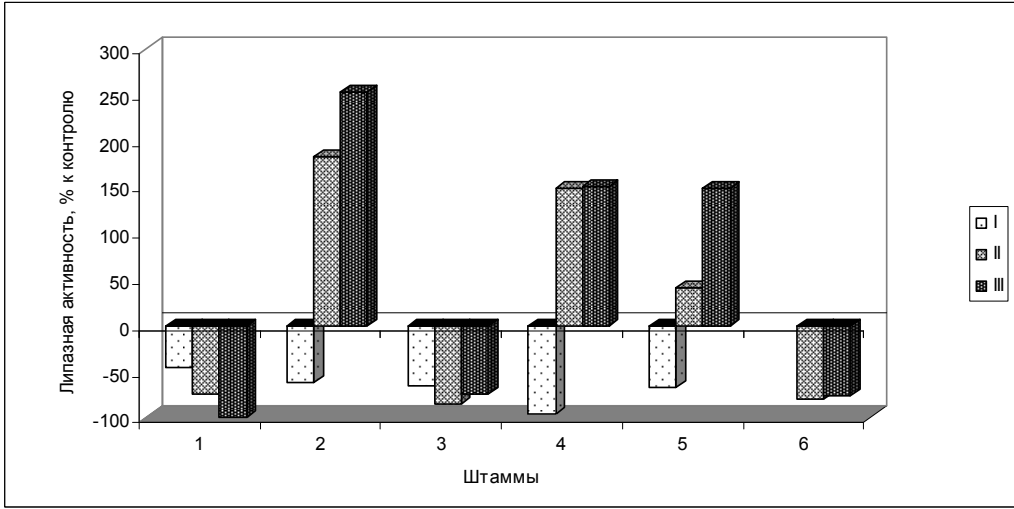


Рис. 2. Влияние оливкового масла и твинов на липазную активность бацилл
 Субстраты: I – оливковое масло, II – твин 40, III – твин 80.

Штаммы: 1 – *B. megaterium* 6; 2 – *B. coagulans* 32; 3 – *B. firmus* 37; 4 – *Bacillus* spp. A7; 5 – *B. subtilis* – 16 штаммов (12 штаммов на II, 11 на III субстрате – стимулирующее действие, 16 штаммов на I, 4 на II, 5 на III субстрате – ингибирующее действие).

Fig. 2. Influence of olive oil and twins on bacilli lipases activity

Substrata: I – olive oil, II – twin 40, III – twin 80.

Strains: *B. megaterium* 6; 2 – *B. coagulans* 32; 3 – *B. firmus* 37; 4 – *Bacillus* spp. A7; 5 – *B. subtilis* – 16 strains (12 strains on II, 11 strains on III substrate – stimulated, 16 strains on I, 4 strains on II, 5 strains on III substrate – inhibited).

штаммов *B. subtilis* твины 40 и 80 способствовали повышению липазной активности штаммов на 30–150%. Рост же всех штаммов бацилл, как правило, усиливался под воздействием изучаемых субстратов, что подтверждает то, что твины являются хорошими индукторами липаз различных микроорганизмов [6, 12]. Наряду с этим однако имеются также данные об их ингибирующем действии [6]. В литературе имеются сообщения, что липазы *B. subtilis* лучше гидролизуют твины, содержащие насыщенные жирные кислоты, чем растительные масла, содержащие ненасыщенные кислоты [3].

Различный характер действия твинов авторы объясняют зависимостью от их природы, а также ролью в дисперсности при образовании эмульсии на поверхности раздела жир–вода [3]. Нельзя не учитывать, что липазы действуют только на поверхности раздела жир–вода, а твины, введенные в питательную среду, как лучшие, чем масла эмульгаторы, понижают поверхностное натяжение на границе жир–вода, что способствует образованию эмульсии более доступной действию липаз. Отсюда неоднозначное действие нерастворимых природных масел и водорастворимых синтетических твинов. К тому же известно, что твины хорошо растворяются в воде и потому их использование является более легким, чем нерастворимых масел.

Таким образом, учитывая то, что истинными субстратами липаз являются нерастворимые в воде жиры и масла, при проведении поиска активных продуцентов липолитических ферментов среди микроорганизмов, наиболее ценными можно считать результаты, полученные при использовании именно природных субстратов. Из исследованных штаммов различных видов бацилл, синтезирующих липазы, было отобрано для дальнейших исследований 5 штаммов, способных активно продуцировать достаточно высокие количества этого фермента при выращивании в глубинных условиях на среде с оливковым маслом в качестве специфического субстрата.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Безбородов А.М.* Биотехнология продуктов микробного синтеза. — М.: Агропромиздат, 1991. — 238 с.
2. *Давранов К.* Микробные липазы в биотехнологии (обзор). // Прикл. биохимия и микробиология. — 1994. — Т. 30, № 4–5. — С. 527–534.
3. *Марченкова А.И., Лобырева Л.Б.* Липолитическая активность спорообразующих бактерий *Bacillus subtilis* 100 и 207 // Биосинтез и метаболизм липидов у микроорганизмов: Тез. докл. III Всес. конф. (12–14 ноября 1979 г., М.), 1979. — С. 130–132.
4. *Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н.* Биохимическая переработка жиров и масел в новые липидные продукты с улучшенными биологическими и физико-химическими свойствами (обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. — 2002. — Т. 38, № 5. — С. 469–481.
5. *Рид Дж.* Ферменты в пищевой промышленности. Перевод с англ. Р.В. Фениксовой. М.: Пищ. пром., 1971. — 414 с.
6. *Рубан Е.Л.* Микробные липиды и липазы. — М.: Наука, 1977. — 218 с.
7. *Смирнов В.В., Слабоспицкая А.Т., Крымовская С.С., Резник С.Р.* Липолитическая активность спорообразующих аэробных бактерий, выделенных из различных источников // Микробиологический журнал. — 1988. — Т. 50, № 2. — С. 6–11.
8. *Pat 6171848 США МПК⁷ А 23 К 1/10, А 01 N 63/00.* Enzyme — producing strain of *Bacillus* bacteria / Lawler D., Smith S., Rolbic L. опубл. 09.01.01.
9. *Borgstrom B., Brockman H.L.* Lipases. Ametrdam; New York; Oxford: Elsevier, 1984. — 527 p.
10. *Elwan S.H., El-Hoseiny M., Ammar M.S., Mostafa S.A.* A Lipases production by *Bacillus circulans* under mesophilic and osmophilic conditions, factors affecting lipases production // J. bacteriol. virol. et immunol. — 1983. — Т. 76, № 7/12. — P. 187–199.
11. *Haba E., Bresco O., Ferrer C., Marques A., Busquets M., Manresa A.* Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil



as selective substrate // Enzyme and Microb. Technol. — 2000. — V. 26, № 1. — С. 40—44.

12. Ota V., Yamada Y. Lipase from *Candida paraliipolytica*. Part 1. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol // Agric. Biol. Chem. — 1966. — V. 30, № 4. — P. 351—358.

13. Ruiz C., Pastor F.J., Diaz P. Izolation of lipid- and polysaccharide-degrading microorganisms from subtropical forest soil and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CK -179 // Lett. Appl. Microbiol. — 2005. — V. 40, № 3 — P. 218—227.

14. Sekhon Anurag, Dahiya Neetu, Tiwari Ram P., Hoondal Jurinder S. Properties of a thermostable extracellular lipase from *Bacillus megaterium* AKJ-1 // J. Basic. Microbiol. — 2005. — V. 45, № 2. — С. 147—154.

УДК 577.152.3

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

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

ЛИПОЛИТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

Реферат

Проведено пошук продуцентів екзоліпаз серед 353 штамів бактерій роду *Bacillus*. Показано, що 62,1% штами бацил здатні до гідролізу маслинової олії та твінів. Краще всього гідролізували ці субстрати штами видів *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* і *B. megaterium*. У видів *B. brevis*, *B. bombycis*, *B. lentus* ця здатність була відсутня взагалі. Проте тільки 19,5% штамів гідролізували маслинову олію. Виходячи з різної субстратної специфічності, умовно виділено 4 групи штамів бактерій. Найбільш перспективними і найбільш продуктивними представляються третя група — штами, що здатні гідролізувати твіни та маслинову олію, і четверта група — штами, що ефективно гідролізують тільки маслинову олію. Показано, що маслинова олія в концентрації 0,5% здатна посилювати ріст і накопичення біомаси бактерій, але різко знижувати їх ліпазну активність. Дія синтетичних твінів на ліпазну активність бактерій неоднозначна: у одних штамів вона стимулююча, у інших — інгібуюча.

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



UDC 577.152.3

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

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

LIPASES BACTERIA ACTIVITY OF GENUS *BACILLUS*

Summary

There have been screened the producers of exsolyases among 353 strains of bacteria of genus *Bacillus*. There has been shown that 62.1% of strains of *Bacillus* are capable of hydrolysing of olive oil and twins. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus* and *B. megaterium* hydrolyzed these substrata the most actively. This ability was absent at *B. brevis*, *B. bombycis*, *B. lentus*. However only 19.5% of strains hydrolyzed olive oil. Four groups of bacteria strains were identified on the basis of different substrate specificity. The third group – strains, capable of hydrolysing of twins and olive oil, and the fourth group – strains, capable of hydrolysing only olive oil are the most perspective and the most productive. There has been shown that olive oil in concentration of 0.5% is capable of stimulating growth and biomass accumulation of bacteria, but inhibiting lipases activity. Synthetic twins influenced on the activity of lypases of bacteria ambiguously: at one strains it was stimulated, at others – inhibited.

Key words: bacteria of genus *Bacillus*, exsoliipases.



ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853 ПРИ ТЕМНОВОМУ ТА ФОТОІНДУКОВАНОМУ ВПЛИВІ ВІСМУТ-МІСТКИХ ПОРФІРИНІВ

*Вісмутові металокомплекси мезо-тетра(4-N-метил)-піридилпорфірину (Vi^{3+} -ТПП) і мезо-тетра(6-N-метил)-хінолінилпорфірину (Vi^{3+} -ТХП) дозо-залежно пригнічують формування біоплівки, накопичення біомаси планктонної культури та синтез альгінату *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. При концентрації 80 мкМ ці показники знижуються на 85–98% при дії Vi^{3+} -ТПП і на 50–82% – Vi^{3+} -ТХП. На відміну від мезо-заміщених порфіринів інгібуючий ефект вісмутового комплексу протопорфірину IX (Vi^{3+} -ПП IX) не залежить від концентрації і не перевищує 50–60%. Утворення біоплівки більш значно пригнічується усіма дослідженими сполуками після їх фотоактивації. Темновий вплив вісмутових комплексів виявився, на відміну від фотоіндукованого, більш суттєвим у відношенні накопичення біомаси у планктонній культурі і вмісту альгінату в біоплівці. Лише при концентраціях 40 і 80 мкМ Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП сильніше (в 1,2–2 рази) гальмували накопичення біомаси у планктонній культурі після фотоактивації.*

Ключові слова: біоплівка *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, вісмутові металокомплекси порфіринів, темнова та фотоіндукована дія.

Інфекції, які викликаються умовно-патогенними бактеріями, займають значне місце у патології людини. Їх поширення у медичних стаціонарах є досить суттєвою проблемою для сучасної медицини. Це перш за все пов'язане з високою резистентністю збудників таких інфекцій до традиційних антимікробних та дезінфікуючих засобів та наявністю механізмів, які сприяють униканню їх дії [8, 11]. Одним з таких механізмів є здатність умовно-патогенних бактерій до утворення біоплівки.

Біоплівка являє собою досить складну структуру, а клітини які входять до її складу набувають деяких досить унікальних ознак [12]. Так, *Pseudomonas aeruginosa* яка є одним з поширених збудників внутрішньолікарняних інфекцій, за рахунок здатності до утворення біоплівки

стає резистентною до антимікробних препаратів [6, 9, 11]. Тому, дуже актуальним є пошук нових антимікробних препаратів, які мають володіти здатністю вражати бактерії у складі біоплівки та володіти декількома різними механізмами дії.

Раніше нами було показано, що синтетичні мезо-заміщені порфірини та їх металокомплекси, не тільки володіють значним спектром антимікробної активності, а також мають два незалежних механізми дії — темновий та фотоіндукований [3, 13].

Метою даної роботи було вивчення темного та фотоіндукованого впливу вісмутових комплексів синтетичних та природних порфіринів на планктонні культури та біоплівку *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Матеріали і методи

У роботі був використаний штам *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, отриманий з музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова. Вивчені у роботі вісмутіві металокомплекси мезо-тетра(4-N-метил)-піридилпорфірину (Vi^{3+} -ТПП), мезо-тетра(6-N-метил)-хінолінілпорфірину (Vi^{3+} -ТХП) і протопорфірину IX (Vi^{3+} -ПП IX) були синтезовані у ПНДЛ-5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за методом [1].

Антимікробну активність вісмутових комплексів досліджували з використанням модифікованого методу серійних розведень у середовищі Гісса, в діапазоні кінцевих концентрацій від 0,4 до 80 мкМ. При вивченні темного впливу *P. aeruginosa* інкубували в присутності сполук 24 години при 37 °С.

Для оцінки фотоіндукованого впливу у пробірки з середовищем Гісса вносили добову культуру *P. aeruginosa*, додавали досліджувані сполуки до кінцевих концентрацій від 0,4 до 80 мкМ і піддавали опроміненню лампою видимого світла потужністю 500 ват. Термін опромінення складав 15 хв, відстань від лампи 50 см. Після опромінення клітини осаджували центрифугуванням при 1000 об/хв на протязі 15 хвилин, над осадову рідину видаляли, а осад суспендували у стерильному середовищі Гісса. Подальше культивування опромінених культур здійснювали 24 години при 37 °С за відсутності досліджуваних сполук.

Інкубацію усіх культур проводили у 48-лункових планшетах для культури тканин фірми "Nunclon". У кожену лунку додавали по 1 мл суспензії клітин *P. aeruginosa*, яка містила 10^3 КУО/мл. Через 24 години з кожної лунки ретельно відбирали планктонні культури і спектрофотометрично оцінювали накопичення в них біомаси при 540 нм. Біоплівки на дні лунок відмивали фізіологічним розчином та фіксували 96% етанолом на протязі 10 хв. Біоплівки фарбували водними розчинами кристалічного фіолетового або алціанового синього на протязі 5 хв. при кімнатній температурі. Планшети із забарвленою біоплівкою підсушували 24 години за кімнатної температури та заливали лізуючим розчином, що містив 0,1 N NaOH і



1% SDS, по 1 мл у кожну лунку. Планшети витримували 1,5–2 години до повного лізису біоплівки за кімнатної температури. Інтенсивність формування біоплівки та синтезу альгінату визначали шляхом вимірювання оптичної густини дослідних та контрольних зразків на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжинах хвиль що відповідають максимумам поглинання кожного з барвників (кристалічний фіолетовий – 592 нм; алціановий синій – 608 нм) [5].

Усі експерименти повторювали 3 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 6. Для обробки та аналізу даних використовували методи віріаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [2].

Результати дослідження та їх обговорення

Співставлення показників контрольних та опромінених за відсутності досліджуваних сполук культур показало, що суттєвих відмінностей між ними немає (табл.). Однак можна відмітити деяку тенденцію до підвищення цих показників (на 5–10%) після опромінення культур. Враховуючи це, дані щодо впливу вісмутівих комплексів виражали у відсотках до показників контролю.

Таблиця
Накопичення біомаси *P. aeruginosa* у планктонній культурі та біоплівці після опромінення видимим світлом

Table
P. aeruginosa biomass accumulation in planktonic culture and biofilm after irradiation with visible light

Варіант	Накопичення біомаси у планктоні, E_{540}	Біомаса біоплівки, E_{592}	Вміст альгінату у матриці біоплівки, E_{608}
Контроль	1,360±0,113	1,564±0,094	0,310±0,025
Опромінення видимим світлом	1,503±0,122	1,656±0,108	0,328±0,027

Отримані результати свідчать про те, що досліджені вісмутіві комплекси синтетичних та природних порфіринів володіють різним рівнем антимікробної активності (рис. 1–3). Крім того, спостерігаються відмінності між Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП, з одного боку, та Vi^{3+} -ПП ІХ, з іншого боку, щодо залежності їх дії від концентрацій. Вісмутівий комплекс природного порфірину (Vi^{3+} -ПП ІХ) викликає практично однакові зміни при низьких та високих концентраціях (рис. 1–3, В) як у темних умовах, так і при опроміненні. У той же час, ефекти вісмутівих комплексів синтетичних

порфіринів (Bi^{3+} -ТПП і Bi^{3+} -ТХП) чітко залежать від концентрацій цих сполук (рис. 1–3, А, Б). Так, при малих концентраціях вони зменшують біомасу *P. aeruginosa* ATCC 27853 у планктонній культурі лише на 10–40%, тоді як при високих — на 45–80%.

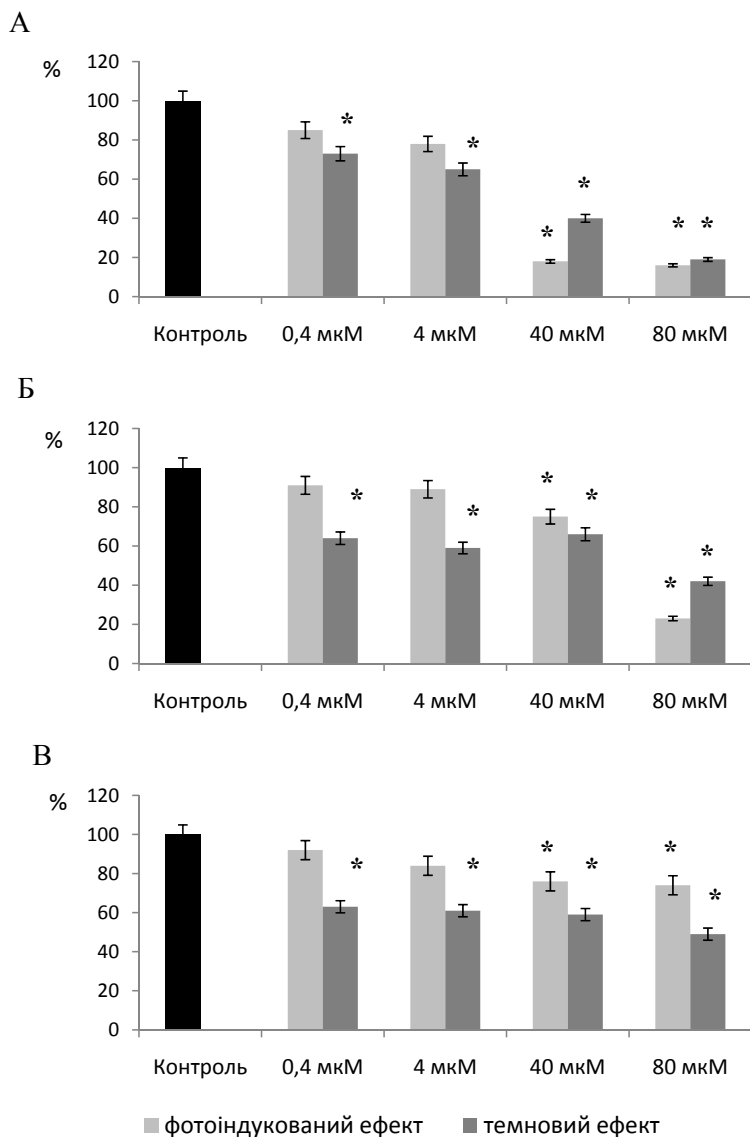


Рис. 1. Вплив вісмутувих комплексів порфіринів на біомасу планктонної культури *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 за темнових умов та опромінення (А – Bi^{3+} -ТПП, Б – Bi^{3+} -ТХП, В – Bi^{3+} -ПП IX)

Примітка: * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 1. Influence of the porphyrins bismuth complexes on the planktonic culture biomass of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dark conditions and after irradiation (A – Bi^{3+} -TPyP, Б – Bi^{3+} -TQP, В – Bi^{3+} -PP IX)

Note: * – significant different from control

Вісмутовий комплекс протопорфірину IX зменшував біомасу при опроміненні на 10–25%, а за темного впливу на 40–50%. До особливостей впливу Bi^{3+} -ТПП і Bi^{3+} -ТХП на біомасу планктонної культури відносяться більш виражені зміни при низьких концентраціях в темнових умовах у порівнянні з опроміненням, тоді як при високих концентраціях сполук переважає фотодинамічна дія. Для Bi^{3+} -ПП IX при усіх концентраціях темнова дія є більш значною.

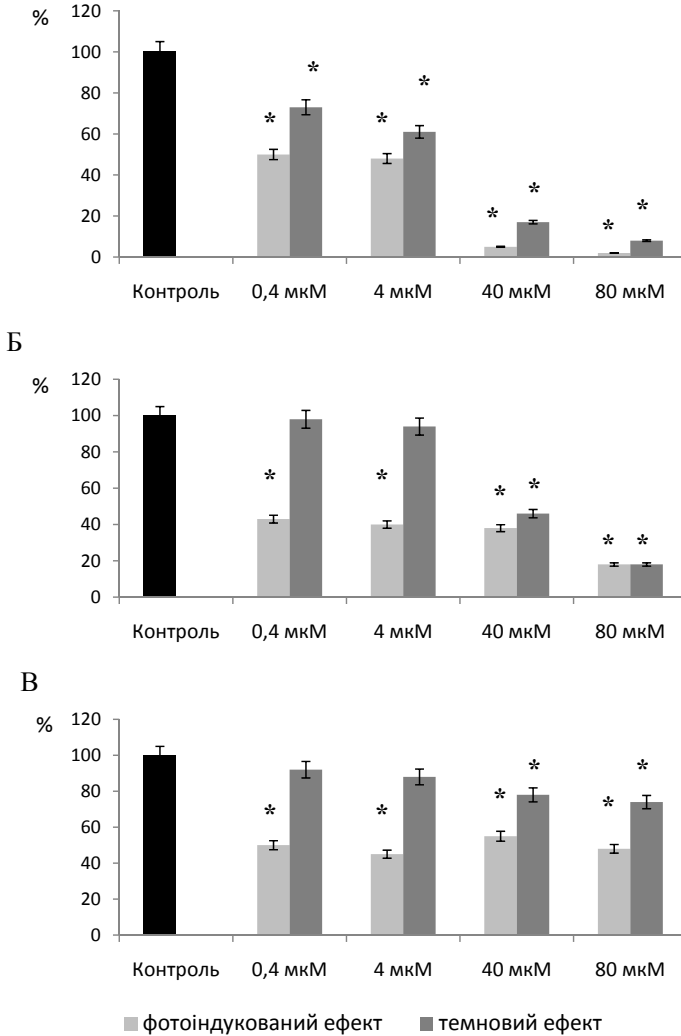


Рис. 2. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 за темнових умов та опромінення (А – Bi^{3+} -ТПП, Б – Bi^{3+} -ТХП, В – Bi^{3+} -ПП IX)

Примітка: * – різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 2. Influence of the porphyrins bismuth complexes on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dark conditions and after irradiation (A – Bi^{3+} -TRP, B – Bi^{3+} -TQP, C – Bi^{3+} -PP IX)

Note: * – significant different from control

Процес формування біоплівки порушується більш значно, ніж накопичення біомаси у планктонній культурі, особливо за дії Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП (рис. 2). У концентрації 40 мкМ Vi^{3+} -ТПП пригнічує його на 83–95%, а у концентрації 80 мкМ — на 95–98%. Для Vi^{3+} -ТХП відповідні зміни складають 54–62% та 80–82%. Вісмутувий комплекс природного порфірину незалежно від концентрації гальмує формування біоплівки після фотоактивації удвічі. Слід також зазначити, що фотодинамічне інгібування досліджуваними сполуками біоплівки є більш ефективним ніж темнове. Враховуючи, що наслідком фотосенсибілізації порфіринів є утворення з молекул O_2 високоактивних, але короткоживучих, форм кисню [15], можна припустити, що вони викликають суттєві метаболічні зміни в клітинах *P. aeruginosa*, які перешкоджають утворенню біоплівки.

Враховуючи, що матрикс біоплівки приблизно на 90% складається з альгінату, було вивчено вплив вісмутувих комплексів порфіринів на його вміст. Встановлено, що характер впливу усіх сполук на цей компонент аналогічний їх впливу на біомасу планктонної культури: більш значне зменшення вмісту альгінату при темнових умовах та залежність ефектів синтетичних порфіринів від концентрацій (рис. 3). Слід також відмітити суттєвий темновий вплив на цей показник Vi^{3+} -ПП IX, який знижує вміст альгінату на 45–50% при малих і на 55–60% при високих концентраціях.

Порівняння впливу досліджуваних сполук на формування біоплівки та її матриксу свідчить про те, що фотоіндукована дія усіх вісмутувих комплексів і темнові ефекти високих концентрацій Vi^{3+} -ТПП і Vi^{3+} -ТХП переважно пригнічують клітинні компоненти біоплівки. Відомо, що формування біоплівки мікроорганізмами знаходиться під контролем системи quorum sensing, яка забезпечує необхідну для цього комунікацію клітин [9, 16]. Порушення комунікації, в свою чергу, може сприяти більш інтенсивному відкріпленню клітин від біоплівки і переходу до планктонної культури. Наслідком цього є менш виражене зменшення біомаси планктонної культури у порівнянні з біоплівкою (рис. 1 і 3). Крім того, існує припущення [14], що незалізни металокомплекси порфіринів використовують для потрапляння усередину клітин системи транспорту гему та/або гемоглобіну, які є джерелами заліза, недостатність котрого пригнічує життєдіяльність бактерій.

Одержані результати свідчать про більш високу активність вісмутувового комплексу мезо-тетра(4-N-метил)-піридилпорфірину, особливо при високих концентраціях, ніж відповідного комплексу мезо-тетра(6-N-метил)-хінолінілпорфірину. Така залежність спостерігається як за темноті дії цих сполук, так і в умовах їх фотоактивації.

Менша активність Vi^{3+} -ПП IX в порівнянні з вісмутувими комплексами синтетичних порфіринів, а також її незалежність від концентрацій може бути обумовлена можливістю утворення з протопорфірину IX за участю бактеріальної гемоксигенази білівердину, який є потужним анти-



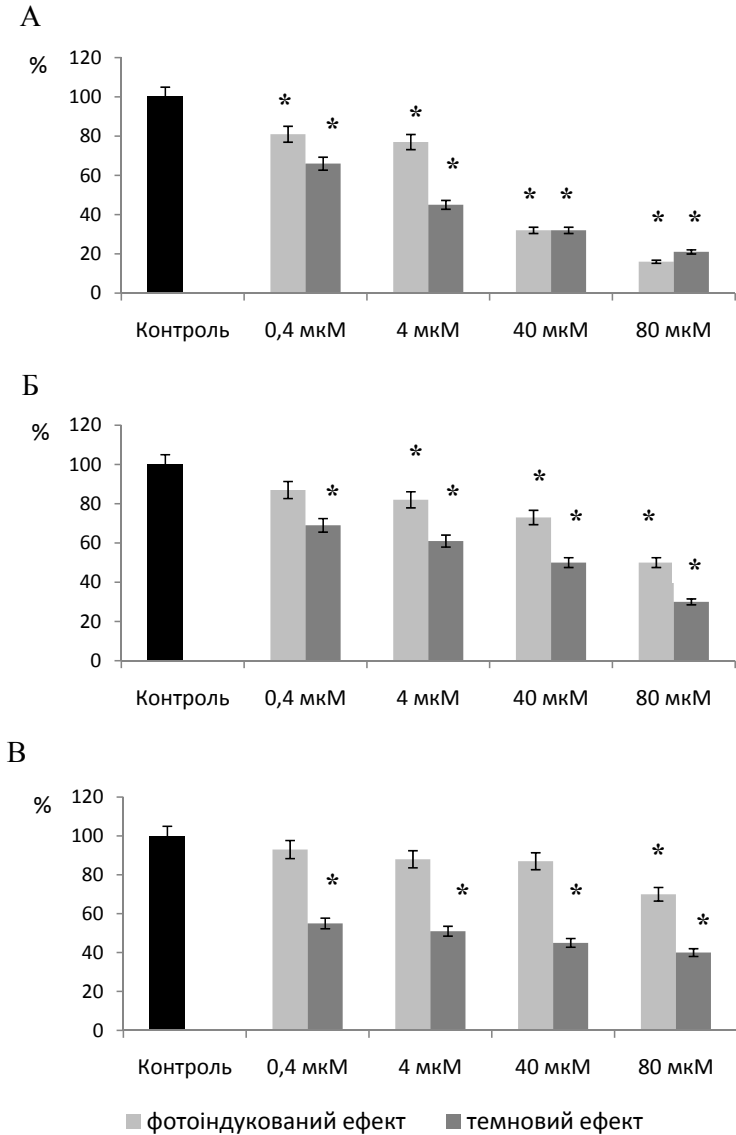


Рис. 3. Вплив вісмутових комплексів порфіринів на синтез кислих мукополісахаридів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 за темнових умов та опромінення (А – Bi^{3+} -ТПП, Б – Bi^{3+} -ТХП, В – Bi^{3+} -ПП IX)

Примітка: * - різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 3. Influence of the porphyrins bismuth complexes on alginate production *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dark conditions and after irradiation (А – Bi^{3+} -TPyP, Б – Bi^{3+} -TQP, В – Bi^{3+} -PP IX)

Note: * - significant different from control

оксидантом [10], а також компонентом бактеріофітохромів (BphPs), які функціонують як сенсорні кінази двокомпонентної сигнальної системи, що забезпечує експресію численних генів, зокрема системи quorum sensing [4, 7]. Металокомплекси синтетичних мезо-заміщених порфіринів не

тільки не є субстратами цього ферменту, але здатні суттєво інгібувати його активність [14].

Враховуючи отримані результати і дані інших авторів, можна припустити, що вісмутові комплекси порфіринів здатні блокувати ріст і утворення біоплівки *P. aeruginosa* за участю різних механізмів, поглиблене вивчення яких буде здійснюватися у подальших дослідженнях.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ишков Ю.В., Жилина З.И., Водзинский С.В. Порфирины и их производные. XXI // Журн. орг. химии. — 2000. — Т. 36, вып. 4. — С. 609–612.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 260 с.
3. Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Зінченко О.Ю., Русакова М.Ю., Жилина З.И., Водзінський С.В., Ишков Ю.В. Взаємодія мікроорганізмів з природними і синтетичними порфіринами // Вісник ОНУ. Біологія. — 2001. — Т. 6, вип. 2. — С. 317–322.
4. Bhoo S.H., Davis S.J., Walker J., Karniol B., Vierstra R.D. Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore // Nature. — 2001. — V. 414. — P. 776–779.
5. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J. Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices // Journal of Clinical Microbiology. — 1985. — V. 22. — № 6. — P. 996–1006.
6. Gillis R.J., White K.G., Kyoung-Hee Choi. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrobial agents and chemotherapy. — 2005. — V. 49. — № 4. — P. 3858–3867.
7. Gooderham W.J., Hancock R.E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* // FEMS Microbiol. Rev. — 2009. — V. 33. — P. 279–294.
8. Hilf M., Yu V.L., Zuravleff J.J. Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlation in a prospective study of 200 patients // Am. J. Med. — 1989. — V. 87 — P. 540–546.
9. Hošťacká A., Čížnár I., Slobodniková L., Kotulová D. Clinical *Pseudomonas aeruginosa*: potential factors of pathogenicity and resistance to antimicrobials // Folia Microbiologi. — 2006. — V. 6. — P. 633–638.
10. Kikuchi G., Yoshida T., Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation // Biochem. Biophys. Res. Com. — 2005. — V. 338. — P. 558–567.
11. Kok-Fai Kong, Suriya Ravi Jayawardena, Shalaka Dayaram Indulkar. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB lactamases, proteases,



quorum sensing, and other virulence factors // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2005. — V. 49, № 11. — P. 4567–4575.

12. O'Toole George A. To Build a biofilm // *Journal of Bacteriology*. — 2003. — V. 185, № 9. — P. 2687–2689.

13. Philippova T.O., Galkin B.N., Zinchenko O.Yu. The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* // 2003. — V. 12, № 11–12. — P. 141–148.

14. Stojiljkovic I., Kumar V., Srinivasan N. Non-iron metalloporphyrins: Potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria // *Mol. Microbiol.* — 1999. — V. 31, № 2. — P. 429–442.

15. Wilson M., Burns T., Pratten J. Killing of *Streptococcus sanguis* in biofilms using a light-activated antimicrobial agent // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 1996. — V. 37. — P. 377–381.

16. Wilson M. Lethal photosensitisation of biofilm-grown bacteria // *J. Proc. SPIE*. — 1997. — V. 3191. — P. 68–78.

Н.Б. Галкин, С.В. Водзинский, А.М. Кириченко, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЁНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853 ПРИ ТЕМНОВОМ И ФОТОИНДУЦИРОВАННОМ ВЛИЯНИИ ВИСМУТ-СОДЕРЖАЩИХ ПОРФИРИНОВ

Реферат

Висмутовые металлокомплексы мезо-тетра(4-N-метил)-пиридил-порфирина (Vi^{3+} -ТПП) и мезо-тетра(6-N-метил)-хинолинилпорфирина (Vi^{3+} -ТХП) дозо-зависимо подавляют образование биоплёнки, накопление биомассы в планктонной культуре и синтез альгината *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. При концентрации 80 мкМ эти показатели снижаются на 85–98% при действии Vi^{3+} -ТПП и на 50–82% — Vi^{3+} -ТХП. В отличие от мезо-замещенных порфиринов ингибирующий эффект висмутового комплекса протопорфирина IX (Vi^{3+} -ПП IX) не зависит от концентрации и не превышает 50–60%. Образование биоплёнки более выражено подавляется всеми изученными соединениями после их фотоактивации. Темновое воздействие висмутовых комплексов оказалось, в



отличие от фотоиндуцированного, более существенным в отношении накопления биомассы в планктонной культуре и содержания альгината в биопленке. Лишь при концентрациях 40 и 80 мкМ Bi^{3+} -ТПП и Bi^{3+} -ТХП сильнее (в 1,2–2 раза) подавляли накопление биомассы в планктонной культуре после фотоактивации.

Ключевые слова: биоплёнка *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, висмутовые металлокомплексы порфиринов, темновое и фотоиндуцированное действие.

M.B. Galkin, S.V. Vodsinsky, F.M. Kirichenko, V.O. Ivanytsia

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

THE PECULIARITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853 BIOFILM FORMATION AT THE DARK OR PHOTOINDUCED ACTION OF BISMUTH-CONTAINING PORPHYRINS

Summary

Bismuth complexes of the *meso*-tetra(4-N-methyl)-pyridylporphyrin, *meso*-tetra(6-N-methyl)-quinolinylporphyrin inhibit biofilm formation, alginate synthesis and planktonic culture growth by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 in dependence of the dose. In concentration of the 80 μM these markers decreased for 85–98% in presence of the Bi^{3+} -TPP, and for 50–82% – Bi^{3+} -THP. In contrast with *meso*-substituted porphyrins, protoporphyrin IX bismuth-complex action was not dependent from a concentration and was not higher then 50–60%. Biofilm formation process was repressed higher in presence of the photoactivated compounds. Instead this, dark action were prevailed to photoinduced on the planktonic culture biomass and alginate synthesis. Only in presents of the concentrations 40 and 80 μM Bi^{3+} -TPP, and Bi^{3+} -THP higher (in 1.2–2 times) inhibit planktonic culture biomass after photoactivation.

Key words: biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, bismuth metallocomplexes of porphyrins, dark and photoinduced action.



І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ПІГМЕНТИ ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ЗЕЛЕНИХ СІРКОБАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 ЗА ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

*Досліджено вплив солей важких металів на пігментний склад фототрофних зелених сіркобактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002. Показано, що внесення $CdSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ чи $CuSO_4$ у середовище знижує вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002. Встановлено, що найменша кількість пігментів у клітинах бактерій є за внесення у середовище 2,5 мМ солей важких металів.*

*Ключові слова: фотосинтезувальні пігменти, фототрофи, зелені сіркобактерії, *Chlorobium limicola* Ya-2002, важкі метали.*

Фотосинтезувальні зелені сіркобактерії родини *Chlorobiaceae* поширені в безкисневих ділянках озера Яворівське [2]. Завдяки їхній життєдіяльності токсичний сірководень, який утворюється сірко- та сульфатвідновлювальними бактеріями [7], використовується як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [1, 2].

У зелених сіркобактерій частина пігментів локалізується безпосередньо у цитоплазматичній мембрані, а частина — в особливих структурах — хлоросомах [14]. Вони розміщуються біля цитоплазматичної мембрани. Процес утворення і форма такого фотосинтезувального апарату залежать від умов культивування бактерій [9].

Відомо, що основними пігментами цих мікроорганізмів є бактеріохлорофіли *c* і *d* [1, 2, 14]. Крім того, всі фототрофні бактерії містять каротиноїди, склад яких у різних видів неоднаковий. У зелених сіркобактерій основним каротиноїдом є хлоробактин. Крім того, вони синтезують ізореніератин. Від складу та співвідношення пігментів залежить забарвлення бактерій [1, 2].

Результати аналізу вмісту у воді іонів важких металів, зокрема Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} та Cu^{2+} протягом кількох останніх років показали їх швидке нагромадження у придонних відкладах, що призводить до порушень функціонування мікробіоценозів [5].

Відомо, що іони важких металів у концентрації 1–2 мМ негативно впливають на клітини мікроорганізмів [3]: порушують фотосинтез, ціліс-



ність мембран, процеси трансляції [12], структуру та функціонування багатьох ферментів [5, 7].

Вплив солей важких металів на аноксигенні зелені фотосинтезувальні сіркобактерії, зокрема на пігментний вміст, не вивчено.

Метою нашої роботи було дослідити вміст фотосинтезувальних пігментів зелених сіркобактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій CdSO_4 , або ZnSO_4 , або $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ чи CuSO_4 .

Матеріали і методи

Фототрофні зелені сіркобактерії *Chlorobium limicola* Ya-2002 виділені й ідентифіковані на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [2].

Бактерії вирощували 10 діб за анаеробних умов при температурі $+25$ – $+28$ °C у середовищі GSB (Green Sulfur Bacteria) [14]. Освітлення при вирощуванні зелених сіркових бактерій було цілодобовим, забезпечувалося лампою розжарювання потужністю 60 Вт. Інтенсивність світла становила 40 лк [2]. Крім того, використовували червоні світлофільтри, які пропускали світло оптимальної для даних бактерій довжини хвилі. Значення рН середовища було нейтральним (рН 7,0) [14].

З метою дослідження здатності фотосинтезувальних сіркобактерій до росту в присутності солей важких металів до середовища вносили різні концентрації (0,5, 1,0, 1,5, 2,0 та 2,5 мМ) CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ чи CuSO_4 .

Для одержання екстракту пігментів клітини зелених сіркобактерій відмивали від середовища ізотонічним розчином натрій хлориду, центрифугували 30 хв при 8000 об/хв. Надосадкову рідину зливали, а одержану пастоподібну біомасу тонким шаром наносили на поверхню скла і висушували за температури $+40$ °C. Висушені клітини руйнували розтиранням із кварцовим піском [6, 10].

Екстракцію пігментів проводили сумішшю етанолу та ацетону в об'ємному співвідношенні 1:1 до повного знебарвлення осаду. Одержані екстракти використовували для реєстрації спектрів поглинання [6].

Розділення суміші пігментів на окремі компоненти проводили хроматографічно з використанням силуфолових пластинок ("Sorbfil", Росія) у висхідному потоці системи розчинників бензин : ацетон : петролейний ефір : гексан в об'ємному співвідношенні 10:10:3:10 [6, 10, 15].

Ідентифікацію пігментів проводили за забарвленням, величинами R_f та основними максимумами поглинання при відповідній довжині хвилі [13, 15].

Спектри поглинання екстрагованих пігментів фототрофних сіркобактерій записували у діапазоні довжин хвиль від 350 до 900 нм на реєструвальному двопробеновому спектрофотометрі "Specord M-40".

Концентрації основних пігментів пурпурових та зелених сіркобактерій розраховували за формулою:



$$C = \frac{D}{E \cdot l}$$

де C — концентрація пігменту, г/л;

D — оптична густина розчину;

E — питомий коефіцієнт екстинкції відповідного пігменту ($E_{\text{кар}}$ — 271,8 при 474 нм, $E_{\text{бхл}}$ — 930,0 при 770 нм), л · (г · см)⁻¹;

l — товщина поглинаючого шару, см, ($l=0,3$ см).

Вміст пігментів з розрахунку на 1 г сухої ваги клітин обчислювали за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot K}{H}$$

де A — кількість пігменту на 1 г сухої ваги клітин, мг/г;

C — концентрація пігменту, г/л;

V — об'єм екстракту, мл;

H — наважка клітин, г;

K — відношення об'єму елюату до об'єму розчину, нанесеного на хроматограму [6].

Вираховували основні статистичні показники за безпосередніми даними (середнє арифметичне — M ; стандартна похибка середнього арифметичного — m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних, обраховували коефіцієнт Ст'юдента [4]. Достовірною вважалася різниця при показнику достовірності $P > 0,95$. Статистичне опрацювання результатів проводили, використовуючи програми Excel та Origin.

Результати та їх обговорення

Хроматографічне розділення компонентів екстрактів клітин *C. limicola* Ya-2002 дало змогу виявити пігменти різні за забарвленням та величиною R_f (див. таблицю).

Таблиця

Пігментний склад фотосинтезувальних зелених сіркобактерій *Chlorobium limicola* Ya-2002

Table

Pigments composition of photosynthetic green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002

Пігмент	Колір пігменту	Максимум поглинання, λ, нм	Значення R_f
Бактеріохлорофіл <i>c</i>	Темно-зелений	356, 384, 668	0,43
Бактеріохлорофіл <i>d</i>	Світло-зелений	408, 654, 608	0,61
Хлоробактин	Яскраво-жовтий	430	0,89
Ізоренієратин	Коричнево-рожевий	466	0,84



За впливу різних концентрацій CdSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, CuSO_4 у розчині екстрагованих пігментів з клітин *C. limicola* Ya-2002 основні максимуми поглинання спостерігали при 356, 384, 408, 430, 466, 608, 654, 668 нм, що підтверджує наявність бактеріохлорофілів *c*, *d* і каротиноїдів — ізоренієратину та хлоробактину (рис. 1).

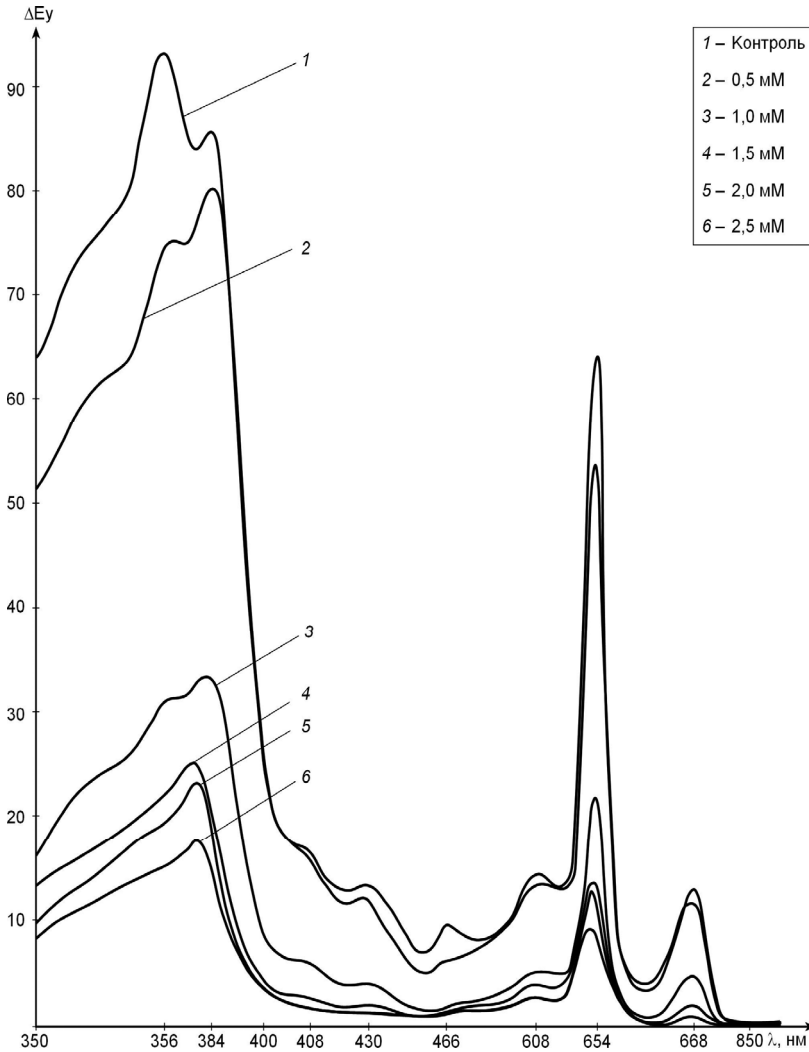


Рис. 1. Спектри поглинання пігментів *Chlorobium limicola* Ya-2002, вирощених за впливу CuSO_4

Fig. 1. Absorption spectra of *Chlorobium limicola* Ya-2002 pigments grown under the influence of CuSO_4

Дослідження спектрів поглинання та хроматографічний розподіл дозволили підтвердити наявність досліджуваних [10, 13] пігментів і визначити їхній вміст у клітинах бактерій *C. limicola* Ya-2002, вирощених за різних концентрацій солей важких металів.

Як видно з рис. 2, на хроматограмах переважали темно-зелені, світло-зелені, коричнево-зелені, яскраво-жовті та коричнево-рожеві ділянки.

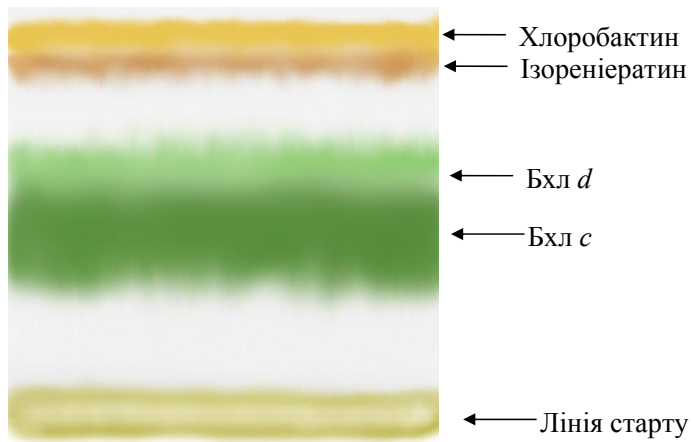


Рис. 2. Хроматографічне розділення фотосинтезувальних пігментів клітин *Chlorobium limicola* Ya-2002, вирощених у середовищі GSB

Fig. 2. Chromatographic separation of the photosynthetic pigments of *Chlorobium limicola* Ya-2002 cells grown in GSB medium

Досліджували кількісні зміни пігментного складу за впливу солей важких металів. Під час росту в середовищі без внесення солей металів вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002 був найвищим. У клітинах бактерій визначена більша кількість бактеріохлорофілів *c* та *d*, значно менше — каротиноїдів (рис. 3–6).

Внесення солі Кадмію у середовище культивування спричинило суттєве зменшення кількості фотосинтезувальних пігментів у клітинах бактерій *C. limicola* Ya-2002. За найвищої досліджуваної концентрації CdSO_4 кількість бактеріохлорофілів *c* та *d* зменшилася відповідно на 20% та 23%, порівняно з контролем. Вміст хлоробактину та ізоренієратину за цих умов зменшився, відповідно, на 23% та 33%, порівняно з вмістом цих пігментів у клітинах контрольного варіанту (рис. 3).

Відомо, що кадмій сульфат у концентрації 50 мг/дм³ спричиняє зникнення забарвлення бактерій *Pseudomonas aeruginosa* [8]. Очевидно, іони Кадмію включаються у структуру фотосинтезувальних пігментів, наслідком чого є пригнічення їх функції та зменшення кількості.

За внесення ZnSO_4 у середовище також відмітили зменшення кількості пігментів у клітинах зелених сіркобактерій *C. limicola* Ya-2002, порівняно з контролем. Збільшення концентрації солі металу до 2,5 мМ призвело до зменшення вмісту бактеріохлорофілів *c* та *d*, відповідно, на 33% та 32%, порівняно з контролем. Вміст хлоробактину та ізоренієратину

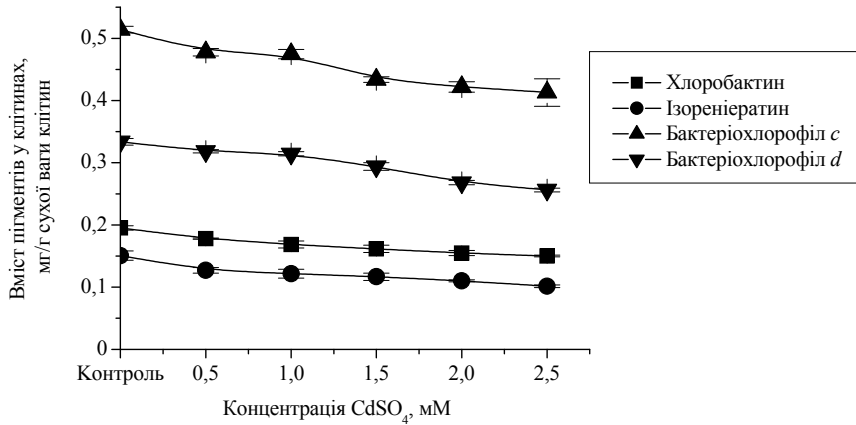


Рис. 3. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій CdSO₄

Fig. 3. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different CdSO₄ concentrations

вже зменшився за внесення 0,5 мМ ZnSO₄ (рис. 4). Найбільший вплив виявляв цинк сульфат у концентрації 2,5 мМ, що, можливо, обумовлено здатністю Zn²⁺ конкурувати з Mg²⁺ за активний центр у молекулі бактеріохлорофілів [9].

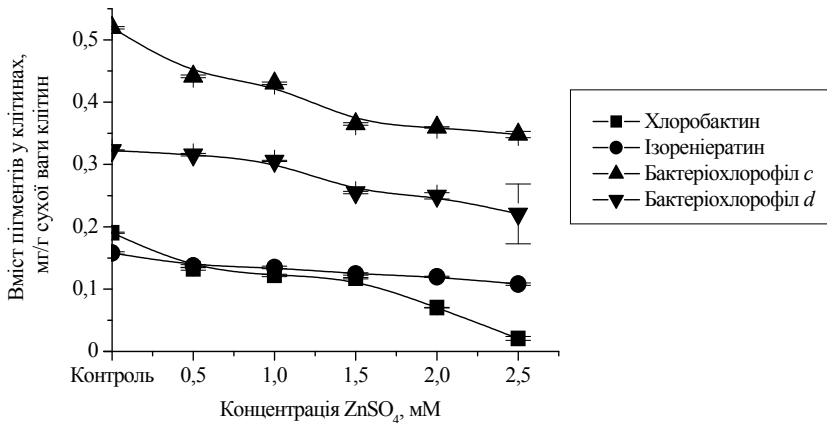


Рис. 4. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій ZnSO₄

Fig. 4. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different ZnSO₄ concentrations

За впливу 2,5 мМ плумбум нітрату кількість бактеріохлорофілів c та d зменшилася відповідно на 7% та 25%, порівняно з контролем. За цих умов зменшувався вміст хлоробактину та ізоренієратину відповідно

на 53% та 28%, порівняно з контролем (рис. 5). Можливо, така дія Pb^{2+} зумовлена негативним впливом на плазматичну мембрану, що у свою чергу зв'язана із фотосинтезуючим апаратом.

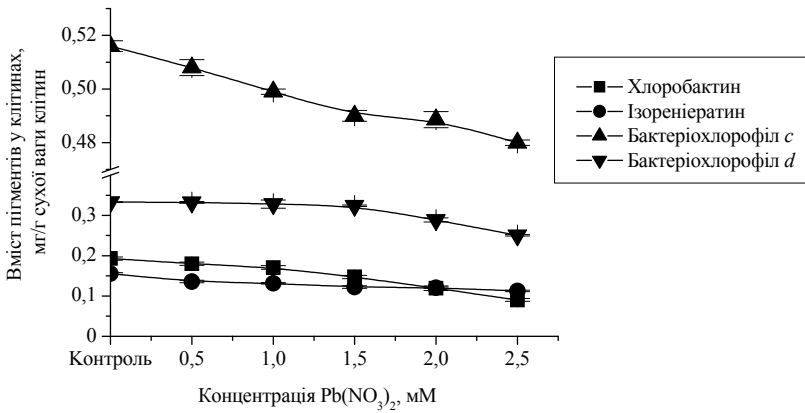


Рис. 5. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій $Pb(NO_3)_2$

Fig. 5. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different $Pb(NO_3)_2$ concentrations

Купрум сульфат також суттєво зменшував вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002. Внесення 2,5 мМ солі Купруму спричинило зменшення вмісту бактеріохлорофілів c та d відповідно на 31% та 27%, порівняно з контролем. Кількість каротиноїдів у клітинах *C. limicola* Ya-2002 за цих умов зменшувалась подібно до вмісту бактеріохлорофілів (рис. 6).

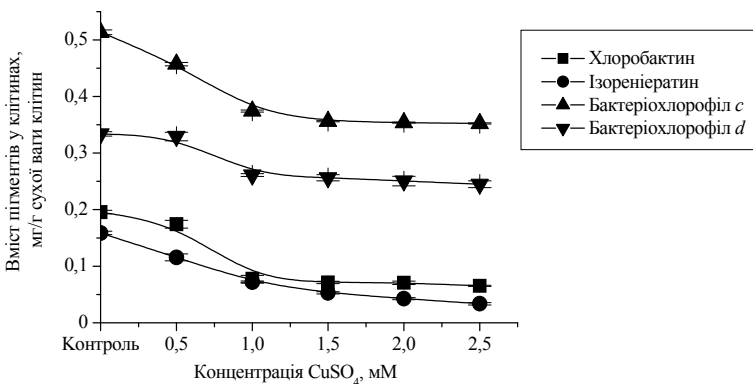


Рис. 6. Вміст фотосинтезувальних пігментів у клітинах *Chlorobium limicola* Ya-2002 за впливу різних концентрацій $CuSO_4$

Fig. 6. Content of photosynthetic pigments in the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 under the influence of different $CuSO_4$ concentrations

Припускаємо, що подібно до інших іонів металів, Cu^{2+} проникає у клітину і входить до складу життєвоважливих молекул, включаючи пігменти, викликаючи їх дезактивацію [11].

Таким чином, за умов росту *C. limicola* Ya-2002 у середовищі зі солями важких металів зменшується кількість фотосинтезувальних пігментів у клітинах бактерій, що, очевидно, призводить до пригнічення фотосинтезу. На основі результатів наших досліджень побудували узагальнюючу схему впливу солей важких металів на вміст пігментів у клітинах *C. limicola* Ya-2002:

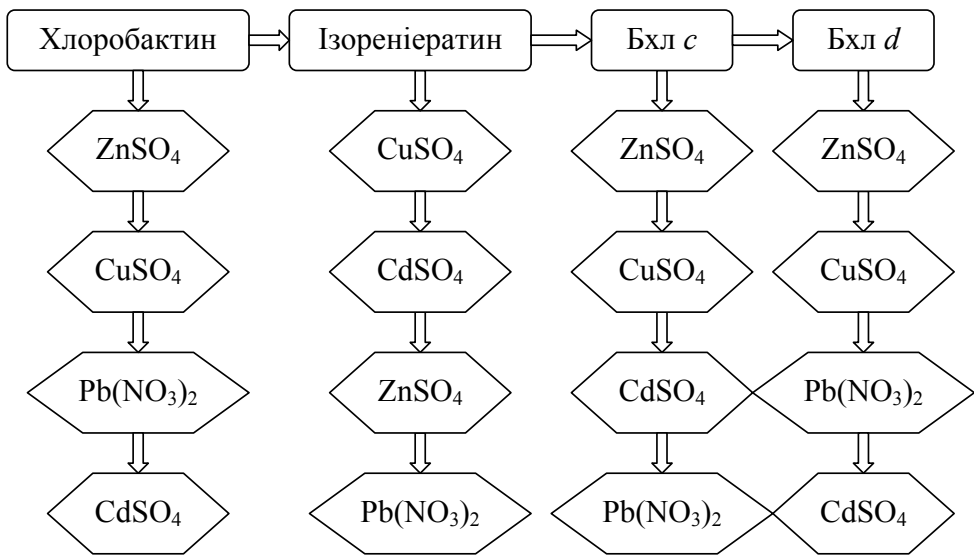


Рис. 7. Узагальнююча схема впливу солей важких металів на вміст пігментів клітин *C. limicola* Ya-2002

Fig. 7. The generalized scheme of the influence of heavy metals salts on the pigments content of *C. limicola* Ya-2002 cells

У клітинах *C. limicola* Ya-2002 за впливу 2,5 мМ кадмій сульфату вміст хлоробактину та бактеріохлорофілу *d* знизився на 23%, а бактеріохлорофілу *c* та ізоренієратину — на 20 і 33%, відповідно. За таких умов плумбум нітрат інгібував синтез клітинами бактеріохлорофілу *d* та ізоренієратину на 25–28%, а бактеріохлорофілу *c* та хлоробактину — на 7 і 53%, порівняно з контролем. Внесення 2,5 мМ ZnSO_4 спричинило зниження вмісту ізоренієратину та бактеріохлорофілів на 32–33%, а хлоробактину на 89%. Найвища концентрація (2,5 мМ) купрум сульфату по-різному пригнічувала синтез пігментів: хлоробактину — на 67%, ізоренієратину — на 79%, бактеріохлорофілів *d* і *c* — на 27–31%, порівняно з контролем.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баран І.М., Кушкевич І.В., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Систематичне положення, фізіолого-біохімічні властивості та екологія зелених фототрофних бактерій // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. — 2007. — Вип. 43. — С. 48–60.
2. Горішний М.Б. Екологічне значення зелених сіркових бактерій в утилізації сірководню: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2008. — 20 с.
3. Кушкевич І.В. Вплив солей важких металів на фізіолого-біохімічні характеристики бактерій циклу сірки: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2010. — 20 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Мороз О.М., Гудзь С.П., Подопригора О.І. та ін. Вплив важких металів на ріст та відновлення сульфатів *Desulfovibrio desulfuricans* // Наук. вісн. Ужгор. ун-ту. Сер. Біол. — 2009. — Вип. 26. — С. 193–202.
6. Мусієнко М.М. Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин. — К.: Фітосоціоцентр, — 2001. — 200 с.
7. Перетятко Т.Б. Екологічне значення сульфатвідновлювальних бактерій штучних водойм (на прикладі Яворівського родовища сірки): Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — К., — 2007. — 20 с.
8. Рильський О.Ф. Реакція пігментсинтезуючих бактерій *Pseudomonas fluorescens* та *Pseudomonas aeruginosa* на дію важких металів // Актуальні питання біології, екології та хімії. — 2009. № 1. — С. 47–51.
9. Blankenship R.E. Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis. — USA, 1995. — 1368 p.
10. Britton G. General carotenoid methods. Methods in enzymology. — London: Academic press, 1985. — Vol. 3, Part B. — P. 113–145.
11. Brown N.L. Copper resistance determinants in bacteria // Plasmid. — 1992. — № 27. — P. 41–51.
12. Gadd G.M. Metals and microorganisms: a problem of definition // FEMS Microbiol. Letts. — 1992. — № 10. — P. 197–204.
13. Oelze J.M. Analysis of bacteriochlorophylls // Meth. microbiol. — 1985. — Vol. 18. — P. 257–284.
14. Overmann J. Green sulfur bacteria. — New York: Springer-Verlag, 1999. — P. 245–256.
15. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as fingerprinting technique for microbial phototrophs / Frigard et al. FEMS Microbiol. Ecol., 1996. — № 20. — P. 69–77.

І.В. Кушкевич, С.А. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,
тел.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

**ПИГМЕНТЫ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ЗЕЛЕННЫХ
СЕРОБАКТЕРИЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002
ПОД ВЛИЯНИЕМ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

Реферат

Исследовано влияние солей тяжелых металлов на пигментный состав фототрофных зеленых серобактерий *Chlorobium limicola* Ya-2002. Определено, что внесение $CdSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ или $CuSO_4$ в среду снижает содержание фотосинтезирующих пигментов в клетках *C. limicola* Ya-2002. Установлено, что наименьшее количество пигментов в клетках бактерий наблюдается при внесении в среду 2,5 мМ солей тяжелых металлов.

К л ю ч е в ы е с л о в а : фотосинтезирующие пигменты, фототрофы, зеленые серобактерии, *Chlorobium limicola* Ya-2002, тяжелые металлы.

I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevsky str., Lviv, 79005, Ukraine,
tel.: +38 (096) 107 42 39, e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

**PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS OF GREEN SULFUR
BACTERIA OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 UNDER
THE INFLUENCE OF HEAVY METALS SALTS**

Summary

The influence of heavy metals salts on the pigment composition of phototrophic green sulfur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 has been studied. It was shown that the introduction of $CdSO_4$, $ZnSO_4$, $Pb(NO_3)_2$ or $CuSO_4$ in the medium reduces the content of pigments in cells photosynthetic *C. limicola* Ya-2002. It is established that the least amount of pigment is in the bacteria cells in the medium under the introducing 2.5 mM of heavy metals salts.

К e y w o r d s : photosynthetic pigments, phototrophs, green sulfur bacteria, *Chlorobium limicola* Ya-2002, heavy metals.



УДК 577.152.3

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

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

ПЕКТОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

*Исследована способность синтезировать внеклеточные пектолитические ферменты с широким спектром действия у 353 штаммов бактерий рода *Bacillus* чашечным и титровальным методами. Показано, что большая часть исследованных бактерий способна синтезировать и выделять в среду полигалактураназу (60,6% исследованных штаммов), и лишь 13,9% из них выделяли в среду пектинэстеразу. Установлено, что активность пектинрасщепляющих ферментов у бацилл различна и зависит от состава питательной среды.*

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

В стенках клеток и в межклеточных прослойках высших растений как в корнеплодах, так и в стеблях и фруктах присутствуют тяжелоразрушаемые пектины [6]. Содержание этих веществ в растительном материале не превышает 1%, но тем не менее они обеспечивают целостность клетки, являясь ее цементирующим материалом, и играют особо важную роль в метаболизме резервных веществ [3]. Пектиновые полисахариды достаточно хорошо изучены вследствие их широкого использования в различных отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности в процессах размягчения плодов.

Распад пектиновых полисахаридов катализируется микроорганизмами с помощью двух групп пектолитических ферментов: пектинэстеразы и полигалактураназы. Последовательным действием этих ферментов достигается полное разложение пектиновой молекулы. Пектинэстераза (ПЭ) катализирует омыление метильных эфирных групп галактурановой кислоты и широко распространена в основном в клетках растений. Полигалактураноза (ПГ) осуществляет гидролитические расщепление 1,4-глюкозидных связей между молекулами галактурановой кислоты и найдена в основном в микроорганизмах. Оба фермента высокоспецифичны и зависят от условий культивирования и наличия в среде необходимого субстрата.

© Л.В. Авдеева, А.И. Осадчая, Л.А. Сафронова, В.М. Иляш, М.А. Хархота, 2010



На сегодняшний день промышленные препараты пектиназ производят только из грибов. В то же время значимое место среди возможных продуцентов пектолитических ферментов занимают бактерии и среди них бактерии рода *Bacillus* [2, 7, 12]. Согласно имеющимся литературным данным, хотя и довольно противоречивым, бациллы вида *B. subtilis* обладают выраженной способностью синтезировать пектолитические ферменты. Однако по данным некоторых исследователей эти бактерии не всегда способны продуцировать оба типа пектиназ, одни — лишь только пектинэстеразу или полигалактуроназу [4], другие способны синтезировать и полигалактуроназу, и пектинэстеразу [5, 11].

Важность поиска таких штаммов определяется практической задачей, перспективностью использования ферментных препаратов в разных отраслях народного хозяйства, основанных на переработке растительного сырья, повышении биологической ценности кормов или разложения растительных остатков в почве. На практике во ВНИИ виноградарства и виноделия "Магарач", Грузинском НИИ пищевой промышленности и Краснодарском комбинате биохимических и витаминных препаратов уже установлена высокая эффективность пектолитических препаратов на основе грибов в повышении биологической ценности кормов [2]. И если для снижения вязкости яблочного сока наиболее эффективными являются препараты, обладающие активностью как пектинэстеразы, так и полигалактуроназы, то для обработки земляники, винограда нужны препараты в основном с высокой полигалактуроназной активностью. Сфера применения пектолитических ферментов расширяется. Они уже находят свое применение в медицинской промышленности для получения ряда ценных лекарственных соединений. Поэтому все еще сохраняется потребность поиска новых продуцентов пектолитических ферментов.

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение пектинолитической активности различных видов бактерий рода *Bacillus*, а также изучение влияния состава среды на образование этих ферментов в условиях глубинного культивирования.

Материалы и методы

Объектом исследований пектолитической активности были 353 штамма 23 видов рода *Bacillus* с коллекции отдела антибиотиков Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, изолированных из различных эконисш (почвы, лечебные грязи, желудочно-кишечный тракт животных и людей и другие).

Скрининг активных по пектиназам культур проводили в два этапа. Первый этап заключался в прямом отборе активных культур разных видов бактерий из их посевов на поверхность агаризованной среды со специфическим для них субстратом, как источником углерода. Образование и активность ферментов пектолитического комплекса оценивали по их действию на пектин по появлению отчетливых зон деэтерифицированного



пектинового субстрата (0,5%) после 2-суточной инкубации при 37 °С на МПА. Под действием метилового красного через 1–2 часа под влиянием образующейся галактуроновой кислоты вокруг выросших колоний появлялись молочно-белые зоны различного диаметра. Под действием бромтимолового синего, который также применяли для окрашивания, проявлялись прозрачные синеватые зоны.

Для исследования ферментативной активности штаммов, отобранных в результате первого этапа, бактериальные культуры выращивали в колбах емкостью 750 мл в условиях аэрации на качалке (200 об/мин) при 37 °С в течении двух суток на жидкой синтетичной среде следующего состава (в г/л): натрия цитрат — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, pH среды — $7,0 \pm 0,2$ с добавлением яблочного пектина (0,5% в 0,5 М цитратно-фосфатном буфере, pH 5,0).

По окончании ферментации в бесклеточном фильтрате определяли титрометрическим методом активность пектинэстеразы (ПЭ) по нарастающему количеству карбоксильных групп и активность полигалактуроназы (ПГ) по учету количества образующихся альдегидных групп [1].

За единицу пектолитической активности принимали количество фермента, которое катализировало за 1 час при 37 °С распад 1 г пектина и выражали числом условных единиц в 1 мл культуральной жидкости (ед/мл).

Результаты и их обсуждение

Активные штаммы бактерий на агаризованной среде вследствие расщепления пектина под влиянием синтезируемых ими пектолитических ферментов образовывали зоны просветления двух типов: прозрачные зоны с бледно-синим ореолом, которые через несколько часов теряли четкость контуров, и/или четкие стойкие зоны с бело-молочным ореолом. Отличались зоны также по диаметру и контрастности и выявлялись в разные сроки, что, возможно, является отражением степени активности разных типов пектиназ, составляющих пектолитический комплекс. Неактивные культуры не образовывали зон гидролиза.

Установлено, что 60,6% штаммов бацилл обладали способностью разлагать пектин. Среди них наиболее активно гидролизировали пектин, образуя на этом субстрате различные зоны, штаммы вида *B. subtilis* (69,7%). Из них у 40 штаммов этого вида зоны имели достаточно большой диаметр (20–25 мм) (табл.). Эту группу культур можно считать наиболее активной и практически значимой, так как они располагают разным набором пектолитических ферментов и способны наиболее полно расщеплять пектиновый субстрат.

Достаточно активными в расщеплении пектина были также штаммы *B. licheniformis*. Штаммы этого вида также образовывали зоны, разные по диаметру, а 5 штаммов из них были наиболее активными и давали оба типа зон.



Таблица

Table

Пектиназная активность различных видов бактерий рода *Bacillus*Pectinases activity of different bacteria species of genus *Bacillus*

Вид <i>Bacillus</i>	Общее количество штаммов	Активные штаммы										Неактивные штаммы		
		Зоны с бледно-синим ореолом, мм					Зоны с молочным ореолом, мм					Зоны с синим и молочным ореолом, мм		Неактивные штаммы
		Всего штаммов	до 10	до 20	выше 20	Всего штаммов	до 10	до 20	выше 20	Всего штаммов	до 20	выше 20		
<i>B. subtilis</i>	228	118	19	60	39	41	4	21	16	40	18	22	69	
<i>B. licheniformis</i>	25	13	3	6	4	12		4	8	5	3	2		
<i>B. cereus</i>	24	1			1	6		5	1	1	1		17	
<i>B. megaterium</i>	13	2	2	2	1	2		2					9	
<i>B. pumilus</i>	14	1			1	4		3	1				9	
<i>B. coagulans</i>	3	1	1										2	
<i>B. circulans</i>	4					2		1	1				2	
<i>B. alvei</i>	3					1			1				2	
<i>B. polymyxa</i>	2												2	
<i>B. brevis</i>	3					1			1				2	
<i>B. thuringiensis</i>	2												2	
<i>B. firmus</i>	2	1		1									1	
<i>B. laterosporus</i>	2												2	
<i>B. sphaericus</i>	2												2	
<i>B. badius</i>	1												1	
<i>B. bombycis</i>	1												1	
<i>B. lentus</i>	1	1		1									-	
<i>B. pasteurii</i>	1												1	
<i>B. macerans</i>	2												2	
<i>B. pulvifaciens</i>	1					1		1						
<i>B. species</i>	15	2	1	1									13	
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	2	2	2		1		1						
<i>B. silboestris</i>	1	1	1											
<i>Bceeo</i>	353	143	24	74	45	71	5	37	29	46	22	24	139	



У представителів видів *B. polymyxa*, *B. thuringiensis*, *B. laterosporus*, *B. sphaericus*, *B.adius*, *B. bombycis*, *B. pasteurii*, *B. macerans* не встановлено наявності пектолітичних ферментів. У видів *B. firmus*, *B. lentus*, *B. silvestris*, *B. coagulans* активними були по одному штаму.

В останнє час все більше уваги приділяється пошукам продуцентів з широким спектром внекліткових пектиназ. Відомо, що повне розкладання пектинової молекули досягається лише послідовним дією двох типів пектиназ. Полигалактураноаза діє на нерозчинні форми пектина середньої рослинної пластинки, а пектинестераза доповнює і посилює дію полигалактураноази.

Таким чином, в результаті проведених досліджень показано, що бацили різних видів мають неоднакову по ступеню пектолітичної активності. При цьому 143 штаму (40,5%) з них утворювали тільки прозорі зони, 71 штаму (20,1% від всіх досліджуваних) — зони з молочним ореолом і тільки 46 штаму з досліджуваних утворювали і те і інші зони, а 139 штаму бацил (39,4%) виявилися взагалі не здатними розщеплювати пектиновий субстрат.

Штаму, які утворювали і інші зони і найбільшого діаметра (20 мм і більше), були обрані для наступного етапу скринінгу з метою в'ясування закономірностей синтезу і проявлення пектолітичної активності у досліджуваних бактерій при їх глибокому культивуванні в середовищах, де в якості єдиного джерела вуглецю використовували глюкозу, пектин або обидва джерела разом.

Більшість штаму в середовищі з пектином характеризувалися більш активним синтезом полигалактураноази, ніж в середовищі з глюкозою, що є підтвердженням індукованого характеру синтезу цього ферменту у досліджуваних бактерій і узгоджується з наявними даними для більшості інших мікроорганізмів [2—4, 6, 10].

В той же час 74 штаму різних видів бацил полигалактураноазу синтезували більш активно в середовищі без пектина. Очевидно, ПГ у цих культур є конститутивним ферментом. Подібні повідомлення також мають [9, 13]. Отже, при вивченні властивостей мікроорганізмів, що продуцують пектолітичні ферменти, необхідно обов'язково враховувати їх здатність змінювати свій обмін в залежності від складу середовища і умов культивування.

І незважаючи на те, що в пектолітичному комплексі досліджуваних бацил виявлено ПЗ в значно менших кількостях, ніж ПГ (в 5—36 і більше разів), таке наявність її в препаратах дуже важливо, оскільки за даними ряду дослідників вона гідролізує пектин в 1000 разів швидше і глибше порівняно з ПГ, а в поєднанні з ПГ вона значно посилює розщеплення пектинового субстрату. Однак мають і інші повідомлення, що наявність цього ферменту в препаратах в значних кількостях не завжди бажано, так як, відщепляючи

метоксильные группы в пектиновых веществах, он может способствовать накоплению нежелательного токсичного метанола [11].

Из штаммов бацилл, синтезирующих ПЭ, было отобрано для дальнейшей работы 12 штаммов, способных продуцировать достаточно высокие количества этого фермента, и 7 штаммов бацилл, активных только по ПГ, а также 14 штаммов, активных и по ПЭ, и по ПГ.

Таким образом, исследуемые бактерии обладают в целом выраженной пектолитической активностью. Эти ферменты различаются между собой по механизму действия и субстратной специфичности. Исходя из этого, можно предвидеть, что включение ферментных препаратов из бацилл, активных как по ПЭ, так и ПГ в корм животным, должно способствовать снижению в нем вязкости пектиновых веществ, увеличению количества растворимых веществ и повышению его усвояемости в целом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лифшиц Д.Б.* Методы определения пектолитической активности препаратов плесневых грибов // Унифицирование методов определения активности ферментных препаратов производственного назначения. К.: УкрНИИНТИ, 1967. — 42 с.
2. *Лобанок А.Г., Астапович Н.И., Михайлова Р.В., Павловская Ж.И.* Регуляция образования пектолитических и целлюлолитических ферментов микроорганизмами // Проблемы биоконверсии растительного сырья. — М.: Наука, 1986. — С. 192–214.
3. *Лобанок А.Г., Бабицкая В.Г., Богдановская Ж.Н.* Микробный синтез на основе целлюлозы : Белок и другие ценные продукты. — Минск: Наука и техника, 1988. — 261 с.
4. *Микробные ферменты и биотехнология.* Под ред. В.М. Фогарти. М.: Агропромиздат, 1986. — 208 с.
5. *Рид Дж.* Ферменты в пищевой промышленности. М.: Пищевая промышленность, 1971. — 44 с.
6. *Фениксова Р.В.* Биосинтез ферментов микроорганизмами // Ферменты микроорганизмов. М.: Наука, 1973. — 58 с.
7. *Gierasimiuk J., Strzelczyk E.* Cellulolytic and pectolytic activity of bacilli isolated from the root-free soil and the rhizosphere of different forest trees // Folia forest. pol. A. — 2003. — № 45.— P. 15–26.
8. *Kashyap D.R., Chandra S., Kaul A., Tewari R.* Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus sp.* DT7 // World. J. Microbiol. and Biotechnol. — 2000. — V. 16, № 3. — P. 277–282.
9. *Kelly C.T., Fogarty W.M.* Production and properties of polygalacturonatatelyase by an alkalophilic microorganism *Bacillus sp.* RK9 // Can. J. of microbiol 1978. — V. 24, № 10, — P. 1164–1172.



10. Li Li-heng, Lan Shi-le, Cao Xing-zhi, Xie Da-ping. Оптимальные условия для определения пектиназы и ксиланазы у *Bacillus circulans* // J. Hutnan. Agr. Univ. — 2005. — V. 31, № 3. — P. 304–306.
11. Samuel K.C., Gabriel M. Pectic Enzyme Activities of Bacteria Associated with Rotted Onions (*Allium cepa*) // Appl. and Environ. Microbiol. — 1981. — V. 42, № 4. — P. 585–589.
12. Tamburini E., Leon A.G., Perito B., Mastromei Y. Characterization of bacterial pectinolytic strains involved in the Water retting process // Environ. Microbiol. — 2003. — V. 5, № 9. — С. 730–736.
13. Ward O.P., Fograry W.M. Polygalacturonase lyase production by *Bacillus subtilis* and *Flavobacterium pectinovorum* // Appl. Microbiol. — 1974. — V. 27. — P. 346–350.

УДК 577.152.3

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

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

ПЕКТОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДА *BACILLUS*

Реферат

Досліджена здатність синтезувати позаклітинні пектолітичні ферменти з широким спектром дії у 353 штамів бактерій роду *Bacillus* чашковим і титрувальним методами. Показано, що велика частина досліджених бактерій здатна синтезувати і виділяти в середовище полігалактуранази (60,6% досліджених штамів), і лише 13,9% з них виділяли в середовище пектинестеразу. Встановлено, що активність пектинрозщеплюючих ферментів у бацил різна і залежить від складу поживного середовища.

Ключові слова: пектинази, бактерії роду *Bacillus*.



UDC 577.152.3

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

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

PECTOLITIC BACTERIA ACTIVITY OF GENUS *BACILLUS*

Summary

There have been investigated the ability of synthesising of extracellular pectolitic enzymes with a wide spectrum among 353 strains of genus *Bacillus*. There have been shown that the most of them (60.6% of investigated strains) are capable to synthesising and allocating the polyhalactouronases in the medium, and only 13.9% of them allocated the pectynesterases in the medium. There have been established that activity of pectolytic enzymes of bacilli is different and depends upon nutrient of the medium.

Key words: pectinases, bacteria of genus *Bacillus*.



С.В. Приходько, О.С. Бондар, І.М. Курмакова, О.П. Третяк

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

РІСТ КОРОЗІЙНО НЕБЕЗПЕЧНИХ БАКТЕРІЙ ЗА ПРИСУТНОСТІ ПЕСТИЦИДУ 2,4-Д

Експериментально доведено, що корозійно небезпечні бактерії, зокрема сульфатвідновлювальні, залізовідновлювальні, денітрифікувальні – резистентні до пестициду 2,4-Д, що обумовлює ріст за його присутності як планктонних клітин, так і клітин у складі біоплівки. Визначено зростання сульфатвідновлювальної активності бактерій, що може підсилювати корозійну агресивність ґрунту при застосуванні препаратів з діючою речовиною – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота.

Ключові слова: корозійно небезпечні бактерії, біоплівка, біокорозія, пестицид 2,4-Д.

Застосування різноманітних засобів захисту рослин призводить до змін у складі мікробних угруповань ґрунту, які існують у природних екосистемах як специфічно організовані прикріплені до субстратів біоплівки [1, 2]. Їх перебудова відбувається із переважним розвитком мікроорганізмів, резистентних до полютантів, зокрема пестицидів [3]. До складу корозійного мікробного угруповання біоплівки, сформованої на металевій поверхні, входять сульфатвідновлювальні (СВБ), залізовідновлювальні (ЗВБ), денітрифікувальні (ДНБ) бактерії та ін. [4]. Саме сульфатвідновлювальні бактерії вважаються головним чинником процесу біокорозії сталі, яка є причиною більше половини усіх пошкоджень підземних газопроводів. Розвиток корозійно небезпечної мікрофлори під впливом пестицидів вивчено не достатньо, хоча встановлено, що техногенний пресинг на ґрунтову екосистему веде до порушення мікробної сукцесії [5–7], при високих рівнях техногенних забруднень можлива трансформація мікробних угруповань в корозійно активні [1], деякі пестициди, зокрема Лінурон, стимулює швидкість біопошкодження сталі у ґрунті [8]. При цьому особливості зміни чисельності бактерій у біоплівці, яка формується на поверхні сталі під дією пестицидів, практично не вивчено, хоча це питання є важливим для забезпечення техногенної безпеки різноманітних металевих споруд технологічного призначення.

До 19 різних препаратів, які застосовуються в агропромисловому комплексі, входить 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) у вигляді



солі або ефіру. У ґрунті вона розкладається через 280–300 діб (норма внесення 222–300 кг/га) за участю мікроорганізмів родів *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Nocardia* [9].

Мета роботи — дослідження впливу пестициду 2,4-Д на чисельність корозійно небезпечних бактерій за умов біокорозії маловуглецевої сталі.

Матеріали і методи

Лабораторний модельний експеримент проводили у герметичних скляних ємностях (100 мл), заповнених середовищем Постгейта „В” із внесенням 10 мл суспензії мікробного угруповання (3-х добова культура з наступною чисельністю бактерій в інокуляті: СВБ — $5 \cdot 10^5$ кл/мл, ЗВБ — 10^4 кл/мл, ДНБ — 10^5 кл/мл), в які занурювали зразки сталі СтЗпс (24 см²). Концентрація 2,4-Д (10% розчин бутилового ефіру 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти) — 1 г/л. Облік бактерій на поверхні сталі проводили на 9, 24, 48, 72, 168, 240 та 336 годину експозиції. Бактерії біоплівки знімали ультразвуком (25 кГц, прилад УЗМ-003/н). Кількість бактерій у змиві визначали методом граничних десятикратних розведень при висіві відповідної суспензії на поживні середовища: СВБ — Постгейта „В”, ЗВБ — Каліненка, ДНБ — Гільтая [10]. Культивування проводили при температурі 28 ± 2 °С. Чисельність мікроорганізмів на рідких поживних середовищах визначали за допомогою таблиць Мак-Креді [11].

Концентрацію біогенного сірководню визначали методом йодометричного титрування за загальноприйнятою методикою [12]. Відносна похибка представлених результатів при $n=3$ не перевищує 5%.

Результати та їх обговорення

Процес мікробної корозії сталі визначається якісним та кількісним складом мікроорганізмів агресивного угруповання біоплівки. Результати дослідження формування біоплівки за присутності 2,4-Д та у контролі представлені на рис. 1–2.

Основну роль у формуванні корозійної біоплівки відіграють сульфат-відновлювальні бактерії. Характер динаміки їх чисельності у біоплівці за присутності 2,4-Д та контролі різний (рис. 1–2). З пестицидом максимум спостерігається на 168 год, а в контролі чисельність СВБ зростає протягом перших 48 годин та з 168 по 240 год з досягненням максимальної кількості. За присутності пестициду як і у контролі СВБ зафіксовані вже на 9 год експозиції. У перших двох точках чисельність бактерій в досліді з пестицидом практично не відрізняється від контролю. Після 48 год експозиції з 2,4-Д чисельність СВБ у біоплівці менша на 2 порядки порівняно з контролем. Зростання кількості СВБ за дії 2,4-Д в 21,7 разу та на 3 порядки зафіксоване на 72 та 168 год експерименту, відповідно. При експозиції 240 год кількість СВБ у досліді з пестицидом виявляється меншою у 216 разів, а в кінці експерименту (через 336 год) чисельність бактерій у контролі та в досліді з 2,4-Д практично однакова.



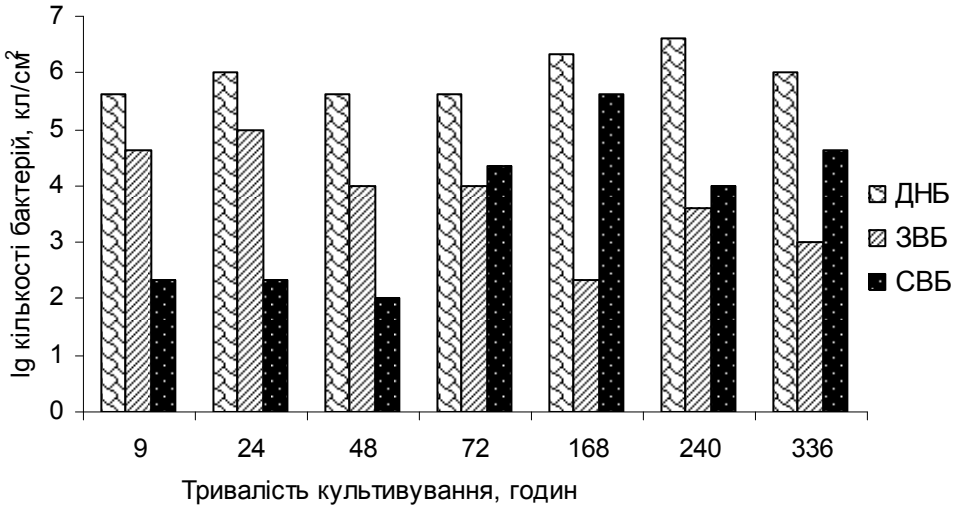


Рис. 1. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі за присутності 2,4-Д

Fig. 1. Dynamics of bacteria quantity in a biofilm on the surface of light carbon steel in the presence 2,4-D

Встановлено незначний вплив пестициду 2,4-Д на чисельність залізо-відновлювальних та денітрифікувальних бактерій у біоплівці: в різних контрольних точках значення знаходяться в межах одного порядку.

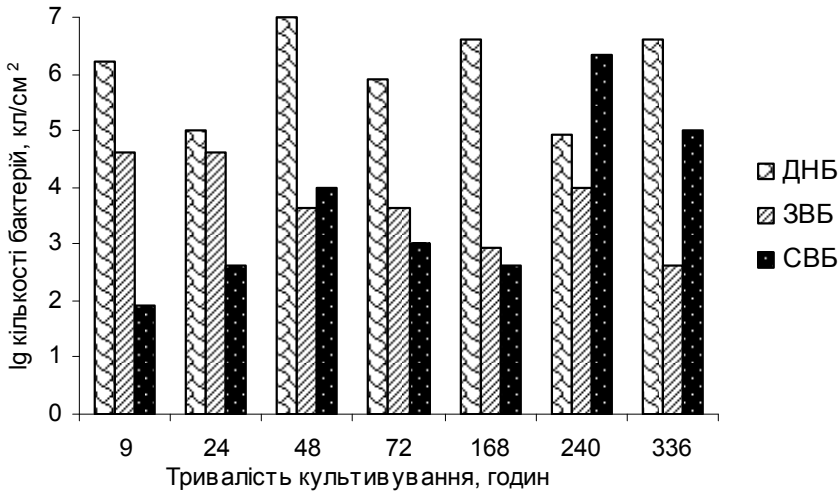


Рис. 2. Динаміка кількості бактерій у біоплівці на поверхні маловуглецевої сталі (контроль)

Fig. 2. Dynamics of bacteria quantity in a biofilm on the surface of light carbon steel (control)

Отже, компоненти корозійного мікробного угруповання біоплівки, а саме сульфатвідновлювальні, залізовідновлювальні та денітрифікувальні бактерії, резистентні до 2,4-Д, що обумовлює їх розвиток у біоплівці. При цьому найбільший вплив пестициду виявлено на сульфатвідновлювальні бактерії — найбільш агресивну складову угруповання.

Одночасно з дослідженням формування біоплівки на поверхні сталі оцінювалася чисельність вільноплаваючих сульфатвідновлювальних бактерій та їх метаболічна активність, що визначає агресивність середовища. Пестицид змінює чисельність СВБ у суспензії при експозиції 72, 240 та 330 год, а при тривалості експерименту 168 год чисельність бактерій у контролі та в досліді з 2,4-Д однакова. Зменшення кількості бактерій за дії 2,4-Д на 72 год становить 2 порядки, а на 336 год їх кількість знижується в 1,7 разу. За наявності 2,4-Д встановлено стимулювання росту вільноплаваючих сульфатвідновлювальних бактерій на 240 год експерименту (рис. 3). Це може бути пояснено здатністю зазначених мікроорганізмів використовувати діючу речовину пестициду як джерело живлення та енергії, що узгоджується з результатами [14].

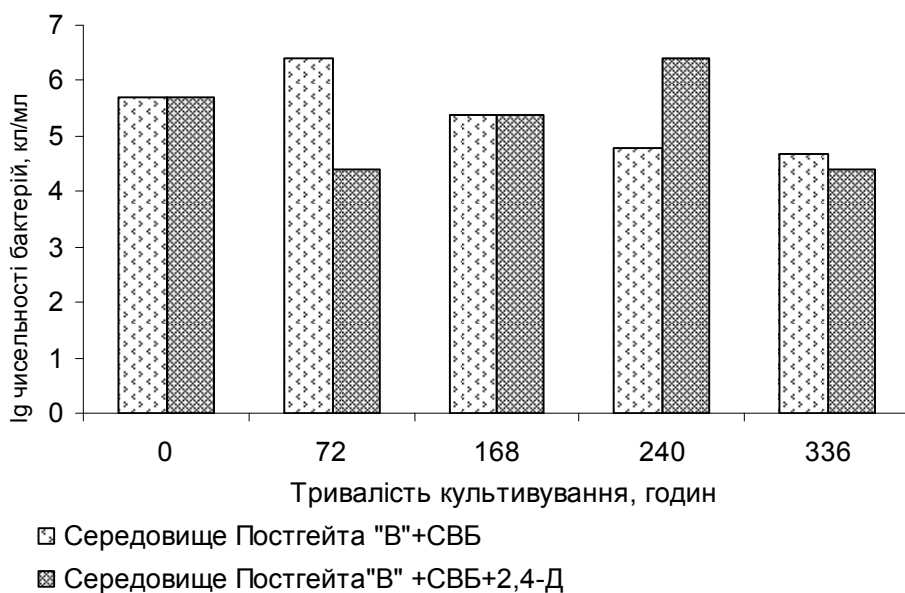
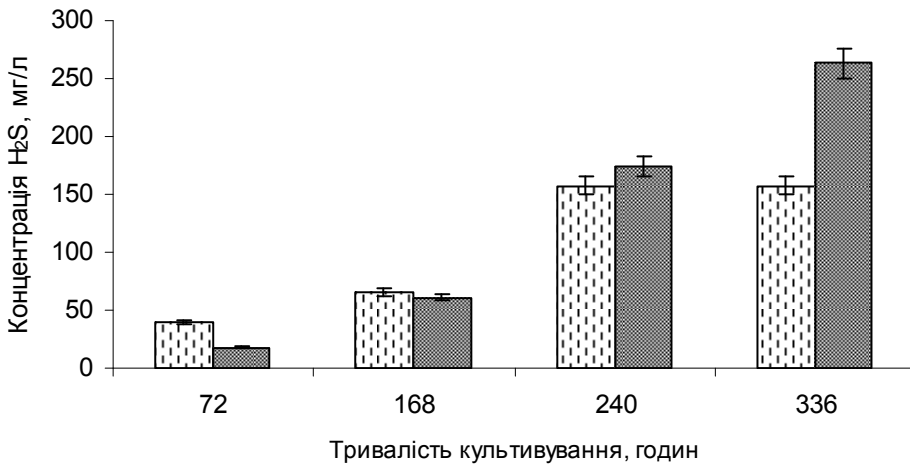


Рис. 3. Динаміка кількості вільноплаваючих сульфатвідновлювальних бактерій без пестициду та за присутності 2,4-Д

Fig. 3. Dynamics of quantity of free-floating sulphatereducing bacteria without pesticide and in the presence 2,4-D

Показником метаболічної активності сульфатвідновлювальних бактерій є продукування біогенного сірководню — основного метаболіту бак-

терій зазначеної фізіологічної групи. Динаміку накопичення сірководню без пестициду та за присутності 2,4-Д за умов мікробної корозії сталі СтЗпс наведено на рис. 4. Показано, що 2,4-Д уповільнює продукування сірководню у 2,2 разу на 72 год та практично не впливає на цей показник на 168 год, що узгоджується зі зміною чисельності вільноплаваючих сульфатвідновлювальних бактерій. Збільшення часу експерименту призводить до стимулювання сульфатвідновлювальної активності бактерій: накопичення біогенного сірководню незначно зростає на 240 год, та у 1,7 разу — на 336 год. При цьому кількість вільноплаваючих СВБ у контролі становить $5 \cdot 10^4$ кл/мл, в досліді з 2,4-Д — $2,5 \cdot 10^4$ кл/мл, що вказує на зростання фізіологічної активності бактерій та їх адаптацію до бутилового ефіру 2,4-дихлорфеноксоцтової кислоти.



□ Середовище Постгейта "В"+СВБ ■ Середовище Постгейта "В"+СВБ+2,4-Д

Рис. 4. Вплив 2,4-Д на концентрацію сірководню за умов мікробної корозії сталі, індукованої сульфатвідновлювальними бактеріями

Fig. 4. Influence of 2,4-D on concentration of sulphide hydrogen subjected to the conditions of microbe steel corrosion induced by sulphatereducing bacteria

Таким чином, сульфатвідновлювальні бактерії резистентні до пестициду 2,4-Д, що обумовлює ріст як планктонних клітин, так і клітин у складі біоплівки. Відмічено зростання сульфатвідновлювальної активності бактерій за ґрунту при застосуванні пестицидів з діючою речовиною — 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота. Тому в подальшому доцільно дослідити вплив зазначених пестицидів на біокорозію сталі у ґрунті та склад біоценозів, які тривалий час знаходилися під пресингом ксенобіотиків, зокрема пестицидів та продуктів їх природної деградації.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Андреюк К.І., Козлова І.П., Коптева Ж.П., Піляшенко-Новохатний А.І., Заніна В.В., Пуриш Л.М.* Мікробна корозія підземних споруд. — Київ: Наук. думка, 2005. — 259 с.
2. *Lewandowski Z.* Structure and function of bacterial biofilms // *Biofilms: recent advances in their study and control / Ed. by L.V. Evans.* — Haywood: Haywood Acad. publ., 2000. — P. 2—17.
3. *Андреюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін.* Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження — К.: Обереги, 2001. — 240 с.
4. *Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г.* Динаміка сукцесійних змін у сульфидогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі // *Мікробіол. журн.* — 2007. — Т. 69, № 6. — С. 19—25.
5. *Благодатская Е.В., Ананьева Н.Д.* Оценка устойчивости микробных сообществ в процессе разложения поллютантов в почве // *Почвоведение.* — 1996. — № 1. — С. 1341—1346.
6. *Wardle D.A., Parkinson D.* Interactions between microclimatic variables and the soil microbial biomass // *Biology and Fertility of Soils.* — 1990. — Vol. 9. — P. 273—280.
7. *Zokwood J.P.* Species: would any of them be missed? // *Curr. Biol.* — 1994. — Vol. 4—5. — P. 455—457.
8. *Смикун Н.В.* Розвиток корозійно небезпечної мікрофлори ґрунту під впливом деяких пестицидів // *Мікробіол. журн.* — 2008. — № 6, т. 70. — С. 74—87.
9. *Патика В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І. та ін.* Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів. — К.: Основа, 2005. — 300 с.
10. *Романенко В.И., Кузнецов С.И.* Экология микроорганизмов пресных водоемов. — Ленинград: Наука, 1974. — 196 с.
11. *Руководство к практическим занятием по микробиологии: Практ. пособие / Под ред. Н.С. Егорова.* — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. — 215 с.
12. *Васильев В.П.* Аналитическая химия. Гравиметрические и титрометрические методы анализа. — М.: Высшая школа, 1989. — 320 с.
13. *Деденко Л.Р., Керженцев И.В.* Математическая обработка и оформление результатов экспериментов. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1977. — 112 с.
14. *Жарикова Н.В., Журенко Е.Ю., Коробов В.В. и др.* Биоразнообразие бактерий — деструкторов хлорированных феноксикислот // *Вестник ОГУ.* — 2009. — № 6. — С. 121—123



С.В. Приходько, Е.С. Бондарь, И.Н. Курмакова, А.П. Третьяк

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

РОСТ КОРРОЗИОННО ОПАСНЫХ БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ПЕСТИЦИДА 2,4-Д

Реферат

Показано влияние пестицида 2,4-Д на формирование биопленки бактериями коррозионного микробного сообщества в процессе разрушения стали. Экспериментально доказано, что коррозионно опасные бактерии, в том числе сульфатвосстанавливающие, железовосстанавливающие, денитрифицирующие, резистентны к пестициду 2,4-Д, что обуславливает рост в его присутствии как планктонных клеток, так и клеток в составе биопленки. Установлено увеличение сульфатвосстанавливающей активности бактерий в присутствии пестицида, что может усиливать коррозионную агрессивность почвы при применении препаратов с действующим веществом — 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота.

К л ю ч е в ы е с л о в а : коррозионно опасные бактерии, биопленка, биокоррозия, пестицид 2,4-Д.

S.V. Prichodko, E.S. Bondar, I.N. Kurmakova, A.P. Tretyak

Chernigov National Pedagogical University of T.G. Shevchenko,
53, Getman Polubotok str., Chernigov, 14013, Ukraine,
tel.: +38(04622) 3 21 06, e-mail: kurmakova@mail.ru

GROWTH OF CORROSIVE DANGEROUS BACTERIA IN THE PRESENCE OF THE 2,4-D PESTICIDE

Summary

The influence of the 2,4-D pesticide on forming of a biofilm by bacteria of corrosive microbial community in the process of destruction of steel is shown. It is experimentally proved that corrosive dangerous bacteria, including sulphate-reducing, iron-reducing, denitrifying bacteria are resistant to the 2,4-D pesticide, that stipulate their development in biofilm and free-floating cells. The increase of sulphate-reducing activity of bacteria in presence of pesticide is determined, that fact can strengthen the aggressiveness of medium at application of preparations with the effective matter — 2,4-dichlorophenoxyacetic acid.

К e y w o r d s : corrosive dangerous bacteria, a biofilm, biocorrosion, the 2,4-D pesticide.



Т.М. Кривицька, О.С. Багаєва, С.П. Ужевська, Н.М. Непом'яща,
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна, e-mail: grass_snake@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* З ЛАРВІЦИДНОЮ АКТИВНІСТЮ ДО ГРИБНИХ КОМАРИКІВ *BRADYSIA PILISTRATA* FREY (SCIARIDAE)

Виділено 32 ізоляти спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* з джерел можливої дислокації ентомопатогенних бактерій. Ентомоцидна активність по відношенню до личинок грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) була виявлена у 6 ізолятів *Bacillus* sp. Найбільша ларвіцидна активність відмічена у *Bacillus* sp. 14 та *Bacillus* sp. 15, які за своїми ознаками попередньо віднесені до виду *Bacillus thuringiensis*. Визначено їх морфологічні, культуральні та фізіолого-біологічні характеристики.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, ларвіцидна активність, грибний комарик.

При культивуванні грибів виникає проблема боротьби зі шкідниками — грибними комариками. Розвиток личинок міцетофагів, які пошкоджують міцелій та плодові тіла, призводить до суттєвої втрати врожаю, імаго є розповсюджувачами кліщів, цвілевих грибів, вірусів та бактерій, що викликають захворювання грибів. [1].

Відомо, що для знищення комах-шкідників використовуються мікробні препарати, діючою основою яких є ентомопатогенні бактерії роду *Bacillus* та продукти їх метаболізму. Позитивні риси таких препаратів — вибірковість дії проти комах-шкідників та безпечність для людини і довкілля [2, 3, 4]. Конкретних даних щодо використання мікробних препаратів для знищення шкідників грибів, ефективності дії біозасобів в грибівництві, впровадження ентомопатогенних біопрепаратів при вирощуванні грибів в наявних публікаціях нема [1]. Згідно літературних даних, для боротьби з грибними комариками може бути використано бактокулідид (біопрепарат на основі *Bacillus thuringiensis* var. *israilensis*), який призначено для боротьби з личинками кровосисних комарів. Аналогічну ларвіцидну дію на двокрилих комах, шкідників грибівництва, можна очікувати при вико-



ристанні інших відомих препаратів, призначених для знищення двокрилих комах, наприклад, сфероларвіциду (основа — *Bacillus sphaericus*) [2].

Метою роботи був пошук бактерій роду *Bacillus* з наявністю ентомопатогенної дії по відношенню до грибного комарика та вивчення біологічних властивостей найбільш активних штамів.

Матеріали і методи

В роботі використана культура грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) і розроблена раніше методика визначення ентомопатогенної активності бактерій по відношенню до личинок грибного комарика [5, 6].

Для визначення ларвіцидної активності використано виробничі штами, діючі інгредієнти біопрепаратів бактокуліциду (*B. thuringiensis* var. *israilensis* ВКМП В-3313, *B. thuringiensis* var. *israilensis* ВНДІСГМ 7-1/23 та сфероларвіциду (*B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795). Штами отримано з Всеросійської колекції промислових мікроорганізмів (Москва) та з ВНДІ сільськогосподарської мікробіології (Санкт-Петербург). В роботі також випробувано ларвіцидну активність препарату бактокуліциду серійного виробництва Бердського заводу.

Виділення ентомопатогенних штамів бактерій здійснено з відпрацьованого субстрату для вирощування гливи після зняття врожаю, кишечника загиблих личинок грибного комарика, нижньої частини гриба печериці разом із субстратом. Виділення бактеріальних ізолятів з вказаних джерел проведено методом безпосереднього виділення та накопичувальної культури на середовищах: МПА, МПБ, агаризований грибний бульйон (ГА) (табл. 2).

Інкубацію здійснено за 30 °С. З виділених культур готували бактеріальні суспензії щільності на рівні $1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^9$ кл / мл, якими оброблялися личинки грибного комарика *Bradysia pilistriata* та субстрат для вирощування грибів. Морфологічні та фізіолого-біохімічні ознаки штамів визначали за допомогою стандартних методів [7–11]. Після виділення чистих культур та визначення ступеня їх ентомоцидної активності проводили ідентифікацію штамів згідно визначника Бергі [9].

Личинок грибного комарика по 30 одиниць разом із субстратом для вирощування грибів поміщали у склянку (0,5 л, повторність 3-кратна) та інкубували у термостаті при температурі 25 ± 2 °С. Дослідження та оцінку ентомоцидної дії виділених штамів проводили з першої доби після зараження до трьох тижнів після початку досліду. Результати обробляли з використанням формули Еббота: $E = (A - B / 100 - B) \cdot 100\%$, де А — відсоток смертності в досліді; В — відсоток смертності в контролі; Е — ефективність дії штаму мікроорганізмів чи мікробного препарату в % (з поправкою на контроль) [12]. Отримані результати оброблені статистично [13].

Результати досліджень та їх обговорення

В попередніх дослідженнях встановлено, що в грибівницьких господарствах на Одещині, що культивують гливу, найпоширенішим шкідником є грибний комарик *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) [5, 6].

Результати виявлення ларвіцидної дії на личинок грибного комарика *Bradysia pilistriata* порошкового препарату бактокуліциду та виробничих штамів *B. thuringiensis* var. *israilensis* ВНДІСГМ 7-1/23, *B. thuringiensis* var. *israilensis* ВКМП В-3313 і *B. sphaericus* ВКМП В-3296, *B. sphaericus* ВНДІСГМ В-1795 (діючих інгредієнтів бакпрепаратів бактокуліциду та сфероларвіциду) показали їх неефективність, статистично достовірних розходжень в контролі і в дослідних зразках по показнику смертності не виявлено (табл. 1).

Такий низький рівень ентомопатогенної дії ініціював до пошуку ларвіцидних штамів з різних джерел та на різних середовищах. У результаті пошуку нами відібрано 32 штами, які за своїми ознаками віднесені до роду *Bacillus* (табл. 2).

Таблиця 1

Ларвіцидна дія виробничих штамів роду *Bacillus*, продуцентів бактокуліциду та сфероларвіциду, на грибного комарика *Bradysia pilistriata* (експозиція 120 год.)

Table 1

Larvaecyde action of industrial strains of genus *Bacillus*, derivative of bactoculicyde and spherolarvaecyde on a fungus midge *Bradysia pilistriata* (display 120 h)

Виробничі штами	Смертність личинок, %
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israilensis</i> ВКМП В-3313	2,2±1,1
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israilensis</i> ВНДІСГМ 7-1/23	3,2±0,7
<i>B. sphaericus</i> ВКМП В-3296	1,8±0,5
<i>B. sphaericus</i> ВНДІСГМ В-1795	2,0±0,3
Контроль	1,8±0,7

Проведені дослідження дозволили визначити 6 найбільш активних штамів (*Bacillus* sp. 3, 5, 6, 11, 14, 15) по відношенню до личинок грибного комарика *Bradysia pilistriata* (табл. 3). Ларвіцидна дія досліджуваних ізолятів бактеріальних культур по відношенню до *Bradysia pilistriata* обраховувалась після 22- та 36- годинної експозиції. На 22 годину смертність тест-об'єкту була на рівні від 3,0% для ізоляту *Bacillus* sp. 6, до 56,7% для ізоляту *Bacillus* sp. 3. Після 36-годинної експозиції для всіх ізолятів, крім *Bacillus* sp. 6, реєструвалась 100% загибель грибного комарика *Bradysia pilistriata*. Для *Bacillus* sp. 6 смертність та ефективність дії складала 91,0% та 90,3%, відповідно. Подальші дослідження показали,



що штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 мали пролонговану інсектицидну дію, яка виявлялась як на стадії личинок, так і на стадії лялечок, тобто мали найбільшу метатоксичну ентомоцидну дію.

Результати досліджень культуральних та морфологічних ознак наведені у табл. 4. При рості на МПА штами, що досліджували, утворювали ендоспори. Реакція на каталазний тест була позитивною. Ці ознаки дають змогу віднести ці штами до роду *Bacillus*.

Таблиця 2
Джерела, середовища та способи виділення штамів роду *Bacillus*

Table 2
The sources, environments and methods of strains selection of the genus *Bacillus*

Джерело виділення	Середовище та спосіб виділення	Кількість штамів	№№ ізолятів
Відпрацьований субстрат для вирощування грибів гливи	МПА, МПБ, ГА	2	1, 2
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + МПБ) з подальшим посівом на МПА, ГА	1	3
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату, грибний відвар + 0,5% дріжджовий автолізат) з подальшим посівом на МПА, ГА	1	4
Кишечник личинки комарика	МПА, МПБ, ГА	2	5, 6
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + МПБ) з подальшим посівом на МПА, ГА	3	7, 8, 9
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату, грибний відвар + 5% дріжджовий автолізат) з подальшим посівом на МПА, ГА	4	10, 11, 12, 13
Нижня частина ніжки печериць з субстратом	МПА, МПБ, ГА	6	14, 15, 16, 17, 18, 19
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + МПБ) з подальшим посівом на МПА, ГА	6	20, 21, 22, 23, 24, 25
- " -	Накопичувальна культура (10% відпрацьованого субстрату + грибний відвар + дріжджовий автолізат) з подальшим посівом на МПА, ГА	7	26, 27, 28, 29, 30, 31, 32

Бактерії роду *Bacillus* відповідно морфолого-культуральним та фізіолого-біохімічним ознакам об'єднані у дві групи [11]. Штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 утворювали спори еліпсоподібної форми з центральним розташуванням спор усередині клітин; розміри спори не перевищують розміри клітини, які не збільшені, тобто досліджувані культури відносяться до бактерій I групи.

Таблиця 3

Ларвіцидна дія ізольованих бактеріальних штамів на *Bradysia pilistriata*

Table 3

Larvaecyde action of the isolated bacterial strains on *Bradysia pilistriata*

Штам	22 год.		36 год.	
	Смертність личинок, %	Ефективність дії штаму, %	Смертність личинок, %	Ефективність дії штаму, %
<i>Bacillus sp. 3</i>	56,7+4,0	56,7+4,0	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 5</i>	44,8+3,9	44,8+3,9	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 6</i>	3,0+2,2	3,0+2,2	91,0+8,9	90,3+9,4
<i>Bacillus sp. 11</i>	15,0+3,9	15,0+3,9	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 14</i>	6,0+3,3	6,0+3,3	100,0	100,0
<i>Bacillus sp. 15</i>	26,0+4,2	26,0+3,3	100,0	100,0
Контроль	0	-	7,5+2,5	-

На МПА штами швидко ростуть та утворюють спори через 12–15 годин; спостерігалось утворення колоній з поверхнею R-форми. На МПБ спостерігався рівномірний ріст по всьому об'єму середовища без утворення плівки. Штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 утворюють великі клітини завширшки більше 1 мкм, що забарвлюються за Грамом позитивно, рухливі, капсул не утворюють.

Основні фізіолого-біохімічні властивості ізольованих штамів *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 вивчали згідно визначника Бергі [9] у порівнянні з штамом *Bacillus thuringiensis* ВНДСГМ 7-1/23 (табл. 5). Досліджувані штами *Bacillus sp.* 14 та *Bacillus sp.* 15 є гетеротрофними мікроорганізмами. Як джерело вуглецю і енергії вони використовують пептон, глюкозу, сорбіт, цитрат натрію, дріжджовий екстракт, ростуть на МПА та МПБ.



Таблиця 4
Культурально-морфологічні ознаки ізолюваних і промислового штамів *Bacillus*Table 4
Cultivated and morphological signs of isolated and industrial strains of *Bacillus*

Ознаки	Ізолювані штами		Промисловий штам
	<i>Bacillus sp. 15</i>	<i>Bacillus sp.14</i>	<i>B. thuringiensis 7-1/23</i>
Рухливість клітин	+	+	+
Наявність спор	+	+	+
Розташування спор у клітині	Ц	ц	ц
Форма спор	Е	Е	Е
Наявність капсули	-	-	-
Розміри клітин, мкм: довжина ширина	4,71±0,38 1,13±0,09	3,62±0,39 1,12±0,09	4,26±0,41 1,26±0,09
Забарвлення за Грамом	+	+	+
Поверхня колоній на МПА	R	R	R
Характер росту на МПБ	рівномірна мутність по всьому об'єму середовища	рівномірна мутність по всьому об'єму середовища	мутність по всьому об'єму середовища з утворенням плівки

Примітка: Ц — спори розташовані у центрі клітини; Е — еліпсоподібна форма спори, R — поверхня шорстка

Диференціальна діагностика видової належності штамів *Bacillus sp. 14* та *Bacillus sp. 15* показала наявність окиснювального типу метаболізму. Штами утворюють кислоту і ацетоїн з глюкози без виділення газу. При рості на L-арабінозі, D-ксилозі, D-маніті кислоту не утворюють; розщеплюють тирозин, мають лецитиназу, відновлюють нітрати до нітритів, гідролізують казеїн і крохмаль; на цитратно-сольовому агарі Симонса залужують середовище. Здатні до росту у широкому діапазоні температур — від 10,0 °C до 45,0 °C. Оптимальні значення для росту — 30,0–32,0 °C.

Сукупність культуральних, морфологічних (табл. 4) та фізіолого-біохімічних (табл. 5) ознак, а також ідентичність властивостей ізолюваних штамів з властивостями штаму *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23 дозволяє попередньо віднести їх до виду *Bacillus thuringiensis*.

Таблиця 5
Фізіолого-біохімічні властивості штамів *Bacillus sp. 14* та *Bacillus sp. 15*Table 5
Physiological and biochemical properties of the strains of *Bacillus sp. 14* and *Bacillus sp. 15*

Ознаки	<i>Bacillus sp.15</i>	<i>Bacillus sp.14</i>	<i>B. thuringiensis</i> ВНДІСГМ 7-1/23
Реакція Фогес-Проскауера	+	+	+
Утворення кислоти з:			
D-глюкози	+	+	+
L-арабінози	-	-	-
D-ксилози	-	-	-
D-маніту	-	-	-
Продукти розщеплення глюкози:			
газ	-	-	-
ацетоїн	+	+	+
Гідроліз крохмалю	+	+	+
Кристали білка	+	+	+
Утворення лецитинази	+	+	+
Розщеплювання:			
тирозину	+	+	+
казеїну	+	+	+
Утворення луку на цитратно- сольовому агарі	+	+	+
Використання цитрату	+	+	+
Редукція нітратів	+	+	+
Ріст на анаеробному агарі	+	+	+
Температура росту, °С			
максимальна	40,0	40,0	40,0–45,0
мінімальна	10,0	10,0	10,0–20,0
оптимальна	30,0–32,0	30,0–32,0	30,0–32,0

Таким чином, проведені дослідження дозволили виділити 32 ізоляти споруутворюючих бактерії роду *Bacillus*, визначити між них активні (*Bacillus sp.* №№ 3, 5, 6, 11, 14, 15), показати ступінь їх ларвіцидної дії по відношенню до грибного комарика *Bradysia pilistriata*. Для штамів *Bacillus sp. 14* та *Bacillus sp. 15* визначено, що за сукупністю культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознак, а також за ідентичністю властивостей ізольованих штамів з колекційним *B. thuringiensis var. israelensis* ВНДІСГМ 7-1/23 їх можна віднести до виду *Bacillus thuringiensis*, що потребує підтвердження молекулярно-біологічними методами.

Робота виконана відповідно до проектів ДБ 421, ДБ 393 та М/64-2008, що фінансувалися Міністерством освіти і науки України.



ЛІТЕРАТУРА

1. Морозов А.И. Современное промышленное грибоводство. — М.: АСТ; Донецк: Стакер, 2007. — 222 с.
2. Кандыбин Н.В., Барбашова Н.М., Ермолова В.П. Эффективность бактокулицида (*Bacillus thuringiensis* H₁₄) в борьбе с личинками кровососущих комаров // Труды всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии. — 1983. — № 53. — С. 104–112.
3. Orth P., Zalunin I.A., Gasparov V.S., Chestukhina G.G., Stepanov V.M. Insecticidal toxin *Bacillus thuringiensis* // Journal of Protein Chemistry. — 1995. — № 14. — P. 241–249.
4. Патогенны насекомых: структурные и функциональные аспекты / Под ред. В.В. Глупова. М.: Круглый год, 2001. — 736 с.
5. Ужевская С.Ф., Непомящая Н.Н., Багаева О.С., Кривицкая Т.Н., Беляева Т.А., Бобрешова Н.С., Иваница В.А. Перспективы применения штаммов рода *Bacillus* против грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) // Интегрированная защита садов и виноградников. Международная научно-практическая конференция (8–13 сентября 2008 г.), Одесса, 2008 — С. 204–208.
6. Ужевська С.П., Непомяща Н.М., Багаєва О.С., Іваниця В.О. Комахи-шкідники культивованих грибів та розробка методики визначення активності мікробних ентомопатогенних препаратів // Міжнародна науково-практична конференція «Новітні досягнення біотехнології»: Тез. доп. 21–22 жовтня 2010 року, Київ, 2010. — С. 117–119.
7. Логинов Е.В., Лескова А.Я. Метод трехцветной дифференциальной окраски спор, кристаллов, вегетативных клеток энтомопатогенных кристаллообразующих бацилл. // Бюлетень ВНИИСХ микробиол. — 1983. — Вып. 38. — С. 50–52.
8. Методы общей бактериологии / Ред. Герхарт Ф.Т. — Т. 1–3. — М.: Мир, 1983. — 264 с.
9. Гибсон Т., Гордон Р. Палочки и кокки, образующие эндоспоры // Руководство Берги по определению бактерий. — под ред. Дж. Хоулта, 8-е изд. — 1980. — С. 286–289.
10. Харвуд К. Бациллы. Генетика и биотехнология. — М.: Мир, 1992. — 531 с.
11. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных. — К.: Наук. думка, 1983. — 51 с.
12. Методики випробування і застосування пестицидів // С.О. Трибель, Д.Д. Сігарьова, М.П. Секун, О.О. Іващенко та ін. За ред. проф. С.О. Трибеля. — К.: Світ. — 2001. — 448 с.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биологических специальностей вузов. — 4-е изд. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.



Т.Н. Кривицкая, О.С. Багаева, С.Ф. Ужєвская, Н.Н. Нєпомящая,
В.А. Иваница

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

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* С ЛАРВИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ К ГРИБНЫМ КОМАРИКАМ *BRADYSIA PILISTRIATA* FREY (SCIARIDAE)

Реферат

Выделены 32 изолята спорообразующих бактерий рода *Bacillus* из источников возможной дислокации энтомопатогенных бактерий. Энтомцидная активность к личинкам грибного комарика *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) была выявлена у 6 изолятов *Bacillus sp.* Максимальная ларвицидная активность отмечена у *Bacillus sp.* 14 и *Bacillus sp.* 15, которые по своим признакам предварительно отнесены к виду *Bacillus thuringiensis*. Определены их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические характеристики.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, ларвицидная активность, грибной комарик.

T. Krivitska, O. Bagaeva, S. Uzhevskya, N. Nepomyascha, V. Ivanytsia

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

THE CHARACTERISTIC OF BACTERIAL STRAINS OF GENUS *BACILLUS* WITH LARVAECYDE ACTION TO FUNGUS MIDGES *BRADYSIA PILISTRIATA* FREY (SCIARIDAE)

Summary

It was allocated 32 bacterial isolates forming disputes of the genus *Bacillus* from the sources of possible disposition of entomopathogenic bacteria. It was discovered the entomocid activity in relation to the larvae of mushroom mosquito of *Bradysia pilistriata* Frey (Sciaridae) at 6 isolates of *Bacillus sp.* The greatest larvicid activity is determined at *Bacillus sp.* 14 and *Bacillus sp.* 15 identified as *Bacillus thuringiensis*. There were defined their morphological, cultivated, physiological and biochemical characteristics.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, larvicid activity, fungus midge.

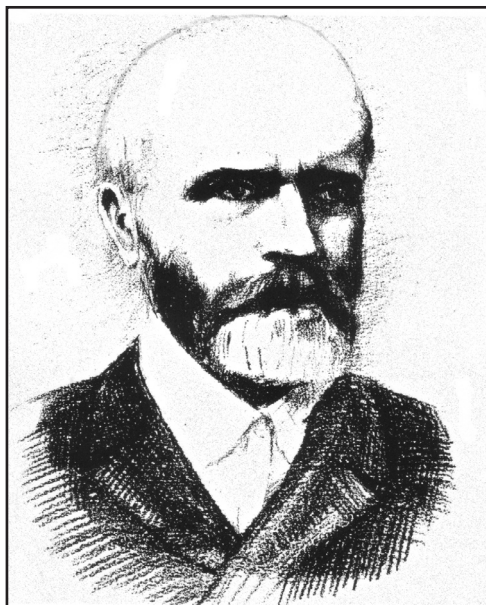


УДК: 579:923 Веріго (477.74)

В.О. Кузнецов

Центр досліджень з історії, освіти, науки і техніки на півдні України імені В.І. Липського, вул. Новаторів, 5-а, Одеса, 65010, Україна, тел.: +38 (0482)37 96 73, e-mail: cuznetsov@meta.ua

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОФЕСОРА О.А. ВЕРІГО (1837–1905) В ОДЕСЬКОМУ (НОВОРОСІЙСЬКОМУ) УНІВЕРСИТЕТІ



Стаття присвячена 105-й річниці з дня смерті видатного вченого, заслуженого професора О.А. Веріго (05.12.1837–26.03.1905). На підставі вивчення архівних матеріалів Державного архіву Одеської області, наукового архіву Інституту архівознавства НБУ імені В.І. Вернадського АН України та літературних джерел розглянуто основні події наукової діяльності О.А. Веріго в галузі мікробіологічних досліджень в Одеському (Новоросійському) університеті.

Ключові слова: історія мікробіології, О.А. Веріго, Одеський університет.

Олександр Андрійович Веріго — всесвітньо відомий хімік-органік, професор Одеського (Новоросійського) університету. Основні його наукові роботи відносяться до хімії ароматичних азосполук. Наукова спадщина О.А. Веріго добре вивчена і описана істориками хімії, а його доробок у галузі мікробіології залишається не висвітленим до сьогоднішнього дня. Тому метою нашого дослідження стало вивчення внеску О.А. Веріго у становлення і розвиток мікробіологічної науки в Одеському (Новоросійському) університеті.

О.А. Веріго народився 5 грудня 1837 року поблизу м. Вітебська (нині Республіка Білорусь), в дворянській родині. Освіту здобув в Петербурзькому комерційному училищі, яке закінчив у 1855 р. і того ж року вступив на фізико-математичний факультет Петербурзького університету, де вивчав хімію під керівництвом професора М.М. Соколова [7].

З 1861 р. О.А. Веріго викладав хімію в Михайлівській артилерійській академії, а з 1862 р. був направлений для удосконалення на 4 роки за кордон, де працював спочатку в лабораторії А. Штреккера в Тюбінгені, а потім — в лабораторії І. Віслінцеуса в Цюріху.

Свою роботу в Імператорському Новоросійському Університеті (ІНУ) О.А. Веріго розпочав у 1866 р. на посаді лаборанта, на яку був запрошений професором М.М. Соколовим [10].

Від Рішельєвського ліцею університет успадкував невеличкий хімічний кабінет у корпусі по вул. Дворянській, але в ньому не було ніякого обладнання, навіть витяжної шафи, й обмаль хімічного посуду і реактивів. М.Д. Зелінський, який у той час був студентом університету, пригадував: *“Завдяки турботам і наполегливій роботі М.М. Соколова і О.А. Веріго хімічна лабораторія у Новоросійському університеті (...) була вже у перші роки добре опорядкована і обладнана всіма необхідними засобами. Практичні заняття притягували багатьох, і лабораторія завжди була одним з найбільш діяльних навчально-допоміжних закладів університету”** [11]. За один тільки навчальний рік кількість студентів, що працювали у лабораторії, збільшилась з 1 до 34. Лабораторія мала свою власну бібліотеку, започатковану бароном О.Ф. Стюартом, який подарував 55 томів книг [14; 19].

У 1869 році, коли кафедра хімії разом з усім природничим відділенням переїхала до нового приміщення на другій поверх червоного корпусу (Преображенська, 24), вона вже була оснащена всім необхідним для проведення навчальних занять і наукових досліджень [9].

О.А. Веріго завжди відносився *“... щиросердно і щиро до своїх співробітників, він намагався зближатися з ними тісніше, влаштовуючи для цього вечірні зібрання, на яких читалися та обговорювалися нові роботи, що з'являлися в хімічній літературі. Чарівність його особистості ще більше підсилювалась веселою змістовною бесідою, і це ще більше зближувало з ним його учнів”*, — пригадував у своїх спогадах співробітник університету В. Кршижанівський [13]. З його лабораторії почався науковий шлях таких видатних учених, як Я.Ю. Бардах, О.М. Безредка, М.С. Вейнберг, М.Ф. Гамалія, В.А. Хавкін, М.Д. Зелінський, П.Г. Меліков (Мелікішвілі), В.М. Петрів (Петріашвілі), П.І. Петренко-Критченко, С.М. Танатар.

* Тут і надалі цитати в перекладі автора.



Після захисту магістерської дисертації на тему «Азобензид и его гомологи» у 1866 р. Рада університету 4 листопада одногосно обирає О.А. Веріго на посаду доцента і доручає йому викладання неорганічної хімії на I курсі. Він також продовжує керувати практичними заняттями студентів, а з 1868/69 н.р. розпочинає читати курс лекцій з технічної хімії [14; 17].

Навесні 1871 р. О.А. Веріго захищає у Київському університеті Святого Володимира докторську дисертацію «О реакции прямого присоединения к группе азобензида» і його обирають екстраординарним, а у 1873 р. — ординарним професором хімії Новоросійського університету [18].

У своєму відгуку на роботи О.А. Веріго, при обранні його на посаду професора, Д.І. Менделєєв писав: *"До цієї рекомендації вважаю необхідним додати, що виказану мною думку про те, що п. Веріго вартий підвищення в званні екстраординарного професора поділяють професори [О.М.] Бутлеров, [М.М.] Бекетов, [Ф.М. Гарнич-]Гарницький і [В.В.] Морковніков, тобто всі головні представники хімії в Росії"* [24, 278].

Протягом декількох років А.О. Веріго виконував обов'язки декана фізико-математичного факультету, його двічі обирали на посаду ректора університету, але він відмовлявся від неї, за особистих обставин.

О.А. Веріго був яскравим лектором і гарячим ентузіастом хімічної освіти. П.Г. Меліков у своїх спогадах пише: *"Завдяки ясному та живому викладанню курсу хімії, блискуче обставленому демонстраційному досліду, завдяки своїй доступності та чуйності на вимоги тогочасного студентства, О.А. Веріго був одним з найулюбленіших професорів, а разом з тим хімія стає одною з найпопулярніших наук у Новоросійському університеті"* [15, 470].

Велику увагу приділяв О.А. Веріго дослідженням прикладного характеру. Він був одним з найактивніших членів Одеського бальнеологічного товариства (ОБТ) з моменту його заснування (1877) і до кінця свого життя. Вже у перший рік існування ОБТ О.А. Веріго обрано Почесним членом, а 1894 року — Президентом Товариства [20-23].

З 1877 р. О.А. Веріго розпочинає дослідження одеських лиманів, їх рапи та грязі. Вивчаючи цілющі грязі одеських лиманів він знайшов в них цілу низку речовин — продуктів відновлення та розкладу неорганічних та органічних сполук. У 1880 р. ОБТ надрукувало його наукову працю "Исследование Одесских целебных лиманов и грязей". Вона цікава тим, що в ній Веріго-хімік, аналізуючи склад органічних кислот в грязі, дійшов висновку про неможливість в межах хімічної науки пояснити процеси утворення грязі і робить здогадку про участь в цьому процесі мікроорганізмів: *"Це мабуть той з ізомерів валеріанової кислоти, який отримано з лейцину, що утворюється також при тих змінах білкових речовин, яким вони підлягають у старому сирі"* [3, 79]. І далі: *"Розпад лейцину на аміак та валеріанову кислоту спостерігалось багато разів, наприклад при гнитті білкових речовин"* [3, 80]. Таким чином, поступово О.А. Веріго приходять до мікробіології, розв'язуючи, на перший погляд, суто хімічні питання.

Аналізуючи фізико-хімічні процеси грязеутворення в роботі "О влиянии микроорганизмов на образование лиманной грязи" він знову робить висно-

вок про неможливість його протікання без участі в ньому мікроорганізмів: *"...ці процеси є окиснювальними процесами, з тією різницею, що одна його стадія відбувається за рахунок вільного кисню, до чого до речі, здатне сірчисте залізо, яке безпосередньо реагує з киснем на підставі його екзотермічності, друга ж стадія здійснюється за рахунок зв'язаного кисню і, особливо, явним чином за рахунок кисню оксиду заліза. Цей останній процес – процес ендотермічний, він вимагає витрати енергії і особливих умов.*

Відшукуючи джерело енергії для ендотермічного процесу, я зупинився на припущенні, що ця енергія може постачатися життєвою діяльністю анаеробійних мікроорганізмів, які здатні здійснювати окиснювальні процеси за рахунок кисню, що входить до складу складних речовин" [5].

Ця робота О.А. Веріго була надрукована тільки у 1887 році, але як видно зі звітів ОБТ, доповів він про результати своїх досліджень на 85 засіданні 18 жовтня 1885 р. [21]. Л.Й. Рубенчик відзначав: *"Цю дату можна вважати початком, а Веріго засновником нової галузі мікробіології – соляноозерної мікробіології"* [25, 4].

В Додатках до статті ретельно описано хід витонченого суто мікробіологічного експерименту О.А. Веріго: *"Дві частини одного й того ж сухого сірого порошку з Сакської гязі були покладені у дві тугоплавкі скляні трубки, які з однієї сторони були запаяні. В обох трубках порошок було обито і вкрито рапою, потім обидві трубки були відтягнуті й запаяні з іншого кінця.*

Одна з трубок піддавалась протягом декількох годин температури 120 °С, для знищення мікроорганізмів, які могли б знаходитись у гязі, а потім разом з іншою трубкою залишені стояти. Обидві трубки знаходилися при абсолютно однакових умовах температури і світла. На 3-й день у трубці, яку не нагрівали, у сірій масі з'явилися чорні плями і утворення чорної гязі пішло своїм нормальним шляхом. У трубці, яку нагрівали, не тільки через три дні, але і через 2 місяця не було помітно ні найменших змін: маса залишалася того ж сірого кольору, як і у перший день після запаявання трубки. Після 3-х місяців, запаяний кінчик трубки, яка нагрівалась, було зламано і маса приведена таким чином у зіткнення з повітрям. Проте протягом 3-х тижнів маса залишалася без змін. Тоді на кінчику попередньо прожареної платинової голки було взято невелику кількість (розміром з головку шпильки) нормальної чорної гязі, введено у трубку і змішано з верхнім шаром сірої маси. Через два дні стало помітно, що починаючи з верхнього шару, відбувається перетворення сірої гязі на чорну. Процес цей поступово розповсюдився і через тиждень вся маса зробилася чорною і пластичною, як нормальна гязь.

Очевидно, що ендотермічний процес в гязі викликається життєвою діяльністю мікроорганізмів, які постачають енергію, що обумовлює можливість другого прямого екзотермічного процесу за рахунок кисню повітря. Весь процес у цілому (його можна назвати "дихання гязі") відбувається за рахунок діяльності мікроорганізмів, які мають змогу



жити і розвиватися у середовищі, яке являє собою насичений соляний розчин.

Ці мікроорганізми не витримують температури 120 °С, так як після дії цієї температури грязь позбулася здатності до протікання ендотермічної реакції. Ці організми, очевидно, винятково зустрічаються у повітрі, так як стерилізована грязь стала здатною до ендотермічної реакції тільки завдяки заразливій діяльності нормальної гязі” [21, Прил., 6].

“Голова зборів відзначив важливість повідомлення проф. Веріго і звернув увагу на те, що з його відкриттям стає можливим пересилання гязі у сухому вигляді, що значно спростить можливість користування цим цілющим матеріалом” [21, 50]. Результати цих досліджень були також оприлюднені на Міжнародному конгресі гідрологів у 1886 р. в Біарриці [27].

Фактично, професором О.А. Веріго була вперше розроблена наукова технологія відновлення лиманної гязі з її сухого субстрату за допомогою мікроорганізмів.

Свідок цих подій, одеський лікар, професор Є.М. Брусиловський пригадував: “Спостереження його [Веріго] було настільки запевняючим, що у слід за повідомленням в засіданні Одеського Бальнеологічного Товариства 18 жовтня 1885 року одночасно декілька осіб, у тому числі і автор цього повідомлення, розпочали відшукувати у гязі ймовірних бактерій...” [1].

Б.Л. Ісаченко відзначав: “...О.А. Веріго належить першість в обґрунтуванні вчення про роль біологічного фактору в утворенні чорного пластичного мулу (гязі), який вкриває дно морських лиманів і солоних озер і відомого своїми лікувальними можливостями. (...) Дослідженнями російських бактеріологів було вперше доведена, таким чином, участь мікроорганізмів в генезі чорної лікувальної гязі” [12, 299].

Високо оцінив результати цих досліджень В.І. Вернадський: “Процеси, що відбуваються у гязях, піддалися науковому аналізу тільки у ХІХ столітті, і лише у другій його половині з’ясувалось, що гязі є стільки ж своєрідними природними тілами, якими повинен вважатися і ґрунт, що їхня структура, їх властивості, їх склад є наслідком закономірних процесів, пов’язаних як з їх підґрунтям, водним середовищем, що над ними знаходяться, живою матерією яка їх пронизує та їх оточує, так і з фізико-географічними умовами земної поверхні, у якій вони знаходяться” — і далі він відзначає:

“... праці професора Новоросійського університету Веріго з початку 1880-х стали для всіх подальших робіт дороговказуючою ниткою, він відкрив тут нову галузь явищ природи, довів біохімічний характер процесів гязеутворення” [8].

Велику роль відіграв О.А. Веріго в обґрунтуванні будівництва водогонів у містах Одесі та Миколаєві. Він на прохання Одеської міської управи у 1869 р. провів аналізи водогінної та природних вод і зробив висновок:



“... віддаленість його [водозабору] від джерел інфекції (міські вигрібні ями, відхожі місця) змушують віддати йому перевагу перед міською криничною водою, яка тісно пов’язана з інфекційними джерелами” [4, 9].

Питання про міську каналізацію в Одесі також вирішувалося при безпосередньої участі О.А. Веріго. Досліджуючи у 1877 р. ґрунти пересипу, він ретельно вивчив всю площу піскової арени і визначив місця на ній, де без додаткових витрат можливо розмістити поля зрошення: “Таким чином, в результаті моїх досліджень виявляється, що для цілей зрошення місто може розпоряджатися 300 десятинами землі, яка за своїм складом здатна проводити вельми енергійне знешкодження міських нечистот, а за властивостями своєї ґрунтової води виявляється зручною для пов’язаної зі зрошенням рослинною культурою” [2, 33]. Він також виділяє на арені місця, які можна було б використати з цією ж метою, попередньо збільшивши товщину піскового шару: “Збільшення товщини шару ґрунту, через який повинні будуть пройти нечистоти перед тим, як вони досягнуть ґрунтової води, обумовить швидке і повне перетворення цих нечистот у нешкідливі продукти і зробить неможливим з’явлення смердючих та шкідливих продуктів неповного перетворення нечистот у ґрунтовій воді, як це існує тепер на Пересипу...” [2, 32].

Завдяки цим дослідженням в Одесі, вперше у Росії, були створені поля зрошення, куди відводились каналізаційні води. Фактично, О.А. Веріго першим використав методи біологічного очищення каналізаційних та стічних побутових вод.

Треба також відзначити важливу роль О.А. Веріго у розробці і реалізації методики боротьби з хлібним жуком, або жуком-кузькою (*Anisoplia austriaca* Herbst). Хлібний жук — дуже небезпечний шкідник для рільницького господарства у південних регіонах. Коли у другій половині ХІХ століття почалась особливо інтенсивна оранка степу за умови недосконалої обробки ґрунту, то для розмноження кузьки склалися особливо сприятливі умови. У 1874 р. збитки від жука у Херсонській губернії склали понад 2 млн. карб. [26].

На особливу нараду з обговорення заходів проти хлібного жука, яка походила в Одесі з 28 лютого по 6 березня 1881 р. було запрошено групу видатних професорів з Харківського і Новоросійського університетів: Л.С. Ценковський, Ф.Є. Зайкевич, П.Т. Степанов, О.О. Ковалевський, В.М. Лігін, І.І. Мечников, О.А. Веріго. Треба звернути увагу на той факт, що серед запрошених тільки двоє за фахом були не біологи. В.М. Лігін — механік, так як на порядку денному стояло питання про використання спеціальних машин для збирання жуків, і О.А. Веріго — хімік, хоча про хімічні методи боротьби з жуком питання взагалі не розглядалося. О.А. Веріго був також єдиним хіміком серед зоологів, які увійшли до складу спеціальної комісії з вивчення питань з боротьби з хлібним жуком.

І.І. Мечников ще у 1878 р. запропонував для боротьби з хлібним жуком використати грибок — зелену мюскардину (*Isaria destructor*), яка показала свою ефективність на полях графа Бобринського у Смілянській економії проти бурякового довгоносіка. Ефективною виявилась також і знайдена О.А. Ковалевським під Одесою мюскардина справжня (*Botrytis bassii*) з



більш кантагіозними властивостями. На основі цих грибків О.О. Ковалевський і О.А. Веріго почали створювати препарат проти хлібного жука.

І.І. Мечников, який в той час знаходився за кордоном, у листах постійно консультував їх: *“Необхідно взяти абсолютно чисті шматочки грибка (обрізавши шкіру) і отримати спори у чистому вигляді, профільтрованому повітрі. Потім ці спори треба культивувати у прокип’яченому суслі. (Це знає Веріго)”* [16, 110].

Треба зауважити, що в коментарі до цього листа А.Є. Гайсинович помилково вважає, що І.І. Мечников має на увазі не О.А. Веріго, а його племінника, професора-фізіолога Б.Ф. Веріго. Але це не відповідає істині, тому що в ці роки Б.Ф. Веріго був ще студентом Петербурзького університету і не міг працювати в Одесі.

О.А. Веріго був одним з ініціаторів природоохоронної діяльності і розпочав досліди з проблем забруднення Чорного моря. У своїй роботі *“О причинах засорення Одесской бухты и способах их устранения”* він ретельно вивчає основні підприємства-забруднювачі міста, склад їх стічних вод і розробляє ефективні методи їх очищення, ґрунтуючись на вивченні міжнародного досвіду у цій галузі [6].

Участь О.А. Веріго у розв’язанні важливих практичних питань міського господарства зробило його одним з найпопулярніших та шанованих професорів міста. У місцевій пресі та у хімічних журналах постійно друкувалися його роботи про сірку та одеський кам’яновугільний газ, корозію водогінних труб, методи аналізу повітря у робочих приміщеннях і т. інш.

Особливо плідною була робота О.А. Веріго у галузі розробки методів оцінювання якості харчових продуктів та боротьби проти їх фальсифікації — вона притягнула увагу і співчуття міської громади. Спочатку ці дослідження проводилися у маленькій власній лабораторії, але невдовзі вона розрослася і перетворилася на своерідну міську санітарну станцію. Це була перша в Росії лабораторія, головною метою якої було дослідження якості продуктів харчування та боротьба з їх фальсифікацією — попередник санітарної служби міста.

Після 25 років служби (1884) О.А. Веріго призначена пенсія, але він залишився в університеті ще на 5 років. 1 листопада 1891 р. він був затверджений у званні Заслуженого професора.

21 листопада 1896 р. О.А. Веріго переведено на посаду чиновника для окремих доручень Міністерства фінансів Росії в Одесі. За дорученням С.Ю. Вітте він організував Центральну лабораторію Міністерства фінансів в Одесі для потреб винної монополії. До останніх днів життя О.А. Веріго брав діяльну участь в роботі міського громадського господарства [11].

Згідно наказам урядового Сенату О.А. Веріго було нагороджено орденами: св. Володимира (1871), св. Анни (1874), св. Станіслава I ст. (1878), св. Володимира III ст. (1883). Йому було надано чини надвірного радника (1870), колезького радника (1871), статського радника (1875).

Помер О.А. Веріго 13 березня 1905 р.

Олександр Андрійович Веріго був першим науковцем в історії Одеського (Новоросійського) університету, який здійснив у своїй лабораторії експери-



ментальні роботи в галузі загальної мікробіології і заснував новий науковий напрям — соляноозерна мікробіологія. У своїй лабораторії він підготував плеяду науковців-мікробіологів, які у подальшому відігравали вирішальну роль у розвитку світової мікробіологічної науки: Я.Ю. Бардах, О.М. Безредка, М.С. Вейнберг, М.Ф. Гамалія, В.А. Хавкін та ін.

О.А. Веріго першим у Російській імперії з епідеміологічної точки зору обґрунтував необхідність проведення водогонів у містах і створив міську лабораторію, яка визначала придатність харчових продуктів до споживання, довів необхідність створення державної санітарної служби.

Професор О.А. Веріго науково обґрунтував і розробив проект знешкодження каналізаційних вод біологічними методами і гостро поставив питання про необхідність захисту навколишнього середовища від промислових забруднень. Вперше розробив технологію відновлення лікувальної лиманної грязі з її сухого субстрату за допомогою мікроорганізмів і розпочав роботи з отримання штучної лікувальної грязі, яка була продовжена його учнями та послідовниками Я.Ю. Бардахом, Л.Й. Рубенчиком та вченими наступних поколінь.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Брусиловский Е. М.* К вопросу о роли микроорганизмов в образовании лиманной грязи //Отчеты о деятельности Одесского бальнеологического общества. С октября 1887г. по январь 1891 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — Одесса: Русск. Тип. Исаковича, 1892.— Вып. 4.— С. 39—81.
2. *Вериго А. А.* Исследование почвы Пересыпи по отношению к вопросу об орошении нечистотами. — Одесса: Типогр. Л. Нитче, 1878. — 35 с., 3 л. карт.
3. *Вериго А. А.* Исследование Одесских целебных лиманов и грязей. / Одес. бальнеол. о-во. — Одесса: Тип. Л. Нитче, 1880.— 107 с. с табл.
4. *Вериго А. А.* Дополнение к документам по вопросу об устройстве водопровода в г. Николаеве 1884-1885гг. — Одесса: тип. А. Шульце, 1885. — 22 с.
5. *Вериго А. А.* О влиянии микроорганизмов на образование лиманной грязи. — Одесса: Тип. «Одес. листка», 1887.
6. *Вериго А. А.* О причинах засорения Одесской бухты и способах их устранения. — Одесса: Тип. «Одес. новостей», 1894. — 33 с. 6 л. ил.
7. *Вериго Александр Андреевич.* Выдающиеся химики мира: Биографический справочник/ Волков В.А., Вонский Е.В., Кузнецова Г.И.; Под ред. В.И. Кузнецова. — М.: Высш. Шк., 1991. — С. 92
8. *Вернадский В. И.* Об участии живого вещества в создании почв. // Сытник К.М. В. И. Вернадский. Жизнь и деятельность на Украине. /Сытник К.М., Апанович Е.М., Стойко С.М.; АН УССР. — 2-е изд. испр. и доп. — К.: Наук. думка, 1988. — С. 186—214.
9. ДАОО, Ф. 42.— Оп. 35. — Спр. 10. Ар. 1-72.
10. ДАОО, Ф. 45. — Оп. 4.— В'яз. 20. — Спр. 1163-б.



11. *Зелинский Н.Д.* А. А. Вериго: некролог // Рус. ведомости. — 1905.— № 78.
12. *Исаченко Б.Л.* Микробиология / Очерки по истории русской ботаники. — М.: МОИП, 1947.— С. 275-311.
13. *Кршижановский В. А.А.* Вериго (1837-1905) // Новороссийский университет в воспоминаниях современников. — Одесса, 2000. — С. 130.
14. *Маркевич А.И.* Двадцатипятилетие Императорского Новороссийского университета: Ист. зап. и акад. списки. — Одесса: Экон. тип., 1890.— 734 с.
15. *Меликов П.* Александр Андреевич Вериго // Журн. рус. физ.-хим. о-ва.— 1905. — Т. 37, вып. 5. — С. 469–475.
16. *Мечников И.И.* : Письма (1863–1916) / Под ред. А.Е. Гайсиновича, Б.В. Лёвшина. — М.: Наука, 1974. — 296 с.
17. *Обозрение* преподавания наук в Императорском Новороссийском университете за 1868/69 учебный год. — Одесса: Тип. «Одес. вестника», 1868.
18. *Обозрение* преподавания наук в Императорском Новороссийском университете на осеннее полугодие 1888 г. — Одесса: Тип. «Одес. вестника», 1888.
19. *Отчет* о состоянии и деятельности Императорского Новороссийского университета за 1866-1867 уч. год. // Зап. ИНУ.— 1867. — т. 1.
20. *Отчеты* о деятельности Одесского бальнеологического общества с 1877 по 1881 год. — Одесса: Типогр. Нитче, 1881. — Вып. 1. — 144 с.
21. *Отчеты* о деятельности Одесского бальнеологического общества. Вып. 3. С июня 1883 г. по октябрь 1887 г. / Под ред. Д-ра М. Погребинского. — Одесса: Типогр. «Одес. листка», 1888. — Вып. 3. — 306 с.
22. *Отчеты* о деятельности Одесского бальнеологического общества. С октября 1887 г. по январь 1891 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — Одесса: Русск. типогр. Исаковича, 1892. — Вып. 4. — 199 с.
23. *Отчеты* о деятельности Одесского бальнеологического общества. С января 1892 г. по ноябрь 1898 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — Одесса: Типогр. Южно-Русского о-ва Печатного дела, 1898. — Вып. 5. — 305 с.
24. *Протокол* заседания ученого совета ИНУ 22-го ноября 1871г./ Зап. ИНУ.— Т. 8, 1872. — С. 249–286.
25. *Рубенчик Л.И.* Развитие соляноозерной микробиологии в дореволюционной России. Архів ІА НБУ імені Вернадського. Ф. 156.— Оп.1.— Спр.19.— Рукопис, б.д. — 28 арк.
26. *Хлебный жук*: протоколы и доклады особого совещания земств, созванного для обсуждения вопроса о хлебном жуке в Одессе 26 февраля — 6 марта 1881г. — Одесса: Тип. Нитче, 1881. — 136 с.
27. *Verigo A.* Influencedes microorganismes etc / Congres intern. D'Hydrologie etc. Biarits, 1886. — P. 186.

УДК: 579:923 Вериго (477.74)

В.А. Кузнецов

Центр исследований по истории, образованию, науке и технике на юге Украины
имени В.И. Липского, ул.Новаторов, 5-а, Одесса, 65010, Украина,
тел.: +38 (0482)37 96 73, e-mail: cuznetsov@meta.ua

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОФЕССОРА
А.А. ВЕРИГО (1837—1905) В ОДЕССКОМ (НОВОРОССИЙСКОМ)
УНИВЕРСИТЕТЕ**

Реферат

Статья посвящена 105-ой годовщине со дня смерти выдающегося ученого, заслуженного профессора А.А. Вериго (05.12.1837—26.03.1905). На основании изучения архивных материалов Государственного архива Одесской области, научного архива Института архивоведения НБУ имени В.И. Вернадского АН Украины и литературных источников рассмотрены события научной деятельности А.А. Вериго в области микробиологических исследований в Одесском (Новороссийском) университете.

Ключевые слова: история микробиологии, А.А. Вериго, Одесский университет.

V. O. Kuznetsov

South Ukrainian Education, Science and Technology History Research Centre named
after V.I.Lypsky, Novatorov Str., 5-a, Odesa, Ukraine, 65000,
tel.: +38 (0482) 37 96 73, e-mail: cuznetsov @meta.ua

**O.A. VERIGO SCIENTIFIC ACTIVITY IN THE FIELD
OF MICROBIOLOGY IN THE UNIVERSITY OF ODESA
(NOVOROSIYSKY UNIVERSITY)(1837—1905)**

Summary

The article is devoted to the 105th anniversary from the death date (13.03.1905) of a prominent scientist, the honoured professor O.A. Verigo (05.12.1837—26.03.1905). The main events of O.A.Verigo's scientific activity in the field of microbiology and biological technologies were studied on the basis of the archive materials of the State Odesa Region Archive, on the scientific archive of the Archive Studying Institution NLU named after V.I. Vernadsky of the Ukrainian Academy of Sciences and other literature sources.

К e y w o r d s: history of microbiology, O.A. Verigo, Odesa University.



**V ЛІТНЯ ШКОЛА
«МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»
В ОДЕСЬКОМУ НАЦІОНАЛЬНОМУ УНІВЕРСИТЕТІ
ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА**

Літня школа традиційно проводиться щороку навесні на базі кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Організаторами школи виступають Одеський національний університет, Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Товариство мікробіологів України імені С.М. Виноградського та Спілка біологів і біотехнологів Одеси. У 2010 році окремі заняття V Літньої школи проводилися спільно з компанією “Біо-Рад” (США).

Під керівництвом фахівців відділу молекулярної біології бактеріофагів ІМВ імені Д.К. Заболотного і співробітників кафедри мікробіології і вірусології ОНУ слухачі школи навчалися накопичувати та ідентифікувати бактеріофаги, проводити транскон’югацію і трансформацію бактеріальних клітин, отримали навички роботи з ДНК та білками, опанували методи горизонтального та вертикального електрофорезів та метод полімеразної ланцюгової реакції. За люб’язною допомогою доктора Гюлі Шанаді (Угорщина, представництво компанії “Біо-Рад”) слухачі школи ознайомилися з іонно-обмінною хроматографією для розділення білків та нуклеїнових кислот.

На протязі трьох тижнів практичних занять (11.05.2010 по 28.05.2010) молоді вчені мали можливість отримати навички роботи з різноманітним сучасним обладнанням, а крім того, навчитися основ біоінформатики у комп’ютерному класі. Під час навчання усі слухачі забезпечувалися друкованими посібниками.

Лекційні заняття Літньої школи, які проводилися доктором біологічних наук, професором Товкачем Ф.І., були присвячені найактуальнішим питанням молекулярної біології і генетики мікроорганізмів і привертала особливу увагу відвідувачів школи.

Під час занять молоді вчені з різних міст України — Києва, Харкова, Одеси — мали можливість обмінятися власним досвідом та знайти друзів за інтересами.

Наприкінці навчання завідувач кафедри мікробіології і вірусології і керівник Літньої школи доктор біологічних наук, професор Іваниця В.О.



вручив слухачам, які прослухали повний курс, свідоцтва, що підтверджують отримані ними знання.

Наступного року чекаємо молодих вчених та аспірантів на заняттях VI Літньої школи “Молекулярна мікробіологія і біотехнологія”!

Детальніше дізнатися про Літню школу можна на сайті Одеського національного університету імені І.І. Мечникова (www.onu.edu.ua, розділ “Наука” / ”Літні школи”) або, написавши на електронну адресу: limanska@gmail.com.

Н.В. Ліманська



ПАМ'ЯТІ ГАЛИНИ АНДРІЇВНИ КОЖАНОВОЇ



20 жовтня 2010 року пішла з життя відомий мікробіолог, провідний науковий співробітник кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, кандидат біологічних наук Кожанова Галина Андріївна.

Вона народилася 19 вересня 1937 року у родині службовця. Ще в юнацькі роки захоплювалася біологією, тому після закінчення школи прийшла навчатися на біологічний факультет Одеського державного університету імені І.І. Мечникова. Під час навчання Галина Андріївна проявила себе як цілеспрямована, працьовита, ерудована, здібна студентка, яка брала активну участь у науковій роботі, у неї була велика жага до різнобічних знань. Спеціалізувалася вона на кафедрі мікробіології і вірусології. У студентські роки Галина Андріївна

займалася спортивною акробатикою, брала участь у Всесвітньому фестивалі молоді у Москві.

У вісімнадцять років Галина Андріївна втратила батьків. Всі побутові проблеми, а також турбота про неповнолітнього брата лягли на її плечі, але вона не тільки не залишала навчання в університеті, але й турбувалася про освіту брата.

Серед її вчителів та наставників у ці важкі роки були такі провідні вчені: член-кореспондент АН України професор В.П. Тульчинська, член-кореспондент АН України професор М.О. Савчук, професори Р.О. Файтельберг, І.І. Пузанов. Всі вони з батьківською любов'ю ставилися до неї та її родини.

Після успішного закінчення університету Г.А. Кожанова отримала призначення у мікробіологічну лабораторію Одеського науково-дослідного стоматологічного інституту. Її науково-дослідна робота була спрямована на вивчення видового складу лактобактерій порожнини рота при карієсі зубів, впливу антибіотиків на ротову мікробіоту. Під час цих досліджень Галина Андріївна консультувалася з академіком АМН СРСР, лауреатом державної премії професором З.В. Єрмольєвою, яка надала їй дослідні зразки антибіотиків. Ці дослідження лягли в основу її кандидатської дисертації «Лактобактерії порожнини рота в нормі і при карієсі зубів» (науковий керівник кандидат медичних наук Л.А. Бланк), яка була успішно захищена у 1970 році на відкритому засіданні Вченої ради Одеського державного університету імені І.І. Мечникова за фахом «Мікробіологія». Її офіційними опонентами були член-кореспондент АН УРСР професор В.П. Тульчинська та доктор медичних наук професор М.Н. Мінервін.

У 1970–1971 рр. Галина Андріївна брала активну участь у проведенні протиепідемічних заходів у боротьбі з холерою в Одесі.



З травня 1975 року життя Кожанової Г.А. повністю пов'язане з кафедрою мікробіології і вірусології ОДУ імені І.І. Мечникова, де протягом тридцяти п'яти років на посаді провідного наукового співробітника вона очолювала наукову групу біологічної очистки. Г.А. Кожанова залишила науковий спадок у таких галузях мікробіології, як біотехнологія очистки промислових стічних вод від біорезистентних сполук, екології і захисту природного середовища від нафтового забруднення та важких металів, участі мікроорганізмів у підтримці гомеостазу різних екологічних ніш біосфери.

Г.А. Кожановою був проведений цілеспрямований пошук та селективний відбір з морського середовища та інших екологічних ніш бактерій-деструкторів біорезистентних органічних сполук, у тому числі вуглеводнів нафти, органічних барвників, СПАР, фенолів тощо. Були розроблені нові скринінгові тести для оцінки деструктивної активності бактерій, створена колекція культур бактерій з практично-корисними властивостями. Окремі найбільш біохімічно активні культури були задепоновані у Колекції промислових мікроорганізмів ВНДІ генетики АН СРСР.

Галина Андріївна запропонувала нові шляхи використання іммобілізованих бактерій-деструкторів у природоохоронних біотехнологіях очищення стічних вод. Саме вона розробила композиції біологічно позитивних носіїв природного походження, які не тільки забезпечували просторову сукцесію, але й слугували джерелом мінерального живлення іммобілізованих бактерій.

Результати наукових досліджень були втілені на декількох підприємствах, у тому числі біотехнологія очищення промислових стічних вод з використанням біореакторів «Мікос» — на Литкарінському заводі оптичного скла, Івано-Франківському заводі тонкого органічного синтезу, Казанському заводі антибіотиків. Використання системи «Мікос» на Батумському нафтопереробному заводі дозволяло зменшити вміст нафтопродуктів у стічних водах до аналітичного нуля.

Г.А. Кожанова розробила та запатентувала методику отримання біопрепарата «Еконадін», призначеного не тільки для очищення промислових стічних вод, але й природних водойм і ґрунту від нафтопродуктів. Біофільтри «Еконад» пройшли випробування на сучасному підприємстві «Ексімнафтопродукт». Біопрепарат «Еконадін» широко використовується в портах України, нафтопереробних та нафтозберігаючих підприємствах для очищення води та ґрунту від плівкового нафтового забруднення. Ці розробки неодноразово демонструвалися на Всесвітніх та міжнародних виставках, у тому числі у Німеччині, Китаї, Японії. За розробку нових технологій очищення води Г.А. Кожанова у 1982 році отримала срібну медаль ВДНГ СРСР.

Дослідницький талант Галини Андріївни високо цінував лауреат Державної премії України, зав. відділом мікробіології очищення води Інституту колоїдної хімії та хімії води імені А.В. Думанського АН УРСР, доктор біологічних наук, професор М.М. Ротмістров.

Галина Андріївна багато уваги приділяла розробці нових методів біологічного контролю якості водного середовища з використанням класичних мікробіологічних біотестів, оригінальних методів *in vitro* із застосуванням культур клітин для виявлення токсичної і генотоксичної дії полутантів. Ці



біотести увійшли у практику оперативного контролю водного середовища, використовувалися при розробці та апробації високих природоохоронних біотехнологій. Дослідження виконувалися за програмою ЮНЕСКО «Людина та біосфера». У 1985 році за ці розробки Галина Андріївна з групою вчених була нагороджена дипломом ВДНГ СРСР.

Г.А. Кожанова має понад 100 наукових робіт, 10 патентів. Вона брала участь з доповідями у роботі Всесвітніх та міжнародних конгресів, конференцій, сипозиумів, була активним організатором наукових форумів — з'їзду гідробіологів, робочих груп ДКНТ СРСР з біотестування, Першої Всесоюзної школи з мікробіологічного моніторингу. Галина Андріївна була науковим консультантом дипломних та курсових робіт студентів. Під її керівництвом були успішно захищені дві кандидатські дисертації.

Для своїх учнів вона була прикладом відданості науці, працьовитості, заохочувала самостійність у науковому пошуку. Завжди знала, чим живуть її колеги, які у них проблеми, знаходила потрібні слова підтримки, до кожного виявляла доброту та турботу.

Галина Андріївна була люблячою жінкою, мамою, виховала чудову доньку та онуків. Часто подорожувала, дуже любила природу. Була наділена великим почуттям гумору та оптимізму, до останньої хвилини не втрачала дитячої безпосередності у сприйнятті світу. Завдячуючи її оптимізму, колеги були впевнені у позитивних результатах задуманої роботи у майбутньому.

Галина Андріївна Кожанова була яскравою особистістю, талановитим вченим, сповненим творчої енергії; чарівною жінкою, вірним другом, надзвичайно доброю і чуйною людиною, яка любила життя в усіх його проявах.

Такою незвичайною людиною з великим відкритим серцем і широкою душею вона залишиться у пам'яті всіх, хто її знав.

Від колег-мікробіологів —
доцент кафедри мікробіології і вірусології ОНУ
Т.В. Гудзенко



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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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



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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латинською мовою.

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

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

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; 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 3.11.2010. 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