

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
Microbiology & Biotechnology

№ 1(5)
2009

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 1(5)

•
2009

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsya

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsya, T.O. Filipova

Accepted for publishing articles are reviewed

The journal is established by

Odesa National Mechnykov University.

Registration certificate: KV № 11462-335R. Date of issue 07.07.2006.

PUBLISHERS

Odesa National Mechnykov University
Society of Microbiologists of Ukraine named after S.M. Vinogradskogo
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
A d d r e s s :

Odesa National Mechnykov University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel.: 723-28-39, 748-11-01

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2008

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 1(5)

•
2009

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

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

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються

Журнал заснований

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова

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

ВИДАВЦІ

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

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

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

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

E.V. Kuzminskiy, P.I. Gvozdyak, N.B. Golub BIOFUAL ELEMENTS — THE PROBLEMS AND PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT. II. MICROBIAL FUEL ELEMENTS.....	6
---	---

I.K. Kurdish INFLUENCE OF BIOGENIC AND ABIOGENIC FACTORS ON THE EFFICIENCY OF MICROORGANISMS INTRODUCTION INTO AGROECOSYSTEMS.....	23
---	----

EXPERIMENTAL WORKS

M.Ya. Spivak, V.S. Pidgorsky, L.M. Lazarenko, L.M. Shynkarenko, L.T. Rachkova, Z.M. Olevinska LACTOBACILLUS AND BIFIDOBACTERIUM INFLUENCE ON THE INDICES OF IMMUNE RESPONSE OF THE ORGANISM SHOWN ON THE EXPERIMENTAL MODEL	39
---	----

O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.I. Seifullina, T.O. Philipova, V.S. Podust ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NICOTINOILHYDRAZONE SALYCILIC ALDEHYDE AND ITS COMPLEXES	49
---	----

T.I. Patyka, V.F. Patyka THE TOXIGENE PROPERTIES OF ENTOMOPATHOGENIC <i>BACILLUS</i> <i>THURINGIENSIS</i>	56
--	----

A. S. Gordienko, T. S. Antonyuk, I. K. Kurdish INFLUENCE OF CLAY MINERAL ON BACTERIA ADHESION — THE COMPONENTS OF GRANULATED PREPARATION FOR PLANT GROWING....	64
---	----

I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush, S.P. Gudz, O.R. Kulachkovsky INFLUENCE OF CADMIUM SULFATE ON THE GROWTH, VELOCITY OF OXYGEN UPTAKE AND ULTRASTRUCTURE OF <i>CHROMATIUM</i> SP.....	70
--	----

I.I. Guljaeva, H.O. Snigur, V.P. Polischuk, B.N. Milkus VIRUSES DISEASES OF GRAINS IN ODESSA REGION	77
---	----

O.A. Dregval, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov COMBINED ACTION OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIAL AND FUNGAL STRAINS	82
---	----

G.V. Lisyutin, A.Y. Bukhtiyarov, S.O. Biloivanenko, L.P. Ponomarjova, T.V. Gudzenko, V.O. Ivanytsya OIL CONTAMINATION AND HETEROTROPHIC MICROBIOTA OF THE ZMIINY ISLAND AQUATORIUM.....	88
--	----

ANNIVERSARY AND REMARKABLE DATES

CONGRATULATIONS TO THE JUBILEE.....	95
INFORMATION FOR THE AUTHORS.....	97

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Є.В. Кузьмінський, П.І. Гвоздяк, Н.Б. Голуб

БІОПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ – ПРОБЛЕМИ ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ
II. МІКРОБНІ БІОПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ 6

І.К. Курдиш

ВПЛИВ БІОГЕННИХ І АБІОГЕННИХ ФАКТОРІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ
ІНТРОДУКЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ У АГРОЕКОСИСТЕМИ 23

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

**М.Я. Співак, В.С. Підгорський, Л.М. Лазаренко, Л.М. Шинкаренко,
Н.К. Коваленко, Л.Т. Рачкова, З.М. Олевінська**

ВПЛИВ ЛАКТО- ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОРЕАКТИВ-
НОСТІ ОРГАНІЗМУ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ 39

**О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Філіпова, І.Й. Сейфулліна,
В.С. Подуст**

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ НІКОТИНОЇЛГІДРАЗОНА
САЛЦИЛОВОГО АЛЬДЕГІДУ ТА ЙОГО КОМПЛЕКСІВ 49

Т.И. Патыка, В.Ф. Патыка

ТОКСИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭНТОМОПАТОГЕНОВ *BACILLUS*
THURINGIENSIS 56

А.С. Гордиенко, Т.С. Антонюк, И.К. Курдиш

ВЛИЯНИЕ ГЛИНИСТЫХ МИНЕРАЛОВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ
– КОМПОНЕНТОВ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
РАСТЕНИЕВОДСТВА 64

І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш, С.П. Гудзь, О.Р. Кулачковський

ВПЛИВ КАДМІЙ СУЛЬФАТУ НА РІСТ, ШВИДКІСТЬ ПОГЛИНАННЯ
КИСНЮ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРУ *CHROMATIUM* SP. 70

И.И. Гуляева, Г.А. Снигур, В.П. Полищук, Б.Н. Милкус

ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ ЗЕРНОВЫХ В ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ 77

О.А. Дрегваль, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков

СУМІСНА ДІЯ ШТАМІВ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ І ГРИБІВ 82

**Г.В. Лісютін, А.Є. Бухтіяров, С.О. Білоіваненко, Л.П. Пономарьова,
Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця**

НАФТОВЕ ЗАБРУДНЕННЯ І ГЕТЕРОТРОФНА МІКРОБІОТА АКВАТОРІЇ
ОСТРОВА ЗМІНІЙ 88

Ю В І Л Е І І Д А Т И

ВІТАЄМО З ЮВІЛЕЄМ! 95

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ 97

УДК 579.088;158.54

Є.В. Кузьмінський, П.І. Гвоздяк, Н.Б.Голуб

Національний технічний університет України «КПІ»,
пр. Перемоги 37, 4 корпус, Київ, 03056, Україна;
тел/факс: 8 (044) 24 168 84,
e-mail: kuzminskiy@fbt.ntu-kpi.kiev.ua;
ecobio@i.com.ua, <http://www.ntu-kpi.kiev.ua/keb>

БІОПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ — ПРОБЛЕМИ І ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ II. МІКРОБНІ БІОПАЛИВНІ ЕЛЕМЕНТИ*

В оглядовій роботі здійснено аналіз стану, розглянуто проблеми та визначено перспективи розвитку біопаливних елементів — електрохімічних пристроїв, в яких за допомогою мікроорганізмів здійснюється пряме перетворення хімічної енергії різноманітних речовин (вуглеводів, жирів, білків та ін.) в електричну в результаті біохімічних трансформацій.

К л ю ч о в і с л о в а : мікробні біопаливні елементи, прокаріоти, еукаріоти, медіатори, ферменти, субстрати, анод, катод.

Мікробний біопаливний елемент — це пристрій, в якому здійснюється перетворення енергії хімічних зв'язків в електричну з використанням ферментів, що знаходяться в живому мікроорганізмі. Рушійна сила МПЕ (мікробний паливний елемент) — система окисно-відновних реакцій, що перебігають у живих клітинах.

В науковій літературі розглядається два базових типи МПЕ:

— опосередкований МПЕ — в цьому МПЕ первинне паливо, яке не є електрохімічно активним, за допомогою ферментних систем мікроорганізмів перетворюється в активні метаболіти, які й забезпечують електричний струм на аноді;

— прямий МПЕ — у цьому випадку мікроорганізми генерують електрони, які передаються на анод, чим і забезпечується електричний струм.

Такий поділ є досить умовним, оскільки мікроорганізми мають широкі метаболічні можливості, що дозволяє перебігати множині біохімічних перетворень одночасно. Прикладом МПЕ, який складно віднести до якогось певного типу, можуть бути так звані седиментні (донні) МПЕ. Інтерес до седиментних МПЕ обумовлений тим, що в донних відкладеннях морів, річок та інших водойм, за рахунок діяльності

* Першу частину огляду «Біопаливні елементи — проблеми і перспективи розвитку. I. Ферментні паливні елементи» дивись «Мікробіологія і біотехнологія» № 3, 2008; стор. 21.

© Є.В. Кузьмінський, П.І. Гвоздяк, Н.Б. Голуб, 2009



анаеробної мікрофлори по розкладанню органічних речовин, що накопичуються, встановлюється негативний окисно-відновний потенціал середовища. При зануренні анода в таке середовище, а катода — у поверхневий шар води, що аерується і має позитивний потенціал, виникають умови для генерації електричного струму. Через екстенсивний характер процесу питома потужність такого МПЕ досить низька — порядку 0,01 Вт/м² електрода, але, з огляду на величезні обсяги донних відкладень, які американські дослідники [7,32] навіть називають «похованими скарбами», такий метод одержання електроенергії представляється перспективним, хоча і вимагає розробки ряду принципово нових технічних рішень.

Мета даної роботи — аналіз стану, розгляд і визначення проблем та перспектив розвитку новітнього напрямку технічної біоенергетики — біопаливних елементів (зокрема мікробних Біо-ПЕ) — пристроїв, в яких за допомогою мікроорганізмів здійснюється пряме перетворення хімічної енергії різноманітних речовин (вуглеводів, жирів, білків та ін.) в електричну в результаті біохімічних трансформацій.

1. Опосередковані МПЕ

Опосередковані МПЕ можуть бути виконані у двох конфігураціях:

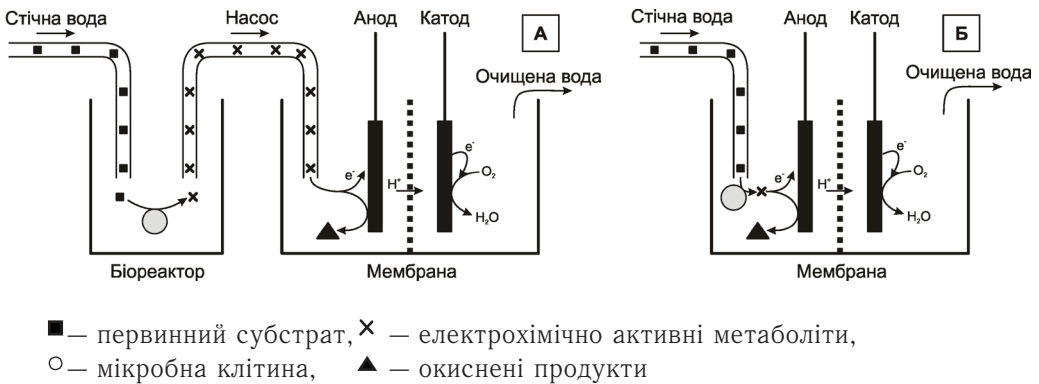


Рис.1. Схематичне зображення конфігурацій опосередкованого МПЕ:

А — опосередкований МПЕ з відділеним мікробним біореактором;

Б — опосередкований МПЕ з інтегрованим біореактором

Fig. 1. Schemetic picture of MFE configurations;

A — MFE with the separated microbial bioreactor; B — MFE with the integrated bioreactor

— опосередкований МПЕ з відокремленим мікробним біореактором — у цьому випадку паливо і мікроорганізми відділені від анодної зони електрохімічної комірки (рис.1, А). Ця конфігурація часто використовується при біологічному напрацюванні газоподібного водню для його послідуного електрохімічного окиснення в хімічному паливному елементі. У ролі палива в системах цього типу також можуть застосовуватися й інші метаболічні продукти (наприклад, форміат чи сірководень);

— опосередкований МПЕ з інтегрованим біореактором — без відділення палива і мікроорганізмів від анодної зони електрохімічної комірки (рис.1, Б). У цьому випадку процес мікробної ферментації відбувається безпосередньо в анодному відділенні паливної комірки. Робочі умови в анодному просторі диктує біологічна система, тому вони значно відрізняються від тих, що мають місце у звичайних

хімічних паливних елементах. У цьому випадку ми маємо дійсно мікробний біо-паливний елемент, а не просто комбінацію біореактора з паливним елементом.

Важливим для нашої проблематики є відомий факт, що різні бактерії та морські водорості, наприклад, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium perfringens* здатні виділяти водень за анаеробних умов [2,25]. Найефективніший процес виробництва водню був зафіксований при ферментації глюкози *Clostridium butyricum* (штам IFO: 3847 ммоль H_2 на годину в присутності 1г мікроорганізмів, при 37 °С) [5]. Треба відмітити, що іммобілізація бактерій також має велике значення, тому що стабілізує відносно нестійку гідрогеназну систему. Для стабілізації біокаталітичного процесу бактерії вводять у полімерні матриці, наприклад, поліакриламід [35], агаровий гель [18,34] та фільтрувальний папір [36], ефективним також може виявитися електроутримання [1]. Іммобілізовані мікробні клітини безперервно виробляли H_2 в анаеробних умовах протягом тижнів, тоді як не іммобілізовані клітини були повністю дезактивовані швидше, ніж за два дні [18]. Наприклад, воднево—кисневий хімічний паливний елемент (анод у вигляді сітки з платинової черні, а катод — сітка з паладійової черні, які розділені нейлоновим фільтром) був сполучений з біореактором, який виробляв водень [18,34]. Отриманий у такий спосіб H_2 збирали і транспортували до анодного відділення паливного елемента, де газ використовували у якості палива. Струм та напруга на виході залежали від швидкості продукування водню у біореакторі, і при потоці H_2 зі швидкістю 40 мл/хвилину було отримано напругу відкритого ланцюга 0,95 В з густиною струму 40 мА /см² [34].

Таблиця 1 містить інформацію про характеристики МПЕ, що використовують природні продукти мікробної ферментації (наприклад, H_2 , H_2S), у якості струмотворювальних речовин.

Таблиця 1

Приклади МПЕ, що використовують продукти мікробного метаболізму для окиснення на аноді ^a

Table 1

Examples of MFE used microbial metabolism products for anodic oxidation

Мікроорганізм	Поживний субстрат	Продукт ферментації	Напруга на МПЕ	Густина струму, МПЕ	Анод МПЕ ^a	Джерело
<i>Clostridium butyricum</i>	Стічні води	H_2	0,62 В (при 1 Вт)	0,8 А (при 2,2 Вт)	Ni, покритий Pt, 165 см ² (5 анодів)	[18]
<i>Clostridium butyricum</i>	Меляса	H_2	0,66 В (при 1 Вт)	40 мА/см ² (при 1 Вт)	Ni, покритий Pt, 85 см ²	[34]
<i>Clostridium butyricum</i>	Лактат	H_2	0,6 В ^b	120 мкА/см ² ^c	Pt чернь, 50 см ²	[15]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Глюкоза	H_2	1,04 В ^c	60 мкА/см ² ^d	сталь, покрита Pt, 25 см ²	[39]
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Декстро-за	H_2S	2,8 В ^c	1 А	Графіт, активований $Co(OH)_2$ (3 аноди)	[10,13]

Примітки: ^a У більшості досліджень анод МПЕ був об'єднаний з O_2 -катодом.

^b Площа поверхні анода дається як геометрична (видима) поверхня.

^c Вимірювання з розімкнутим електричним ланцюгом МПЕ.

^d Вимірювання з замкнутим електричним ланцюгом МПЕ.



2. Прямі мікробні біопаливні елементи

Цей тип МПЕ імітує біологічну систему, з тою лише різницею, що мікроорганізми транспортують утворені ними в результаті катаболізму потоки електронів не на свої природні кінцеві акцептори, а на анод, з якого через систему зняття потужності вони кінець кінцем попадають на катод:

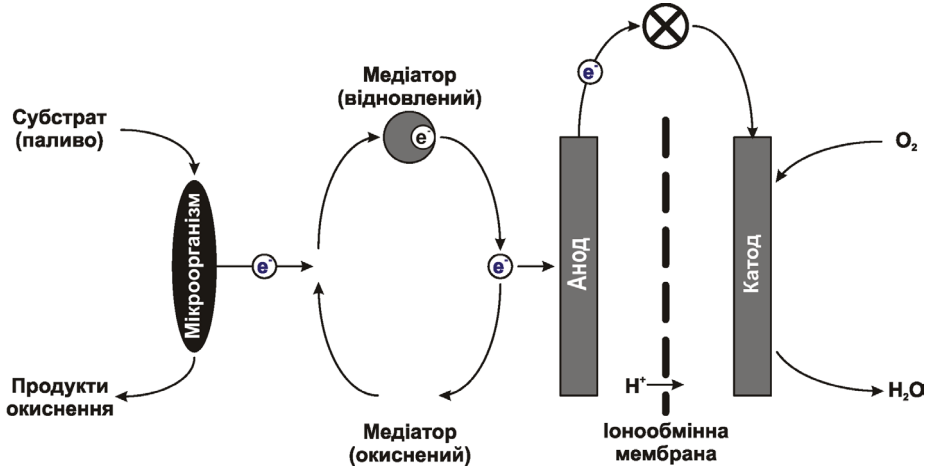


Рис. 2. Схематичне зображення прямого МПЕ

Fig. 2. Schematic picture of direct MFE

У такий спосіб хімічна енергія, що міститься в субстраті (паливі), за допомогою каталітичних систем мікроорганізмів перетворюється в електричну.

Перенесення електронів від внутрішньоклітинних відновників до електрода в прямому МПЕ може здійснюватися наступними шляхами:

- за допомогою штучних чи природних медіаторів електронного переносу;
- за участю цитохромів, розміщених у зовнішній мембрані мікроорганізму;
- за допомогою електропровідних пілій – «нано-проводів – nanowires» (рис. 6);
- за іншими, ще не з’ясованими, механізмами.

Отже, в МПЕ розглядається декілька механізмів електронного переносу, виходячи з яких прямі МПЕ можна умовно розділити на наступні типи:

- прямий медіаторний – МПЕ функціонує тільки за використання штучного медіатора електронного переносу;
- безмедіаторний – МПЕ не потребує обов’язкового використання штучного медіатора електронного переносу.

2.1. Прямі медіаторні МПЕ

Відновники, що утворюються в метаболічних процесах у мікробних клітинах, ізольовані від навколишнього середовища мікробною мембраною. Тому контакт мікробних клітин з електродом звичайно пов’язаний з перенесенням електрона через клітинну мембрану [3]. Це завдання може вирішуватися за допомогою медіаторів, які, входячи в клітину, окиснюють клітинні кофактори, наприклад, НАДН. Виходячи із клітини, медіатори переносять заряд на електрод, при цьому НАД⁺ залишається всередині клітини.

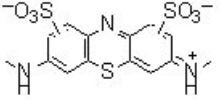
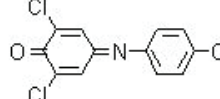
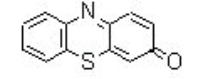
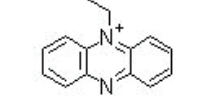
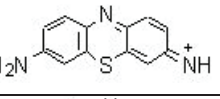
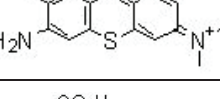
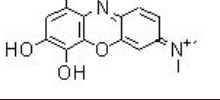
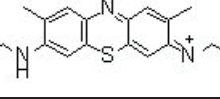
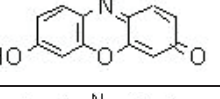
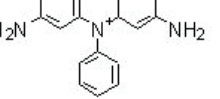
З наукової літератури відомі різні види медіаторів, а найбільш уживані в МПЕ наведено в табл.2.

Таблиця 2

Стандартні окисно-відновні потенціали E° (відносно нормального водневого електрода) медіаторів електронного переносу в МПЕ та швидкість їх відновлення мікробними клітинами [33]

Table 2

Standart oxidative renewed potential E° of electronic mediators transformation (relatively to normal hydrogen electrode) and rate of their renovation by microbial cells [33]

Медіатор	Структурна формула	E° , В	Швидкість відновлення ^b , мкмоль ⁻¹ с ⁻¹
<i>N,N</i> -диметил-дисульфонат тіонін		+0,220	0,33
2,6-дихлорфенол-індофенол		+0,217	0,41
Фенотіазинон		+0,130	1,43
Феназин етосульфат		+0,065	8,57
Тіонін		+0,064	7,10
Синій толуїдин-О		+0,034	1,47
Галоцианін		+0,021	0,53
Новий метиленовий синій		-0,021	0,20
Резорфін		-0,051	0,61
Сафранін-О		-0,289	0,07

^a E° при рН 7.0

^b Відновлення барвника за допомогою *Proteus vulgaris* при 30°C, 50 мкмоль барвника та 0,10-0,15 мг (суха маса мікробних клітин) /мл; субстрат — глюкоза.



Так, тіонін забезпечує електронний перенос від *Proteus vulgaris* [6,20] і *E.coli* [15,18]. Інші органічні барвники, перевірені на предмет участі в електронному транспорті, включають бензилвіологен, 2,6-дихлорофенол-індофенол, 2-гідрокси-1,4-нафтохінон, феназини (феназин етосульфат, сафранін), фенотіазин (алізарин діамантовий синій, *N, N*-диметил-дисульфонат тіонін, метиленовий синій, фенотіазин, синій толуїдин-О), і феноксазини (діамантовий крезоловий синій, галоціанін, резорфін) [12,16,23,33]. Для більшості мікроорганізмів, серед досліджених барвників, феноксазин, фенотіазин, феназин, індофенол, біпіридилні похідні, тіонін і 2-гідрокси-1,4-нафтохінон виявилися найбільш ефективними щодо підтримки високого рівня напруги МПЕ [12]. Також встановлено, що хелатні комплекси заліза (наприклад, Fe (III) – етилендіамінтетраацетат – ЕДТА) успішно переносять електрони в системі з *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactis* і *Erwinia dissolvens* [41]. У свою чергу, моно- і дисульфовані похідні тіоніну застосовуються для визначення впливу гідрофільних замісників на ефективність медіаторного електронного переносу від *E. coli* до анода [26]. Заміщення тіоніну до 2-сульфованого та 2,6-дисульфованого тіоніну призводить до збільшення ефективності медіаторного електронного переносу, що відображається у рості величини електричного струму МПЕ.

Слід також зазначити, що вибір медіатора є досить непростим завданням, яке вимагає серйозних наукових досліджень, що зв'язано зі специфічністю взаємодії медіатора і бактеріальної клітини. Деякі медіатори, що добре проявили себе для одного виду мікроорганізмів, можуть бути неприйнятними, наприклад, через токсичність, для інших видів. У випадку використання в МПЕ асоціації мікроорганізмів доцільним може бути застосування низки спеціально підібраних медіаторів. Проте, виходячи із виконаного нами аналізу, можна висунути ряд загальних вимог, яким повинен відповідати обраний для прямого МПЕ медіатор:

- бути електрохімічно активним в анодному просторі МПЕ;
- окиснювально-відновний потенціал медіатора має бути достатньо позитивним для забезпечення швидкого електронного переносу від метаболіту, і при цьому не повинен бути занадто позитивним, щоб запобігти істотному зниженню електрорушійної сили (ЕРС);
- мати достатню проникність через клітинну мембрану як в окисненому, так і у відновленому станах;
- бути резистентним до руйнівної дії ферментних систем мікроорганізму та не бути токсичним для самого мікроорганізму;
- демонструвати стабільність протягом тривалого часу експлуатації;
- не повинен адсорбуватися на бактеріальних клітинах або на поверхні електрода.

Оскільки медіатор електронного переносу повинен відповідати низці вимог, деякі з яких є взаємовиключними, неможливо досягти ідеальних умов для здійснення електронного переносу з бактеріальної клітини на електрод. За таких умов перевагу може мати сумісне використання двох (і більше) медіаторів для підвищення ефективності переносу електронів. Розчин, що містить тіонін і комплекс Fe (III)-ЕДТА як медіатори електронного переносу, був застосований для забезпечення електронного переносу від *Escherichia coli* до анода, за використання глюкози як первинного субстрату [38]. Хоча обидва медіатори можуть бути відновлені за допомогою *E. coli*, тіонін відновлюється більш ніж в 100 разів швидше, ніж Fe (III)-ЕДТА. Однак електрохімічне окиснення відновленого тіоніну перебігає набагато повільніше, ніж окиснення Fe (II)-ЕДТА. Тому електрони, отримані при



окисненні глюкози в присутності *E. coli*, переносяться головним чином на тіонін. Відновлений тіонін швидко окиснюється за допомогою Fe (III)-ЕДТА, причому, як було показано [38], швидкість даного процесу дуже велика. Нарешті, відновлений хелатний комплекс Fe (II)-ЕДТА переносить електрони до анода за допомогою електродної реакції Fe (III)-ЕДТА / Fe (II)-ЕДТА з досить великою константою швидкості ($k = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$).

Існують різні схеми взаємодії медіатора, мікроорганізму і анода. Перша — це коли медіатор ковалентно зв'язаний з анодною поверхнею, а клітини можуть вільно переміщуватися поблизу анода (Рис. 3).

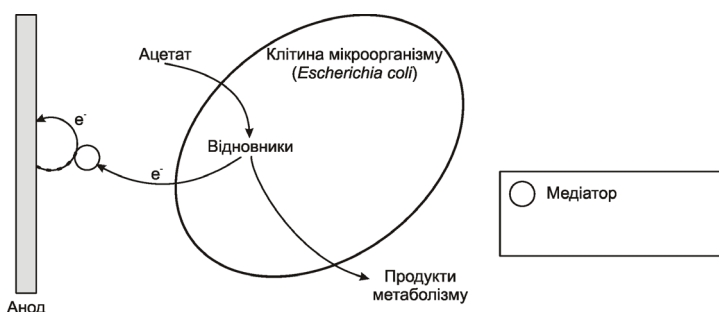


Рис. 3. Схема взаємодії мікробних клітин з медіатором — медіатор ковалентно зв'язаний з анодною поверхнею, а клітини вільно переміщуються поблизу анода

Fig. 3. Scheme of microbial cells and mediator interaction: the mediator is covalently connected with anodic surface, cells are moving easily nearby anode

Так, наприклад, щоб такий органічний барвник як нейтральний червоний став ефективним дифузійним медіатором електронного переносу від *E. coli*, його ковалентно «пришивали» до поверхні графітового електрода за допомогою амідного зв'язку між карбоксильною групою на поверхні електрода і аміногрупою барвника [29,30]. Потім модифікований у такий спосіб медіатором електрод використовувався як анод у присутності *E. coli*, при цьому медіатор забезпечував електронний перенос від мікробних клітин до провідної підкладки в анаеробних умовах.

Згідно другої схеми, медіатор перебуває між анодом і ковалентно зв'язаними з поверхнею електрода клітинами мікроорганізму (Рис.4).

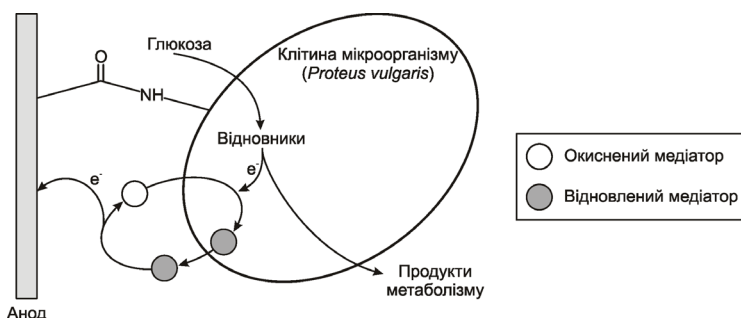


Рис.4. Схема взаємодії мікробних клітин з медіатором — медіатор знаходиться між анодом і клітинами мікроорганізму, які ковалентно зв'язані з поверхнею електрода

Fig. 4. Scheme of microbial cells and mediator interaction: the mediator is situated between anode and microorganism cells, connected covalently with electrode surface

Так, у роботі [41] мікробні клітини *Proteus vulgaris* ковалентно зв'язували з окисненою поверхнею вуглецевого електрода за допомогою амідного зв'язку між карбоксильними групами на поверхні електрода і аміногрупами мікробної мембрани. Електрод, модифікований прикріпленими мікроорганізмами, застосовувався як анод прямого МПЕ за використання глюкози в ролі первинного субстрату і тіоніну у якості дифузійного медіатора електронного переносу. Модифікований бактеріями анод продемонстрував більш високі значення струму і кращу стабільність у порівнянні із системою, до складу якої входили ті ж компоненти, але з не іммобілізованими клітинами.

За третьою схемою медіатор адсорбовано на клітинах іммобілізованого мікроорганізму.

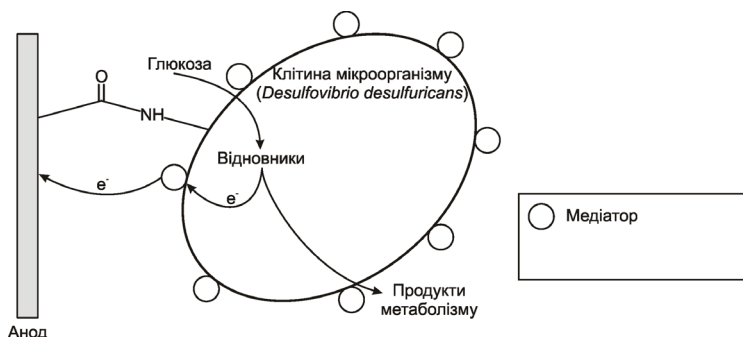


Рис.5. Схема взаємодії мікробних клітин з медіатором: медіатор адсорбовано на клітинах мікроорганізму

Fig. 5. Scheme of microbial cells and mediator interaction: the mediator is adsorbed on microorganism cells

У цьому випадку медіатор здійснює електронний транспорт із клітин до анода в результаті їхнього безпосереднього контакту. У роботі [28] досліджувався такий прямий МПЕ, в якому використовувалися клітини *Desulfovibrio desulfuricans* з адсорбованим на поверхні полімерним похідним віологену і тетраціанохінондиметану (TCNQ).

У таблиці 3 наведено характеристики деяких медіаторних МПЕ, описаних у наукових публікаціях.

2.2. Прямі безмедіаторні МПЕ

Щодо іншого типу так званих безмедіаторних прямих МПЕ, то в них використовуються такі металвідновлюючі бактерії як *Geobacter sulfurreducens* чи *Shewanella putrefaciens*, які містять специфічні цитохроми зовні цитоплазматичної мембрани [27]. Ці електронні переносники здатні генерувати анодний струм у відсутності кінцевих акцепторів електронів в анаеробних умовах [7,8,17- 19]. Дані бактерії, як правило, знаходяться у відкладеннях, де вони використовують нерозчинні акцептори електронів — такі як Fe (III) та Mn (IV). Окрім уже названих, до металвідновлюючих мікроорганізмів, які застосовуються у МПЕ, відносяться такі як *Geobacter metallireducens* та *Desulfuromonas acetoxidans* [7], *Rhodoferrax ferrireducens* [9].

Таблиця 3

Характеристики деяких МПЕ, які використовують штучні медіатори електронного переносу*

Table 3

Characteristics of some MFE used artificial electronic mediators of transformation

Мікроорганізм	Поживний субстрат	Медіатор	Напруга	Струм (густина струму)	Анод ¹	Джерело
<i>Pseudomonas methanica</i>	CH ₄	1-нафтол-2-сульфонат індо-2,6-дихлорфенол	0,5–0,6В ²	2,8 мкА/см ² (при 0,35 В)	Pt грубодисперсна 12,6 см ²	[37]
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза	Метиленовий синій	0,625 В ^с	-	Pt, 390 см ²	[11]
<i>Proteus vulgaris</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Глюкоза	Тіонін	0,64 В ^с	0,8 мА (при 560 Вт)	Пористий вуглець, 800 см ²	[12]
<i>Proteus vulgaris</i>	Глюкоза	Тіонін	350 мВ (при 100 Вт) ^з	3,5 мА (при 100 Вт)	Пористий вуглець, 800 см ²	[21]
<i>Proteus vulgaris</i>	Сахароза	тіонін	350 мВ (при 100 Вт) ^д	3,5 мА (при 100 Вт)	Графіт	[6]
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза	тіонін	390 мВ (при 560 Вт) ^д	0,7 мА (при 560 Вт)	-	[26]
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Streptococcus lactis</i>	Глюкоза	Fe (III)-ЕДТА	0,2 В ^с	90 мкА (при 560 Вт) ^д	-	[41]
<i>Erwinia dissolvens</i>	Глюкоза	Fe (III)-ЕДТА	0,5 В ^с	0,7 мА (при 560 Вт) ^д	-	[41]
<i>Proteus vulgaris</i>	Глюкоза	2-гідрокси-1,4-нафтахінон	0,75 В ^с	0,45 мА (при 1 кОм)	Графітова повсть, 1 г (0,47 м ² г ⁻¹)	[28]
<i>Escherichia coli</i>	Ацетат	Нейтральний червоний	0,25 В ^с	1,4 мкА/см ² ⁴	Графіт, 100 см ²	[30]
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза	Нейтральний червоний	0,85 В ^с	17,7 мкА/см ² ^е	Графітова повсть, 12 г (0,47 м ² г ⁻¹)	[30]
<i>Escherichia coli</i>	Глюкоза	2-гідрокси-1,4-нафтахінон	0,53 В (при 10 кОм)	0,18 мА/см ² ^е	Скловуглець, 12,5 см ²	[33]

Примітка:

* У більшості досліджень анод МПЕ був об'єднаний з O₂-катодом.¹ Площа поверхні анода дається як геометрична (видима) поверхня.² Вимірювання з розімкнутим електричним ланцюгом МПЕ.³ Значення, розраховане на підставі інших даних за використання закону Ома.

Rhodofera ferrireducens, специфічно виділений із анаеробних відкладень, здатен до ефективної передачі електрона до графітового електрода, використовуючи глюкозу у якості єдиного джерела вуглецю [9]. Ця бактерія є першим з описаних штамів, який здатен повністю метаболізувати глюкозу до вуглекислого газу, супроводжуючи це генерацією електричного струму із ефективністю 90 %.

Слід також відзначити, що прямі МПЕ, які використовують змішані металвідновлюючі бактеріальні культури, мають наступні важливі переваги перед тими, що використовують чисті анаеробні культури:

- більша стійкість до зміни умов роботи;
- високий рівень споживання субстрату;
- велике різноманіття субстратів, які можуть споживатися;
- висока питома потужність.

У табл. 4 наведені характеристики роботи деяких МПЕ на чистих і змішаних культурах, які працюють без додавання медіаторів.

Таблиця 4

Характеристики деяких МПЕ, які працюють без додавання штучних медіаторів електронного переносу

Table 4

Characteristics of some MFE working without any artificial mediators of electronic transformation

Мікроорганізм	Субстрат	Матеріал анода	Струм (мА)	Питома потужність (мВт/м ²)	Джерело
<i>Shewanella putrefaciens</i>	лактат	графітова тканина	0,031	0,19	[21]
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	ацетат	графіт	0,40	13	[8]
<i>Rhodofera ferrireducens</i>	глюкоза	графіт	0,2	8	[9]
<i>Rhodofera ferrireducens</i>	глюкоза	графітова тканина	0,57	17,4	[9]
<i>Rhodofera ferrireducens</i>	глюкоза	пористий графіт	74	33	[9]
Змішана культура з морської води	ацетат	графіт	0,23	10	[40]
Змішана культура з морської води	сульфід / ацетат	графіт	60	32	[40]
Змішана культура з активного мулу	ацетат	графіт	5	-	[24]
Змішана культура з активного мулу	глюкоза	графіт	30	3600	[31]
Змішана культура з активного мулу	стоки	графітова тканина	0,2	8	[22]

¹ Вимірювання з замкнутим електричним ланцюгом МПЕ.



При передачі електронів металвідновлюючими бактеріями на малорозчинні мінерали можуть використовуватися не тільки мембранні цитохроми і медіатори електронного переносу. Так, наприклад, останнім часом дослідниками було зафіксовано утворення деякими мікроорганізмами електропровідних пілій — так званих «нано-проводів» (nanowires) [42]. Мікроорганізми *Shewanella oneidensis* культивували у хемостаті в анаеробних умовах при слабкому перемішуванні (50 обертів за хвилину). При цьому спостерігалось утворення пілійподібних відростків діаметром 50 — 150 нм та довжиною у декілька десятків мікрон. Також була доведена можливість утворення «нано-проводів» іншими мікроорганізмами [14]. На рис. 6 наведена фотографія «нано-проводів», утворених між *P. thermopropionicum* та *M. thermoautotrophicus*, яка була зроблена за допомогою скануючого електронного мікроскопа.

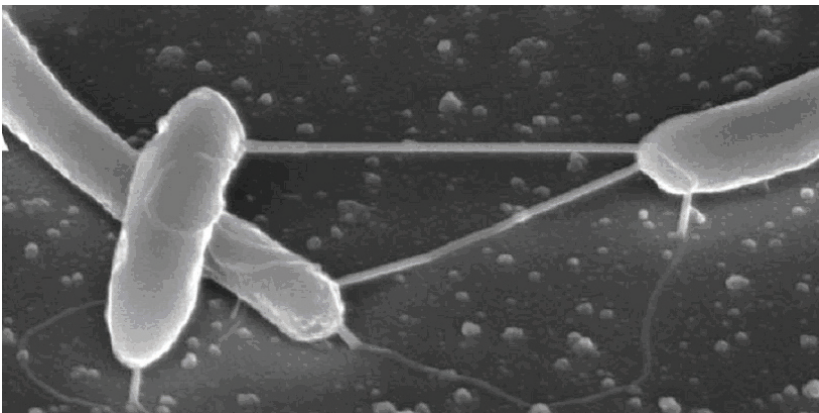


Рис.6. Фотографія «нано-проводів», утворених між мікроорганізмами *P. thermopropionicum* та *M. thermoautotrophicus* (зроблена за допомогою скануючого електронного мікроскопа) [14]

Fig. 6. Photo of “nanowires” created between *P. thermopropionicum* and *M. thermoautotrophicus*, microorganisms (made with the help) of scanning electronic microscope [14]

І, нарешті, проаналізувавши наявну в наукових джерелах інформацію щодо стану розробки різних типів Біо-ПЕ, можна запропонувати наступну класифікацію біопаливних елементів (рис.7).

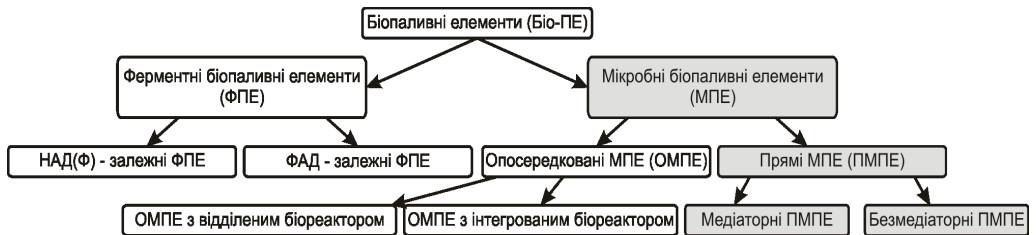


Рис.7. Класифікація біопаливних елементів

Fig. 7. Classification of biofuel elements



3. Висновки

Мікробний біопаливний елемент імітує біологічну систему, з тою лише різницею, що мікроорганізми транспортують утворені ними в результаті катаболізму потоки електронів не на свої природні кінцеві акцептори, а на анод, з якого через систему зняття потужності вони кінець кінцем попадають на катод. Оптимальним катодом є кисневий електрод, оскільки кисень — доступний окисник, має високий окисно-відновний потенціал, використовує протони та продукує екологічно чистий продукт — воду. Проте, слід зазначити, що застосування кисню на електродах є складним завданням та вимагає дорогих каталізаторів.

Існує два базових типи МПЕ — опосередкований і прямий — у цьому випадку мікроорганізми генерують електрони, які безпосередньо передаються на анод, чим і забезпечується електричний струм. Прямі МПЕ, в яких застосовують змішані металвідновлюючі бактеріальні культури, мають важливі переваги перед тими, в яких використовують чисті анаеробні культури — більшу стійкість до зміни умов роботи; високий рівень і велике різноманіття субстратів, які можуть споживатися; високу питому потужність. В свою чергу, прямі МПЕ можна умовно розділити на безмедіаторні — МПЕ не потребує обов'язкового використання штучного медіатора електронного переносу та прямі медіаторні — МПЕ функціонує тільки за використання штучного медіатора електронного переносу. Обраний для прямого МПЕ медіатор — бути електрохімічно активним в анодному просторі МПЕ; окиснювально-відновний потенціал медіатора має відповідати потенціалу метаболіту — відновника; мати достатню проникність через клітинну мембрану як в окисненому, так і у відновленому станах; бути резистентним до руйнівної дії ферментних систем мікроорганізму та не бути токсичним для самого мікроорганізму; демонструвати стабільність протягом тривалого часу експлуатації; не повинен адсорбуватися на бактеріальних клітинах або поверхні електрода.

Мікробні біопаливні елементи характеризуються відносно простими технологіями отримання клітин мікроорганізмів (відсутня необхідність примусового оновлення біокаталізатора), високим рівнем саморегуляції при зміні складу середовища та доступністю конструктивних рішень. На відміну від чистих ферментів цілі мікроорганізми у МПЕ здатні до саморегуляції, тому можуть застосовуватися до субстратів змінного складу та багатокомпонентних середовищ (наприклад, стоків) і самостійно коригувати інгібування ферментів. На нашу думку, саме можливість застосування МПЕ для очищення стоків з одночасною генерацією електричного струму та простота конструкції надає їм певні переваги у порівнянні з ферментними паливними елементами.

Стічні води, що мають у своєму складі забруднення органічного походження, є найбільш привабливим об'єктом для впровадження прямих МПЕ, бо окупність останніх буде визначатись не тільки отриманою електроенергією, а й витратами на очищення стічної води. Найбільш перспективними в цьому контексті є МПЕ на основі гетеротрофних, фотогетеротрофних і так званих седиментних мікроорганізмів; при цьому МПЕ можуть бути реалізовані як з використанням медіаторів, так і без них. Водночас варто мати на увазі, що вона є багатокомпонентною та змінною в часі системою, склад якої не завжди можна змоделювати та передбачити.



ЛІТЕРАТУРА

1. Гвоздяк П. И. Исследование микробной деструкции синтетических азотсодержащих веществ и электроудерживание микроорганизмов в связи с очисткой воды // автореферат докт. дис. 14.03.76/ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ, Київ-1976.-34. с.
2. Akiba T., Bennetto H. P., Stirling J. L., Tanaka K. Electricity production from alkalophilic organisms. // *Biotechnol. Lett.* — 1987. — v.9. — N 9. — P. 611–616.
3. Allen M. J. Biofuel Cells in “Methods in Microbiology”(eds Norris J. R., Ribbon D. W.), Academic Press, New York, 1972.-P. 247-283.
4. Allen R. M., Bennetto H. P. Microbial fuel cells — Electricity production from carbohydrates. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 1993. — N 39/40. — P. 27–40.
5. Bennetto H. P., Stirling J. L., Tanaka K., Vega C. A. Anodic reaction in microbial fuel cells. // *Biotechnol. Bioeng.* — 1983. — N 25. — P. 559–568.
6. Bennetto H. P., Delaney G. M., Mason J. R., Roller S. D., Stirling J. L., Thurston C. F. The sucrose fuel cell: efficient biomass conversion using a microbial catalyst. // *Biotechnol. Lett.* — 1985. — v. A. — N 7. — P. 699–705.
7. Bond D. R., Holmes D. E., Tender L. M. and Lovley D. R. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments // *Science*.-2002.-v.295(5554).- P.483-485.
8. Bond, D. R. and Lovley, D. R. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2003. — v.69.— N 3. — P. 1548–1555.
9. Chaudhuri, S. K. and Lovley, D. R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediator-less microbial fuel cells. // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — v.21.— P. 1229–1232.
10. Cooney M. J., Roschi E., Marison I. W., Comniellis C., von Stockar U. Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: evaluation for use in a biofuel cell// *Enzyme Microbial. Technol.*-1996.-v. 18.-N 2.-P. 358-365.
11. Davis J. B., Yarbrough H. F. Preliminary experiments on a microbial fuel cell// *Science*.-1962.-v. 137.-P. 615-616.
12. Delaney G. M., Bennetto H. P., Mason J. R., Roller S. D., Stirling J. L., Thurston C. F. Electron transfer coupling in microbial fuel cells: 2. Performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator-substrate combination// *J. Chem. Technol. Biotechnol. B*.-v. 34.-P. 13-27.
13. Habermann W., Pommer E. H. Biological fuel cells with sulphide storage capacity // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*.-1991.-v. 35.-N1.- 128-133.
14. Ishii S., Kosaka T., Hori K., Hotta Y. & Watanabe K. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermautotrophicus*. // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2006. — v.71.— N 12.— P. 7838–7845.
15. Karube I., Matsunaga T., Tsuru S., Suzuki S. Biochemistry fuel cell utilizing immobilized cells of *Clostridium hutyricum*// *Biotechnol. Bioeng.* — 1977. — v. 19. — P. 1727–1733.
16. Kharitonov A. B., Alfonta L., Katz E., Willner I. Probing of bioaffinity interactions at interfaces using impedance spectroscopy and chronopotentiometry // *J. Electroanal. Chem.* — 2000. — v. 487. — P. 133–141.



17. Kim B. H., Kim H. J., Hyun M. S., Park D. H. Direct electrode reaction of Fe (III) reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. // J. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — v.9a. — P. 127–131
18. Kim, H. J., Hyun M. S., Chang I. S., Kim B. H. A microbial fuel cell type biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. // J. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — v.9. — N 3. — P. 365–367.
19. Kim B. H., Ikeda T., Park H. S., Kim H. J., Hyun M. S., Kano K., Takagi K. and Tatsumi H. Electrochemical activity of an Fe (III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. // Biotechnol. Tech. — 1999. — v.13.— N 7. — P. 475–478.
20. Kim N., Choi Y., Jung S., Kim S. Effect of initial carbon sources on the performance of microbial fuel cells containing *Proteus vulgaris* // Biotechnol. Bioeng. — 2000. — N 70. — P. 109–114.
21. Kim H. J., Park H. S., Hyun M. S., Chang I. S., Kim M. and Kim B. H. A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*// Enzyme Microb. Technol.- 2002.-v. 30(2).-P.145-152.
22. Kim B. H., Park H. S., Kim H. J., Kim G. T., Chang I. S., Lee J. and Phung N. T. Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell// Appl. Microbiol. Biotechnol.-2004.- v. 63(6).-P.672-681.
23. Kreysa G., Sel D. I, Krömer P. Bioelectrochemical fuel cells. // Ber Bunsenges. Phys. Chem. (West Germany), Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie. — 1990. — v.94.— N 9. — P. 1042–1045.
24. Lee J., Phung N. T., Chang I. S., Kim B. H. and Sung H. C. (2003) Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses FEMS//Microbiol. Lett.-2003.- v. 223(2).- P.185-191.
25. Lewis K. Symposium on bioelectrochemistry of microorganisms. IV. Biochemical fuel cells. // Bacteriol. Rev. — 1966. — v.30. — N 1. — P. 101–113.
26. Lithgow A. M., Romero L., Sanchez I. C., Souto F. A., Vega C. A. Interception of electron-transport chain in bacteria with hydrophilic redox mediators. // J. Chem. Res. Synop. — 1986. — N 5. — P. 178–179.
27. Myers C. R., Myers J. M. Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. // J. Bacteriol. — 1992. — v.174.— N 11. — P. 3429–3438.
28. Park D. H., Kim B. H., Moore B., Hill H. A. O., Song M. K., Rhee H. W. Electrode reaction of *Desulfovibrio desulfuricans* modified with organic conductive compounds. // Biotechnol. Techniques. — 1997. — v.11.— N 3. — P. 145–148.
29. Park D. H., Kim S. K., Shin I. H., Jeong Y. J. Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with neutral red. // J. Biotechnol. Lett. — 2000. — v. 22. — P. 1301-1304.
30. Park D. H., Zeikus J. G. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. // Appl. Environm. Microbiol. — 2000. — v. 66. — P. 1292–1297.
31. Rabaey K., Lissens G., Siciliano S. D. and Verstraete W. A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency// Biotechnol. Lett.-2003.- v. 25(18).-P. 1531-1535
32. Reimers, C. E., Tender, L. M., Fertig, S. & Wang, W. Harvesting energy from the marine sediment-water interface. // J. Environ. Sci and Technol.— 2001. — v.35. — N 2. — P. 192–195.



33. Roller S. D., Bennetto H. P., Delaney G. M., Mason J. R., Stirling S. L., Thurston C. F. Electron-transfer coupling in microbial fuel cells: 1. Comparison of redox mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria // J. Chem. Technol. Biotechnol. B.-1984.-v. 34.-P. 3-12.

34. Suzuki S., Karube I., Matsunaga T., Kuriyama S., Suzuki N., Shirogami T., Takamura T. Biochemistry energy conversion using immobilized whole cells of *Clostridium hutyticum*// Biochimie.-1980.-v. 62.-P. 353-358.

35. Suzuki S., Karube I. Energy production with immobilized cells. // Appl. Biochem. Bioeng. — 1983. — v.4. — N 3. — P. 281—310.

36. Suzuki S., Karube I., Matsuoka H., Ueyama S., Kawakubo H., Isoda S., Murahashi T. Biochemistry energy conversion by immobilized whole cells// Ann. N. Y. Acad. Sci.-1983.-v. 413.- 133-143.

37. Shukla A. K., Suresh P., Berchmans S., Rajendran A. Biological fuel cells and their applications // Current Sci. — 2004.-v.87.-N 4.-P.455-468.

38. Tanaka K., Vega C. A., Tamamushi R. Thionine and ferric chelate compounds as coupled mediators in microbial fuel cells. // Bioelectrochem. Bioenerg. — 1983. — N 11. — P. 289—297.

39. Tanisho S., Suzuki Y., Wakao N., Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* stain E.82005 // J. Hydrogen Energy. — 1987. — v. 12. — N 9. — P. 623-627.

40. Tender L. M., Reimers C. E., Stecher H. A., Holmes D. E., Bond D. R., Lowy D. A., Pilobello K., Fertig S. J. and Lovley D. R. Harnessing microbially generated power on the seafloor//Nat. Biotechnol.-2002.- v. 20(8).- P.821-825.

41. Vega C. A., Fernández I. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with *Lactobacillus Plantarum*, *Streptococcus Lactis*, and *Erwinia Dissolvens* // Bioelectrochem. Bioenerg. — 1987. — N 17. — P. 217—222.

42. Yuri A. Gorby, Svetlana Yanina, Jeffrey S. McLean, Kevin M. Rosso, et al. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 2006. — v.103.— N 30.— P. 11358—11363.



Е.В. Кузьминский, П.И. Гвоздяк, Н.Б. Голуб

Национальный технический университет Украины «КПИ»,
пр. Победы 37, 4 корпус, Киев, 03056, Украина;
тел/факс: 8 (044) 24 168 84, e-mail: kuzminskiy@ibt.ntu-kpi.kiev.ua;
ecobio@i.com.ua, <http://www.ntu-kpi.kiev.ua/keb>

**БИОТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ –
ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ.
II. МИКРОБНЫЕ БИОТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ**

Реферат

В обзорной работе сделан анализ состояния, рассмотрены проблемы и определены перспективы развития биотопливных элементов— электрохимических приспособлений, в которых с помощью микроорганизмов осуществляется прямое преобразование химической энергии различных веществ (углеводов, жиров, белков и др.) в электрическую в результате биохимических трансформаций.

К л ю ч е в ы е с л о в а: микробные биотопливные элементы, прокариоты, эукариоты, медиаторы, ферменты, субстраты, анод, катод.

E.V. Kuzminskiy, P.I. Gvozdyak, N.B. Golub

National Technical University of Ukraine “KPI”, 37 Prospekt Peremogy Str.,
Kyiv, 03056, Ukraine; tel/fax: 8 (044) 24 168 84, e-mail: kuzminskiy@ibt.kiev.ua;
ecobio@i.com.ua, <http://www.ntu-kpi.kiev.ua/keb>

**BIOFUEL ELEMENTS — THE PROBLEMS AND PERSPECTIVES
OF DEVELOPMENT. II. MICROBIAL FUEL ELEMENTS**

Summary

In this review the condition of biofuel elements was analyzed. Biofuel elements are the electrochemical devices in which by the help of microorganisms the direct transformation of chemical energy of different substances (carbohydrates, fats, proteins etc.) into electrical energy occurs as the result of biochemical transformations. The problems and perspectives of biofuel elements development were discussed and determined.

K e y w o r d s: microbial fuel elements, procariotes, eukariotes, mediators, anode, cathode.



І.К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 90 11, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВПЛИВ БІОГЕННИХ І АБІОГЕННИХ ФАКТОРІВ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ІНТРОДУКЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ У АГРОЕКОСИСТЕМИ

В огляді літератури проаналізовано вплив біогенних та абіогенних факторів на ефективність інтродукції у агроєкосистеми мікроорганізмів, що стимулюють ріст і розвиток рослин. Угрупуванням живих організмів у агроєкосистемах властива стабільність. При внесенні до них певного штаму мікроорганізмів їх чисельність часто швидко знижується. Це обумовлено не тільки властивостями застосовуваного штаму, а й особливостями його взаємодії з компонентами агроєкосистеми. Важливий вплив на ефективність інтродукованих мікроорганізмів спричиняє стан суцесії екосистеми, способи застосування мікробних препаратів, первинні етапи взаємодії мікроорганізмів з рослинами.

К л ю ч о в і с л о в а: мікроорганізми, інтродукція, біотичні та абіотичні фактори, агроєкосистеми.

Інтродукція мікроорганізмів у агроєкосистеми є ефективним методом корекції мікрофлори ризосфери, покращення росту та розвитку рослин та підвищення їх врожайності [20]. Вона здійснюється з метою: стимулювання проростання насіння і формування проростків; покращення живлення рослин, їх фотосинтетичної діяльності, росту і розвитку, прискорення цвітіння і плодоношення, підвищення врожайності; стійкості рослин до хвороб і шкідників та їх захисту від цих негативних чинників; покращення фізико-хімічних характеристик ґрунту, його очищення від забруднювачів; оптимізації складу екосистем ґрунту [17, 28, 31, 79].

При внесенні мікробних препаратів у кореневу зону рослин на них буде діяти безліч біогенних та абіогенних факторів [1-3, 14]. У зв'язку з цим чисельність інтродукованої в ґрунт мікробної популяції часто швидко знижується, що є ключовим фактором, який визначає успіх застосування мікроорганізмів у нових для них екосистемах [109, 120]. Без належної уваги до впливу цих факторів неможливо розраховувати на стабільність позитивної дії внесених в агроєкосистему мікробних препаратів на ріст, розвиток рослин і їх врожайність.

Вплив абіотичних факторів на мікроорганізми, інтродуковані у агроєкосистеми

Ефективність мікробних препаратів у рослинництві в значній мірі визначається абіотичними факторами середовища (температурою, вологістю, рН, вмістом хімічних речовин тощо). Вони можуть діяти на динаміку інокулянту безпосередньо,



спричиняючи вплив на інтродукований штам мікроорганізмів, а також можуть впливати опосередковано, змінюючи чисельність та фізіологічну активність інших живих організмів екосистеми [40, 120].

Стресовий вплив на мікрофлору ґрунту спричиняє його періодичне висушування та зволоження [93]. Це може бути причиною лізису помітної кількості клітин і, таким чином, змін складу мікробної спільноти [60]. Було показано, що максимальний рістстимулюючий вплив ризобактерій *Pseudomonas aeruginosa*, а також їх бінарної культури з *Bacillus subtilis* на врожайність томатів, що був обумовлений зниженням ураження нематодами *Meloidogyne javanica* та деякими видами фітопатогенних грибів, проявлявся за вологості ґрунту від 50 до 75 % від повної вологості, тоді як при 25 % його вологості ефективність *P. aeruginosa* помітно знижувалась [112].

Значний вплив на виживання інтродукованих бактерій спричиняє температура середовища. Так, колонізація коріння гороху бактеріями *Bacillus subtilis* зростала з підвищенням температури до 30 °C [53]. В той же час високі температури тропічних регіонів можуть лімітувати формування і функціонування бобово-ризобіального симбіозу [100].

Помітно впливають на виживання інтродукованих мікроорганізмів і низькі температури. Було встановлено, що чисельність популяції *Azospirillum*, яка була внесена в ґрунт в зоні помірного клімату, після зимівлі не відновлювалась до вихідних значень [75]. Подібна закономірність спостерігалась в кореневій зоні багаторічних трав, де чисельність азоспірил досягала максимальних значень в рік їх застосування. На наступні два роки їх кількість помітно знижувалась [28]. У вегетаційних дослідах було показано, що реакція рослин на інокуляцію може істотно змінюватись (від позитивної до негативної) в залежності від рН ґрунту та вирощуваного сорту рослин [2].

Значний вплив на функціонування мікроорганізмів у агроєкосистемах спричиняє вміст в ґрунті мінеральних речовин. Внесення до нього аміачної селітри та вуглеамонійних солей спричиняло негативний вплив на формування симбіотичних відносин бульбочкових бактерій з рослинами сої [28]. Внесення агрофоски в ґрунт суттєво знижувало формування мікоризи на корінні сої [37]. Сумісне застосування бульбочкових бактерій і мінеральних добрив також знижувало ефективність бобово-ризобіального симбіозу у рослин нуту [8].

В забруднених екосистемах успіх інтродукції мікроорганізмів обумовлюється в основному відповідністю фізико-хімічних умов середовища фізіологічним потребам інтродукованої популяції. Було показано, що виживання рифампіцинрезистентного штаму *Azospirillum lipoferum* в ґрунті підвищувалось при інгібуванні ґрунтової мікрофлори цим антибіотиком [1]. В ґрунтах, що містили підвищені концентрації Zn^{2+} , адаптовані до цього іону мікоризні гриби *Glomus mosseae* захищали рослини конюшини від токсичної дії даних іонів [122].

Бактеризація насіння ячменю сорту Цілинний-5 асоціативними бактеріями *Azospirillum lipoferum* 137, *Agrobacterium radiobacter* 10 та іншими видами бактерій, стійкими до токсичних концентрацій іонів свинцю і кадмію, позитивно впливала на ріст рослин і покращувала споживання ними біогенних елементів у ґрунті, забрудненому іонами даних металів. При цьому вміст іонів свинцю і кадмію в зерні не підвищувався, що свідчить про можливість застосування вказаних асоціативних бактерій для зниження токсичного впливу на рослини іонів важких металів [3].



Встановлено, що інтродукція бактерій *Bacillus megaterium 501* та *Exophiala nigrum A-29*, які здатні розкладати фосфорорганічні пестициди, в торф'яні субстрати, що забруднені цими пестицидами, супроводжувалась помітною стимуляцією росту рослин і підвищенням їх продуктивності [24].

Фізіологічний стан мікроорганізмів, інтродукованих у агроєкосистеми

Одним з визначальних факторів успішної інтродукції мікробних препаратів у агроєкосистеми є властивості штамів мікроорганізмів, введених до їх складу, особливості рослин, при вирощуванні яких передбачається застосовувати ці препарати та фізіологічна активність живих організмів, що формують цю екосистему [46, 102]. В певній мірі зниження чисельності деяких інтродукованих мікроорганізмів можна передбачити на основі аналізу їх фізіологічних властивостей і умов середовища. Так, було показано [119], що чисельність *Bacillus subtilis*, інтродукованих в ґрунт, знижується до рівня спор, присутніх у інокулянті до інтродукції.

Фізіологічні властивості мікроорганізмів залежать від багатьох факторів середовища. Так, було встановлено, що клітини грамнегативних бактерій *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, вирощені в умовах лімітування по вуглецю, краще переносять стресові умови при внесенні у ґрунт. При додаванні до нього глюкози ці види бактерій характеризувались зниженням резистентності до дії стресових факторів [63,78]. Відповідно до даних інших дослідників [1, 16], оліготрофні бактерії роду *Arthrobacter* виживали у ґрунті краще, ніж копіотрофний штам роду *Flavobacterium*. Однак у цьому напрямку потрібні додаткові дослідження, оскільки наведені результати ще не доводять, що виявлені закономірності обумовлені відношенням досліджених штамів до субстратів, а не іншими їх ознаками.

Встановлено, що за дії стресових факторів розмір клітин грамнегативних бактерій зменшується. Так, при експоненційному рості *Vibrio ssp.* формують паличкоподібні клітини, тоді як в умовах лімітування росту по вуглецю, азоту чи фосфору спостерігається утворення кокоподібних клітин [74]. За подібних умов у бацил і клостридій утворюються спори, а за впливу водного стресу чи токсичних агентів бактерії роду *Azospirillum* можуть трансформуватись у цисти [47, 110].

Слід відмітити, що при створенні стресових умов для мікробних популяцій часто формуються маленькі, некультурабельні клітини (вони не ростуть на звичайних живильних середовищах). На сьогодні невідомо чи можуть такі клітини стати активними, чи це є перехідна стадія до їх відмирання [120].

Значний вплив на функціонування інтродукованих у агроєкосистеми мікроорганізмів спричиняють кореневі ексудати рослин [11, 57, 96, 97], а також відмираючі клітини поверхні кореня [29, 70]. Згідно з даними [57] кореневі виділення складають близько 20 % від загальної кількості продуктів фотосинтезу рослин. Відомо, що їх склад відрізняється в залежності не тільки від виду рослин, а й стадії їх розвитку і умов вирощування [11, 96, 97]. Ці відмінності спричиняють зміни у складі мікробних спільнот кореневої зони. Показано, що їх склад в ризосфері ячменю на 40 % відрізнявся при зміні режиму живлення рослин в залежності від концентрації іонів заліза [97].

Таким чином, дія корневих ексудатів на мікробні популяції ґрунту є селективною [57]. Зважаючи на це, а також на відмінності у трофічних потребах різних видів мікроорганізмів, ймовірно допустити, що не існує універсального штаму



мікроорганізму, здатного стимулювати ріст, розвиток будь-яких видів рослин та підвищувати їх врожайність.

Було показано, що чисельність популяції мікроорганізмів, інтродукованих в стерильний ґрунт, майже не змінюється впродовж тривалого часу [71], тоді як в звичайних ґрунтових умовах спостерігається помітне зниження чисельності інокуляту. Було показано [119], що за 10 днів чисельність внесених в ґрунт флуоресцентних псевдомонад знижувалась на 0,2-1,0 log. Цей феномен обумовлений як їх фізіологічними особливостями, так і стійкістю складу та функцій мікробного ценозу в зонах інтродукції, який називають мікробіостазом [72].

Важливими факторами, що спричиняють стимулювання росту рослин при застосуванні мікроорганізмів в агроєкосистемах, є виділення цими популяціями біологічно активних речовин: вуглеводів, органічних кислот, амінокислот, а також гормонів росту [12, 69, 77, 91]. Згідно з нашими даними, бактерії *Bacillus subtilis* IMB B-7023, що спричиняють стимулюючий вплив на ріст рослин, здатні накопичувати в середовищі ряд біологічно активних речовин фенольної природи, амінокислоти [20, 43, 118], а також деякі органічні кислоти [34].

Інтродуковані в агроєкосистему мікроорганізми можуть спричиняти стимулюючий вплив на рослини не тільки шляхом прямої дії на їх розвиток, а й впливати опосередковано, змінюючи чисельність та фізіологічну активність живих організмів екосистеми, в тому числі фітопатогенів [120]. В деяких випадках внесення препаратів у агроєкосистему може стимулювати азотфіксувальну активність не завдяки збільшенню кількості інтродукованого виду, а шляхом впливу на інші види азотфіксувальних бактерій [28]. Було показано, що бактеризація пшениці бульбочковими бактеріями супроводжується підвищенням в кореневій зоні нітрогеназної активності та збільшенням врожайності [73]. Іншим прикладом непрямої дії мікробних препаратів на ріст рослин може бути стимуляція *Streptomyces platensis* росту *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Ці стрептоміцети також підвищували нодуляцію конюшини бульбочковими бактеріями у модельному експерименті [27].

Ефективність застосування мікробного препарату в агроєкосистемах в значній мірі визначатиметься адаптаційними властивостями його компонентів, результатами їх антибіозу з представниками екосистем [120]. Багато видів ризосферних бактерій в умовах жорсткої конкуренції за субстрат у вигляді кореневих виділень, продукують антибіотики та інші інгібітори росту мікроорганізмів [10, 51, 115]. Наприклад, бактерії *Pseudomonas aureofaciens*, що стимулюють ріст рослин, синтезують феназинові антибіотики [107]. Було показано, що біля 30 % ізолятів бактерій, виділених з ґрунту, є антагоністами мікроскопічних грибів *in vitro*. Приблизно 3 % з цих бактерій відносяться до роду *Bacillus* [91]. Бактерії *B. subtilis* здатні синтезувати антибіотик бацилизин, а також ліпопептиди, які в концентрації 5 – 100 мкг/мл пригнічують ріст фітопатогенних грибів [92].

Відомо, що якісний та кількісний склад вторинних метаболітів, які синтезуються мікроорганізмами, залежить від умов їх культивування, фази росту культури [11, 87, 92]. Зважаючи на обмеженість харчових субстратів в ґрунті, мало ймовірно, що при конкурентному співіснуванні компонентів мікробного ценозу в кореневій зоні рослин можуть створюватись умови для накопичення помітних кількостей вторинних метаболітів, в тому числі речовин антибіотичної природи.

Успіх інтродукції нових видів мікроорганізмів у існуючі біоценози визначається селективністю умов застосування інокулянту та його положенням у біоценозі [120].



Коли дотримуються умови такої селективності, для досягнення успіху необхідна мінімальна кількість клітин інтродукованого штаму. Так, наприклад, для успішного формування бобово-ризобіального симбіозу необхідно, щоб на одну насініну бобових рослин, наприклад сої, приходилось 10^4 – 10^5 клітин ризобій. В той же час, коли створюються умови селективності, для успіху процесу інокуляції достатньо до 300 клітин ризобій на одну насініну [62]. Якщо умови екологічної селективності для інокулянтів не досягнуті, необхідні більш високі їх дози, застосування яких, однак, ще не гарантує успіху [120].

Одним з факторів, що може обумовлювати зміни чисельності внесених в ґрунт мікроорганізмів є функціонування найпростіших [7, 33, 65, 71, 101]. Було показано, що інтродукція популяції бактерій разом з найпростішими супроводжується помітним зниженням чисельності мікроорганізмів. Найпростіші здатні поїдати метанотрофні бактерії в ґрунті рисових полів [101]. Виявлені певні відмінності у поїданні найпростішими деяких видів бактерій [58].

Ґрунти різної текстури відрізняються за пористістю, яка впливає на виживання мікроорганізмів. Показано, що ґрунтові пори діаметром від 2 до 6 мкм сприяють виживанню *Pseudomonas fluorescens*, захищаючи їх від поїдання найпростішими *Colpoda steinii* краще, ніж більш великі пори від 6 до 30 мкм [125]. Клітини, що знаходяться у недоступних для найпростіших місцях, наприклад, всередині ґрунтових часток, краще виживають [121].

Мікроорганізми краще виживають у глинистих ґрунтах, ніж у піщаних [120]. Так, кількість клітин *Rhizobium leguminosarum*, що були внесені в ґрунт, стійко знижувалась. Однак, коли ґрунт збагачували 10 % бентонітової глини, чисельність популяції залишалась на постійному рівні, що було обумовлено тим, що глинисті мінерали захищали бактерії від поїдання найпростішими [71].

Слід відмітити, що деякі види бактерій здатні синтезувати вторинні метаболіти, які їх захищають від поїдання найпростішими [80]. Таким чином встановлено, що найпростішим належить важлива роль в регуляції чисельності мікроорганізмів в ґрунті [106]. Однак, в даний час недостатньо досліджено питання специфічності поїдання мікроорганізмів найпростішими і їх роль у функціонуванні інтродукованих мікроорганізмів у агроєкосистемах.

Колонізація кореневої зони інтродукованими мікроорганізмами Ефективність бактеріальних препаратів, що застосовуються в рослинництві, у значній мірі залежить від здатності мікроорганізмів приживатись і розвиватись у ризосфері рослин і підтримувати високу щільність інтродукованої популяції, колонізувати ризосферу і ризоплану рослин [13, 26, 120]. Чисельність мікроорганізмів у ризосфері рослин є на порядок вищою, ніж за її межами [29]. Зважаючи на те, що у ризосфері та ризоплані мінеральні джерела фосфорного і азотного живлення є гостродефіцитними, за споживання цих речовин між мікроорганізмами і рослинами складаються конкурентні взаємини [32], які, ймовірно, можуть спричиняти негативний вплив на ефективність інтродукованих в агроєкосистему мікробних препаратів.

Відомо, що іноді мікроорганізми, які стимулюють ріст рослин, не проявляють ефективності у польових умовах у зв'язку з їх нездатністю колонізувати коріння рослин [49, 52]. Причиною цьому може бути антибіоз мікрофлори кореневої зони рослин. Так, було показано, що метаболіти мікроорганізмів, які домінують на корінні проростків ячменю, можуть інгібувати *in vitro* ріст бактерій роду *Azospirillum* [1]. Важлива роль в колонізації інтродукованими бактеріями ризосфери рослин



належить здатності мікроорганізмів використовувати специфічні компоненти корневих ексудатів.

Процес колонізації коріння рослин мікроорганізмами здійснюється в декілька стадій: хемотаксис бактерій до поверхні насіння чи коріння рослин, сорбція клітин на насінні, поверхні коріння чи листя, їх розмноження у відповідь на виділення насінневих чи корневих ексудатів, колонізація органів рослини.

Перший етап цього складного процесу – хемотаксис, що у рідких середовищах обумовлений роботою джгутиків [4]. Нами показано, що азотфіксувальні бактерії *Bradyrhizobium japonicum* та *Azotobacter vinelandii* і фосфатмобілізівні мікроорганізми *Bacillus subtilis* проявляють хемотаксис до широкого кола органічних сполук [18,21,44]. Різні штами бульбочкових бактерій відрізнялись за силою хемотаксисної відповіді на досліджені органічні речовини. В той же час екстракти насінневих оболонки деяких сортів сої були репелентами для досліджених штамів бульбочкових бактерій. Крім того, репелентами слугували окремі органічні сполуки: для бульбочкових бактерій – лактоза [44], а для *Bacillus subtilis* – серин [21, 22].

У напіврідких середовищах, а також, ймовірно, у ґрунтових умовах, поряд з джгутиками, важлива роль належить іншим видам рухливості бактерій. Одним з них є їх колективне пересування по поверхні середовища, роїння (swarming). Переміщення бактерій по поверхні середовища здійснюється за допомогою латеральних джгутиків, а також пілей IV типу, шляхом тягучої (twitching) їх рухливості [39, 68, 85]. Було показано, що в напіврідкому середовищі (0,5 % агару) за відсутності в ньому мінерального джерела азоту та при внесенні до нього 0,05 % глютамату, аспартату, гістидину чи проліну, як єдиних джерел азоту, спостерігається роїння бактерій *Pseudomonas aeruginosa*. В процесі такого колективного переміщення популяції утворюють деревоподібні колонії [54, 56, 85, 104].

Роїння у ряду видів бактерій пов'язане з секрецією сурфактантів, які знижують тертя між поверхнями і бактеріями при їх переміщенні. Такими сурфактантами є клітинні поліцукриди [64], ліпопептиди, рамноліпіди [45]. У штамів *Bacillus subtilis*, які були нездатні синтезувати позаклітинні протеолітичні ферменти і сурфактанти, рухливість типу роїння не спостерігалась [55]. Крім *B. subtilis* та *P. aeruginosa*, такий тип колективної рухливості є характерним для *Serratia liquefaciens* [59], *Proteus mirabilis* [98] та інших видів бактерій [68, 85].

Функціонування цього типу руху обумовлено кворум-чутливими системами, що пов'язані з синтезом та сприйняттям певних хімічних сполук як сигнальних молекул. Такими сигнальними молекулами є ацилгосерин лактон, його похідні та інші сполуки [6, 61, 85]. Залежна від щільності популяції бактерій кворум-чутливість обумовлює їх вірулентність, секрецію екзопродуктів, колонізацію твердих поверхонь і утворення біоплівки [113].

В той же час показано, що в ґрунтових умовах ацилгосерин лактон може швидко розкладатися мікрофлорою [124]. Похідні гомосерин лактону здатні трансформувати деякі представники бактерій родів *Ochrobacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* і *Delftia*. Це, ймовірно, в майбутньому може стати основою розробки нових методів контролю фітопатогенних бактерій [76].

В результаті хемотаксису бактерій до насінневих чи корневих ексудатів клітини вступають в контакт з тканинами рослин. Успіх цієї стадії в значній мірі залежить від особливостей поверхні мікробних клітин (вмісту на них пілей, фімбрій, джгутиків інших специфічних компонентів) та тканин рослин [57,67,82, 95,123].



Встановлено, що найбільш інтенсивна адгезія азотфіксувальних бактерій *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 до поверхні коріння огірків сорту Конкурент спостерігалась в перші 5 хв їх взаємодії [19]. Найбільш високою адгезивною здатністю характеризувались бактерії, відібрані у фазі логарифмічного росту (24 год. культивування). У популяції *Azotobacter vinelandii*, відібраної в стаціонарній фазі росту (72 год.), чисельність адгезованих на корінні клітин знижувалась майже на 82 %, а після культивування протягом 96 годин — більше ніж в 10 разів. Нами показано, що факторами, які перешкоджають адгезії бактерій на твердих матеріалах, є електростатичне відштовхування однойменно заряджених поверхонь та втрата рухливості клітин при їх тривалому культивуванні [19].

Подібна залежність зниження чисельності адгезованих бактерій при їх тривалому культивуванні також спостерігалась іншими дослідниками. Так, бактерії *Azospirillum brasilense*, відібрані в фазі експоненційного росту, найбільш активно прикріплювались до коріння пшениці, в той час як відібрані зі стаціонарної фази росту в значно меншій кількості [9].

Успіх процесу інтродукції мікроорганізмів в значній мірі залежить від стадії розвитку екосистеми. Останнє чітко відслідковується при використанні біопестицидів для боротьби з фітопатогенами та фітофагами. Так, відомо, що найбільш чутливими до пестицидів є личинки комах молодших стадій розвитку. Якраз застосування біопестицидів в такий період було найбільш успішним.

Ефективність інтродукції мікроорганізмів у рослинництво визначається станом сукцесії (зміни) екосистеми. Найкращі умови створювались для проростання насіння рослин при їх внесенні на початку мікробної сукцесії в ґрунті за 60 % вологості від повної вологоємності. Якщо за відсутності інокулянту проростало 60–70 % насіння крес-салату, то при його бактеризації азоспірилами на першому етапі сукцесії — 90–95 %. В умовах молодшої мікробної сукцесії всі 3 досліджувані штами азоспірил підвищували біомасу жита на 35–70 %. Найгірші результати спостерігались, коли насіння рослин вносили в ґрунт через 7–10 діб після його зволоження, тобто на більш пізній стадії розвитку сукцесії. При посіві на 7-му добу після початку сукцесії проростало тільки 37–50 % бактеризованого насіння крес-салату [25].

Встановлено, що на ранніх стадіях сукцесії (3–8 діб) *Streptomyces olivocinereus* позитивно впливав на розвиток бульбочкових бактерій. Однак, на більш пізніх стадіях сукцесії (50-а доба) за інтродукції цих стрептоміцетів спостерігалось відмирання бульбочкових бактерій [38]. Таким чином, термін інтродукції мікроорганізмів у багаті видами екосистеми є одним з визначальних факторів успіху цього процесу.

Здатність інтродукованих мікроорганізмів колонізувати кореневу зону рослин у значній мірі визначається способом їх застосування. В даний час в рослинництві застосовують такі методи інтродукції мікроорганізмів: бактеризація насіння; внесення мікроорганізмів в борозни при висіві насіння чи в ґрунт; замочування коріння розсади; внесення препарату в лунки при висаджуванні розсади; внесення препарату з поливною водою, в ґрунт та філосферу рослин.

Одним з перших способів використання мікробного потенціалу в агроекосистемах було внесення на поля ґрунту, в якому вирощували бобові культури, або коріння та бульбочок, зібраних з бобових рослин [42]. Більш широкого розповсюдження набула бактеризація насіння рослин, що дозволяє відносно рівномірно розподілити мікроорганізми на його поверхні. Однак, слід відмітити, що навіть при нетривалому зберіганні бактеризованого насіння рослин вміст життєздатних мікроорганізмів на



ньому може помітно знижуватись. Так, на бактеризованому ризоторфіном насінні сої після двох годин його зберігання залишалось 50 % життєздатних клітин, а після 6 годин — тільки 10 % ризобій [28].

Згідно з результатами наших досліджень, після зберігання бактеризованого *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 насіння кукурудзи сорту Брусниця протягом 48 годин чисельність цих бактерій на його поверхні знижувалась з $2,3 \times 10^4$ до 1×10^3 кл/г. На бактеризованому азотобактером насінні інших рослин його кількість знижувалась менш помітно. Це, ймовірно, обумовлено негативним впливом екстрактів насінневих оболонки та молекулярного кисню повітря на життєздатність бактерій.

В ряді випадків хороші результати були досягнуті при внесенні бактеріальних препаратів у агроєкосистему з поливною водою. При такому способі інтродукції бактерії роду *Pseudomonas* та *Bacillus pumilus* SE34г інтенсивно колонізували головний корінь і бокові корінці, але не верхню його частину. Якщо бактеріями обробляли насіння, їх кількість була вищою на головному корені [126].

Позитивний вплив на розвиток рослин спричиняло епіфітне застосування суспендованого препарату Азогран (гранульований препарат *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076) в тепличних умовах на помідорах сорту Барселона. За такого способу інтродукції препарату врожайність рослин підвищилась на 19,3 %, тоді як після внесення препарату в кореневу зону (по 1 гранулі на рослину) — на 10,9 %. Помітний стимулюючий вплив на ріст рослин спостерігався при епіфітному застосуванні суспендованого препарату комплексної дії, до складу якого введені азотфіксувальні бактерії *Azotobacter vinelandii* ІМВ В-7076 та фосфатмобілізівні — *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023. Обробка газонної трави Пожитниця багаторічна сорту Київська-101 суспензією такого препарату, розбавленого водою 1:100 сприяла підвищенню висоти трав'яного покриву на 15,4 % [21, 22].

Про стан мікробної популяції на корінні рослин можна отримати уявлення по вмісту РНК, кількість якої зростає при підвищенні фізіологічної активності бактерій [86, 94]. Методом флуоресцентної *in situ* гібридизації показано, що високою активністю на поверхні коріння проростків рослин характеризувались лише поодинокі клітини псевдомонад. В мікроколоніях інтенсивність флуоресценції була нижчою. Менш помітно псевдомонади колонізували кінчик кореня, однак вони відрізнялись високою активністю. Після двох діб інкубування на поверхні кореня помітно зростала кількість інших ґрунтових мікроорганізмів, що відрізнялись розмірами клітин [94].

Застосовуючи метод флуоресцентних поліклональних антитіл до ліпополіцукридного антигену *Pseudomonas fluorescens* DR 54, а також метод флуоресцентної гібридизації *in situ* було показано, що після обробки коріння псевдомонадами протягом перших двох діб інкубації рослин на них переважно визначались саме ці бактерії. Однак, зі збільшенням терміну вирощування цих рослин на корінні помітно зростала чисельність ґрунтових мікроорганізмів [94].

Встановлено, що чисельність інтродукованих бацил-антагоністів у ризосфері ярої пшениці в значній мірі визначається дозою інокулянту. Так, бактеризація пшениці в розрахунку 10^3 КґО *Bacillus subtilis* на одну насінину не забезпечувала приживання цих бактерій у кореневій зоні. При такій дозі інокулянту інтродуковані бактерії витіснялись аборигенною мікрофлорою. Лише після нанесення на одну насінину 10^4 бактерій вони визначались у ризосфері рослин [15]. Їх максимальна кількість спостерігалась на початкових стадіях розвитку рослин. Показано, що для

успішного впливу на ріст і розвиток рослин необхідні більш високі дози інокулюму — 10^5 – 10^6 бактерій на насінину [50, 81, 96].

Ймовірно, ці результати обумовлені відмінностями у властивостях інтродукованих штамів мікроорганізмів та біоценозів окремих видів рослин, що свідчить про необхідність визначення оптимальних доз препаратів і дотримання їх при застосуванні у певних агроєкосистемах. На прикладі інтродукції гранульованого бактеріального препарату комплексної дії в кореневу зону цукрових буряків, картоплі, томатів та інших рослин нами було показано, що найбільш помітна стимуляція їх росту, розвитку і урожайності була досягнута при внесенні однієї гранули препарату (0,25 г), що містив у одному грамі 10^8 життєздатних бактерій. Внесення більш високих доз препарату знижувало його стимулюючий вплив [23, 41, 88].

Було показано, що різні види мікроорганізмів істотно відрізняються за здатністю колонізації ними тих чи інших частин кореня рослин [20, 29, 94]. Використовуючи метод вирощування рослин в напівагаризованому середовищі за присутності в ньому певного штаму бактерій, нами показано, що досліджені штами роду *Bacillus* здатні у різному ступені колонізувати кореневу зону огірків сорту Конкурент, утворюючи в середовищі своєрідні зони (мікроколонії навколо кореня), які добре визначаються візуально. Бактерії *Azotobacter vinelandii* також здатні колонізувати коріння огірків [19]. Методами оптичної та електронної мікроскопії встановлено, що ці бактерії нерівномірно колонізують поверхню кореня. Лише в деяких його зонах вони утворюють мікроколонії [19]. Кореневі кінчики, які є фізіологічно найбільш активними і виділяють найбільшу кількість ексудатів, колонізуються бактеріями *Bacillus subtilis* в найбільшому ступені. На поверхні кореня при цьому визначали від 1×10^3 до 1×10^7 КУО/г сирової маси [70].

В той же час не завжди спостерігається кореляція між колонізуючою здатністю бактерій і їх впливом на продуктивність рослин [5, 53]. Було показано, що інокуляція стоколосу безостого різними видами азоспірил приводила до суттєвого підвищення рівня азотфіксації в кореневій зоні рослин, але при цьому приживались в кореневій зоні лише бактерії *Azospirillum brasilense* [5].

Слід відмітити, що після інтродукції мікроорганізмів у агроєкосистему проектне покриття кореневої поверхні рослин складало десятки долі відсотку від загальної площі поверхні кореня. Для 14-добових рослин ячменю цей показник досягав лише 0,1 %, голубого проса — 0,15 %, цибулі — 0,19 %. Максимальне заселення бактеріями ризоплани спостерігалось в зоні прикріплення кореня до насінини. В цій зоні бактерії колонізували більш помітну частину поверхні коріння: ячменю — 1,3–1,8 %, огірків — 1,8–2,7 %, голубого проса — 1,0–4,0 %, цибулі — 4,5–9,0 % [16].

Бактеризація насіння сої штамми *Pseudomonas sp.* супроводжувалась колонізацією кореневої зони та підвищенням маси коріння і зниженням поширення антракнозу (anthracnose) на листях рослин, що обумовлено індукцією системної резистентності їх до хвороб [117]. Індукцію системної резистентності банану до вірусу курчавості викликало обприскування цих рослин суспензіями бактерій *Pseudomonas fluorescens* чи *Bacillus subtilis* [83]. Обробка насіння пшениці ендоефітними бактеріями *Bacillus subtilis* 26D підвищувала вміст в проростках фітогормону ІУК та спричиняла антистресовий вплив на ці рослини в засолених середовищах та за водного дефіциту [30]. Подібну дію викликали ліпополіцукриди



бактерій [103], ферменти [105], сидерофори [89], саліцилова кислота та деякі інші фактори [99, 112].

У зв'язку з відмінностями в трофічних потребах різних видів мікроорганізмів, та хімічного складу насінневих та корневих ексудатів рослин, ступінь позитивного впливу бактеріальних препаратів на ріст, розвиток і урожайність рослин визначається специфічністю компонентів цих препаратів до певного виду рослин. На прикладі бульбочкових бактерій показано, що ефективність впливу інтродукованих препаратів на ріст, розвиток і урожай рослин залежить не тільки від властивостей штаму бактерій, але і від сортових особливостей рослин [8, 36].

Важливим фактором, що впливає на колонізацію коріння рослин інтродукованими мікроорганізмами, є їх конкуренція з мікрофлорою ґрунту і ризосфери. На сьогодні мало відомо щодо впливу властивостей ґрунту на поширення в кореневій зоні введених в агроекосистему мікроорганізмів, колонізацію ними певних зон коріння, різноманітності спільнот ризосфери в залежності від виду рослин, їх стадії розвитку.

Таким чином, успіх застосування мікробних препаратів у агроекосистемах залежить від взаємодії значної кількості факторів, роль тільки деяких з них на сьогодні можна вважати визначеною [49, 95]. Тому інтродукція мікробних препаратів у агроекосистему нерідко не забезпечує бажаних результатів. Як правило, в кореневу зону чи філосферу рослин вносять препарат, в якому міститься 10^4 – 10^8 бактерій. В той же час в кожному грамі ґрунту знаходиться не менше 10^9 мікроорганізмів [29], які, ймовірно, перебувають в більш активному фізіологічному стані, ніж біологічні компоненти препарату, що перед використанням певний час зберігається.

В останні десятиріччя показано, що поряд з мікроорганізмами, які функціонують у ризосфері та ризоплані рослин, значна кількість бактерій представлена ендofітами, які ізолюють з внутрішніх тканин рослин і які не завдають їм шкоди [66]. Згідно з нашими даними [35], вміст грамнегативних бактерій в ендоризі — внутрішніх тканинах кореня [84], ріпаку досягав $1,2 \times 10^7$ кл./г маси кореня. Відповідно з іншими даними [51] чисельність культивованих мікроорганізмів в ризосфері томатів досягала $7,6 \times 10^7$ кл./г сирової маси, а в ендоризі — $2,0 \times 10^7$. Таким чином, вміст мікроорганізмів в ендоризі лише в три рази є нижчим, ніж у ризосфері [57].

Ендofітні бактерії здатні синтезувати фітогормони та стимулювати ріст рослин, а також можуть бути антагоністами фітопатогенів [48, 51, 90]. Вступаючи в найбільш тісні взаємовідносини з рослинами, ендofітні мікроорганізми, ймовірно, спричиняють дуже помітний, але ще недостатньо досліджений вплив не тільки на рослини, а й на мікробний ценоз кореневої зони рослин.

В даний час, як правило, ще недостатньо враховується вплив ризосферної мікрофлори, ендofітних бактерій рослин, а також інших біогенних та абіогенних факторів кореневої зони рослин на процес інтродукції мікробних препаратів в агроекосистему. Дослідження таких взаємодій дозволить розкрити їх механізми і розробити підходи до управління процесом інтродукції мікробних препаратів у агроекосистему, корекції складу і функціонування мікробних угруповань кореневої зони рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Белимов А. А., Иванчиков А. Ю., Воробьев Н. И.* Роль доминирующей микрофлоры ризопланы ячменя во взаимодействии интродуцируемых дизазотрофов с растением // *Микробиология.* — 1998. — 67. — № 3. — С. 409-415.
2. *Белимов А. А., Кулакова А. М., Груздева Е. В.* Влияние рН почвы на взаимодействие ассоциативных бактерий с ячменем // *Микробиология-1998.* — 67. — № 4. — С. 561-568.
3. *Белимов А. А., Кунакова А. М., Сафронова В. И.* и др. Использование ассоциативных бактерий для инокуляции ячменя в условиях загрязнения почвы свинцом и кадмием // *Микробиология.* — 2004. — 73. — № 1. — С. 118-125.
4. *Брезгунов Н. В., Завальский Л. Ю., Лазарев Ф. В., Попов В. Г.* Хемотаксис бактерий// *Успехи микробиологии.* — М.: Наука, 1989. — № 23. — С. 3-28.
5. *Волкогон В. В.* Особливості взаємодії *Azospirillum sp.* з рослинами стоколосу за умови штучної бактеризації // *С.-г. мікробіологія.* — 2005. — № 1-2. — С. 77-85.
6. *Волошин С. А., Капрельянц А. С.* Межклеточные взаимодействия в бактериальных популяциях// *Биохимия.* — 2004. — 69. № 11. — С. 1555-1564.
7. *Гельцер Ю. Г.* Простейшие (*Protozoa*) как компонент почвенной биоты (систематика, экология). М.: МГУ, 1993. — 174 с.
8. *Дідович С. В.* Формування та функціонування симбіозу в агроценозах південного Степу України. Автореф. дис.... канд.. с.-г. наук. Чернівці, 2006. — 20с.
9. *Егоренкова И. В., Коннова С. А., Скворцов И. М., Игнатов В. В.* Исследование начальных этапов взаимодействия бактерий *Azospirillum brasilense* с корнями проростков пшеницы: адсорбция, деформация корневых волосков // *Микробиология.* — 2000. — 69. — № 1. — С.120-126.
10. *Козар С. Ф.* Мікробні комплекси за участю азоспірил як регулятори росту рослин// *Агрокол. журн.* — 2008. Спец. випуск. — С. 109-111.
11. *Кравченко Л. В., Азарова Т. С., Леонова-Ерко Е. И.* и др. Корневые выделения томатов и их влияние на рост и антифунгальную активность штаммов *Pseudomonas*// *Микробиология-2003.* — 72. — № 1. — С.48-53.
12. *Кравченко Л. В., Боровков А. В., Пишкрил З.* Возможность биосинтеза ауксинов ассоциативными азотфиксаторами в ризосфере пшеницы // *Микробиология.* — 1991. — 60, № 5. — С.927-931.
13. *Кравченко Л. В., Макарова Н. М., Азарова Т. С., Проворов Н. А., Тихонович И. А.* Выделение и фенотипическая характеристика ростстимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования фитопатогенных грибов// *Микробиология.* — 2002. — 71, № 4. — С.521-523.
14. *Кравченко Л. В., Шапошников А. И., Макарова Н. М., Азарова Т. С., Тихонович И. А.* Динамика численности антифунгальных штаммов *Pseudomonas* в ризосфере огурцов, выращиваемых в условиях гидропонии на минеральном тепличном субстрате// *Микробиология.* — 2006. — 75, № 3. — С.404-409.
15. *Кузьмина Л. Ю., Мелентьев А. И.* Колонизация ризосферы яровой пшеницы бактериями рода *Bacillus* Cohn при бактеризации семян// *Микробиология.* — 2003. — 72, № 2. — С.268-274.
16. *Кураков А. В., Костина Н. В.* Микробная колонизация поверхности корней на ранних стадиях развития растений// *Микробиология.* — 1997. — 66, № 3. — С.394-401.
17. *Курдиш И. К.* Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика -Киев: КВІЦ, 2001. — 141с.
18. *Курдиш И. К., Антонюк Т. С., Чуйко Н. В.* Влияние некоторых факторов внешней среды на хемотаксис *B Bradyrhizobium japonicum*// *Микробиология.* — 2001. — 70, № 1. — С.106-110.
19. *Курдиш И. К., Бега З. Т., Гордиенко А. С., Дыренко Д. И.* Влияние *Azotobacter vinelandii* на прорастание семян растений и адгезия этих бактерий к корням огурцов// *Прикл. биохим. и микробиол.* — 2008. № 4. — С.442-447.
20. *Курдиш И. К., Рой А. А., Чуйко Н. В.* и др. Взаимодействие бактерий- компонентов препарата комплексного действия с некоторыми видами растений// *Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем.* Саратов, 2007. — С.11.
21. *Курдиш И. К., Рой А. О., Чуйко Н. В.* та інші. Застосування гранульованого бактеріального препарату комплексної дії у рослинництві// *Агрокол. журн.* — 2008. — Спец. випуск. — С.140-142.



22. Курдиш І. К., Чуйко Н. В., Булавенко Л. В., Диренко Д.І. Ефективність інтродукції гранульованих бактеріальних препаратів у агроєкосистеми квіткових рослин//Збірник наук. праць Уманського держ. аграр. унів-ту «Основи формування продуктивності сільськогосподарських рослин за інтенсивних технологій вирощування». — Умань, 2008. — С.186-192.
23. Курдиш І. К., Церковник Л. С., Цвей Я. П., Черната Д. М. Перспективи і проблеми інтродукції мікробних препаратів у агроценози// Вісник Чернівецького нац. університету. — 2005. — В.252. — С.126-131.
24. Лисина Т. О., Гаранькина Н. Г., Круглов Ю. В. Влияние интродуцируемых в почву микроорганизмов-деструкторов пестицидов на рост и развитие растений//Прикл. биохим. и микробиология. — 2001. — 37, № 3. — С.374-378.
25. Майорова Т. Н., Кожевин П. А., Звягинцев Д. Г. Подходы и оптимизация интродукции азоспирилл//Микробиология-1996. — 65. — № 2. — С.277-28.
26. Мелентьев А. И., Кузьмина Л. Ю., Галимзянова Н. Ф. Влияние температуры и влажности почвы на колонизацию ризосферы пшеницы бактериями *Bacillus Cohn.*, антогонистами фитопатогенов //Микробиология-2000. — 69. — № 3. — с.426-432.
27. Мерзаева О. В., Широких И. Г. Перспективы использования актиномицетов в растениеводстве// Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Матер. VI Междунар. научн. конфер. Минск, 2-6 июня 2008 г. Минск, 2008. — Т.2. — С.22-23.
28. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / За ред. В. В. Волкогона. — К.: Аграрна наука, 2006. 311 с.
29. Мишуustin Е. Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. — М.: Наука, 1972. — 342с.
30. Мубинов И. Г. Реакции пшеницы на действие клеток эндофитного штамма 26D *Bacillus subtilis*- основы биофунгицида фитоспорин. Автореф. дис...канд. биол. наук. — Уфа, 2007. — 22 с.
31. Патица В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та інші. Біологічний азот/ За ред. В. П. Патики. — Київ: СВІТ, 2003. — 422 с.
32. Полянская Л. М., Оразова М. Х., Свешникова А. А., Звягинцев Д. Г. Влияние азота на колонизацию микроорганизмами корневой зоны ячменя // Микробиология. — 1994. — 63, № 2. — С.308-313.
33. Раилкин А. И. Квадрат числа пищевых вакуолей как новый показатель интенсивности фагоцитоза у инфузорий-сидиментаторов // Цитология. — 1982. — 24, № 10. — С.1241-1244.
34. Рой А. О., Гордиенко А. С., Курдиш И. К. Некоторые свойства родительского и резистентного к стрептомицину штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 -компонента бактериальных препаратов для растениеводства / Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии.(1-2 июня 2006г., Минск) Минск-Раков, 2006. — С.294-296.
35. Рой А. А., Рева О. Н., Курдиш И. К., Смирнов В. В. Биологические свойства фосфат-мобилизирующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023//Прикладн. биохим. и микробиол. — 2004. — 40, № 5. — С.551-557.
36. Сичкар В. И., Князев А. В., Патыка В. Ф. Селекция сои на повышение симбиотической азотфиксации // Науч. — техн. бюл. ВНИИ сои. — Новосибирск, 1987. — 33. — С.32-37.
37. Толкачев М. З., Дідович С. В., Абдурашитов С. Ф. Ефективність симбіозу сої з ризобіями й ендомікоризними грибами в рівних умовах фосфорного живлення//Агроєкологічний журн. — 2008. Спец. випуск — С.236-239.
38. Триггер Е. Г., Полянская Л. М., Кожевин П. А. Межмикробные взаимодействия в почве (на примере некоторых популяций стрептомицетов и бактерий) //Микробиология-1990. — 59. — № 4. — с.688-694.
39. Шелудько А. В., Борисов И. В., Крестиненко В. А., Панасенко В. И., Кацы Е. И. Влияние конго красного на подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. — 2006. — 75, № 1. — С.62-69.
40. Широких И. Г., Широких А. А., Родина Н. А. и др. Влияние кислотности почвы и токсичности алюминия на структуру микробной биомассы в ризосфере ячменя//Почвоведение. — 2004. — № 8. — С.961-966.
41. Широконос А. М., Цвей Я. П., Рой А. О., Курдиш І. К. Вплив гранульованих бактеріальних препаратів на врожайність картоплі// Агроєкологічний журнал. — 2004. — № 3. — С.24-28.

42. *Хотянович А. В.* Получение азотфиксирующих бактериальных препаратов/ Промышленная микробиология. М.: Высшая школа, 1989. — С.586-599.
43. *Чернова Л. С., Рой А. А., Курдиш И. К.* Синтез внеклеточных аминокислот фосфат-мобилизирующим штаммом *Bacillus subtilis* ИМБ В-7023 /Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии.(26-28 мая 2004г., Минск) Минск, 2004. — С. 261-262.
44. *Чуйко Н. В., Антонюк Т. С., Курдиш И. К.* Хемотаксис *Bradyrhizobium japonicum* к различным органическим соединениям // Микробиология. — 2002. — 71, № 4. — С.460-466.
45. *Arino S., Marchal R., Vandecasteele J. P.* Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community// J. Appl. Microbiol. 1998. — 84. — P.769-776.
46. *Assmus B. Schloter M., Kirchof G., Hutzler P., and Hartmann A.,* Improved in situ tracking of rhizosphere bacteria using dual staining with fluorescence-labeled antibodies and rRNA-targeted oligonucleotides //Microb. Ecol. — 1997. — 33. — P.32-40.
47. *Bashan Y., Levanony H. and Whitmoyer P. E.* Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd // J. Gen. Microbiol. — 1991. — 137. — P. 187-196.
48. *Benhamou N., Kloepper J. W., Quadt-Hallmann A., Tuzun S.* Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria// Plant Physiol. — 1996. — 112. — P.919-929.
49. *Benizri E., Baudoin E., and Guckert A.* Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria// Biocontrol Sci. Technol. — 2001. — 11. — P.557-574.
50. *Bennett R. A., Lynch J. M.* Colonization potential of rhizosphere bacteria// Curr. Microbiol. — 1981. — 6. — P.137-138.
51. *Berg G., Krechel A., Ditz M. et al.* Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi // FEMS Microbiol. Ecol. — 2005. — 51, № 2. — P.215-229.
52. *Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J.* Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria// Curr. Opin. Plant Biol. — 2001. — 4. — P.343-350.
53. *Bull C. T., Weller D. M., Tomashow L. S.* Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 // Phytopathology. — 1991. — 81. — P. 954-959.
54. *Chiang P., Habash M., Burrows L. L.* Disparate subcellular localization patterns of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus ATPases involved in twitching motility// J. Bacteriol. — 2005. — 187, № 3. — P.829-839.
55. *Connelly M. B., Young G. M., Sloma A.* Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*// J. Bacteriol. — 2004. — 184, № 13. — P. 4159-4167.
56. *Darzing A.* Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Mixococcus xanthus*// Mol. Microbiol. — 1994. — 11. — P.137-153.
57. *Davey M. E., O'Toole G. A.* Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics// Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 2000. — 64, № 4. — P.847-867.
58. *De Moraes J., Alfieri S. C.* Growth, encystment and survival of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria// FEMS Microbiol. Ecol. — 2008. — 66, № 2. — P.221-229.
59. *Eberl L., Molin S., Givskov M.* Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1// J. Bacteriol. — 1999. — 181, № 6. — P.1703-1712.
60. *Fierer N., Schimel J. P., Holden P. A.* Influence of daying-rewetting frequency on soil bacterial community structure// Microb. Ecol. — 2003. — 45, № 1. — P.63-71.
61. *Fugua W. C., Winans S. C., Greenberg E. P.* Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family cell to cell density-responsive transcriptional regulators// J. Bacteriol. — 1994. — 176. — P.269-275.
62. *Giddens J. E., Dunigan E. P., Weaver R. W.* Legume inoculation in the southeastern USA. South. Coop. Ser. Bull. — 1982.283. P.1-38.
63. *Givskov M., Eberl L., Molin S.* Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442: two-dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress-induced proteins// J. Bacteriol. — 1994. — 176. — P.4816-4824.



64. Gugi D., Rahman M. M., Lai H. C. et al. A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*// Mol. Microbiol. — 1995. — 17. — P.1167-1175.
65. Habte M., Alexander M. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil// Appl. Microbiol. — 1975. — 29. — P.159-164.
66. Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepper J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops// Can. J. Microbiol. — 1997. — 43, № 10. — P.895-914.
67. Hanson M. S., Hempel J., Brinton C. Purification of E. coli type 1 pilin and minor pilus protein and partial characterization of adhesion protein// J. Bacteriol. — 1988. — 170, № 8. — P.3350-3358.
68. Harshey R. M. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria// Mol. Microbiol. — 1994. — 13. — P.389-394.
69. Hartmann A., Singh M., Klingmøller et al. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid// Can. J. Microbiol. — 1983. — 29, № 8. — P.916-923.
70. Hawes M. C., Brigham L. A., Wen F., Woo H. H., Zhu Y. Function of root border cells in plant health: pioneers in the rhizosphere// Annu. Rev. Phytopathol. — 1998 -36. — P.311-327.
71. Haynen C. E., van Elsland J. D., Kuikman P. J., van Veen J. A. Dynamics of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* introduced into soil: the effect of bentonite clay and predation by protozoa// Soil Biol. and Biochem. — 1988. — 20, № 4. — P.483-488.
72. Ho W. C. and Ko W. H. Soil microbiostasis: effects of environmental and edaphic factors// Soil. Biol. Biochem. — 1985. — 17. — p.167-170.
73. Hoflich G. Influence of inoculation of rhizobium-bacteria on growth of cereals// Zbl. Microbiol. — 1989. — 144, № 2. — P.73-79.
74. Holmquist L., Kjelleberg S. Changes in viability, respiratory activity and morphology of the marine *Vibrio sp.* strain S14 during starvation of individual nutrients and subsequent recovery// FEMS Microbiol. Ecol. — 1993. — 12. — P. 215-224.
75. Horemans S., De Koninck K., Vlassak K. Aspects of the ecology of *Azospirillum sp.* in Belgian soils// *Azospirillum*. IV. Genetics, physiology, ecology. Ed. Klindmuller W. Springer-Verlag, -Berlin, Heidelberg, -1988. — P.207-214.
76. Jajra S., Przysova J., Czajkowski R. et al. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N-acyl-homoserine lactone// Can. J. Microbiol. — 2006. — 52. — P.1006-1015.
77. Jain D. K., Partiquin D. G. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations //Appl. Environ. Microbiol. — 1984. — 48, № 6. — P.1208-1213.
78. Jenkins D. E., Chaisson S. A., Matin A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. — 1990 — 172. — P.2779-2781.
79. Jetiyanon J., Kloepper J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases// Biol. Control. — 2002. — 24. — P.285-291.
80. Jousset A., Scheu S., Bonkowski M. Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria// Functional Ecology. — 2008. — 22, № 4. — P.714-719.
81. Juhnke M. E., Mathre D. E., Sands D. C. Relationship between bacterial seed inoculum density and rhizosphere colonization of spring wheat// Soil Biol. Biochem. — 1989. — 21, № 4. — P.591-595.
82. Karste G., Adler K., Tschape H. Temperature dependence of M-pilus formation as demonstrated by electron microscopy// J. Basic Microbiol. — 1987. 27, № 4. — P.225-228.
83. Kavino M., Harish S., Kumar N. et al. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus// Soil Biology and Biochem. — 2007.39, № 5. — P.1087-1098.
84. Kloepper J. W., Schippers B., Bakker P. A. H. M. Proposed elimination of the term endorhizosphere// Phytopathology -1992. — 82. — P.726-727.
85. Kohler T., Curty L. K., Barja F. et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili// J. Bacteriol. — 2000. — 182, № 21. — P. 5990-5996.

86. Kramer F. G., Singleton F. L. Measurement of rRNA variations in natural communities of microorganisms on the southerneastern U. S. continental shelf// Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — 59. — P.2430-2436.
87. Krebs B., Hüding B., Kubart S. et al. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains// Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. — 1998. — 105. — P.181-197.
88. Kurdish I. K., Tsercovniac L. S., Chernata D. M., Tsvey Ya. P., Gizbullin N. G. Influence of granulated bacterial preparation of complex action on harvest seed of sugar beet // Abst. Intern. sci. conf. «S. P. Kostychev and contemporary agricultural microbiology» (Oktober 8-12, Yalta, Ukraine). — 2007. — P. 97.
89. Leeman M., Den Ouden F. M., van Pelt J. A. et. al. Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*// Phytopathology. — 1996. — 86. — P.149-155.
90. Lian J., Wang Z., Zhou S. Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to Fusarium wilt pathogen infection// J. Gen. Appl. Microbiol. — 2008. — 54. — P.83-92.
91. Lievens K. U., van Rijsbergen R., Leyns F. R. et al., Dominant rhizosphere bacteria as source for antifungal agents// Pestic. Sci. — 1989. — 27. — P.141-154.
92. Loeffler W., Kratzer W., Kremer S. et al. Gegen Pilze wirksame Antibiotika der *Bacillus subtilis*-Gruppe// Forum Microbiologie. — 1990. — 3. — P. 156-163.
93. Lovieno P., Baath E. Effect of drying and rewetting on bacterial growth rates in soil// FEMS Microb. Ecol. — 2008. — 65, № 3. — P.400-407.
94. Lübeck P. S., Hansen M., Sorensen J. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and in situ hybridization techniques// FEMS Microbiol. Ecol. — 2000. — 33. — P.11-19.
95. Lugtenberg B. J. J., Dekkers L., and Blomberg G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* // Ann. Rev. Phytopathol. — 2001. — 38. — P.461-490.
96. Lynch J. M., Whipps J. M. Substrate flow in the Rhizosphere/ The rhizosphere and Plant Growth. D. L. Keister and Cregan B. eds. Beltsville Symos. In Agrac. Res. 14. Kluwer, Dordrecht, the Netherlands. — 1991. — P.15-24.
97. Marschner P., Growley D. E. Phytosiderophores decrease iron stress and pyoverdine production of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (pvd-inaZ)// Soil Biol. Biochem. — 1998. — 30. — P.1275-1280.
98. Matsujama T., Takagi Y., Nakagawa Y et al. Dynamic aspects of the structured cell population in a swarming colony of *Proteus mirabilis*// J. Bacteriol. — 2000. — 182. — № 2. — P.385-393.
99. Meyer G., Hüfte M. Salicylic acid produced by rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean//Phytopathology -1997. — 87. — P.588-593.
100. Michiels J., Verreth Ch., Vander J. Effect of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strain// Appl. and Environ. Microbiol. — 1994. — 60, № 4. — P.1206-1212.
101. Murase J., Frenzel P. Selective grazing of methanotrophs by protozoa in a rice field soil// FEMS Microbiol. Ecol. — 2008. — 65, № 3. — P.408-418.
102. Neeno-Eckwall E. C., Kinkel L. L., Schottel J. L. Competition and antibiosis in the biological control of potata scab// Can. J. Microbiol. — 2001. — 47, № 4. — P.332-340.
103. Newman M. A., Daniels M. J., Dow J. M. Lipopolisaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense related gene expression in *Brassica campestris*// Mol. Plant-Microbe Interaction. — 1995. — 8. — P.778-780.
104. O'Toole G. A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development// Mol. Microbiol. — 1998. — 30. — P.295-304.
105. Pavla T. K., Holmsström K. O., Heino P., Pavla E. T. Induction of plant defense response by exoenzymes of *Erwinia carotovora subsp. carotovora*// Mol. Plant-Microbe Interaction. — 1993. — 6. — P.190-196.
106. Petroni G., Rosati G., Vannini C. et al. In situ identification by fluorescently labeled oligonucleotide probes of morphologically similar, closely related ciliate species// Microb. Ecol. — 2003.45, № 2. — p.156-162.



107. Pierson L. S., Keppenne V. D., Wood D. W. Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density// J. Bacteriol. — 1994. — 176. — P.3966-3974.
108. Poulsen L. K., Ballard G., Stahl D. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilm// Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — 59. — P.1354-1360.
109. Rincon A., Ruiz- Diez B., Garcia-Fraile S. et al. Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*// FEMS Microbil. Ecol. — 2005. — 51, № 3. — P.303-311.
110. Sadasivan L. and Neyra C. A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 // J. Bacteriol. — 1987. — 169. — P. 1670-1677.
111. Siddiqui I. A., Ehteshamul-Haque S. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: The influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria// Plant and Soil. — 2001. — 237, № 1. — P.81-89.
112. Siddiqui I. A., Shaukat S. S. Resistance against damping-off fungus *Rhizoctonia solani* systemically induced by the plant-growth- promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (1E-6S (+) and *P. fluorescens* (CHAO) // J. Phytopathol. — 2002. — 150. — P. 500-506.
113. Song Y., Xie Ch., Ong Y-M. et al. The BpsIR quorum-sensing system of *Burkholderia pseudomallei*// J. Bacteriol. — 2005. — 187, № 2. — P.785-790.
114. Sturz A. V., Christie B. R., Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production// Crit. Rev. Plant Sci. — 2000. — 19. — P.1-30.
115. Suslov T. V., Schroth M. N. Rhizobacteria of sugar beet: effect of seed application and root colonization on yield//Phytopathology-1982. — 72. — p.199-206.
116. Thompson I. P., Young C. S., Cook K. A. et al., Survival of two ecologically distinct bacteria (*Flavobacterium* and *Arthrobacter*) in unplanted and rhizosphere soil: field studies// Soil Biol. Biochem. — 1992. — 24. — P.1-14.
117. Tripathi M., Johri B. N., Sharma A. Plant growth — promoting *Pseudomonas sp.* strains reduce natural occurrence of anthracnose in soybean (*Glycine max* L.) in central Himalayan region // Curr. Microbiol. — 2006. — 52(2). — P.390-394.
118. Tsercovniac L. S., Kurdish I. K. Biological activities substances of bacterium- compounds microbial preparation // Abst. Intern. sci. conf. «S. P. Kostychev and contemporary agricultural microbiology» (Oktober 8-12, Yalta, Ukraine). — 2007. — P. 39.
119. Van Elsas j. D., Dijkstra A. F., Govaert J. M., van Veen J. A. Survival of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* introduced into two soils of different texture in field microplots// FEMS Microb. Ecol. — 1986. — 38. — P.151-160.
120. Van Veen J. A., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. Fate and Activity of Microorganisms introduced into soil// Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 1997. — 61, № 2. — P.121-135.
121. Vargas R., Hattori T. Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates// FEMS Microbiol. Ecol. — 1986. — 38. — P. 233-242.
122. Vivas A., et al., Barea J. M., Biro B., Azcon R. Effectiveness of autochthonous bacterium and mycorrhizal fungus on *Trifolium* growth, symbiotic development and soil enzymatic activities in Zn contaminated soil// J. of Appl. Microbiol. — 2006. — 100, № 3. — P.587-598.
123. Vuong C., Kidder J. B., Jacobson E. R. et al. *Streptococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesion production significantly increases during tricarboxylic acid cycle stress// J. Bacteriol. — 2005. — 187, № 9. — P.2967-2973.
124. Wang Y., Leadbetter J. R. Rapid acetil-homoserine lactone quorum signal biodegradation in diverse soil// Appl. and Environ. Microbiol. — 2005. — 71, № 3. P.1291-1299.
125. Wright D. A., Killham K., Glover L. A., Prosser J. I. Role of pore size location in determining bacterial activity during predation by protozoa in soil// Appl. Environ. Microbiol. — 1995. — 61. — P. 3537-3543.
126. Zinong Y., Reddy M. S., Kloepper J. W. Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system// Can. J. Microbiol. — 2003. — 49, № 6. — P.383-389.

І.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина,
тел.: 8 (044) 526 90 11, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ И АБИОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНТРОДУКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В АГРОЭКОСИСТЕМЫ

Реферат

В обзоре литературы проанализировано влияние биогенных и абиогенных факторов на эффективность интродукции в агроэкосистемы микроорганизмов, стимулирующих рост и развитие растений. Сообществам живых организмов в агроэкосистемах свойственна стабильность. При внесении в них определенного вида микроорганизмов их численность часто заметно снижается. Это обусловлено не только свойствами использованного штамма, но и особенностями его взаимодействия с компонентами агроэкосистемы. Существенное влияние на эффективность интродуцированных микроорганизмов оказывает состояние экосистемы, способы применения микробных препаратов, первичные этапы взаимодействия микроорганизмов с растениями.

К л ю ч е в ы е с л о в а: микроорганизмы, интродукция, биотические и абиотические факторы, агроэкосистемы.

I.K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU, Academ. Zabolotny str.,154,
Kyiv, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 90 11, e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

INFLUENCE OF BIOGENIC AND ABIOGENIC FACTORS ON THE EFFICIENCY OF MICROORGANISMS INTRODUCTION INTO AGROECOSYSTEMS

Summary

In the review of literature there have been analysed the influence of biogenic and abiogenic factors on the efficiency of microorganisms introduction into agroecosystems provided the significant stimulatory effect on the growth and development of plants. The communities of the alive organisms are characterized by agroecosystems stability. Their number is often significantly decreased after applying of determined species of microorganisms. It has been caused not only by the properties of the used strain culture, but also by the characteristics of it's interaction with compounds of ecosystem. The significant influence upon the efficiency of microorganisms introduction is made by the state ecosystem, the methods of using of microbial preparations, the first steps of interaction the microorganisms with a plant.

K e y w o r d s: microorganisms, introduction, biogenic and abiogenic factors, agroecosystems.



УДК 579.864.1:615.331

**M.Ya. Spivak, V.S. Pidgorsky, L.M. Lazarenko,
L.M. Shynkarenko, L.T. Rachkova, Z.M. Olevinska**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, 154,
Academ. Zabolotny str., Kyiv MSP, ДД03680,
Ukraine, tel.: 8 (044) 526 94 25, e-mail: spivak@serv.imv.kiev.ua

LACTOBACILLUS AND BIFIDOBACTERIUM INFLUENCE ON THE INDICES OF IMMUNE RESPONSE OF THE ORGANISM SHOWED ON THE EXPERIMENTAL MODEL

It was studied the influence of Lactobacillus and Bifidobacterium on interferonogenesis and functional activity of murine phagocytosis system cells in vivo. It was established that Bifidobacterium Bifidobacterium, Bifidobacterium longum, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei and Lactobacillus bulgaricus in vivo had activated the endogenous interferon production proved to be true by essential increase of interferon concentration in murine blood plasma. Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium longum have appeared the most effective inducing agent of both "early" and "late" interferon. These preparation also extended spontaneous and ridostin-induced production of interferon by spleen cells. The probiotic strains of Lactobacillus and Bifidobacterium introduction was accompanied by stimulation of oxygen-depending bactericide and absorbing activity of peritoneal macrophages. Received data testify the obtained composition on the basis of Bifidobacterium longum and Lactobacillus acidophilus is the most perspective for immune correction.

Key words: lactobacteria, bifidobacterium, probiotic, interferon, immunity

During the last years humane infectious inflammatory and oncology diseases accompanied by formation of secondary immunodeficiency conditions tend to grow. A perspective direction of purposeful immune correction is used of probiotics and/or prebiotics created on the basis of indigenious normal flora of a gastroenteric path, in particular *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* [9, 1, 4, 10, 5]. It is known that probiotic influence on development of cellular and humoral immune response changing variety of production of immune regulating cytokines, first of all Th1-type — interferon- γ and interleukin-2 [1, 8, 3, 2, 5]. Therefore search of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* with immune modulating properties for creation new highly effective probiotics preparations is an actual problem. In connection with the aforesaid it has been laid down for the

© M.Ya. Spivak, V.S. Pidgorsky, L.M. Lazarenko, L.M. Shynkarenko, L.T. Rachkova, Z.M. Olevinska, 2009



aim to define immune modulating properties of *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* by investigation of their influence on endogenous interferon production as well as a functional activity of phagocytosis system cells on the murine experimental model.

Materials and methods

There were used freeze-dried *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* of different strains: *Bifidobacterium Bifidobacterium* and *Bifidobacterium longum* as well as *Lactobacillus acidofillus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus* (Collection of Zabolutny Institute of Microbiology and Virology of NAS, Ukraine). Preparations were separately injected *per os* to mice of line BaLb/c with body mass of about 18-20 g for 4 days once a day. As comparison it was used the official probiotic Lacidofil (Institute Rosell, Canada) *per os* for 4 days once a day and standard interferon inducer ridostin (Vector-Pharm, Russia) was introduced intraperitoneally. The dose of preparations for one mouse was made of: *Bifidobacterium Bifidobacterium* – 100 µg, *Bifidobacterium longum* – 50 µg, *Lactobacillus acidofillus* – 50 µg, *Lactobacillus casei* – 50 µg, *Lactobacillus bulgaricus* – 100 µg, ridostin – 25 µg, lacidofil – 50 µg. Dynamic of interferon production was investigated in blood serum in 6 hours, 1, 3, 6 and 12 days. On the 1st, 3rd, 6th and 12th days the following spontaneous and induced production of interferon by spleen cells was studied. Activity of interferon is defined by microtitration in culture of sensitive cells. Reference preparations of both interferon-α (the international standard B 69/19) and interferon-γ (branch standard) were used. The sample dilution protected 50 % cells from cytopathic action of 100 CTA₅₀/0,1 ml of a test virus (vesicular stomatitis virus, vaccinal strain H) [7] was accepted as interferon titer.

For the 1st, 3rd, 6th and 12th days oxygen-depending bactericide and absorbing activity of peritoneal macrophages was studied using routine methods [7]. While studying the absorbing activity of phagocytes it was calculated the phagocytosis index (PI) – percent of cells in sight of the microscope contained latex particles and phagocytic number (PN) – mean quantity of latex particles which were absorbed by each phagocyte (conventional units (CN)). Oxygen-depending bactericide activity of macrophages was studied in spontaneous reduction test as well as in reduction test with pyrogenal stimulation using nitroblue tetrazolium (NBT-test) cytochemical assay. The percent of cells (among 100) containing dark blue granules of diformazan was calculated in sight of the microscope. The functional reserve (FR, %) defined as a difference between data for spontaneous and stimulated NBT test.

All received data were calculated using the computer program Epi Info (version 6.0) by the variation statistics method supplemented with Student's criterion. In order to estimate the individual indices their mean arithmetic value was taken ± mean error ($M \pm m$).

Results and their discussion

Our results have shown that introduction of *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* to mice led to stimulation of endogenous interferonogenesis (tab. 1). However the level and dynamics of interferon synthesis essentially differed depending on strain of *Lactobacteria* as well as *Bifidobacterium*. Among *Lactobacteria* the greatest interferon genesis activity had *Lactobacillus acidophilus*, and among *Bifidobacterium* – *Bifidobacterium longum*. Essential accumulation of interferon in blood serum under the influence of these preparations was observed in 6 hours: an interferon titer increased



Table 1.

Spontaneous production of interferon by spleen cells following the *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* introduction

Mice groups	Titer of interferon, log ₂ Unit/ml/ period of observation			
	1st day	3rd day	6th day	12th day
Intact (Control)	5,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01
Obtaining of <i>B. longum</i>	7,00 ± 0,01*	7,00 ± 0,01	6,00 ± 0,02	4,00 ± 0,01
Obtaining of <i>B. Bifidobacterium</i>	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	3,00 ± 0,01	3,00 ± 0,02
Obtaining of <i>L. acidophilus</i>	7,00 ± 0,04*	7,00 ± 0,01	6,00 ± 0,02	4,00 ± 0,02
Obtaining of <i>L. casei</i>	6,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01
Obtaining of <i>L. bulgaricus</i>	4,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,07
Obtaining of <i>lacidofil</i>	5,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	3,00 ± 0,01
Obtaining of <i>ridostin</i>	4,00 ± 0,09	6,00 ± 0,01	4,00 ± 0,07	4,00 ± 0,11

Note: * $P < 0,05$ compared with control values.

from $5,30 \pm 0,90 \log_2$ U/ml in the control accordingly to $7,00 \pm 0,01$ ($P < 0,05$) and $7,00 \pm 0,04 \log_2$ ($P < 0,05$) U/ml. High level of blood serum interferon remained on 1st (accordingly $8,00 \pm 0,01$ and $7,00 \pm 0,01 \log_2$ U/ml), 3rd (accordingly $9,00 \pm 0,05$ and $9,30 \pm 0,20 \log_2$ U/ml) and 6th (accordingly $9,00 \pm 0,01$ and $8,00 \pm 0,02 \log_2$ U/ml) day. Concentration of interferon in blood serum of mice which received *Lactobacillus acidophilus* has appeared increased for 12th day ($7,00 \pm 0,02 \log_2$ U/ml) too. On the same time following a *Bifidobacterium longum* introduction an interferon titer on the 12th day decreased to control level ($4,09 \pm 0,06 \log_2$ U/ml; $P > 0,05$). Under the influence of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus* concentration of serum interferon did not change comparing with control in 6 hours (accordingly $5,00 \pm 0,09$ and $5,00 \pm 0,01 \log_2$ U/ml) and on 1st day (accordingly $5,30 \pm 0,07$ and $4,30 \pm 0,01 \log_2$ U/ml), however on 3rd day (accordingly $6,30 \pm 0,01$ and $7,30 \pm 0,05 \log_2$ U/ml) and 6th (accordingly $6,00 \pm 0,01$ and $7,00 \pm 0,04 \log_2$ U/ml) the interferon level was seen decreased. In 12 days the interferon level in blood serum of mice received *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus bulgaricus*, decreased to control values (accordingly $4,30 \pm 0,06$ and $4,00 \pm 0,03 \log_2$ U/ml). Following a *Bifidobacterium Bifidobacterium* introduction blood serum interferon titers did not change in 6 hours and on 1st day (accordingly $6,00 \pm 0,01$ and $4,30 \pm 0,10 \log_2$ U/ml), but increased on 3rd day to $7,30 \pm 0,01 \log_2$ U/ml ($P < 0,05$). On 6th and 12th days the interferon level in blood serum of these mice was seen decreased to control level (accordingly $4,00 \pm 0,04$ and $4,30 \pm 0,06 \log_2$ U/ml). It is necessary to notice that under the influence of *ridostin* – the standard inducer of “late” interferon, in 6 hours and on 1st day concentration of blood serum interferon equaled accordingly $5,00 \pm 0,01$ and $5,60 \pm 0,01 \log_2$ U/ml. Accumulation of its cytokine in blood serum was seen only on 3rd and 6th days: the titers were seen increased to $8,30 \pm 0,40$ and $7,30 \pm 0,50 \log_2$ U/ml accordingly. For 12 days they did not exceed a control value ($4,00 \pm 1,00 \log_2$ U/ml; $P > 0,05$).



It was established that following the introduction of *Bifidobacterium longum* or *Lactobacillus acidophilus* at 1st day ability of splenocytes to produce the interferon spontaneously intensify *in vitro* whereas *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lacidophilus* and ridostin did not influence essentially on spontaneous production of interferon by splenocytes *in vitro* (tab. 1).

In reply to the adequate induction the interferon- γ production by spleen cells *in vitro* did not change after introduction of all preparations and interferon- α production was seen increased on 3rd day under the influence of *Bifidobacterium longum* or *Lactobacillus acidophilus* (tab. 2). Interferon- α production by spleen cells did not change following *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium Bifidobacterium*, lacidofil or ridostin injection.

Our data prove that *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* preparations have appeared effective inducing agent of both “early” and “late” interferon, and also intensify the spontaneous and ridostin-induced interferon production by spleen cells. *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium Bifidobacterium* induced “late” interferon synthesis as well as standard interferon inducer – ridostin but did not influence on ability of splenocytes to synthesize interferon.

It is shown that following *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* introduction functional activity of peritoneal macrophages in particular their oxygen-depending bactericide activity has increased that is confirmed by essential growth of NBT-positive cells number in spontaneous NBT-test. Under the influence of *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium Bifidobacterium* or *Lactobacillus acidophilus* oxygen-depending bactericide activity of macrophages increasing was seen on 1st and 6th days and on 12th day following *Bifidobacterium longum* introduction (tab. 3). *Lactobacillus casei* extend quantity of NBT-positive macrophages on 1st and 6th days and *Lactobacillus bulgaricus* – on 1st day. However oxygen-depending bactericide activity of macrophages did not change essentially after lacidofil or ridostin introduction. Under the influence of all studied preparations stimulated NBT-test indices became higher but their FR kept on the control level. *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* had stimulating influence on absorbing activity of macrophages. Following *Bifidobacterium longum* introduction PI was seen increased on 1st, 6th and 12th days up to $44,4 \pm 2,2$, $62,4 \pm 1,9$ and $60,5 \pm 2,5$ % accordingly in comparison with $31,5 \pm 2,6$ % ($P < 0,05$). It was emphasized the tendency of PI to increase on 1st and 6th days (accordingly $4,5 \pm 0,2$ and $4,3 \pm 0,2$ conventional U (CU) comparing with $3,1 \pm 0,2$ CU in control; $P > 0,05$), that index was found out to increase essentially on the 12th day – to $5,7 \pm 0,1$ CU ($P < 0,05$). Under the influence of *Bifidobacterium Bifidobacterium* the macrophages absorbing activity was stimulated too. PI increased on 1st, 6th and 12th days after its introduction according to $51,9 \pm 4,9$; $56,0 \pm 4,1$ and $50,0 \pm 3,1$ %. However it was established that the PI of macrophages had only tendency to increase: this index on 1st, 6th and 12th days became accordingly $4,5 \pm 0,9$; $4,0 \pm 0,8$ and $4,0 \pm 1,0$ CU. *Lactobacillus acidophilus* also stimulated the phagocytosis activity of macrophages. On 1st, 6th and 12th days following its introduction PI reached accordingly $69,6 \pm 2,0$; $56,3 \pm 1,8$ and $57,9 \pm 2,7$ %. PN on 3rd and 12th days remained at control level ($4,2 \pm 0,2$ and $3,6 \pm 0,2$ CU accordingly), and on 6th days increased up to $6,7 \pm 0,21$ CU ($P < 0,05$). Following the *Lactobacillus casei* introduction PN reached $45,7 \pm 1,4$; $50,1$



Table 2.
 Production of IFN- α and IFN - γ by spleen cells following the *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* introduction in response to adequate induction *in vitro*

Groups of mice observed/time of observation	Interferon production/ period of observation											
	interferon- γ titer, log ₂ unit/ml						interferon- α titer, log ₂ unit/ml					
	1st day	3rd day	6th day	12th day	1st day	3rd day	6th day	12th day	1st day	3rd day	6th day	12th day
Intact mice (control)	5,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	3,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,02
Obtaining of <i>B. bifidobacterium</i>	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	3,00 ± 0,02	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,02	4,00 ± 0,02	3,00 ± 0,02	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,02	4,00 ± 0,02	3,00 ± 0,01
Obtaining of <i>B. longum</i>	5,00 ± 0,02	6,00 ± 0,02	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	6,00 ± 0,12	8,00 ± 0,01*	5,00 ± 0,20	4,00 ± 0,16	8,00 ± 0,23*	5,00 ± 0,09	4,00 ± 0,06	4,00 ± 0,16
Obtaining of <i>L. acidophilus</i>	5,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,03	6,00 ± 0,16	8,00 ± 0,23*	5,00 ± 0,09	4,00 ± 0,06	8,00 ± 0,23*	5,00 ± 0,09	4,00 ± 0,09	4,00 ± 0,06
Obtaining of <i>L. casei</i>	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,05	5,00 ± 0,01	5,00 ± 0,08	7,00 ± 0,21	4,00 ± 0,09	3,00 ± 0,01	7,00 ± 0,21	4,00 ± 0,09	3,00 ± 0,01	3,00 ± 0,01
Obtaining of <i>L. bulgaricus</i>	4,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	6,00 ± 0,23	7,00 ± 0,16	4,00 ± 0,13	4,00 ± 0,09	7,00 ± 0,16	4,00 ± 0,13	4,00 ± 0,13	4,00 ± 0,09
Obtaining of <i>lacidofil</i>	5,00 ± 0,01	6,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01
Obtaining of <i>ridostin</i>	4,00 ± 0,09	6,00 ± 0,01	4,00 ± 0,02	4,01 ± 0,03	6,00 ± 0,21	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	6,00 ± 0,21	5,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01	4,00 ± 0,01

Note: * $P < 0,05$ compared with control values.

Table 3.
Oxygen-dependent bactericide activity of macrophages following the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* introduction

Groups of mice observed	Values of NBT-test / time of observation									
	Number of NBT- positive cells in spontaneous NBT-test, %			Number of NBT- positive cells in stimulated NBT-test, %			FR, %			
	1st day	6th day	12th day	1st day	6th day	12th day	1st day	6th day	12th day	
Intact (control)	42,0 ± 4,3				59,7 ± 1,5			9,9±0,3		
Obtaining of <i>B. bifidobacterium</i>	62,0 ± 3,4*	59,0 ± 5,1*	40,0 ± 3,2	71,4 ± 8,7	60,0 ± 2,1	56,0 ± 5,6	13,2 ± 2,1	10,0 ± 1,7	9,9 ± 3,1	
Obtaining of <i>B. longum</i>	70,5 ± 2,3*	60,1 ± 1,6*	57,9 ± 2,0*	75,2 ± 2,1	69,6±1,9	68,4 ± 1,4	10,7 ± 0,3	9,5 ± 0,4	10,5 ± 0,4	
Obtaining of <i>L. acidophilus</i>	60,3 ± 1,9*	59,3 ± 1,4*	47,6 ± 1,6	67,1 ± 2,2	68,4 ± 1,8	58,2 ± 1,8	6,7 ± 0,3	9,1 ± 0,2	10,6 ± 0,3	
Obtaining of <i>L. casei</i>	55,9 ± 2,6*	52,5 ± 2,9*	48,5 ± 1,4	61,7 ± 1,6	69,6 ± 2,4	57,7 ± 2,3	13,7 ± 0,3	8,5 ± 0,3	9,2 ± 0,3	
Obtaining of <i>L. bulgaricus</i>	59,8 ± 1,9*	49,6 ± 2,2	44,3 ± 2,7	68,0 ± 1,2	59,3 ± 2,5	55,0 ± 2,4	8,2 ± 0,5	9,7 ± 0,4	10,7 ± 0,3	
Obtaining of <i>lacydofil</i>	35,0 ± 8,7	42,0 ± 4,3	46,0 ± 3,9	39,0 ± 6,6	46,0 ± 5,6	55,0 ± 8,9	8,6 ± 1,1	9,0 ± 2,1	9,0 ± 1,1	
Obtaining of <i>ridostin</i>	46,2 ± 1,7	42,2 ± 2,3	39,3 ± 1,9	58,4 ± 2,5	52,6 ± 1,8	47,8 ± 2,4	12,1 ± 0,3	10,4±0,2	8,5 ± 0,31	

Note: *P < 0,05 compared with control values.



$\pm 1,3$ and $53,2 \pm 1,8$ % on 3rd, 6th and 12th days respectively. PN on 1st day kept on control level ($2,6 \pm 0,17$ CU), however on 6th and 12th days this index increased up to $5,8 \pm 0,2$ and $6,9 \pm 0,2$ CU respectively. Following the *Lactobacillus bulgaricus* introduction PI on 1st, 6th and 12th days increased to $44,4 \pm 1,6$; $46,4 \pm 2,1$ and $45,8 \pm 1,8$ % accordingly. PN on 3rd day ($4,4 \pm 0,2$ CU) kept on the control level, and on 6th and 12th days increased to $6,1 \pm 0,2$ and $7,3 \pm 0,1$ CU accordingly. Lacidofil also stimulated absorbing activity of peritoneal macrophages. It was observed PI increase of macrophages on 1st, 6th and 12th days to $47,8 \pm 4,3$; $53,0 \pm 2,9$ and $56,0 \pm 5,1$ % accordingly caused by lacidofil introduction. However PN kept on the control level (accordingly $3,4 \pm 0,2$; $4,0 \pm 1,0$ and $5,0 \pm 1,1$ CU). It is established that ridostin injection did not change phagocytosis activity of macrophages. On 1st, 6th and 12th days PI equaled to $34,6 \pm 1,3$; $36,7 \pm 2,0$ and $38,3 \pm 1,7$ % accordingly and PN was $2,7 \pm 0,1$; $3,9 \pm 0,3$ and $4,4 \pm 0,2$ CU accordingly. So submitting to the influence of *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus* PI of macrophages increased during the whole term observed as well as phagocyte numbers on 6th day following the *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus bulgaricus* introduction and on 12th day after the *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus bulgaricus* introduction.

Thus our data showed that *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus* *in vivo* had stimulated the interferonogenesis and functional activity of phagocytosis system cells. However *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* have appeared to be the most effective. Under their influence both “early” and “late” interferon was produced and also spontaneous and ridostin induced production of interferon by spleen cells increased. *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* had stimulating influence on functional activity of phagocytosis system cells. Therefore it is possible to admit that *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* are the most perspective for development of new probiotic preparations for immune correction.

Conclusions

1. *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus* have activated endogenous interferon production *in vivo* proved by essential increase of interferon concentration in blood plasma following their introduction to mice. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* have appeared the most effective both “early” and “late” interferon inducing agents. These preparations also intensified spontaneous and ridostin-induced production of interferon by spleen cells. *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium Bifidobacterium* induced “late” interferon production and did not influence on the interferonogenesis activity of splenocytes.

2. Introduction of *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus bulgaricus* to mice was accompanied by increasing of functional activity of phagocytosis system cells proved by stimulation of oxygen-dependending bactericide and absorbing activity of peritoneal macrophages.



3. Creation of new probiotic preparations for immunity correction on the basis of the compositions of *Laktobacillus* and *Bifidobacterium* was studied as a perspective direction of the subsequent researches. As our data testify the composition on the basis of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* is the most perspective for immune correction.

REFERENCE

1. Angel E. Wold Immune effects of probiotics // Scandinavian Journal of Nutrition/Naringsforskning. — 2001. — 45. — P. 76–85.
2. Blaise Corthesy, H. Rex Gaskins, Annick Mercenier Cross-Talk between probiotic bacteria and the host immune system // Journal of Nutrition. — 2007. — 137. — P. 781S–790S.
3. Hart A.L., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm M.A., Knight S.C., Stagg A.J. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria // Gut. — 2004. — 53. — P. 1602–1609.
4. Horoshilova H.V. Immunomodulating and medical action of probiotics // Immunology. — 2003. — № 6. — P. 352 – 356.
5. Ljaskovsky T.M., Ribalko S.V., Pidgorsky V.S. Interferon induction by lactic acid bacteria in the experiments *in vitro* and *in vivo* // Microbiologichny Zhurnal. — 2005. — 67, № 2. — P. 81–87.
6. Ljaskovsky T.M., Ribalko S.V., Pidgorsky V.C., Kovalenko N.K., Oleshchenko L.T. Effect of probiotic lactic acid bacteria strains on virus infection // Microbiologichny Zhurnal. — 2007. — 69, № 2. — P. 55–63.
7. *Modern methods of diagnostics of virus respiratory infections and their therapy using the preparations of interferon (methodical recommendations)* / Under Edition Moszolevsky F.A., Djachenko N.S, Spivak N.J. — Kiev, 1994. — 18 p.
8. Perdigon G., Fuller R., Raya R. Lactic Acid Bacteria and their Effect on Immune System // Current Issues in Intestinal Microbiology. — 2001. — 2, № 1. — P. 27–42.
9. Sanders M.E. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health // Journal of Nutrition. — 2000. — 130 (2S Suppl). — P. 384S–390S.
10. Zorin B, Nikolaev M., Bondarenko V.M. Modulation of cells of immune system laktobacteria // Microbiologichny Zhurnal. — 2004. — № 6. — P. 57–60.



**М.Я. Співак, В.С. Підгорський, Л.М. Лазаренко, Л.М. Шинкаренко,
Н.К. Коваленко, Л.Т. Рачкова, З.М. Олевінська**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна;
тел.: 8 (044) 526 94 25, e-mail: spivak@serv.imv.kiev.ua

ВПЛИВ ЛАКТО- ТА БІФІДОБАКТЕРІЙ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ ОРГАНІЗМУ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ

Реферат

Вивчено вплив лакто- та біфідобактерій на інтерферогенез та функціональну активність клітин фагоцитарної системи *in vivo*. Встановлено, що *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* та *Lactobacillus bulgaricus in vivo* мали активуючий вплив на продукцію ендогенного інтерферону, що підтверджувалось суттєвим підвищенням концентрації інтерферону у плазмі крові мишей. *Lactobacillus acidophilus* та *Bifidobacterium longum* виявились найбільш ефективними індукторами як «раннього», так і «пізнього» інтерферону. Ці препарати також посилювали спонтанну та ридостин-індуковану продукцію інтерферону клітинами селезінки. Введення мишам штамів лакто- та біфідобактерій супроводжувалась активацією киснезалежної бактерицидності та поглинальної активності макрофагів черевної порожнини. Отримані дані свідчать, що найбільш перспективною для корекції імунітету є композиція на основі *Bifidobacterium longum* та *Lactobacillus acidophilus*.

К л ю ч о в і с л о в а: лактобактерії, біфідобактерії, пробіотики, інтерферон, імунітет.

**Н.Я. Спивак, В.С. Подгорский, Л.Н. Лазаренко, Л.Н. Шинкаренко,
Л.Т. Рачкова, З.М. Олевинская**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина;
тел. 8 (044) 526 94 25, e-mail: spivak@serv.imv.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ ЛАКТО- И БИФИДОБАКТЕРИЙ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИМУНОРЕАКТИВНОСТИ ОРГАНИЗМА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Реферат

Изучено влияние лакто- и бифидобактерий на интерферогенез и функциональную активность клеток фагоцитарной системы *in vivo*. Установлено, что *Bifidobacterium Bifidobacterium*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus bulgaricus in vivo* усиливали продукцию



эндогенного интерферона, что подтверждалось существенным повышением концентрации интерферона в плазме крови мышей. *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium longum* оказались наиболее эффективными индукторами как «раннего», так и «позднего» интерферона. Эти препараты также усиливали спонтанную и ридостин-индуцированную продукцию интерферона клетками селезенки. Введение мышам штаммов лакто- и бифидобактерий сопровождалось активацией кислородзависимой бактерицидности и поглотительной активности макрофагов перитонеальной полости. Полученные данные свидетельствуют, что наиболее перспективной для коррекции иммунитета является композиция на основе *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus acidophilus*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лактобактерии, бифидобактерии, пробиотики, интерферон, иммунитет.



УДК 582.282.23.045

**О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Філіпова, І.Й. Сейфулліна,
В.С. Подуст**Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ НІКОТИНОЇЛГІДРАЗОНА САЛІЦИЛОВОГО АЛЬДЕГІДУ ТА ЙОГО КОМПЛЕКСІВ

Досліджено вплив нікотиніолгідразону саліцилового альдегіду $[H_2Ns](1)$ і комплексів на його основі – германію $[Ge(Ns)_2]$ (2) та стануму $[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (3) на ріст умовно-патогенних бактерій. Показано, що досліджені сполуки у концентраціях 25, 50 та 100 мкг/мл здатні значно пригнічувати накопичення біомаси тест-штамів. У деяких випадках ефективність інгібування дорівнює 100%. Найвищу активність щодо більшості мікроорганізмів виявила сполука 3.

Ключові слова: нікотиніолгідразон, комплекси германію (IV), комплекси стануму (IV), умовно-патогенні бактерії, антимікробний ефект.

Стрімке розповсюдження резистентних до хіміотерапевтичних засобів мікроорганізмів робить проблему пошуку нових антимікробних агентів однією з найактуальніших для сучасної медицини. Особливе значення в цьому плані набуває створення синтетичних препаратів, які у порівнянні з природними антибіотиками мають ряд переваг: менш трудомісткій та дорогий метод синтезу кінцевого продукту та необмежена можливість модифікації молекул з наступною зміною активності.

Останнє, насамперед, стосується біокоординаційних сполук. Поєднання в складі однієї молекули біологічно активних компонентів (комплексоутворювач та ліганд), як відомо, сприяє синергізму їх дії, зменшує токсичність [1, 4]. Слід зазначити, що можливість варіювання іонів металів і, відповідно, лігандів відкриває перспективи для цілеспрямованого створення речовин з певною фізіологічною дією. У зв'язку з цим, постійно зростає кількість різноманітних комплексів, що знаходять застосування як інсектициди, фунгіциди, бактерицидні та противірусні агенти, тощо [3].

Досліджені нами за останні роки комплекси германію (IV) з біолігандами, зокрема гідразонами, виявили широкий спектр біологічної активності, в тому числі протизапальної [6, 8, 13]. Тому дану роботу було присвячено вивченню впливу нікотиніолгідразону саліцилового альдегіду та вперше синтезованих комплексів на його основі – германію (IV) і стануму (IV) на ріст умовно-патогенних бактерій. Такий вибір об'єктів дослідження базувався на даних літератури про наявність антимікробної та протизапальної дії як гідразонів, так і зазначених іонів металів [11, 12].

© О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Філіпова, І.Й. Сейфулліна, В.С. Подуст, 2009



Матеріали і методи

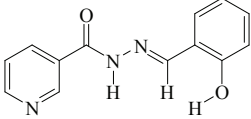
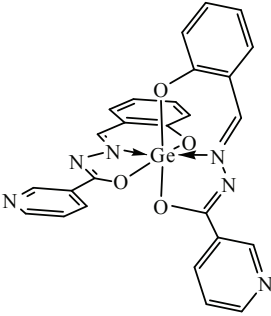
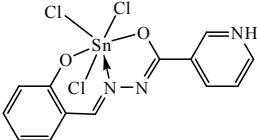
Нікотиноїлгідразон $[H_2Ns]$ (1) отримано реакцією конденсації гідразиду нікотинової кислоти з саліциловим альдегідом за загальною методикою [2]. Комплекси германію і стануму складу $[Ge(Ns)_2]$ (2) та $[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (3) вперше синтезовано на кафедрі загальної хімії Одеського національного університету імені І. І. Мечникова за оригінальними методиками взаємодією $GeCl_4$ та $SnCl_4$ з H_2Ns [7]. Комплекси охарактеризовано сукупністю фізико-хімічних методів дослідження: ІЧ та ПМР спектроскопія, мас-спектрометрія, електропровідність, термогравіметрія, рентгено-структурний аналіз (комплекс 3) [7]. Схеми їх будови наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Будова гідразона і відповідних комплексів германію (IV) та стануму (IV)

Table 1

The structure of hydrazone and its complexes with germanium (IV) and stannum (IV)

		
<p>H_2Ns (1)</p>	<p>$[Ge(Ns)_2]$ (2)</p>	<p>$[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (3)</p>

При вивченні антибактеріальних властивостей досліджених сполук як тест-мікроорганізми використовували штами бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Micrococcus luteus* ATCC 4698, отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України. Зберігання тест-штамів здійснювали на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару (МПА) за температури 4 °С. Для досліджень використовували добові культури, вирощені в пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Для визначення антибактеріальної активності сполук 1–3 готували робочі розчини, які містили по 5,0 мг, 2,5 мг та 1,25 мг кожної речовини в 1 мл диметилсульфоксиду. У дослідні пробірки відбирали по 20 мкл робочих розчинів та доводили об'єм до 1 мл рідким середовищем Гісса з глюкозою без індикатора Андреде. Таким чином, кінцева концентрація сполук у середовищі становила 25, 50 та 100 мкг. Кількість паралелей для кожної концентрації дорівнювала 5. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм [9]. Усі експерименти проводили у 3 повторях.

Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Концентрацію отриманої суспензії



визначали за калібрувальною кривою, вимірюючи оптичну густина за допомогою спектрофотометру “Spekol-10» (Німеччина). Суспензію клітин розводили фізіологічним розчином до концентрації 2×10^4 клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл та вносили до кожної експериментальної пробірки, отримуючи кінцеву концентрацію 1×10^3 КУО/мл.

Культури інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжині хвилі 540 нм. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі Гісса без додавання досліджуваних речовин.

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження впливу сполуки 1 на ріст тест-мікроорганізмів встановлено, що найбільшою чутливістю до її присутності в середовищі характеризуються клітини *E. coli* та *P. vulgaris*, ріст яких повністю пригнічувався за присутності 100 мкг досліджуваної сполуки в 1 мл середовища. При зниженні концентрації вдвічі інгібуючий ефект зменшувався до 86,7 %, 81,9 % та 63,1 % у випадку *E. coli*, *P. vulgaris* та *S. enteritidis* відповідно. Взагалі, спостерігали пряму залежність ефекту від концентрації (рис. 1). Серед грампозитивних тест-штамів найбільшу чутливість виявила культура *M. luteus*, інгібування росту якої досягало 77,8–88,9 % за різних концентрацій сполуки. Менш чутливими були клітини *S. aureus* та *B. subtilis*. За максимального впливу сполуки ріст культур зазначених штамів уповільнювався на 65,1 % та 59,4 %. У випадку *P. aeruginosa* спостерігали незначну інгібуючу дію сполуки 1 за концентрацій 50 та 100 мкг/мл, а за концентрації 25 мкг/мл зареєстровано навіть стимуляцію росту культури. Цікаво, що стимулюючий ефект щодо *P. aeruginosa* виявили також сполука 2 у всіх варіантах та сполука 3 у концентраціях 25 та 50 мкг/мл (рис. 2, 3). Винятком є лише уповільнення накопичення біомаси на 63,6 % у порівнянні з контролем за присутності 100 мкг/мл сполуки 3.

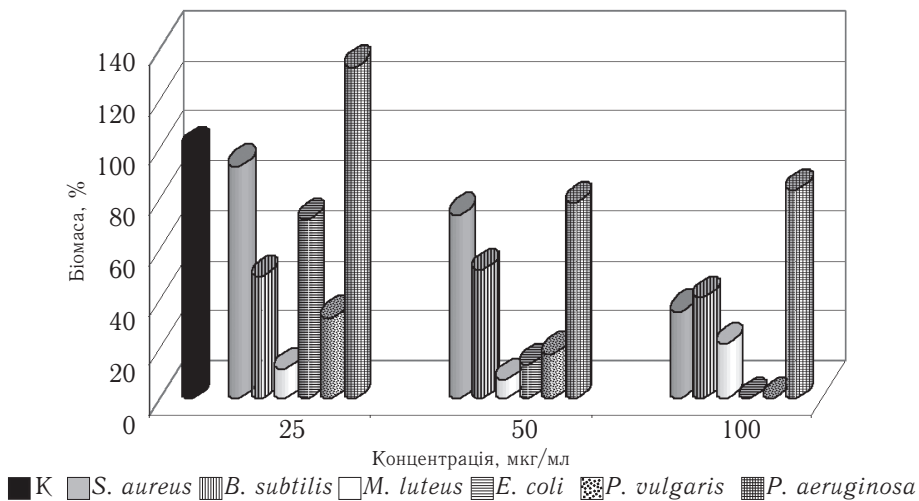


Рис. 1. Накопичення біомаси тест-штамів за присутності сполуки 1

Fig. 1. The test-strain biomass amount in the presence of compound 1

За присутності сполуки 2 у поживному середовищі найбільш виражений інгібуєчий ефект спостерігали у культурі *B. subtilis* (45,6 %). Накопичення біомаси *M. luteus* та *P. vulgaris* також пригнічувалося на 40,8–72,4 % та 36,9–65,2 % відповідно (рис. 2). Крім того, зареєстровано незначний інгібуєчий вплив (24,5 %) щодо *S. aureus*.

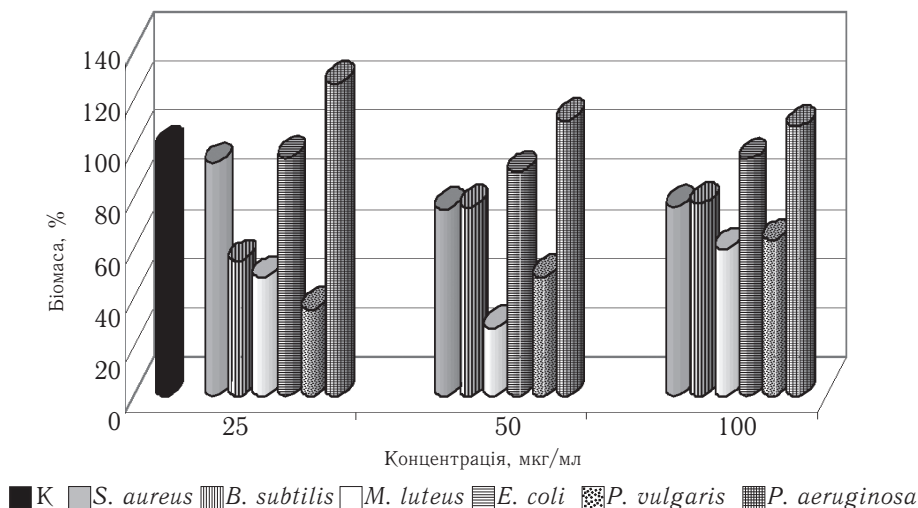


Рис. 2. Накопичення біомаси тест-штамів за присутності сполуки 2

Fig. 2. The test-strain biomass amount in the presence of compound 2

Сполука 3 у концентраціях 25 та 50 мкг/мл спричинила повне пригнічення росту культури *P. vulgaris*, а у максимальній концентрації – на 91,7 % (рис. 3). Високою чутливістю до цієї сполуки характеризувалися також клітини *M. luteus*, причому прояв інгібуєчої дії зростав у зворотній залежності від її вмісту в середовищі. Крім того, за концентрації 100 мкг/мл сполуки 3 зареєстровано практично повне пригнічення росту культур *E. coli* та *B. subtilis* – біомаса дослідних культур не перевищувала 1 % та 7 % від контролю відповідно.

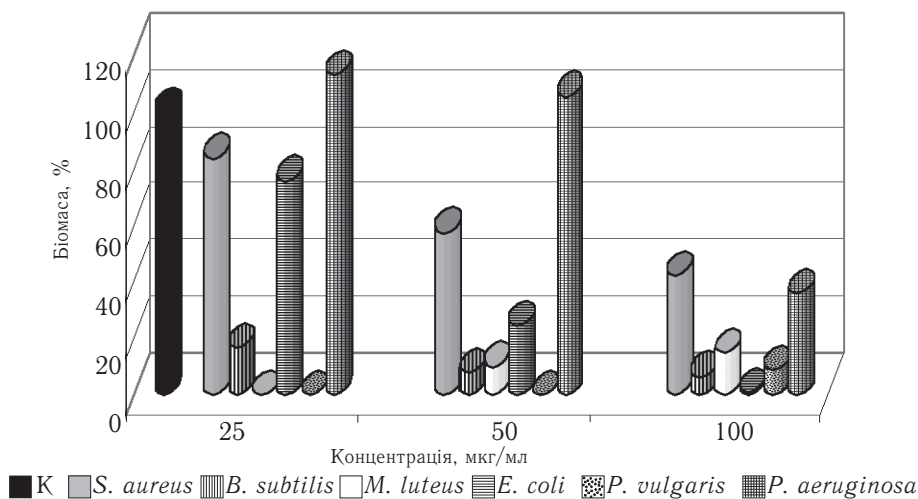


Рис. 3. Накопичення біомаси тест-штамів за присутності сполуки 3

Fig. 3. The test-strain biomass amount in the presence of compound 3

У культурі *S. aureus* максимального інгібуючого впливу, який складав 52,4 %, було досягнуто також при додаванні до поживного середовища 100 мкг/мл сполуки. Слід зазначити, що уповільнення накопичення біомаси *P. aeruginosa* спостерігалось лише за найбільшою з використаних у досліді концентрацій зазначеної речовини.

Порівнюючи досліджені сполуки за спектром та ступенем біологічної активності, можна розташувати їх таким чином $3 > 1 > 2$. Так, сполука 3 спричиняла значний інгібуючий вплив на усі обрані тест-штами (табл. 2). Сполука 1 також виявила здатність пригнічувати життєдіяльність усіх використаних у досліді мікроорганізмів, проте в окремих випадках вираженість ефекту була більш слабкою, ніж у сполуки 3. Крім того, співставлення активності сполук 1 та 3 щодо окремих штамів, наприклад, *M. luteus* та *P. vulgaris*, показує, що приблизно однаковий ефект спостерігається при використанні сполуки III у концентрації, яка у 2–4 є нижчою, ніж у сполуки 1.

Таблиця 2

Інгібування росту тест-мікроорганізмів досліджуваними сполуками

Table 2

The test-microorganism growth inhibition by studied compounds

Сполука	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	65,1 / 100*	59,4 / 100	92,2 / 50	100 / 100	100 / 100	21,5 / 50
2	24,5 / 50	45,6 / 25	72,4 / 50	9,5 / 50	65,2 / 25	0
3	57,4 / 100	93,3 / 100	100 / 25	99,1 / 100	100 / 25	63,6 / 100

Примітка: * – максимальне інгібуювання росту (%) / концентрація (мкг/мл)

Що ж стосується сполуки 2, то у досліджених концентраціях вона значно поступалася за активністю 1 та 3. Проте, цілком вірогідне збільшення її ефективності при варіюванні умов досліду.

Таким чином, дослідження впливу сполук 1–3 показало наявність у синтезованих сполук антибактеріальної активності щодо умовно-патогенних мікроорганізмів. Не зареєстровано жодних закономірностей стосовно переважної дії досліджених сполук на грампозитивні або грамнегативні бактерії. Однак, найменшою чутливістю серед обраних тест-штамів характеризувалася *P. aeruginosa*, відома своєю природною стійкістю до численних хіміотерапевтичних засобів. Сполукою з найбільш широким антимікробним спектром виявився комплекс 3.

Цілком ймовірно, що інгібуючий вплив досліджених сполук на ріст тест-штамів реалізується шляхом їх залучення до ключових метаболічних шляхів бактеріальної клітини за рахунок структурної подібності до нікотинової кислоти [5, 10].

Зміна антимікробної дії в ряду сполук $3 > 1 > 2$, які можна розглядати як похідні нікотинової кислоти, свідчить також і про вплив на неї іону металу. Проте, більш виражена активність сполуки 3 у порівнянні з рештою, вірогідно, пояснюється бактерицидною дією сполук стануму [11, 12] та здатністю гальмувати окиснювальне фосфорилування [1].

Отримані результати свідчать про перспективність подальшого вивчення взаємодії досліджених сполук з бактеріальними клітинами.



ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт Э. Избирательная токсичность. — М.: Мир, 1971. — С. 56.
2. Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии: Пер. с нем. — М.: Химия, 1968. — 944 с.
3. Киселёв Ю. М., Добрынина Н. А. Химия координационных соединений. М.: Академия, 2007. — 344 с.
4. Крис Е. Е., Волченкова И. И., Григорьева А. С. Координационные соединения металлов в медицине. Киев: Наук. Думка, 1986. — 216 с.
5. Машковский. Д. М. Лекарственные средства. — М.: Изд-во «Новая Волна», 2002. — Т. 2, изд. 14. — С. 309.
6. Нікітін О. В., Галкін Б. М., Сейфулліна І. Й., Шматкова Н. В. Вивчення впливу комплексів германію (IV) з саліцилальгідразами хлорбензойної та гідроксибензойної кислоти на ексудативне запалення, яке викликано різними флогогенними агентами // *Biomedical and Biosocial Anthropolology*. — 2004. — № 3. — С.81-83.
7. Сейфулліна І. Й., Шматкова Н. В. Бензоил-(пиридиноил) гидразоны ароматических альдегидов в реакциях комплексообразования с тетрахлоридами германия и олова // Тезисы XXIII Международной Чугаевской конференции по координационной химии. — Одесса, 4-7 вересня 2007. — С. 47-49.
8. Сейфулліна І. Й., Нікітін О. В., Галкін Б. М., Шматкова Н. В. та ін. Протизапальна активність комплексів германію з саліцилальгідразами нітробензойної кислоти // *Одеський медичний журн.* — 2003. — № 3, вип. 77. — С. 21-23.
9. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175 — 177.
10. *Страчунский Л. С., Белоусов Ю. Б., Козлов С. Н.* Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. — М.: Наука, 2002. — 142 с.
11. Vacchi, A. Bonarti, M. Carcelli. Organotin complexes pyrrole-2,5-dikarboxaldehyde bis (acylhydrazones). Synthesis, structure antimicrobial activity and genotoxicity // *J. Inorg. Biochem.* — 1998. — V. 69. — P. 101-112.
12. Malhotra Rajesh, Kumar Sudhir, Dhindsa Kuldip Singh. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of organotin and organosilicon complexes of substituted hydrazones // *Indian J. Chem.* — 1997. — Vol. 4A. — P. 321-323
13. Seifullina I. I., Shmatkova N., Galkin B., Nikitin A. Germanium complexes with substituted pyridincarbonic acids hydrazones as anti-inflammatory agents // Poster Abstract 7th Intern. Symp. on Applied Bioinorg. — Mexico. — 2003. — P. 96.



О.Ю. Зинченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Филиппова,
И.И. Сейфуллина, В.С. Подуст

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НИКОТИНОИЛГИДРАЗОНА САЛИЦИЛОВОГО АЛЬДЕГИДА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ

Реферат

Исследовано влияние никотиноилгидразона салицилового альдегида $H_2Ns(1)$ и комплексов на его основе — германия $[Ge(Ns)_2]$ (2) и олова $[SnCl_3(Ns-H)]$ (3) на рост условно-патогенных бактерий. Показано, что исследованные соединения в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл способны значительно подавлять накопление биомассы тест-штаммов. В некоторых случаях эффективность ингибирования составляет 100 %. Наиболее высокую активность в отношении большинства микроорганизмов проявило соединение 3.

Ключевые слова: никотиноилгидразон, комплексы германия (IV), комплексы олова (IV), условно-патогенные бактерии, антимикробный эффект.

O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.I. Seifullina, T.O. Philipova, V.S. Podust

Odesa National I. I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NICOTINOILHYDRAZONE SALYCILIC ALDEHYDE AND ITS COMPLEXES

Summary

The influence of nicotinoilhydrazone salicylic aldehyde and its complexes with germanium (IV) and stannum (IV) on the opportunistic bacterial pathogens has been investigated. It has been shown that studied compounds are able to suppress the test-strain biomass increase at concentrations of 25, 50 and 100 μg per ml. The inhibition level in some variants was about 100 %. The compound 3 has demonstrated the highest activity towards the most used microorganisms.

Key words: nicotinoilhydrazone, complexes of germanium (IV), complexes of stannum (IV), opportunistic bacteria, antimicrobial effect.



Т.И. Патыка¹, В.Ф. Патыка²

¹Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, тел.: (812) 47 62 802, e-mail: patykatatyana@mail.ru

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

ТОКСИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЭНТОМОПАТОГЕНОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Проанализированы токсигенные свойства энтомопатогенных бактерий Bacillus thuringiensis с различным уровнем продуцирования энтомотоксинов (кристаллического δ-эндотоксина, термостабильного β-экзотоксина) с использованием тест-насекомых разных видов (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera). Показано, что восприимчивость различных таксонов (насекомых) к энтомопатогенным препаратам обусловлена составом их активных токсинов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis*, энтомотоксины.

Группа энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* впервые была обнаружена Л. Пастером при изучении нозематоза тутового шелкопряда на юге Франции. Пастер назвал ее *Bacillus bombycis*, а кристаллы эндотоксина — «необыкновенными ядрами». Позднее в Японии С. Ишивата, изучая болезни тутового шелкопряда, несколько подробнее описал как саму болезнь, так и ее возбудителя — бактерию и практически заново открыл *B. thuringiensis* назвав ее *Bacillus sotto*. А в 1911 году эта группа бактерий получила современное название, после того как немецкий ученый Берлинер выделил в Тюрингии аналогичные микроорганизмы, тщательно изучил их и присвоил название *B. thuringiensis*.

В 1962 году эта бактерия получила таксономический статус и вошла в мировую номенклатуру как самостоятельный вид под названием *Bacillus thuringiensis* Berliner [1, 2, 3]. Ученые института Пастера в Париже Бонфуа и де Баржак (1962 г.) разработали схему внутривидовой идентификации разновидностей *B. thuringiensis*, которая базируется на определении структуры жгутикового антигена (серологическая диагностика) и дополняется физиолого-биохимическими характеристиками [4, 5]. О. Лысенко (1985 г.) приводит схему диагностики более 30 серовариантов *B. thuringiensis* по Н-антигену, на основании физиолого-биохимических свойств [2]. На специфичности Н-антигена базируются серодиагностика многообразия биовариантов *B. thuringiensis* [6]. Недавняя всесторонняя переклассификация инсектицидных генов *B. thuringiensis* была осуществлена Crickmore и др. [7]. Выделение и описание новых разновидностей энтомопатогенов во всем мире продолжается. На сегодня описано более 70 подвигов *B. thuringiensis*, эффективных против широкого спектра фитофагов из отрядов *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* и одновременно не токсичных для полезной энтомофауны, рыб, теплокровных животных и человека [2, 8].



Патогенное действие бактерии *B. thuringiensis* на насекомых связано с токсинами и другими метаболитами, которые она продуцирует. Токсины являются важными факторами патогенности, которые вырабатываются микроорганизмами и реализуют основные механизмы инфекционного процесса. Кристаллические белки (δ -эндотоксины) рассматриваются как главные токсикологические компоненты биоинсектицидов на основе *B. thuringiensis*, хотя эти бактерии продуцируют еще и другие факторы активности относительно фитофагов (термостабильный водорастворимый β -экзотоксин нуклеотидной природы; фосфолипазы, (α -экзотоксин, γ -экзотоксин); экзоферменты (лецитиназы, протеазы) и др. [2, 7-9]. Серологические варианты бактерий *B. thuringiensis* по-разному продуцируют перечисленные токсины, причем, их синтез зависит от многих факторов, включая условия культивирования бактерий. Способность продуцировать экзотоксин выявлена у штаммов разных серологических групп. Так, экзотоксиногенные культуры *B. thuringiensis*, относящиеся к серотипам: 1 – *var. thuringiensis*, 4 – *var. kenyae*, 8 – *var. tolworthi*, 9 – *var. morrisoni*, 10 – *var. darmstadiensis* и др., оказывают токсическое действие не только на чешуекрылых насекомых, но и на двукрылых и жесткокрылых. Таким образом, наличие термостабильного экзотоксина в культуре (или препарате в целом) расширяет спектр энтомоцидного действия бацилл группы *thuringiensis*.

Следует напомнить, что патогенность характеризуется специфичностью, т. е. способностью вызвать типичные для данного вида возбудителя патоморфологические и патофизиологические изменения в определенных тканях и органах при естественных для него способах заражения. Патогенность – видовое свойство микроорганизма, проявляющееся по отношению к организму определенного вида при обычных условиях их взаимного влияния друг на друга. Вирулентность же является свойством данного штамма возбудителя, обладающего различной степенью и формой изменчивости, в результате чего взаимоотношения микроорганизмов данного штамма и данной особи хозяина при данных факторах внешней среды не всегда дают одни и те же следствия. Таким образом, вирулентность одного и того же микроорганизма может проявляться по-разному, в зависимости от путей его проникновения в макроорганизм, условий взаимоотношения патогена и его хозяина и влияния различных факторов.

Цель работы состояла в изучении токсигенных характеристик разных серологических вариантов *B. thuringiensis*, проявляющих энтомоцидность к насекомым различных таксономических видов – комнатной мухе (*Musca domestica* L.), комару (*Aedes aegypti*), пчелиной огневке (*Galleria mellonella* L.), колорадскому жуку (*Leptinotarsa decemlineata* Say.).

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *B. thuringiensis*, выделенные из природных популяций больных и погибших насекомых разных эколого-географических регионов и отселектированные в ГНУ ВНИИСХМ экзотоксиногенные штаммы 1-го, 10-го серотипов *B. thuringiensis var. thuringiensis* H₁ и *B. thuringiensis var. darmstadiensis* H₁₀; штамм 14-го серотипа – *B. thuringiensis var. israelensis* H₁₄.

Для микроскопических исследований использован метод окраски мазка культур по В. А. Смирнову (с учетом споро- и кристаллообразования) [10]. Культивирование штаммов *B. thuringiensis* проводили глубинным методом в колбах Эрленмейера с жидкими питательными средами дрожже-полисахаридного состава на биотехноло-



гической качалке при температуре 28–30 °С, 220 об/мин., в течение 72 часов. Продуктивность культур оценивалась общепринятыми методами в микробиологии (с использованием серийных разведений культуральной жидкости с последующим высевом на МПА и подсчетом выросших колоний). Для оценки уровня биосинтеза термостабильного β-экзотоксина культуральную жидкость *B. thuringiensis* центрифугировали в режиме 8 тыс. об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость, содержащую экзотоксин, стерилизовали (1 атм, 20 мин.). Бактериальные суспензии культур *B. thuringiensis*, а также стерильный центрифугат в соответствующих разведениях использовали для дальнейших исследований токсигенного потенциала *B. thuringiensis* на тест-насекомых по методикам ВНИИСХМ [2, 12, 13]. Биотестирование проводили на инсектарных линиях насекомых — комнатной мухе (*Musca domestica* L.), пчелиной огневке (*Galleria mellonella* L.), комаре (*Aedes aegypti*), а также на насекомых, собранных в природе — колорадском жуке (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), комаре (*Aedes aegypti*).

Значение LK_{50} для биотеста рассчитывается по таким же формулам, как и инсектицидность бактериальных культур (формула Кербера):

$$\lg LK = \lg C_m - \delta \times (\sum n \div n_0 - 0,5)$$

где C_m — максимальная апробируемая концентрация;

δ — логарифм отношения каждой предыдущей концентрации к последующей (логарифм кратности разведений);

$\sum n \div n_0$ — сумма отношений числа насекомых, которые погибли от данной концентрации, к общему числу насекомых, которые подверглись действию этой концентрации.

Инсектицидная активность комплекса спор и кристаллов рассчитывалась по формуле Франца:

$$M = 100 \times (1 - \frac{K_1}{K_2} \times \frac{P_2}{P_1}), \%$$

где: K_1 — количество насекомых в контроле до обработки;

K_2 — количество насекомых в контроле после обработки;

P_1 — количество насекомых в опыте до обработки;

P_2 — количество насекомых в опыте после обработки.

Результаты и их обсуждение

Насекомые из родов *Diptera*, *Lepidoptera*, *Coleoptera* неодинаково чувствительны к β-экзотоксину *B. thuringiensis*. Наиболее восприимчивы личинки двукрылых (комнатная муха), личинки колорадского жука. В то же время мухи не восприимчивы к кристаллическому эндотоксину. Поэтому их гибель от биоагента *B. thuringiensis* H_1 означает токсическое действие экзотоксина (табл. 1). Токсичность культуральной жидкости для насекомых разных систематических групп явилась основанием для дальнейших исследований комплекса полезных свойств *B. thuringiensis* в рамках производства экологически безопасных микробиопрепаратов для контроля численности насекомых-вредителей, как альтернатива инсектицидам химического синтеза.

Следует отметить, что конечный результат действия экзотоксина не может оцениваться исключительно по процентному показателю гибели личинок за определенный период. Поэтому в наших последующих исследованиях вели учет



гибели насекомых на других фазах развития в последующих поколениях, а также учитывали происходящие изменения, которые могут активизировать снижение численности насекомых.

Таблица 1

Энтомоцидное действие β -экзотоксина *B. thuringiensis*

Table 1

Entomocycle effect of β -exotoxin *B. thuringiensis*

Тест-объект	Разведение надосадочной культуральной жидкости (супернатанта)	% гибели насекомых	ЛК ₅₀ , %
<i>Musca domestica</i> L.	Без разведения	100	0,83
	1:10	97	
	1:100	62	
<i>Galleria mellonella</i> L.	1:10	100	3,7
	1:100	70	
<i>Leptinotarsa decemlineata</i> Say.	1:10	100	0,48
	1:100	80	

В многочисленных опытах отмечена сильная степень ингибирования питания личинок колорадского жука (L_2) при обработке листьев картофеля жидкой формой препарата *B. thuringiensis* H_1 в 0,5 %. Антифидантный эффект на имаго жука возможен при обработке кормовых растений биопрепаратом или экзотоксином (по отдельности) в более высоких концентрациях (до 2 %).

Чувствительность насекомых к экзотоксину в большей мере зависит от способа введения его в организм. При пероральном введении экзотоксин значительно менее токсичен, чем при парентеральных инъекциях. Действие экзотоксина, введенного в организм *per os*, носит характер хронической интоксикации насекомого. Отчетливого периода ухудшения состояния насекомого сразу после инфицирования при этом не наблюдается (табл. 2).

Таблица 2

Воздействие β -экзотоксина на вес личинок колорадского жука при инфицировании их во втором возрасте

Table 2

 β -exotoxin influence on weight of potato beetle larvae at infecting them at the second age

Концентрация β -экзотоксина, %	Вес 10 личинок на 7 сутки опыта, мг	Снижение веса, %
0,1	799	37
1,0	412	68
10,0	224	82
контроль	1273	0

Личинки после интоксикации питаются менее активно, отстают в росте и весовых показателях. Установлено, что воздействие экзотоксина происходит, прежде всего, на развивающиеся клетки в период метаморфоза, поэтому отмечается возрастная восприимчивость насекомых и специфическое действие экзотоксина *B. thuringiensis*.



Однако β -экзотоксин действует медленнее кристаллического δ -эндотоксина. В споро-кристаллическом комплексе β -экзотоксин действует как синергист, т. е. после разрушения δ -эндотоксином стенки кишечника насекомого он активно и быстро проникает в гемолимфу и органы хозяина, вызывая таким образом разноплановые физиологические изменения и летальный эффект. Следовательно, одновременное введение экзо- и эндотоксинов способствует возрастающему энтомоцидному эффекту *B. thuringiensis*.

Из серии опытов, выполненных с яйцекладками различных видов насекомых, установлено, что продуцируемый *B. thuringiensis* H_1 , *B. thuringiensis* H_{10} экзотоксин обладает овицидным действием (гибель эмбрионов). Яйца пчелиной огневки при этом погибали на 27,8 %, комнатной мухи — 50 %, колорадского жука — 100 %, в зависимости от концентрации экзотоксина. Выявлено, что для каждого вида существуют определенные периоды, когда яйцо более чувствительно или более резистентно к воздействию экзотоксина. Обработка отложенных яиц насекомых экзотоксином оказалась фатальной и для личинок, отродившихся из обработанных яиц. При обработке яиц 1 % суспензией *B. thuringiensis* H_1 без экзотоксина незначительная (30 %) гибель тест-насекомого происходит в постэмбриональный период развития, тогда как от 1 % *B. thuringiensis* H_1 с экзотоксином погибает 4,6 % яиц и все вылупившиеся личинки, что, в общем, составляет 100 %. Так, личинки колорадского жука, пережившие интоксикацию в фазе яйца, погибают в большинстве случаев в течение 10 суток, после отрождения. Гибель отрождающихся личинок происходит, с одной стороны, в результате интоксикации эмбриона, с другой — при заражении их в момент прогрызания хориона.

В плане патологического эффекта действия на насекомых важно, что продуцируемый *B. thuringiensis* экзотоксин может действовать не только при заражении перорально, но и контактно, то есть через покровы насекомых, а в комбинации со споро-кристаллическим комплексом он является синергистом. Это, в свою очередь, расширяет сферу применения экзотоксинсодержащих препаратов на основе *B. thuringiensis*. Их используют для снижения численности чешуекрылых насекомых, а также представителей отрядов *Coleoptera*, *Diptera*.

Оценка биологического потенциала *B. thuringiensis* H_1 и *B. thuringiensis* H_{10} в полевых условиях показала в среднем практически одинаковую активность в отношении личинок колорадского жука на картофеле — до 90 % (табл. 3).

Таблица 3
Фитозащитное действие *B. thuringiensis* H_1 и *B. thuringiensis* H_{10}
Table 3
Phytoprotective effect of *B. thuringiensis* H_1 and *B. thuringiensis* H_{10}

Вариант опыта	Норма расхода препарата, кг/га	Количество живых личинок на учетных растениях, экз.			Биологическая эффективность, %	
		до обработки	3-й день	10-й день	3-й день	10-й день
<i>B. thuringiensis</i> H1 (Битоксибациллин)	2,0	462	357	46	16,2	91,1
<i>B. thuringiensis</i> H10 (Бацикол)	2,0	524	225	38	57,1	92,8
Контроль (без обработки)	-	389	480	517	увеличение численности	



Главной отличительной особенностью энтомопатогена *B. thuringiensis* H_{10} по сравнению с другими вариантами *B. thuringiensis* является его селективное действие в отношении опасных жесткокрылых насекомых-фитофагов, включая имаго [11].

Пораженные энтомотоксинами *B. thuringiensis* насекомые в значительной мере утрачивают вредоносность и способность к размножению. При этом важно, что снижение их вредоносности может сказываться еще до заметного снижения уровня численности популяции насекомого. Применение биоинсектицидов на основе *B. thuringiensis* против насекомых-вредителей целесообразно соотносить с популяционным составом.

B. thuringiensis H_{14} со свойствами ларвицидного действия на двукрылых насекомых явился фактором, который катализирует преимущественную разработку бактериальных ларвицидов для использования их в водной среде, непосредственно в местах вылода комаров и мошек. Уникальность действия бактерий подвида *israelensis* на личинок двукрылых насекомых связана исключительно с особенностями их кристаллического эндотоксина. Эндотоксин, который содержится в оболочке спор и вегетативных клеток, вызывает у личинок комаров деструктивные изменения клеточной стенки кишечника, особенно его среднего отдела. Ларвицидная активность штамма *B. thuringiensis* H_{14} при титре до 3,0 млрд спор /мл культуральной жидкости по показателю ЛК₅₀ при свободном поглощении личинками спор и кристаллического эндотоксина из водной суспензии препарата в лабораторных исследованиях составила $0,126 \times 10^{-3} \%$, что свидетельствует о высокой функциональности патогена для личинок комара *Aedes* 4 возраста (табл.4). В каждом варианте опыта по 25 личинок, 3-х кратная повторность, в контроле — стерильная вода.

Таблица 4

Ларвицидная активность *B. thuringiensis* H_{14} при инфицировании личинок (L_4) *Aedes aegypti*

Table 4

Larvicidal activity of *B. thuringiensis* H_{14} at infecting of population *Aedes aegypti* (L_4) by the sublethal dose

Доза (концентрация) патогена, мг/л	Титр спор, млрд/мл КЖ	Гибель личинок через 24 часа, %	ЛК ₅₀ , % культуральной жидкости ($\times 10^{-3}$)
0,5	2,90	100	0,126
0,25	2,90	94,0	0,126
0,125	2,90	44,0	0,126
0,06	2,90	14,0	0,126

В отличие от фитозащитных препаратов на основе *B. thuringiensis*, технология применения ларвицидных биопрепаратов требует особых подходов. Целесообразно проводить учет многих факторов и обстоятельств, таких как характеристика биотопов — водоемов, их площадь, подлежащая обработке и глубина, температура воды. Кроме того, необходимо учитывать особенности водоснабжения, проточность, степень зарастания и органосолевые показатели. Обязательным и естественным фактором при этом остается видовой состав и возрастная структура популяции кровососущих комаров.



Наличие в препаратах *B. thuringiensis* основных энтомоцидных компонентов (спор, кристаллического δ -эндотоксина и термостабильного β -экзотоксина) не только усиливает энтомоцидный эффект, но, что очень важно, расширяет спектр их действия, предопределяет видовой состав восприимчивых к этим препаратам вредоносных насекомых. Но не следует забывать, что эффективность использования биопрепаратов *B. thuringiensis* зависит не только от их качественных и функциональных показателей, но и от технологий применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вейзер Я. Микробиологические методы борьбы с вредными насекомыми. (Болезни насекомых) /Под ред. Гилярова М. С. — М.: Колос, 1972. — 640 с.
2. Кандыбин Н. В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика. — М.: Агропромиздат, 1989. — 172 с.
3. Микроорганизмы в борьбе с вредными насекомыми и клещами /Под ред. М. С. Гилярова. — М.: Колос, 1976. — 583 с.
4. de Barjac, H. and Bonnefoi, A. Essai de classification biochimique et serrologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis* //Entomophaga. — 1962. — 7. —P. 5–31.
5. de Barjac, H. and Bonnefoi, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis berliner* with a key to their differentiation //Journal of Invertebrate Pathology. — 1968. — 11. —P. 335–347.
6. M. M. Lecadet, E. Frachon, V. Cosmao Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thierry. Uniter des Bacter ies Entomopathogè'nes, Institut Pasteur, Paris, France. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis* //Journal of Applied Microbiology. — 1999. — 86. —P. 660–672.
7. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., & Dean, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins //Microbiology and Molecular Biology Reviews. — 1998. — 62. —P. 807.
8. Патыка В. Ф., Патыка Т. И. Экология *Bacillus thuringiensis*. — К.: изд-во ПГАА, 2007. — 216 с.
9. Добрица А. П., Корецкая Н. Г., Гайтан В. И., Коломбет Л. В., Дербышев В. В., Жиглецова С. К. Разработка биопестицидов против колорадского жука //Российский химический журнал (ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева), 2001, т. XLV, № 5,6. — С. 174-184.
10. Smirnofj W. A. A straining method for differentiating spores, crystals and cells of *Bacillus thuringiensis* //Insect. Pathol. — 1962. — P. 384-386.
11. Кандыбин Н. В., Смирнов О. В. Микробиологизация — альтернатива химизации при получении экологически чистой продукции. Производство экологически безопасной продукции растениеводства. Региональные рекомендации (под ред. Соколова М. С., Угрюмова Е. П.). — Вып. 1. — Пущино, 1995. — С. 66-72.
12. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых и клещей. — М., 1984. — 27 с.
13. Лескова А. Я. Методические указания по идентификации культур *B. thuringiensis* и оценки их патогенных свойств. — Л., 1984. — С. 17-19.



Т.І. ПАТИКА¹, В.П. ПАТИКА²

¹Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкін, шосе Подбельського, 3, тел. (812) 47 62 802, e-mail: patykatatyana@mail.ru

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

ТОКСИГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ ЕНТОМОПАТОГЕНІВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Реферат

Проаналізовано токсигенні властивості ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* з різним рівнем продукування ентомотоксинів (кристалічного δ -ендотоксину, термостабільного β -екзотоксину) з використанням тест-комах різних видів (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera). Показано, що чутливість різних таксонів комах до ентомопатогенних препаратів обумовлена природою, складом та структурою токсинів.

К л ю ч о в і с л о в а: ентомопатогенні бактерії *Bacillus thuringiensis*, ентомотоксини.

Т.І. ПАТЮКА¹, V.F. ПАТЮКА²

¹All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology
Russian Academy of Agricultural Sciences,
196608, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Podbelsky str., 3,
тел. (812) 47 62 802, e-mail: patykatatyana@mail.ru

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

THE TOXIGENE PROPERTIES OF ENTOMOPATHOGENIC *BACILLUS THURINGIENSIS*

Summary

There were analysed the toxigen properties of entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* with various level of formation entomotoxins (crystal δ -endotoxin, thermostable β -exotoxin) with use of test insects of different species (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera). It is shown that the susceptibility of various taxons of the insects to entomopathogenic preparations is caused by the structure of their active toxins.

К e y w o r d s: entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*, entomotoxins.



УДК 579.64:631.44

А.С. Гордиенко, Т.С. Антонюк, И.К. Курдиш

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев ГСП, Д 03680, Украина, тел.: 8 (044) 526 90 11,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВЛИЯНИЕ ГЛИНИСТЫХ МИНЕРАЛОВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ – КОМПОНЕНТОВ ГРАНУЛИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

*Глинистые минералы монтмориллонит и палыгорскит, которые применяются при получении гранулированных бактериальных препаратов, снижают адгезию клеток *Azotobacter vinelandii* и *Bacillus subtilis* к твердой поверхности (стекло). Следовательно, данные дисперсные минералы не будут препятствовать распространению бактерий в прикорневой зоне растений, куда вносятся микробные препараты с целью повышения продуктивности культурных растений.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: адгезия бактерий, глинистые минералы

Взаимодействие микроорганизмов с высокодисперсными материалами, в том числе с глинистыми минералами, обуславливает ряд явлений и эффектов, которые представляют интерес как в теоретическом, так и в практическом аспектах. Так, внесение твердых частиц в среду культивирования способствует во многих случаях возрастанию физиологической активности бактерий [11]. Глинистые минералы обеспечивают увеличение устойчивости клеток к повышенным температурам [7] и высушиванию [5].

Обработка суспензий микроорганизмов глинистыми минералами приводит к тому, что возрастает эффективность отделения клеток от дисперсионной среды [3, 5], т. е. имеет место снижение агрегативной устойчивости бактериальных суспензий. Учитывая тот факт, что в основе процессов коагуляции и адгезии лежат одни и те же физико-химические закономерности, представляло интерес изучить влияние глинистых минералов на прикрепление бактерий к твердым поверхностям. Необходимость данных исследований обусловлена тем, что глинистые минералы используются при получении гранулированных микробных препаратов [8]. Поэтому возникает вопрос о том не будут ли данные материалы способствовать прочному прикреплению клеток бактерий – компонентов этих препаратов к частицам почвы, что может повлиять на их миграцию в прикорневой зоне.

Материалы и методы

Объектами исследований служили штаммы бактерий *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 [10] и *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 [9]. Азотобактер выращивали на модифицированной среде Берка, г/л: $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ – 0,8; KH_2PO_4 – 0,2; натрий лимоннокислый – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,1; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ – 0,015; $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9 H_2O$ – 0,005; Na_2MoO_4 – 0,005; сахароза – 20, 0. Для культивиро-

А.С. Гордиенко, Т.С. Антонюк, И.К. Курдиш, 2009



вания бактерий *B. subtilis* использовали среду следующего состава, г/л: пептон — 10,0; NaCl — 3,0; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ и KCl по 0,3; KH_2PO_4 и $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ по 0,1; $MnSO_4$; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ по 0,001. Бактерии выращивали в условиях периодического культивирования на качалке (240 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл со 100 мл суспензии при 28 °С в течение 18 ч (*B. subtilis*) и 48 ч (*A. vinelandii*).

Клетки отмывали последовательно дважды дистиллированной водой и один раз фосфатным буфером (рН 7,0, ионная сила 0,05), в котором в дальнейшем проводили все исследования.

Использовали глинистые минералы монтмориллонит и палыгорскит Черкасского месторождения глин (Украина). Для исследований отбирали фракцию глин, частицы которой не оседают в процессе центрифугирования при 6000 g в течение 15 мин. Такие частицы имеют размеры значительно меньше 1 мкм и не видны в световой микроскоп. Использование данной фракции глинистого минерала в концентрации, не превышающей 500 мг/л, не изменяет оптическую плотность суспензии бактерий при внесении в нее дисперсного материала.

Адгезию бактерий исследовали в расположенных вертикально колонках диаметром 16 мм, которые содержали по 15 г стеклянных гранул размером 1 — 2 мм. Суспензию бактерий предварительно смешивали с суспензией глинистого минерала, выдерживали 30 мин., и по 7 мл полученной смеси вносили в колонки, обеспечивая слой носителя полным покрытием водной фазой.

Концентрация клеток в суспензии составляла: *B. subtilis* — $1,0 \cdot 10^9$ кл/мл, *A. vinelandii* — $2,5 \cdot 10^8$ кл/мл. После контакта с адсорбентом в течение 2 ч суспензию сливали и по разности в оптической плотности суспензии бактерий до и после взаимодействия с носителем рассчитывали количество клеток, сорбировавшихся на 1 г стеклянных гранул.

Электрофоретические исследования проводили на установке для микроэлектрофореза [1]. Готовили три типа образцов: 1 — суспензия клеток (контроль 1); 2 — суспензия глинистого минерала (фракция частиц размером 1 — 5 мкм) — контроль 2; 3 — суспензия клеток бактерий, в которую внесен глинистый минерал (частицы высокодисперсной фракции размером меньше 1 мкм). В последнем случае после внесения в суспензию бактерий глинистого минерала образцы выдерживали в течение 15 мин. Концентрация клеток была постоянной - $1,0 \cdot 10^8$ кл/мл. Изменяли скорость электрофореза 50 клеток или частиц минерала и рассчитывали их электрофоретическую подвижность (ЭФП).

Результаты и их обсуждение

Установлено (рис.1), что глинистые минералы способствуют уменьшению количества клеток *A. vinelandii*, прикрепившихся к поверхности твердых частиц. Наблюдается также различие в степени снижения адгезии клеток в зависимости от типа глинистого минерала. Так, в присутствии палыгорскита имеет место незначительное (~ 25 %) уменьшение адгезионной способности бактерий при концентрации глины до 100 мг/л. Дальнейшее увеличение содержания данного минерала в суспензии не влияет на эффективность процесса прикрепления клеток. Внесение в суспензию бактерий монтмориллонита обеспечивает уменьшение адгезии во всей области изученных концентраций глинистого минерала и при его содержании 500 мг/л количество прикрепившихся клеток снижается по сравнению с контролем более чем в три раза.



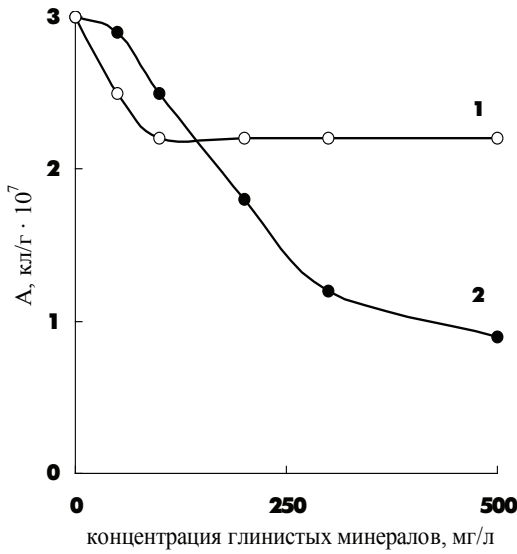


Рис.1. Количество адсорбированных клеток *Azotobacter vinelandii* (A) при внесении в суспензию бактерий глинистых минералов палыгорскита (1) и монтмориллонита (2)

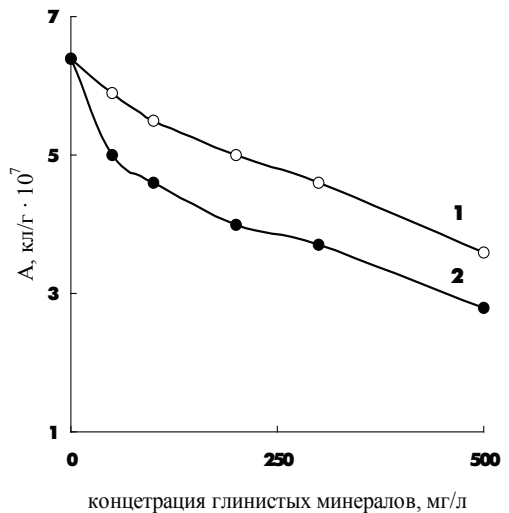
Fig. 1. Quantity of adsorbed *Azotobacter vinelandii* cells (A) at addition of clay minerals palygorskite (1) and montmorillonite (2) into bacterial suspension

Исследованные глинистые минералы отличаются по химическому составу, форме частиц, гидрофильно-гидрофобным свойствам [12] и электроповерхностным свойствам (рис.3). Поэтому установленное различие по влиянию этих материалов на процесс адгезии бактерий *A. vinelandii* можно было бы объяснить именно с этих позиций, но только в том случае если полученный эффект наблюдался и для другой культуры бактерий.

В то же время установлено (рис 2), что зависимости снижения адгезивной способности клеток *B. subtilis* к поверхности стекла для обоих глинистых минералов имеют однотипный характер. А именно, во всей изученной области концентраций глинистых минералов увеличение их содержания в суспензии бактерий приводит к постепенному уменьшению количества прикрепившихся клеток. Более того, палыгорскит эффективнее снижает адгезию бактерий данной культуры. Таким образом, вероятно, влияние глинистых минералов на процесс прикрепления клеток к адсорбенту обуславливается не только свойствами частиц глины, но также и особенностями строения поверхности бактерий.

Рис.2. Количество адсорбированных клеток *Bacillus subtilis* (A) при внесении в суспензию бактерий глинистых минералов монтмориллонита (1) и палыгорскита (2)

Fig. 2. Quantity of adsorbed *Bacillus subtilis* cells (A) at addition of clay minerals montmorillonite (1) and palygorskite (2) into bacterial suspension



Ранее было показано [6], что палыгоскит может оказывать различное влияние на адгезию некоторых метанотрофных бактерий. Так при концентрации этого минерала в суспензии бактерий *Methylomonas rubra* до 200 мг/л адгезия клеток к стеклу возрастала на 70 %. Дальнейшее увеличение содержания глинистого минерала обуславливало снижение его стимулирующего влияния на взаимодействие бактерий с твердой поверхностью. В то же время, для бактерий *Methylococcus capsulatus* ингибирующее действие глинистого минерала на адгезию клеток имеет место уже при низких концентрациях глины, аналогично эффекту, установленному для бактерий *B. subtilis* и *A. vinelandii*.

Авторами [6] было высказано предположение о том, что степень влияния глинистого минерала на процесс адгезии бактерий, очевидно, детерминирована способностью частиц глины к контактному взаимодействию с поверхностью клеток. Подобное предположение вполне обосновано, так как было установлено [2, 4], что наличие адгезии мелких частиц глины на поверхности бактерий определяет эффективность процесса коагуляции клеток и последующего их седиментационного отделения от дисперсионной среды.

Метод микроэлектрофореза позволяет установить наличие адсорбционного взаимодействия между клетками микроорганизмов и твердыми частицами [2, 13]. Одним из условий применения данного метода является наличие достоверного различия в электроповерхностных свойствах изучаемых объектов, т. е. различий в определяемой в эксперименте ЭФП бактерий и твердых частиц. В этом случае, если имеет место сорбция мелких частиц твердой фазы на поверхности клеток, ЭФП таких комплексов бактерия-дисперсный материал стремится (снижается либо увеличивается) к значению ЭФП дисперсного материала. Такая зависимость отражает процесс постепенного заполнения поверхности клеток сорбируемыми частицами при увеличении их концентрации в суспензии бактерий. Соответствие значения ЭФП клеток таковому частиц дисперсного материала указывает на образование на поверхности бактерий слоя из сорбированных частиц, что подтверждается данными электронной микроскопии [2,13].

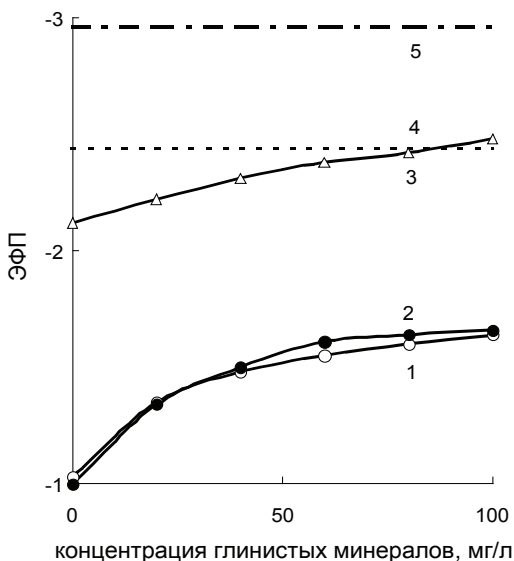


Рис.3. Электрофоретическая подвижность (ЭФП, $\mu\text{м} \cdot \text{см} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$) клеток *Azotobacter vinelandii* (1,2) и *Bacillus subtilis* (3) при внесении в их суспензию палыгорскита (1) и монтмориллонита (2, 3); ЭФП частиц палыгорскита (4) и монтмориллонита (5)

Fig. 3. Electrophoretic mobility (EPM) of *Azotobacter vinelandii* (1,2) and *Bacillus subtilis* (3) cells at addition of palygorskite (1) and montmorillonite (2, 3) into their suspension; EPM of palygorskite (4) and montmorillonite (5) particles

Результаты исследований, представленные на рис. 3, свидетельствуют о том, что сорбция частиц как монтмориллонита, так и палыгорскита на поверхности клеток азотобактера незначительная. Об этом говорит тот факт, что даже при высоких концентрациях минералов (100 мг/л) бактерии не приобретают значений ЭФП, характерных для частиц глин. Слабо выражена адгезия частиц монтмориллонита и на поверхности бактерий *B. subtilis*. Несущественное различие в электроповерхностных свойствах палыгорскита и клеток данной культуры не позволило изучить методом микроэлектрофореза наличие адсорбционного взаимодействия между данными объектами исследования.

Таким образом установлено, что поверхность клеток *A. vinelandii* и *B. subtilis* имеет низкое родство к частицам глинистых минералов. Вероятно, это и является основной причиной ингибирующего действия дисперсных материалов на адгезию данных бактерий. А именно, глинистые частицы занимают активные центры сорбции на поверхности стекла и клетки контактируют уже непосредственно с частицами. Поскольку это взаимодействие незначительное, то и прикрепление бактерий на такой модифицированной поверхности снижается.

Следовательно, результаты проведенных исследований указывают на то, что монтмориллонит и палыгорскит, являющиеся основой при приготовлении гранулированных бактериальных препаратов, снижают адгезию клеток культур *A. vinelandii* и *B. subtilis* к твердой поверхности. При наличии достаточного количества водной фазы данные дисперсные материалы не будут препятствовать распространению бактерий в прикорневой зоне, куда собственно и вносятся гранулированные микробные препараты.

ЛИТЕРАТУРА

- Глоба Л. И., Гордиенко А. С. Установка для микроэлектрофореза // Мед. техника.- 1980.— № 2.— С. 50—51.
- Глоба Л. И., Гордиенко А. С., Гарбара С. В., Ротмистров М. Н. Взаимодействие бактерий с природным черкасским монтмориллонитом при разных значениях рН среды // Микробиол. ж.— 1983.— 45, № 2. — С. 22—26.
- Глоба Л. И., Никовская Г. Н. Влияние монтмориллонита на удаление микроорганизмов из воды при коагуляции // Химия и технология воды.- 1984. — 6, № 4.— С. 316—319.
- Гордиенко А. С., Глоба Л. И., Гвоздяк П. И. Удаление бактерий из воды после ее микробиологической очистки от ПАВ // Химия и технология воды.— 1986.— 8, № 5.— С. 43—45.
- Гордиенко А. С., Курдиш И. К., Краснобрижий Н. Я. Влияние глинистого минерала палыгорскита на выживаемость клеток бактерий при их обезвоживании // Микробиол. ж.— 1990.— 52, № 5.— С. 75—78.
- Курдиш И. К., Кигель Н. Ф. Влияние глинистого минерала палыгорскита на физиологическую активность и адгезию метанотрофных бактерий // Микробиол. Ж.— 1992. — 54, № 1.— С. 73—78.
- Курдиш И. К., Антонюк Т. С. Влияние глинистых минералов на жизнеспособность некоторых бактерий при повышенных температурах // Микробиол. ж.— 1999.— 61, № 3.— С. 3—8.
- Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. Киев: КВЦ, 2001. — 140 с.
- Курдиш И. К., Рой А. О. Патент України № 54923 А. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Опубл. 17.03.2003, Бюл. № 3.
- Курдиш И. К., Бега З. Т. Патент України № 72856 А. Штам бактерій *Azotobacter vinelandii* для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Опубл. 15.04.2005, Бюл. № 4.
- Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. — М: Изд-во МГУ, 1987. — 256 С.
- Тарасевич Ю. И., Овчаренко Ф. Д. Адсорбция на глинистых минералах. — К.: Наукова думка, 1975.— 351 с.
- Marshall K. C. Studies by microelectrophoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and montmorillonite to Rhizobia // J. Gen. Microbiol.—1969.— 56, N3.— P. 301—306.



УДК 579.64:631.44

А. С. Гордієнко, Т. С. Антонюк, І. К. Курдиш

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ДСП, Д 03680, Україна, тел. 8 (044) 526 90 11,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

ВПЛИВ ГЛИНИСТИХ МІНЕРАЛІВ НА АДГЕЗИЮ БАКТЕРИЙ – КОМПОНЕНТІВ ГРАНУЛЬОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ

Реферат

Глинисті мінерали монтморилонит та палигорскіт, які застосовуються для одержання гранульованих бактеріальних препаратів, зменшують адгезію клітин *Azotobacter vinelandii* і *Bacillus subtilis* до твердої поверхні (скло). Таким чином, дані дисперсні матеріали не будуть перешкоджати розповсюдженню бактерій в прикореневій зоні, куди вносяться мікробні препарати з метою підвищення продуктивності культурних рослин.

К л ю ч о в і с л о в а: адгезія бактерій, глинисті мінерали.

A. S. Gordienko, T. S. Antonyuk, I. K. Kurdish

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Academ. Zabolotny str.,
154, Kiev, D 03680, Ukraine, tel: 8 (044) 526 90 11,
e-mail: Kurdish@serv.imv.kiev.ua

INFLUENCE OF CLAY MINERAL ON BACTERIA ADHESION – THE COMPONENTS OF GRANULATED PREPARATION FOR PLANT GROWING

Summary

Clay minerals montmorillonite and palygorskite used in production of granulated bacterial preparation decrease adhesion of *Azotobacter vinelandii* and *Bacillus subtilis* cells to the solid surface (glass). Consequently the given dispersed minerals won't prevent the bacteria distribution in plant root zone, where the microbial preparations are introduced with the purpose of productivity raising of the cultivated plants.

K e y w o r d s: bacterial adhesion, clay minerals.



УДК 579.[22:23:243:26:811.21]:546.4

І.В. Кушкевич, С.О. Гнатуш, С.П. Гудзь, О.Р. Кулачковський

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ВПЛИВ КАДМІЙ СУЛЬФАТУ НА РІСТ, ШВИДКІСТЬ ПОГЛИНАННЯ КИСНЮ ТА УЛЬТРАСТРУКТУРУ *CHROMATIUM SP.**

*Вивчено ріст бактерій *Chromatium sp.* за впливу різних концентрацій кадмій сульфату. Внесення $CdSO_4$ у середовище культивування пригнічує ріст фототрофних сіркових бактерій. Зростання вмісту $CdSO_4$ в середовищі супроводжується збільшенням швидкості поглинання кисню клітинами. Досліджено зміни ультраструктури клітин *Chromatium sp.* за впливу кадмій сульфату.*

*К л ю ч о в і с л о в а: кадмій, токсичність, *Chromatium*, ультраструктура.*

Важкі метали — одні з найнебезпечніших забруднювачів довкілля [1]. Одним з таких металів є кадмій, який потрапляє у навколишнє середовище при вилуговуванні металевих руд, мігрує у поверхневі води разом з відходами металообробних заводів, рудозбагачувальних фабрик, а також багатьох хімічних підприємств, у технологічному циклі яких його використовують [2].

Сполуки кадмію у мікрокількостях відіграють важливу роль у процесах життєдіяльності тварин і людини [2], а у високих концентраціях — токсичні та спричиняють злякисну трансформацію клітин.

У природних водах кадмій зустрічають переважно у вигляді розчинних мінеральних й органо-мінеральних комплексів. Значна частина цього токсичного металу може поглинатися клітинами мікроорганізмів різних систематичних груп. Зниження концентрації розчинених сполук кадмію відбувається за рахунок процесів сорбції, випадання в осад кадмій гідроксиду та кадмій карбонату і поглинання їх мікроорганізмами [3].

Дослідження характеру дії важких металів на мікроорганізми є важливим етапом під час вирішення багатьох екологічних проблем. До них відносять: оцінку стану довкілля, зокрема ґрунтів, пошук біологічних індикаторів техногенного забруднення для створення універсальних комплексних біотехнологій очистки водойм, ґрунтів та атмосфери від іонів металів [4].

Метою нашої роботи було вивчення впливу різних концентрацій кадмій сульфату на ріст і поглинання кисню та ультраструктуру клітин пурпурових сіркобактерій *Chromatium sp.*

* Робота частково виконана за фінансової підтримки Західноукраїнського біомедичного дослідницького центру (WUBMRC)



Матеріали і методи

У роботі використовували культуру пурпурових сіркобактерій *Chromatium* sp., виділену з водойм Яворівського сіркового родовища та ідентифіковану на кафедрі мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка [5].

Бактерії вирощували у рідкому середовищі Ван Ніля протягом 10 діб за анаеробних умов при температурі 20–23 °С і постійному освітленні. У середовище додатково вносили натрій піруват і натрій ацетат у концентрації 4 ммоль/л.

Біомасу культури визначали фотоелектроколориметричним методом на КФК-3 ($\lambda=660$ нм, оптичний шлях 3 мм). Проби для визначення відбирали через першу, другу, третю, четверту, шосту, восьму та десятю доби росту. Швидкість поглинання кисню клітинами визначали полярографічним методом. Величину дифузного струму реєстрували на полярографічній установці. Зміни напруження кисню під час досліду реєстрували за допомогою самописця КСП-4 на паперовій стрічці, швидкість руху якої була 1800 мм/год. Поглинання кисню клітинами визначали за кутом нахилу кривої. Швидкість поглинання виражали у $\text{нг O}_2/\text{хв} \cdot \text{мг клітин}$. У комірку почергово вносили 1 мл суспензії культури сіркобактерій *Chromatium* sp., які культивували при різних концентраціях CdSO_4 .

Для електронномікроскопічних досліджень клітини двічі відмивали стерильною водопровідною водою та осаджували центрифугуванням при 10 000 об/хв протягом 15 хв. Інтактні клітини фіксували в 1,5 %-му водному розчині KMnO_4 упродовж 20 хв. при кімнатній температурі. Ультратонкі зрізи отримували на ультрамікроскопі УМТП-6 і контрастували цитратом плюмбуму за Рейнольдсом [6]. Перегляд і фотографування зразків проводили на електронних трансмісійних мікроскопах УЕМВ-100 Б і ПЕМ-100 за прискорюючої напруги 75 кВ. Кінцеве збільшення на мікрофотографіях – близько 6000 разів.

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програми Origin.

Результати та їх обговорення

Виділені з водойм Яворівського сіркового родовища та ідентифіковані як *Chromatium* sp. пурпурові бактерії – поодинокі одноклітинні мікроорганізми, овальної та видовженої форм. Розміри досліджуваних бактерій становлять 4,5–6,0×8,0–15,0 мкм. Бактерії відкладають у клітинах глобули сірки (S). Розмножуються бінарним поділом (рис. 3.1). Не утворюють ендоспор. Рухаються за допомогою джгутіка.

Вплив CdSO_4 на ріст *Chromatium* sp. досліджували у концентраціях 0,5; 1; 1,5; 2,0; 2,5 мМ у середовищі Ван Ніля (рис. 1).

Найкращий ріст досліджуваної культури, як видно з рис. 1, спостерігали у контрольному середовищі (без внесення солі кадмію). У присутності 0,5 мМ CdSO_4 інтенсивність росту бактерій знизилася на 12 %, порівняно з контролем. При внесенні у середовище 1,0 та 1,5 мМ кадмій сульфату біомаса культури *Chromatium* sp. зменшилася відповідно у 1,3 та 1,6 рази, порівняно з контролем. Подальше зростання концентрації досліджуваного металу до 2,0 мМ призвело до значного уповільнення ростових процесів. За цих умов максимальною була біомаса на восьму добу і становила $2,17 \pm 0,01$ г/л. За найвищої концентрації CdSO_4 – 2,5 мМ біомаса мікроорганізмів майже не змінювалась, що свідчить про токсичний вплив кадмію у цій концентрації на ростові процеси культури.



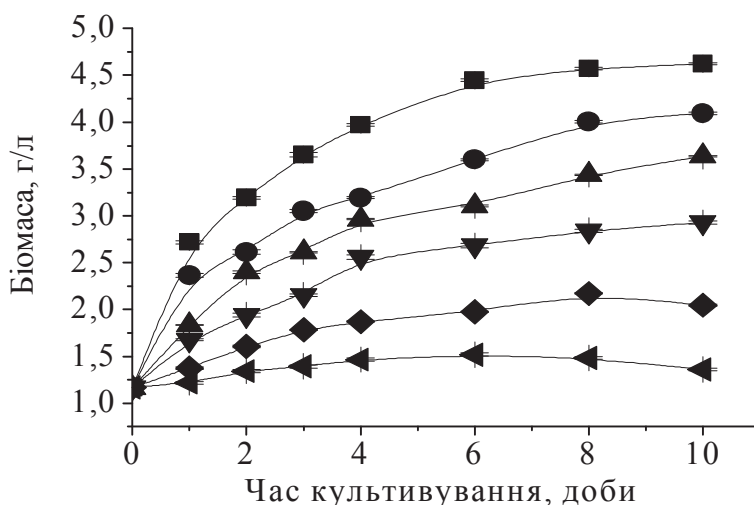


Рис. 1. Ріст культури *Chromatium* sp. у середовищі Ван Ніля за різних концентрацій CdSO_4
 ■ — контроль; ● — 0,5 мМ; ▲ — 1 мМ; ▼ — 1,5 мМ; ◆ — 2 мМ; ◄ — 2,5 мМ

Fig. 1. Growth of *Chromatium* sp. culture in Van Niel medium at different CdSO_4 concentrations
 ■ — контроль; ● — 0,5 мМ; ▲ — 1 мМ; ▼ — 1,5 мМ; ◆ — 2 мМ; ◄ — 2,5 мМ

На думку О. Б. Таширева [1] спочатку бактерії поглинають двозарядні катіони металу, які, можливо, після проникнення в клітину зв'язуються з білками цитоплазми і внутрішніми мембранними структурами або утворюють нерозчинні продукти. Через певний проміжок часу мікроорганізми адаптуються, долають інгібуючу дію сполук кадмію, та здатні акумулювати CdSO_4 у клітині в значних кількостях [7]. Виникнення стійкості до важких металів спричинене, можливо, не зниженням проникності клітинної стінки, а змінами у метаболізмі, які дозволяють клітині виживати при більш високих концентраціях металу [1]. При цьому спостерігаємо збільшення біомаси бактерій, стійких до дії цього токсичного металу. При високих концентраціях кадмію адаптація клітин проходить повільно.

Більшість пурпурових сіркобактерій анаероби [8, 9]. Але вони здатні поглинати молекулярний кисень у невеликих кількостях у темряві за наявності органічних сполук [10]. Дослідження швидкості поглинання кисню бактеріями *Chromatium* sp. за умов росту у середовищі Ван Ніля, яке містило органічні сполуки, з вищевказаними концентраціями кадмій сульфату показало, що при культивуванні бактерій без внесення CdSO_4 (контроль) швидкість поглинання кисню клітинами була найменшою (рис. 2).

Присутність у середовищі 0,5 мМ іонів кадмію призводила до підвищення швидкості поглинання кисню клітинами на першу, другу та третю добу відповідно на 6, 16 та 62 %, порівняно з контролем. Збільшення концентрації досліджуваного металу до 1,0 та 1,5 мМ пришвидшувало поглинання кисню сіркобактеріями упродовж трьох діб. Кадмій сульфат у концентрації 2,0 мМ активував здатність бактерій *Chromatium* sp. поглинати кисень. За цієї концентрації швидкість по-

глинання кисню клітинами досліджуваних мікроорганізмів збільшилася у 5,3 та 4 рази, порівняно з контролем, відповідно на першу, другу та третю доби росту. При внесенні 2,5 мМ металу відмітили найбільшу швидкість поглинання кисню бактеріями *Chromatium* sp. – $16,23 \pm 0,01$, $14,04 \pm 0,01$ та $20,93 \pm 0,01$ нг O_2 /хв · мг клітин на першу, другу та третю доби росту. Отже, збільшення концентрації металу призводить до зростання швидкості поглинання кисню клітинами сіркобактерій.

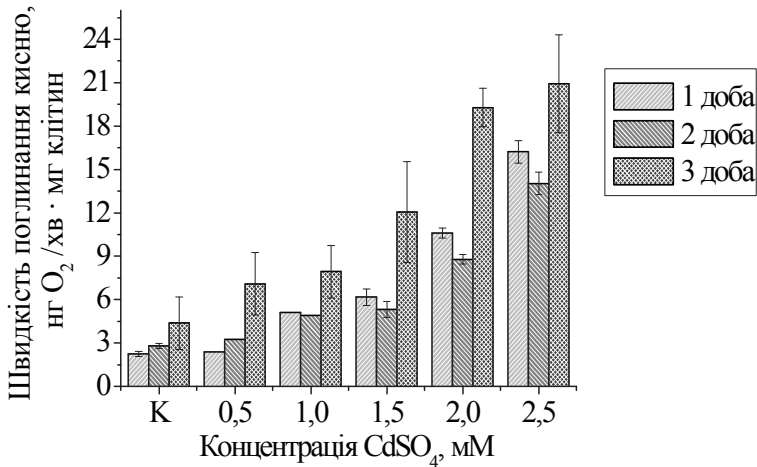


Рис. 2. Вплив $CdSO_4$ на швидкість поглинання кисню клітинами бактерій *Chromatium* sp.

Fig. 2. Influence of $CdSO_4$ on the velocity of oxygen uptake by bacteria cells *Chromatium* sp.

У пурпурових бактерій наявна типова клітинна стінка характерна для грамнегативних бактерій. Вони відкладають в клітинах глобули сірки (S) (рис. 3). Дослідження ультраструктури клітин *Chromatium* sp. під електронним мікроскопом на десяту добу культивування показало, що при внесенні солі кадмію в середовище спостерігаються суттєві зміни.

Внесення кадмію у концентрації 0,5 та 1,0 мМ призводить до порушень при поділі клітин, змінює їх форму. Збільшення концентрації іонів важкого металу до 1,5 мМ спричиняє збільшення розмірів клітини, зміну структури цитоплазми. За наявності в середовищі 2,0 мМ $CdSO_4$ клітини набувають не характерних для них форм, а при 2,5 мМ – відбувається відшарування цитоплазми від клітинної стінки.

Таким чином, досліджено вплив різних концентрацій іонів кадмію на ріст культури *Chromatium* sp. Показано, що внесення даного металу в середовище пригнічує ріст бактерій. Визначено швидкість поглинання кисню культурою сіркобактерій *Chromatium* sp. при рості у середовищі з різними концентраціями $CdSO_4$. Збільшення концентрації кадмію активує поглинання кисню клітинами досліджуваної культури. Внесення кадмію в середовище культивування викликає зміни ультраструктури клітин *Chromatium* sp.

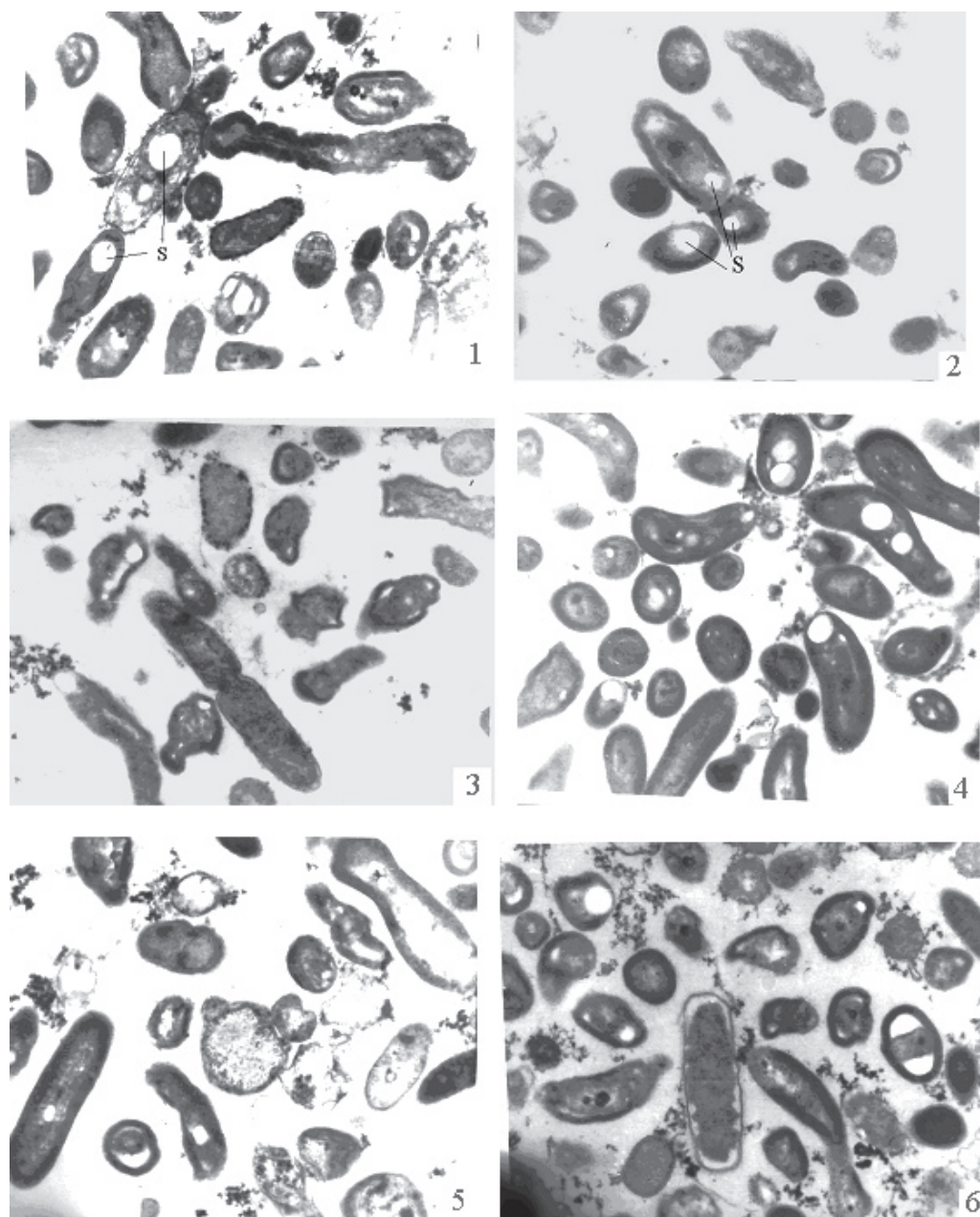


Рис. 3. Клітини *Chromatium* sp. при рості у середовищі з різними концентраціями CdSO_4 :
 1 – контроль; 2 – 0,5 мМ; 3 – 1,0 мМ; 4 – 1,5 мМ; 5 – 2,0 мМ; 6 – 2,5 мМ;
 S – глобули сірки (електронна мікроскопія, $\times 6\ 000$)

Fig. 3. *Chromatium* sp. cells during the growth in the medium with different CdSO_4 concentrations:
 1 – control; 2 – 0,5 mM; 3 – 1,0 mM; 4 – 1,5 mM;
 5 – 2,0 mM; 6 – 2,5 mM; S – sulfur globules (electronic microscope, $\times 6\ 000$)

ЛІТЕРАТУРА

1. Таширеєв А. Б. Взаємодія мікроорганізмів з металами // Мікробіологічний журнал. — 1995. — № 2. — С. 95-101.
2. Таширеєв О. Б. Біотехнології очищення промислових стічних вод на основі термодинамічного прогнозування взаємодії мікроорганізмів з металами та радіонуклідами: Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня доктора технічних наук. — К. 2005. — 42 с.
3. Іутинська Г. О., Антипчук А. Ф., Валагурова Е. В., Козырицька В. Е., Петруша З. В. Відновлення біологічних функцій ґрунтів, забруднених важкими металами // Агротехнімія і ґрунтознавство: Спец. випуск до V з'їзду УТГА (Рівне, 6-10 липня 1998 р.). — Харків: УААН. — 1998. — С.93-95.
4. Иутинская Г. А., Антипчук А. Ф., Валагурова Е. В., Козырицька В. Е., Петруша З. В. Использование микроорганизмов как биотестов на загрязнение почв тяжелыми металлами // Материали Междунар. конф. «Проблеми мікробіології і біотехнології». — Минск: Микробио. — 1998. — С.170-172.
5. Гудзь С. П., Коструба М. Ф., Гнатуш С. О. та ін. Сіркові бактерії Яворівського сіркового родовища та проблеми рекультиватії земель // Вісник Одеського університету. Серія Біологія. — 2002. — Вип. 10. — № 4. — С. 72-75.
6. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscope // Joun. Cell Biol. — 1963. — Vol. 17. — P. 208-212.
7. Іутинська Г. О., Петруша З. В. Резистентність ґрунтових мікроорганізмів до забруднення ґрунтів важкими металами // Мікробіол. журн. — 1999. — Т. 61. — № 5. — С. 72-77.
8. Кондратьєва Е. Н. Фотосинтезирующие бактерии. М.: Изд-во. Москов. ун-та. — 1989. — С. 82-103.
9. Кушкевич І. В. Вплив атмосферного кисню на аноксигенні фототрофні пурпурові сіркобактерії // Матеріали наукової конференції студентів біологічно факультету Львівського національного університету імені Івана Франка (21 квітня 2004 року). — Львів. 2004. — С.47 — 51.
10. Петушкова Ю. П., Ивановский Р. Н. Дыхание клеток *Thiocapsa roseopersicina* // Микробиология. — 1976. — Вып. 1. — С. 389 — 395.

І.В. Кушкевич, С.А. Гнатуш, С.П. Гудзь, О.Р. Кулачковський

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

ВЛИЯНИЕ КАДМИЙ СУЛЬФАТА НА РОСТ, СКОРОСТЬ ПОГЛОЩЕНИЯ КИСЛОРОДА И УЛЬТРАСТРУКТУРУ *CHROMATIUM* SP.

Реферат

Исследовано рост бактерий *Chromatium* sp. под влиянием различных концентраций кадмий сульфата. Внесение $CdSO_4$ в среду культивирования угнетает рост фототрофных серобактерий. Увеличение содержания $CdSO_4$ в среде сопровождается увеличением скорости поглощения кислорода клетками.

Исследовано изменения ультраструктуры клеток *Chromatium* sp. под влиянием кадмий сульфата.

К л ю ч е в ы е с л о в а: кадмий, токсичность, *Chromatium*, ультраструктура.



I.V. Kushkevych, S.O. Hnatush, S.P. Gudz, O.R. Kulachkovsky

Ivan Franko National University of Lviv,
4, Hrushevskiyi Str., Lviv, 79005, Ukraine, tel.: 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: Ivan_Kushkevych@ukr.net

**INFLUENCE OF CADMIUM SULFATE ON THE GROWTH,
VELOCITY OF OXYGEN UPTAKE AND ULTRASTRUCTURE
OF *CHROMATIUM* SP.**

Summary

The growth of bacteria *Chromatium* sp. under the influence of different cadmium sulfate concentrations is investigated. The addition of CdSO_4 to the medium inhibits the growth of phototrophic sulfur bacteria. The increase of CdSO_4 content in the medium leads to the increase of oxygen uptake velocity.

The changes in the ultrastructure of *Chromatium* sp. cells under the influence of cadmium sulfate are investigated.

Key words: cadmium, toxicity, *Chromatium*, ultrastructure.



УДК 632: 630.44

И.И. Гуляева¹, Г.А. Снигур^{2,3}, В.П. Полищук^{2,3}, Б.Н. Милкус¹

¹ Одесский государственный аграрный университет, ул. Пантелеймоновская, 13, Одесса, 65012, Украина;

² Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина; тел.: 8 (048) 717 13 88, e-mail: lvirus@biocc.univ.kiev.ua

³ Институт защиты растений УААН, ул. Васильковская, 33, Киев, 03022, Украина.

ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ ЗЕРНОВЫХ В ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ

На посевах пшеницы и ячменя в Одесской области обнаружены вирусы желтой карликовости ячменя, полосатой мозаики пшеницы и мозаики костра. Часто наблюдалась смешанная инфекция. Вирусы идентифицированы с помощью иммуноферментного анализа. Показана зависимость степени поражения растений вирусами от сроков посева.

К л ю ч е в ы е с л о в а: вирус желтой карликовости ячменя, вирус полосатой мозаики пшеницы, вирус мозаики костра, иммуноферментный анализ.

Вирус желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ) — один из наиболее опасных возбудителей заболеваний зерновых культур во всем мире. Заболевание вызывает комплекс вирусов, который состоит из штаммов вируса желтой карликовости ячменя (BYDV-MAV и BYDV-PAV) и вируса желтой карликовости зерновых (CYDV-RPV). Вирус находится во флоэме и переносится тлями [7]. Штаммы BYDV-PAV распространены во многих странах мира. В Украине ВЖКЯ на посевах зерновых выявлен Г.А. Снигур [4]. Визуально диагностировать ВЖКЯ невозможно, так как аналогичные симптомы могут быть вызваны другими вирусами, грибами и даже абиотическими факторами [8]. Заболевание часто бессимптомно, концентрация вируса в растении низкая [1].

Вирус полосатой мозаики пшеницы (ВПМП), который переносится клещом *Aceria tulipae*, был выявлен в 60-е гг. XX века в республиках бывшего СССР [2] и в Румынии [10], а в начале 70-х гг. обнаружен во многих странах. В Украине ВПМП обнаружен Л. Т. Мищенко [3]. В последние годы широкое распространение этого вируса отмечено в южно-европейских странах [6, 11], причем у восьми генотипов установлена передача ВПМП семенами от 0,5 до 1,5 % [9].

У большинства зерновых культур вирус мозаики костра (ВМК) вызывает симптомы хлоротичности, мозаики и деформации листьев, задержку роста и кустистость. Устойчивая циркуляция ВМК в природе осуществляется посредством имаго и личинок пшавицы (*Ouleta melanopus* L.), способных переносить вирус с дикорастущих однодольных сорняков на культурные зерновые. ВМК заражает



виды растений из сем. Gramineae, принадлежащих к 50 родам. Из двудольных в круг растений-хозяев входит несколько родов из шести семейств. В природе вирус сохраняется на многолетних сорняках-резерваторах: *Bromus inermis*, *Aegilops cylindrica* и другие [5]. Широкая специализация ВМК позволяет ему заражать широкий круг культурных растений, однако вредоносность вируса документально пока не доказана.

Цель исследований заключалась в выявлении вирусов зерновых на посевах озимой и яровой пшеницы и озимого и ярового ячменя в Одесской области.

Материалы и методы

Вирусные болезни зерновых культур в агроценозах могут существенно снижать урожай, нарушая процесс образования зерна и ухудшая его качество. Для идентификации вирусных болезней зерновых обычно используют биологические (визуальная диагностика, тли-переносчики) и инструментальные (электронная микроскопия, серология) методы. В настоящее время наиболее доступным, достаточно специфичным и надежным является иммуоферментный анализ (ИФА). Преимущество иммунологических методов заключается в скорости получения результата в сочетании с высокой специфичностью.

С целью выявления вирусов, поражающих озимую и яровую пшеницу, озимый и яровой ячмень в хозяйствах Ананьевского, Килийского, Беяевского и Овидиопольского районов Одесской области посева были обследованы следующим образом: по диагонали поля на каждые 100 га посева выделяли 8–10 учетных участков размером 0,5 x 0,5 м, на которых отбирали растения с симптомами вирусных и вирусоподобных заболеваний, а также внешне здоровые растения. Отбор образцов для последующей идентификации вирусов, проводили во второй декаде мая 2008 года. Собранные образцы высушивали и сохраняли при комнатной температуре, а также хранили в замороженном виде, при температуре 18 °С.

Для идентификации вирусов применяли «сэндвич»-метод иммуоферментного анализа, с использованием диагностических наборов Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина (ИБХ, Россия), Наборы включали моноклональные антитела и конъюгаты с пероксидазой 4В5 и 4В5-ПХ для выявления штаммов PAV и SGV вируса желтой карликовости ячменя и 4В6 и 4В6-ПХ для выявления штаммов MAV, RPV и RMV этого же вируса. В качестве экстрагирующего буфера использовали 0,1 М фосфатный буфер pH 7,0. Антитела и конъюгат разводили по методике ИБХ. Так как антитела были конъюгированы с пероксидазой, учет проводили на приборе DYNATEC (США) при 492 нм. Для определения вируса желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ), вируса полосатой мозаики пшеницы (ВПМП), вируса штриховатой мозаики ячменя (ВШПМЯ) и вируса мозаики костра (ВМК) использовали коммерческие диагностические наборы фирм Agdia (США) и Loewe (Германия). В связи с тем, что поликлональные антитела были конъюгированы со щелочной фосфатазой, продукт ферментативной реакции измеряли при 405 нм. Реакцию считали положительной в том случае, если показатель оптической плотности при анализе тестируемых растений превышал отрицательный контроль не менее, чем в 2 раза.

Результаты и их обсуждение

В результате визуальных обследований посевов зерновых культур в 4 районах Одесской области обнаружены растения с симптомами вирусной инфекции.



Идентификация вирусов, как было указано выше, проведена с помощью различных тест-систем. Использование тест-системы с моноклональными антителами Института биоорганической химии (Россия) позволила выявить в посевах озимой и яровой пшеницы, озимого и ярового ячменя в Одесской области обе группы штаммов ВЖКЯ: PAV + SGV и MAV+ RPV+ RMV. Установить наличие каждого из штаммов в отдельности не представлялось возможным, так как тест-система была получена на группы штаммов. Поликлональные тест-системы к штаммам ВЖКЯ, полученные в лаборатории вирусологии Киевского национального университета имени Т.Г. Шевченко подтвердили возможность их использования для диагностики ВЖКЯ, который был обнаружен на посевах озимой пшеницы сортов Одесская 267, Селянка, Знахидка, Куяльник, на яровом ячмене сорта Вакула и на озимом ячмене сортов Основа и Абориген. В результате проведенных исследований было установлено, что поражение растений ВЖКЯ составило 41,4 %. Чаще всего вирус выявляли в Беляевском районе.

Вирус полосатой мозаики пшеницы и вирус мозаики костра были обнаружены на озимой пшенице сортов Альбатрос Одесский, Одесская 267, Знахидка, Куяльник и Селянка, а также на озимом ячмене сортов Основа и Абориген. Процент растений зараженных этими вирусами почти не отличался и составил для ВПМП 44,8 %, а для ВМК 48,2 %. Однако степень распространения ВПМП и ВМК в обследованных районах Одесской области была разной. Так, в хозяйствах Ананьевского, Беляевского и Овидиопольского районов идентифицировано 3 вируса (ВЖКЯ, ВПМП и ВМК), а в посевах Килийского района определён только вирус мозаики костра.

Исследования показали наличие смешанной инфекции ВПМП +ВМК и ВПМП + ВМК + ВЖКЯ. Около 7 % образцов были поражены одновременно ВПМП и ВЖКЯ, и только 3 % образцов поражены ВЖКЯ совместно с ВМК.

Результаты идентификации вирусов зерновых при разных сроках сева показали 100-процентное поражение озимой пшеницы ВЖКЯ, посеянной в конце сентября (табл. 1). При более поздних сроках сева озимой пшеницы поражённость ВЖКЯ была намного ниже.

Таблица 1

Выявление вирусов зерновых культур на пшенице разных сроков сева

Table 1

Revealing of grains viruses on wheat of different sowing terms

С о р т	Сроки сева											
	25.09.07			5.10.07			15.10.07			25.10.07		
	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ
Одесская 267	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Селянка	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
Знахидка	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
Куяльник	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+

Однако озимый ячмень оказался наиболее поражен ВЖКЯ, ВПМП и ВМК при последнем сроке сева в начале ноября (табл. 2).



Таблица 2

Выявление вирусов зерновых культур на ячмене

Table 2

Revealing of grains viruses on barley

Сорт	Сроки сева											
	10.10.07			17.10.07			20.10.07			1.11.07		
	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ	ВПМП	ВЖКЯ	ВМБ
Основа	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Абориген	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+

Причиной этого может быть плохое физиологическое состояние растений в связи с очень поздним сроком сева, и, как результат, высокая восприимчивость этих растений к возбудителям вирусных инфекций. Не исключено, что озимый ячмень с очень поздним сроком сева был поражен вирусами в весенний период вегетации. Представляет интерес и тот факт, что ВПМП и ВМК наиболее поражена озимая пшеница, посеянная 15 октября, но при этом на этих же растениях не идентифицирован ВЖКЯ. Возможно, это оптимальный срок сева озимых зерновых культур с целью их защиты от поражения ВЖКЯ. Однако при этом возникает благоприятная экологическая ниша для других вирусов.

Таким образом, на посевах пшеницы и ячменя в ряде районов Одесской области обнаружены как смешанные ВЖКЯ+ВПМП+ВМК, ВПМП+ВМК, так и моно- ВЖКЯ, ВПМП и ВМК инфекции. Дальнейшее изучение сроков сева пшеницы и ячменя позволит рекомендовать наиболее оптимальные из них для снижения вредоносности вышеуказанных вирусов, и установить вредоносность каждого из вирусов в отдельности при смешанной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кастальева, Т. Б. Т. Б., Ерохина Т. Н., Васильева Т. Я., Можаяева К. А. Диагностика вируса желтой карликовости ячменя с помощью иммуноферментной тест-системы на основе моноклональных антител. // Доклады Россельхозакадемии — 1966. — № 5. — С. 19-21.
2. Развязкина Г. М., Карпова Е. А., Белянчикова Ю. В. Вирус полосатой мозаики пшеницы. // Защита растений от вредителей и болезней. — 1963, — № 9. — С. 54-55.
3. Мищенко Л.Т. Вирус полосатой мозаики пшеницы в Украине и его биологические свойства //Защита растений. — Минск, 2006. — Вып. 30, Ч. 1 — С. 263-266.
4. Снигур Г. А. Епідеміологія вірусів зернових культур в агроценозах України. Автореферат здобуття наук. ступ. канд. біол. наук, Київ, 2006. — 20 с.
5. Цыпленков А. Е. Профилактика вирусных болезней зерновых культур //АГРО. — 1999.— Т. 21, № 4. — С. 16-17.
6. Bakardjieva N., Krasteva C, Habekuss A., Rabenstein F. Detection of cereal viruses and study of aphid population in Bulgaria //Bulgarian J. Agricultural Science. — 2004. — № 10. — P. 161—164.
7. D'Arcy C. J, Domier L. L, and Torrance L. Detection and diagnosis of luteoviruses // In: Smith H. G. and Barker H (eds) The Luteoviridae. CAB International Publishing, Oxford, UK. — 1999. — Pp. 147-168.
8. Irwin M. E., Tresh J, M. Barley yellow dwarf virus epidemiology: a study in economical complexity. /In: BYDV in West Asia and North Africa. (A Commeau and K. M. Makkouk (eds). Syria. ICARD. — 1992.— P. 234-278.
9. Jones R. A. C, Coulls B, A., Mackie A. E, Dwyer G. I. Seed transmission of Wheat streak mosaic virus shown unequivocally in wheat // Plant Dis. — 2005.— Vol. 89. № 10. — P. 1048-1050.



10. Pop I. Die Strichelvirose des Weizens in der Rumanischen Volksrepublik. //Phytopathol. — 1962, — № 43. — P. 325-336.

11. Rabenstein RSeifers D. L., Schubert J. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography tritritimoviruses // J. Gen. Virol. — 2002, — Vol. 83. № 6. — P. 895-906.

I.I. Гуляева¹, Г.О. Снігур^{2,3}, В.П. Поліщук^{2,3}, Б.Н. Мілкус¹

¹Одеський державний аграрний університет,¹, вул. Пантелеймонівська, 13, Одеса, 65012, Україна.

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирівська, 64, Київ 01033, Україна; тел.: 8 (048) 717 13 88, e-mai: lvirus@biocc.univ.kiev.ua

³ Інститут захисту рослин УААН, вул. Васильківська, 33, Київ, 03022, Україна

ВИРУСНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ЗЕРНОВИХ В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ

Реферат

В результаті обстеження посівів різних сортів озимої пшениці, озимого та ярового ячменю в ряді районів Одеської області було встановлено, що вони уражені ВЖКЯ, ВСМП і ВМБ. Вірус штрихуватої мозаїки ячменю у відібраних зразках не виявлений. Часто спостерігалась змішана інфекція ВЖКЯ+ВСМП+ВМБ і ВСМП+ВМБ. Показана залежність ступеню ураження рослин вірусами від строків сівби. Для зниження шкодочинності вищевказаних вірусів рекомендується змінювати строки сівби, що дозволить не допустити їх поширення.

К л ю ч о в і с л о в а: вірус жовтої карликовості ячменю, вірус смугастої мозаїки пшениці, вірус мозаїки бромусу, імуноферментний аналіз.

I.I. Guljaeva¹, H.O. Snigur^{2,3}, V.P. Polischuk^{2,3}, B.N. Milkus¹

¹Odesa State Agrarian University, Panteleymonivska Str.,13, Odesa, 65012, Ukraine.

²T.G. Schevtchenko Kyiv National University, Volodumyrska Str., 64, Kyiv, 01033, Ukraine;

phone: 8 (048) 717 13 88, e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

³Institute of plant protection UAAS, Vasylkivska Str., 33, Kyiv, 03022, Ukraine.

VIRUSES DISEASES OF GRAINS IN THE ODESA REGION

Summary

As a result of inspection of various crop cultivars of winter wheat, winter and summer barley in a number of a districts of Odesa regions it has been established that they are infected by barley yellow dwarf virus (BYDV), wheat streak mosaic virus (WSMV) and brome mosaic virus (BMV). The barley strip mosaic virus was not found out in the selected samples. Mixed infection by BYDV+ WSMV + BMV and WSMV + BMV was often observed. It is recommended to change the sowing terms for decreasing of injuriousness of the above-mentioned viruses that will allow to prevent the viruses distribution.

К e y w o r d s: barley yellow dwarf virus, wheat streak mosaic virus, brome mosaic virus, ELISA test.



О.А. Дрегваль, Н.В. Черевач, А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені О. Гончара,
просп. Гагарина, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,
тел.: 8 (056) 37 31 266; e-mail: a_vinnikov@ukr.net

СУМІСНА ДІЯ ШТАМІВ ЕНТОМОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ І ГРИБІВ

*Із загиблих личинок та імаго колорадських жуків виділено штами ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* і грибів *Beauveria bassiana*. Показано, що сумісне застосування цих мікроорганізмів значно розширює спектр їхньої інсектицидної дії. Отримані результати вказують на можливість використання досліджених штамів для розробки комплексного мікробного препарату для захисту рослин від шкідливих комах та кліщів.*

*Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, комплексне застосування, інсектицидна дія.*

Серед ентомопатогенних мікроорганізмів найбільш перспективними для розробки біоінсектицидів вважаються бактерії *Bacillus thuringiensis*. Проте недостатком біопрепаратів на їх основі є вузький спектр дії, що пов'язано з продукцією бактеріями кристалічних білків, високоспецифічних по відношенню до певних видів комах [4, 5]. Розширити спектр дії препаратів можна за рахунок комплексного використання *B. thuringiensis* з іншими ентомопатогенами. Серед них особливо виділяються мускардинні гриби *Beauveria bassiana*, здатні уражати комах на всіх стадіях розвитку та проявляти виражену післядію на популяції шкідників. Але ці гриби, порівняно з бактеріями, в меншій мірі гальмують трофічну активність шкідників [1]. Вищесказане свідчить про доцільність розробки комплексних препаратів на основі ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* та грибів *B. bassiana*.

Метою даної роботи було виділення високоактивних штамів ентомопатогенних бактерій і грибів із природних джерел та дослідження можливості їх сумісного застосування для захисту рослин.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами дослідження служили штами ентомопатогенних бактерій *B. thuringiensis* та грибів *B. bassiana*, виділені із загиблих колорадських жуків. Інсектицидну активність визначали в лабораторних умовах при зараженні личинок II-III віку комах шкідників (колорадського жука, листокрутки всеїдної, американського білого метелика, горностаєвої плодової молі) методом вільного поїдання корму, зволоженого суспензією спор та кристалів ендотоксину *B. thuringiensis* чи бластоспор *B. bassiana* (титр суспензії 1×10^8 спор/мл). Корм для контрольних комах зволожували водою. Інсектицидну активність визначали за відсотком загибелі комах на 2–10 добу.



В дослідіах по сумісному зараженню комах загальна концентрація ендоспор і кристалів *B. thuringiensis* та бластоспор *B. bassiana* в суспензії, якою обробляли корм, складала 1×10^7 в одному мілілітрі (співвідношення 1:1). Одночасно проводили зараження кожним із компонентів бактеріально-грибного комплексу в тій же концентрації. Комплексну дію *B. thuringiensis* та *B. bassiana* проти шкідників рослин захищеного ґрунту вивчали у мікровегетаційних дослідіах на личинках II-III віку тютюнового трипса та особинах різного віку звичайного павутинного кліща. Загальна концентрація ендоспор, кристалів ендотоксину *B. thuringiensis* та бластоспор *B. bassiana* складала 1×10^8 в одному мілілітрі (співвідношення 1:1). Розрахунок проводили за формулою: $M=100 \times (1-K_1/K_2 \times P_2/P_1)$, де M — смертність, %; K_1, K_2 — кількість живих особин до і після обробки в контролі; P_1, P_2 — кількість живих особин до і після обробки в досліді [3].

Результати та їх обговорення

Із загиблих личинок та імаго колорадських жуків було виділено чисті культури грампозитивних споро- та кристалоутворювальних бактерій, ідентифікованих як *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* та грибів, які були віднесені до виду *Beauveria bassiana*. Для перевірки вірулентності отриманих культур бактерій проведено зараження личинок колорадських жуків у лабораторних умовах. Відібрано 3 найбільш активних штами і перевірена їхня інсектицидна активність по відношенню до листокрутки всеїдної — представника ряду Лусоккрилих комах та колорадського жука — представника ряду жорсткокрилих (табл. 1).

Таблиця 1

Інсектицидна активність штамів *B. thuringiensis* (n = 5)

Table 1

Insecticidal activity of *B. thuringiensis* strains (n = 5)

Штам	Загибель комах, %			
	Колорадський жук		Листокрутка всеїдна	
	4 доба	7 доба	4 доба	7 доба
<i>B-1</i>	46,6 + 3,0	62,7 + 3,4	25,0 + 3,2	35,0 + 1,7
<i>B-2</i>	61,3 + 2,5	86,7 + 2,1	33,3 + 2,7	51,6 + 3,2
<i>B-3</i>	57,3 + 4,0	78,7 + 2,5	11,7 + 1,7	30,0 + 4,3
Контроль	0	4,0 + 1,6	0	6,7 + 2,7

Найбільшу інсектицидну активність до колорадського жука виявив штам *B. thuringiensis* B-2, який також показав помірну активність проти листокрутки всеїдної. Порівнюючи інсектицидну активність виділених штамів бактерій з наведеними в літературі даними [2] слід зазначити, що рівень інсектицидності досліджених штамів достатньо високий, щоб вважати їх перспективними для розробки біоінсектицидного препарату. Значною перевагою виділених штамів, особливо штаму *B. thuringiensis* B-2 є те, що він виявився активним по відношенню до представників двох рядів комах — Жорсткокрилих та Лусоккрилих, що зустрічається не часто. Серед більшості природних ізолятів *B. thuringiensis* переважають специфічні до певного ряду шкідників [4]. Для подальшої роботи було відібрано штам *B. thuringiensis* B-2, проведено мутагенез із застосуванням УФ-опромінення та отримано мутантний штам



В-10, який давав 97 % загибель листокрутки всеїдної, не знижуючи активність проти колорадського жука.

Інсектицидну активність 12-ти виділених штамів *B. bassiana* вивчали по відношенню до личинок листокрутки всеїдної. Комахи були високочутливими до всіх виділених культур. Загибель гусені складала 6,7 – 36,7 % на 2 добу, 96,7 – 100 % на 5 добу. Оскільки усі штами були високоактивними по відношенню до досліджуваних комах, відбір продуценту проводили за технологічними характеристиками. Для подальших досліджень відібрано штам *B. bassiana* F-6, проростання конідій якого відбувалося на 2 добу, початок спороутворення відмічався на 5 добу, масове утворення конідій закінчувалося на 21 добу. При культивуванні у глибинних умовах культура утворювала значну кількість бластоспор ($1,5-4,0 \times 10^8$ спор/мл) на 3 – 5 добу.

З метою отримання комплексного біоінсектицидного препарату, ефективного проти широкого кола шкідників, досліджувався вплив бактеріально-грибного комплексу на личинок колорадського жука, американського білого метелика, листокрутки всеїдної, горностаєвої плодової молі. Виявилось, що *B. thuringiensis* та *B. bassiana* можуть підсилювати дію один одного (табл. 2).

Таблиця 2

Комплексна інсектицидна дія *B. thuringiensis* В-10 та *B. bassiana* F-6

Table 2

Combined insecticidal action of *B. thuringiensis* B-10 and *B. bassiana* F-6

Ентомопатогени	Загибель личинок, %			
	Колорадський жук (7 доба)	Американський білий метелик (10 доба)	Листокрутка всеїдна (4 доба)	Горностаєва плодова міль (6 доба)
<i>B. thuringiensis</i>	66,7 + 2,1*	40,0 + 2,7*	92,0 + 0,7	92,8 + 2,7
<i>B. bassiana</i>	64,0 + 1,6*	67,0 + 3,4	68,0 + 3,3*	26,4 + 2,0*
Комплекс <i>B. thuringiensis</i> та <i>B. bassiana</i>	77,3 + 1,6	69,0 + 2,9	93,3 + 2,1	93,6 + 2,7
Контрольні комахи	5,3 + 1,3	7,0 + 2,0	6,7 + 0,6	7,2 + 1,5

Примітка: *- $P < 0,05$ достовірно в порівнянні з комплексом патогенів, $n = 5$.

Note: * – $P < 0,05$ statistically significant in comparison with complex of pathogens, $n = 5$.

Смертність личинок колорадського жука при сумісній дії патогенів (77,3 %) перевищувала смертність, отриману при обробці кожним з компонентів комплексу (66,7 та 64,0 % для *B. thuringiensis* та *B. bassiana*, відповідно). Наші результати узгоджуються з повідомленням С. В. Гораль про високу ефективність комбінованого застосування боверіну з препаратами на основі *B. thuringiensis* (бітоксисабациліном та новодором) проти колорадського жука [1]. При сумісному зараженні *B. thuringiensis* та *B. bassiana* листокрутки всеїдної, американського білого метелика та горностаєвої плодової молі спостерігалось продуктивне співіснування ентомопатогенів, явного пригнічення дії один одного не відмічалось. Американський білий метелик був більш чутливим до *B. bassiana*, а листокрутка всеїдна та горностаєва плодова міль – до *B. thuringiensis*. Суміш мікроорганізмів призводила до отримання того ж результату, що і при зараженні більш сильним із двох патогенів.



Дослідження інсектицидної дії *B. thuringiensis* та *B. bassiana* проти шкідників закритого ґрунту показало, високу ефективність *B. thuringiensis* до павутинного кліща та низьку до трипсу (табл. 3). Згубна дія *B. bassiana* на обох шкідників була високою і приблизно однаковою (близько 71 % смертності). При сумісному застосуванні бактерії та гриби не пригнічували дію один одного (90,2 % загибелі павутинного кліща і 72,2 % – тютюнового трипса).

Таблиця 3

Комплексна дія *B. thuringiensis* B-10 та *B. bassiana* F-6 проти шкідників захищеного ґрунту

Table 3

Combined action of *B. thuringiensis* B-10 and *B. bassiana* F-6 against greenhouse pests

Ентомопатогени	Смертність, %	
	Павутинний кліщ	Тютюновий трипс
<i>B. thuringiensis</i>	91,2 ± 1,0	39,9 ± 1,9*
<i>B. bassiana</i>	70,7 ± 1,6*	71,1 ± 3,0
Комплекс <i>B. thuringiensis</i> та <i>B. bassiana</i>	90,2 ± 1,8	72,2 ± 4,0

Примітка: * P<0,05 достовірно в порівнянні з комплексом патогенів, n = 5.

Note: * P<0,05 statistically significant in comparison with complex of pathogens, n = 5.

Підводячи підсумки випробувань, можна узагальнити, що суміш *B. thuringiensis* та *B. bassiana* є високоефективною по відношенню до всіх 6 досліджених видів шкідників, тоді як кожен з компонентів суміші ефективно вражав меншу кількість шкідників: *B. bassiana* була високоактивною до двох, а *B. thuringiensis* – до трьох видів шкідників (рис.1).

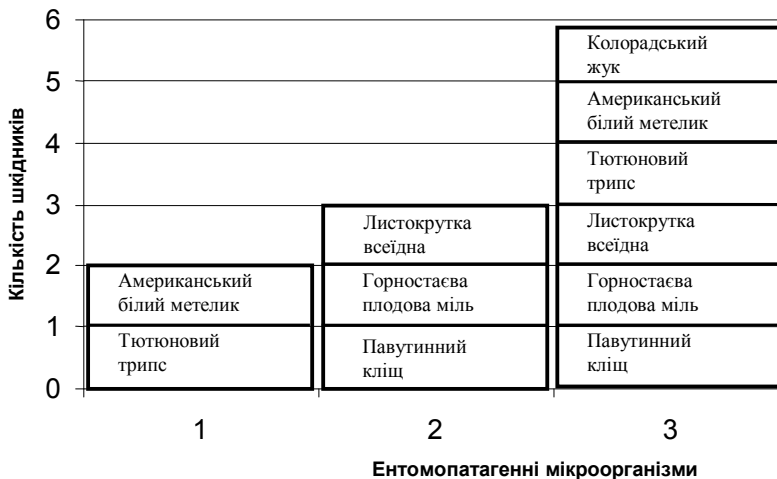


Рис. 1. Шкідники, які найбільш чутливі до дії *B. bassiana* F-6 (1) *B. thuringiensis* B-10 (2) та суміші цих мікроорганізмів (3).

Fig.1. Pests mostly susceptible to *B. bassiana* F-6 (1) *B. thuringiensis* B-10 (2), and their mixture

Таким чином, проведені дослідження показали, що сумісне застосування *B. thuringiensis* B-10 і *B. bassiana* F-6 дозволяє розширити спектр інсектицидної дії цих мікроорганізмів за рахунок поєднання декількох інсектицидних факторів цих патогенів, що дає підставу виділені та досліджені штами використати як основу для розробки комплексного мікробіологічного препарату для захисту рослин від шкідливих комах та кліщів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гораль С. В. Обґрунтування прийомів оптимізації малотоннажної технології виробництва грибних і бактеріальних засобів захисту рослин: Автореф. дис. канд. с.-г. наук. К., 1998. — 17 с.
2. Патыка Т. И., Татарин Л. Н., Кузнецова Л. Н., Шерстобоева Е. В., Патыка В. Ф. О технологичности высокоактивных штаммов *Bacillus thuringiensis* как основы для производства битоксибациллина // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології. — 1999. — № 4. — С. 33 — 35.
3. Патыка Т.И., Машко Н. О., Надкерничний С. П. Біологічний контроль колорадського жука (*Leptinotarsa decemlineata*) на посівах картоплі // Агроекологічний журнал. — 2003. — № 2. — С. 61 — 64.
4. Kaur S. Molecular approaches towards development of novel *Bacillus thuringiensis* biopesticides // World Journal of microbiology and Biotechnology. — 2000. — № 16. — P. 781 — 793.
5. Navon A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection — reality and prospects // Crop Protection. — 2000.- Vol. 19. P.— 669 — 676.

УДК 632.937.1:663.18

О.А. Дрегваль, Н.В. Черевач, А.И. Винников

Днепропетровский национальный университет имени О. Гончара
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина
тел.: 8 (056) 37 31 266; e-mail: a_vinnikov@ukr.net

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ШТАММОВ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ГРИБОВ

Реферат

Из погибших личинок и имаго колорадских жуков выделены штаммы энтомопатогенных бактерий *Bacillus thuringiensis* и грибов *Beauveria bassiana*. Показано, что совместное использование этих микроорганизмов значительно расширяет спектр их инсектицидного действия. Полученные результаты указывают на возможность использования исследуемых штаммов для разработки комплексного микробного препарата для защиты растений от вредных насекомых и клещей.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, комплексное применение, инсектицидное действие.



УДК 632.937.1:663.18

O.A. Dregval, N.V. Cherevach, A.I. Vinnikov

O. Gonchar Dnipropetrovsk National University, Gagaryna Pr., 72,
Dnipropetrovsk, 49050, Ukraine
тел.: 8 (056) 37 31 266; e-mail: a_vinnikov@ukr.net

COMBINED ACTION OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIAL AND FUNGAL STRAINS

Summary

Entomopathogenic *Bacillus thuringiensis* bacteria and *Beauveria bassiana* fungi have been isolated from the dead Colorado potato beetle larvae and adults. It has been shown the combined using of these microorganisms widen the spectrum of their insecticidal effect. The obtained results suggest the possibility of using the investigated strains for the development of a complex microbial bioinsecticide to protect the plants against the insect pests and mites.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, combined using, insecticidal influence.



УДК 576.89:597(261)

**Г.В. Лісютін, А.Є. Бухтіяров, С.О. Білоіваненко,
Л.П. Пономарьова, Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua

НАФТОВЕ ЗАБРУДНЕННЯ І ГЕТЕРОТРОФНА МІКРОБІОТА АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЙНИЙ

Досліджено загальний і фракційний вміст рідких вуглеводнів, загальну мікробну чисельність гетеротрофних бактерій і найбільш імовірне число бактерій, що окиснюють нафту, в акваторії острова Зміїний. Встановлено, що вміст нафти у воді досліджених станцій перевищував значення гранично допустимих концентрацій.

Ключові слова: морська вода, нафтове забруднення, бактерії, острів Зміїний

Розвиток інфраструктури та урбанізація острова Зміїний сприяє посиленню антропогенного навантаження, що може призвести до значного забруднення прибережних вод різноманітними політантами та знищити їхню рекреаційну цінність. Серед джерел забруднення нафтою й нафтопродуктами акваторії острова можна виділити втрати при вантажно-розвантажувальних роботах із суден. Нафтові вуглеводні потрапляють в акваторію також із стоком з суші в результаті роботи сухопутних транспортних і вантажопідйомних засобів у зоні будівництва причальних і берегових споруд «Нової пристані», втратах при транспортуванні палива по трубопроводах і розливах з емностей для зберігання нафти й дизельного палива. Проблема нафтового забруднення акваторії острова Зміїний набуває особливої гостроти у зв'язку з майбутнім освоєнням вуглеводневих запасів шельфу.

У зв'язку з цим, є актуальним дослідження сучасного стану мікробного угруповання й проведення оцінки стійкості екосистеми до забруднення й вивчення біодеструкційного потенціалу мікробіоти з метою прогнозування ситуації при аваріях.

Метою роботи було обстеження і оцінка сучасного стану забруднення води вуглеводнями нафти й чисельності гетеротрофних мікроорганізмів і бактерій, що окиснюють нафту в акваторії острова Зміїний.

Матеріали і методи

У ході комплексного моніторингу екологічного стану острова Зміїний був проведений відбір проб морської води у серпні і жовтні 2008 р. Відбір проб для гідрохімічних й мікробіологічних досліджень здійснювався на 12 прибережних станціях (рис. 1) з поверхневого шару (0–50 см) відповідно до загальноприйнятих методик [4].

© Г.В. Лісютін, А.Є. Бухтіяров, С.О. Білоіваненко, Л.П. Пономарьова, Т.В. Гудзенко, В.О. Іваниця, 2009



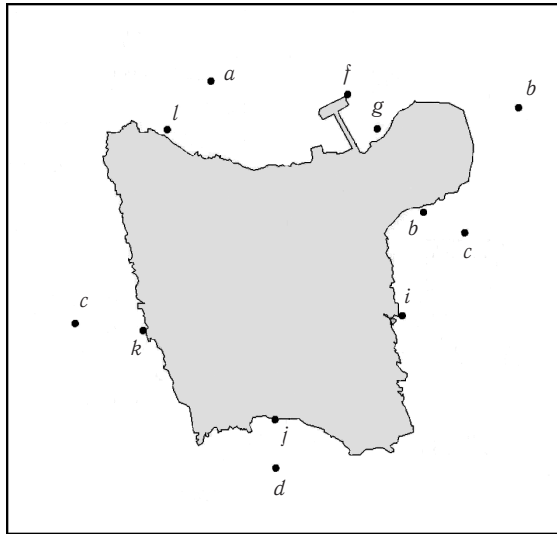


Рис. 1. Карта-схема відбору проб у прибережних водах острова Зміїний

Fig. 1. Water sampling stations scheme in the coastal waters of the Zmiiny island

Загальне мікробне число (ЗМЧ) бактерій визначали методом прямого посіву на щільне агаризоване живильне м'ясо-пептонне середовище (МПА). Культивування бактерій проводили при температурі 20 °С. Облік числа колоній здійснювали через 48 годин.

Для визначення чисельності мікроорганізмів, що окиснюють нафту, використовували метод граничних розведень на рідкому синтетичному морському калієво-дріжджовому середовищі з концентрацією вуглеводнів 1 % [4]. Культивування посівів проводили при кімнатній температурі (20 °С) протягом семи діб. Для обчислення найбільш ймовірного числа бактерій користувалися таблицею Мак-Креді.

Для характеристики нафтового забруднення в пробах води використовували метод екстракції хлороформом і хроматографічного розділення, що дозволив виділити загальний вміст рідких вуглеводнів і окремі фракції: мастила (М) і смолисті сполуки (СМ) [5, 8]. Статистичну обробку результатів проводили згідно стандартних методик з використанням програми "Microsoft Excel 97" [3].

Результати та їх обговорення

Результати визначення вмісту за допомогою методу хроматографічного розділення окремих фракцій розчинних вуглеводнів на досліджених станціях представлені на рисунку 2. По сумарному вмісту в пробах рідких фракцій нафтових вуглеводнів район дослідження можна розділити на зони з високим рівнем 2–5 мг/л, підвищеним до 15 мг/л і аномально високим 26–51 мг/л на окремих станціях. Високі значення відзначалися в пробах води на станціях **j**, **g** (влітку), підвищені — **f**, **i**, **k** (влітку) і **g**, **h**, **i**, **k** (восени) і аномально високі **f** і **l** (восени). Показано, що в переважній більшості вивчених проб морської води виділено дві фракції — мастила й смоли, в основному, низькомолекулярні. Доля мастил у складі рідких (нафтових) вуглеводнів перевищувала вміст смол у багато разів, особливо в пробах з аномальними

концентраціями рідких вуглеводнів конденсатного характеру, що свідчить про флюїдне розвантаження по тектонічно ослаблених зонах.

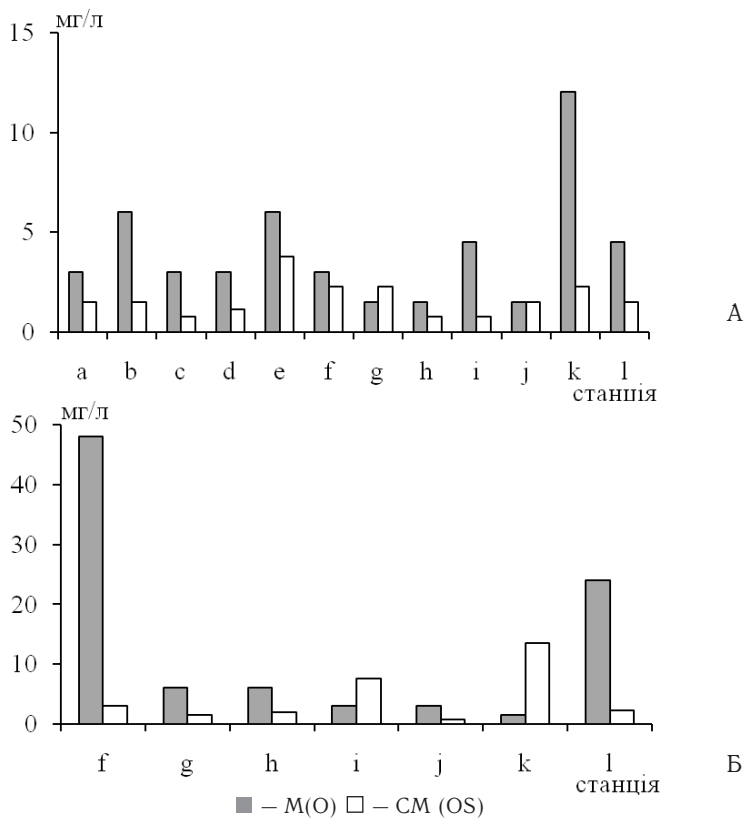


Рис. 2. Просторовий розподіл фракцій рідких вуглеводнів (мг/л): мастила (М) і смолисті сполуки (СМ) у прибережних водах острова Зміїний влітку (А) і восени (Б)

Fig. 2. Spatial distribution of hydrocarbon liquid fraction (mg/l): oil (O) and oil substances (OS) in the coastal waters of the Zmiinyi island in summer (A) and in autumn (B)

В окремих пробах, зокрема, в пробі зі станції **k**, присутні сліди низькомолекулярних поліциклічних ароматичних вуглеводнів (ПАУ), властиві для нафти (флуорени, хризени). У жовтні на цій же станції виявлені сліди парафінів, що також указує на нафтову природу вивчених екстрактів рідких вуглеводнів.

Відповідно до критеріїв, що пред'являються для водних об'єктів, використовуваних для рибогосподарських цілей [7], вміст нафти не повинен перевищувати значень ГДК (0,05 мг/л). У літній період на станціях **f**, **i** відзначалися значення 105 ГДК, а на станції **k** – 285 ГДК. Восени екологічна ситуація перетерпіла зміни в гірший бік. Так, на станції **f** ці значення склали 1020 ГДК. Настільки високі значення рідких вуглеводнів пов'язані, вірогідно, із забрудненням техногенного характеру – надходженням палива при розвантаженні судна «Косатки» в акваторію станції **f** «Старий причал», стоком з суші вуглеводнів поблизу станцій відбору проб **i**, **k** і міграційним потоком вуглеводнів із течією водних мас. Таким чином, можна виділити в акваторії навколо острова Зміїний, зони підвищеного екологічного ризику.

Мінералізація нафтових вуглеводнів — складний процес, що включає в себе біотичні та абіотичні компоненти. При всій розмаїтості процесів, тільки мікроорганізми в змозі провести деструкцію таких забруднювачів до простих сполук і повернути вуглець у кругообіг органічних речовин.

Визначення просторового розподілу бактерій, що здатні окиснювати вуглеводні, пов'язане з необхідністю оцінки потенціалу біодеградації мікробного угруповання акваторії острова Зміїний. Результати мікробіологічного аналізу проб морської води показали, що гетеротрофні бактерії, виділені з поверхневого шару морської води, здатні використовувати вуглеводні нафти як єдине джерело вуглецю й енергії (рис. 3).

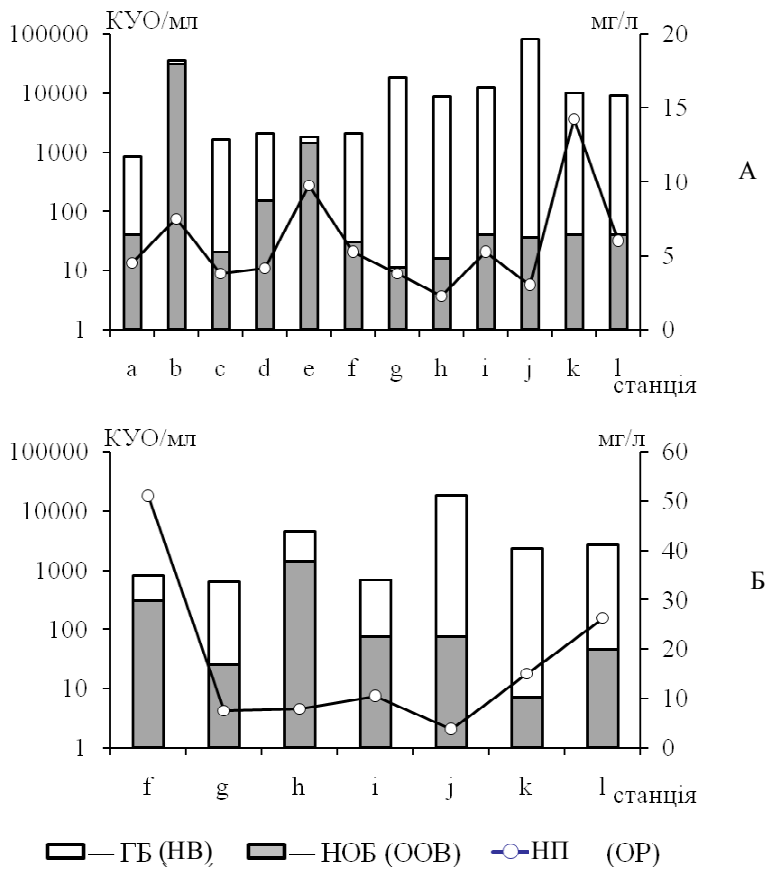


Рис. 3. Співвідношення нафтопродуктів (НП) й чисельності гетеротрофних (ГБ) і бактерій, що окиснюють нафтопродукти (НОБ) у морській воді навколо острова Зміїний влітку (А) й восени (Б).

Fig. 3. Correlation of oil products (OP) with heterotrophic number (HN) and oil products oxidizing bacteria (OOB) in seawater around the Zmiinyi island in summer (A) and in autumn (B).

Влітку кількість досліджуваних бактерій у поверхневому шарі прибіжної зони становила від 11 до 40 КУО/мл, а у віддаленій зоні відзначалося від 20 до 30000 КУО/мл бактерій, що окиснюють нафту. В середньому найменші значення чисель-

ності цих мікроорганізмів були відмічені в жовтні, що можна, вірогідно, пояснити зниженням температури морської води до 16 °С.

Виявлена неоднорідність у розподілі гетеротрофних бактерій і бактерій, що окиснюють нафту, яка залежала від цілого ряду екологічних факторів, у тому числі від місця відбору проб, гідрологічних і гідрохімічних показників, віддаленості від джерел забруднення.

Однак поза залежністю від періоду спостережень і розташування станцій відзначено в цілому перевагу чисельності гетеротрофів над бактеріями, що окиснюють нафту, які склали в середньому 2 % влітку й 18 % восени від чисельності гетеротрофних бактерій, за винятком даних, отриманих для бактерій зі станцій **e** і **b**. Подібна тенденція відзначалась у дослідженнях Каспійського моря й інших районів Чорного моря [1, 6]. Показана також відсутність залежності між рівнем забруднення акваторії нафтовими вуглеводнями й чисельністю бактерій, що окиснюють нафту на тлі високої евтрофікації району досліджень.

Даний феномен обговорюється в науковій літературі і пояснюється тим, що бактерії переважніше утилізують більш доступні автохтонні вуглеводні й органічні речовини, що легко окиснюються. При вмісті нафтових вуглеводнів більш 20 мг/л мікроорганізми починають використовувати для свого розвитку нафтові вуглеводні. Іншою особливістю акваторії острова Зміїний є те, що біомаса водоростей, ціанобактерій має токсичні властивості за рахунок високої сорбційної ємності, що дозволяє накопичувати як природні, так і антропогенні нафтові вуглеводні, що підтверджується знаходженням сумарної рослинної органіки (хлорофіл "а", "с", "d", феофорбид та ін.) в екстрактах рідких вуглеводнів практично у всіх пробах. Біомаса бактерій, що окиснюють нафту, також має токсичні властивості за рахунок виділення продуктів метаболізму нафтових вуглеводнів, що негативно впливає на гідробіоти [1, 9].

Дослідження, проведені співробітниками кафедри мікробіології і вірусології в 1994 р. у північно-західній частині Чорного моря показали, що найбільш імовірне число бактерій, що окиснюють нафту коливалося від 14 до 140000 КУО/мл у районі гідрофронті навпроти каналу Прорва р. Дунай [2]. Вміст нафтових вуглеводнів у цьому районі коливався від фонових (0,3–0,6 мг/л), низьких (1,2–2,4 мг/л) до 4,8–9,6 мг/л у 1998 р. [8]. Отримані раніше й сучасні дані вказують на те, що антропогенне навантаження на цей регіон не знижується.

Проведені вперше еколого-мікробіологічні спостереження поверхневих морських вод у районі острова Зміїний дозволили визначити розподіл і чисельність гетеротрофних бактерій, здатних використовувати вуглеводні нафти.

Проведення систематичних мікробіологічних досліджень прибережних морських вод дозволить одержати більше даних про здатність моря до самоочищення від забруднювачів і більш обґрунтовано прогнозувати можливі наслідки впливу освоєння шельфових нафтогазових родовищ на морську екосистему.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бутаев А. М., Кабыш Н. Ф. О роли нефтеокисляющих микроорганизмов в процессах самоочищения прибрежных вод Дагестанского побережья Каспийского моря от нефтяного загрязнения // Вестник Дагестанского научного центра РАН. — 2002, № 11. — С. 56-69.

2. Іваниця В. А., Худченко Г. В., Панченко Н. Н., Бухтіяров А. Е., Медінец В. І. Мікробіологічні дослідження прибережної частини Чорного моря в районі дельти Дуная і



дельты Днепра. Исследования экосистемы Черного моря // Сб. науч. труд. Укр. науч. цент. экол. моря. — Одесса: ИРЭН, 1994. — С. 54 — 67.

3. *Лакин Г. Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

4. Методические основы комплексного экологического мониторинга океана / Под. ред. А. В. Цыбань. — М.: Гидрометеиздат, 1988. — 287 с.

5. *Нестерова М. Т., Немировская И. А.* Определение нефтепродуктов в морской воде // Методы гидрохимических исследований океана. — М.: Наука, 1978. — 233 с.

6. *Осадчая Т. С., Шадрин Т. В., Енина Л. В., Сосновская Р. В.* Нефтяное загрязнение и микрофлора донных осадков // Экология моря. — 2007. — в. 73. — С. 75 — 78.

7. *Перечень* рыбохозяйственных нормативов: предельно допустимых концентраций и ориентировочно безопасных уровней воздействия (ОБУВ) вредных веществ для воды водных объектов, имеющих рыбохозяйственное значение. — М.: Издательство ВНИРО, 1999. — 325 с.

8. *Пономарева Л. П.* Методы исследования органических загрязнителей в природных объектах морской среды // Екологічні проблеми водних екосистем та забезпечення безпеки життєдіяльності на водному транспорті. — Одеса, 2001. — С. 134-136.

9. *Bordenave S., Soledad Goci-Urriza M., Caumette P., Duran R.* Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat // Appl. Environ. Microbiol. — 2007. — Vol. 73(19) — P. 6089 — 6097.

Робота виконана в рамках тем № ЗМ/321-2008, ЗМ/323-2008, ДЗ/300-2008, що фінансуються Міністерством освіти і науки України

**Г.В. Лисютин, А.Е. Бухтияров, С.А. Белоиваненко,
Л.П. Пономарева, Т.В. Гудзенко, В.А. Иваница**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: v_ivanit@te.net.ua

НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ И ГЕТЕРОТРОФНАЯ МИКРОБИОТА АКВАТОРИИ ОСТРОВА ЗМЕИНЫЙ

Реферат

Исследовано общее и фракционное содержимое жидких углеводов, а также пространственное распространение и численность гетеротрофных бактерий в прибрежной зоне острова Змеиный.

К л ю ч е в ы е с л о в а: морская вода, нефтяное загрязнение, бактерии, остров Змеиный.



**G.V. Lisyutin, A.Y. Bukhtiyarov, S.O. Biloivanenko, L.P. Ponomarjova,
T.V. Gudzenko, V.O. Ivanytsya**

Odesa National I. I. Mechnikov University, Dvoryanskaya str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: e-mail: v_ivanit@te.net.ua

OIL CONTAMINATION AND HETEROTROPHIC MICROBIOTA OF THE ZMIINY ISLAND AQUATORIUM

Summary

General and fractional content of carbohydrogens and also spatial distribution and number of heterotrophic bacteria in the coastal zone of the Zmiiny island have been investigated.

K e y w o r d s: marine water, oil contamination, bacteria, the Zmiiny island.



ANNIVERSARY AND REMARKABLE DATES



ВІТАЄМО З ЮВІЛЕЄМ!

У травні 2009 року виповнилося 85 років Ювеналію Петровичу Зайцеву— видатному вченому із світовим визнанням, морському біологу, нашому земляку. Ю.П. Зайцев – доктор біологічних наук, академік НАН України, професор, заслужений діяч науки і техніки України, член редколегії нашого журналу.

Народився майбутній вчений у селі Балабанівка (нині Миколаївка) Білгород-Дністровського району Одеської області. Батьки його були людьми освіченими, обоє викладали у школі. Мати Людмила Василівна та батько Петро Федотович змалку заохочували дитину вчитися та пізнавати світ.

Після закінчення школи юнак вступив до педагогічного інституту на природничий факультет, а згодом перевівся на біологічний факультет Одеського державного університету імені І.І. Мечникова. Саме тут доля звела Ювеналія Петровича із видатним зоологом Іваном Івановичем Пузановим, який очолював університетську кафедру зоології хребетних. Після закінчення університету Зайцев влаштувався на роботу на посаду лаборанта гідробіологічної станції університету, яка була підпорядкована кафедрі зоології. Праця під опікою Івана Івановича Пузанова, спілкування з ним додали снаги, визначили нові цілі у житті. Не випадково в одній із своїх недавніх статей «Один рік із життя Івана Івановича Пузанова» Ювеналій Петрович назвав його Вчителем і Людиною з великої літери. У нього завжди було багато ідей і задумів. Це саме він доручив Зайцеву розробляти тему, за яку ще ніхто не брався: вивчення іхтіопланктону — пелагічних ікринок і личинок риб в Одеській затоці.

Ювеналій з натхненням взявся за справу. Перша праця молодого дослідника вийшла в «Доповідах АН СРСР»—найпрестижнішому журналі країни. А пізніше він знову здивував своє оточення: історія ще не знала такого випадку, коли лаборант ставав би кандидатом наук. Але це відбулося, і стало першим кроком до наукової кар'єри.

Ю.П. Зайцев працював молодшим науковим співробітником Одеської біологічної станції АН УРСР, пізніше перетвореної в Одеське відділення Інституту біології південних морів АН УРСР. У 1958 році в нього вже було видруковано 29 наукових робіт, і він став старшим науковим співробітником.

1964 року Ю.П. Зайцев захистив докторську дисертацію. У 1970 вийшла друком його монографія «Морська нейстонологія». На цей час інформаційні кордони у країні були вже відкриті, і висунуті ним наукові положення швидко облетіли світ. Він став учасником наукових експедицій у Середземному, Карибському, Балтійському та інших морях, у Мексиканській затоці і в деяких районах Атлантичного й Тихого океанів. Як експерт в галузі біології й екології ООН бере участь у роботі міжнародних комісій з різних питань екологічного стану Чорного моря. Ювеналій Петрович Зайцев—автор понад 300 наукових статей та монографій, опублікованих у видавництвах 20 країн.

Крім відкриття морського нейстону, Ювеналій Петрович відомий своїми дослідженнями реакції морських організмів та їх угруповань на різні види антропогенного впливу. Ім'я Зайцева тісно пов'язане з українським Придунав'ям. За його безпосередньої участі було створено природний заповідник «Дунайські плавні». Він увійшов до складу координаційної ради транскордонного резервату ЮНЕСКО «Дельта Дунаю».

Він зробив відкриття, яке стосується всього Світового океану і кардинально змінило погляди вчених на розвиток у ньому живих організмів. Його праця, перекладена на англійську, миттєво вийшла у США та Ізраїлі. На запрошення урядів і наукових кіл США, Канади, Франції, Японії, Туреччини, Куби, Південно-Африканської Республіки він виступав з лекціями і доповідями перед студентами і викладачами найпрестижніших університетів.

Ювеналій Петрович має досить рідкісну як для вченого рису — він із захопленням популяризує науку. Його книжки доступні й цікаві навіть для не підготованого читача. Нещодавно за підтримки Глобального екологічного фонду і Програми розвитку ООН з відновлення Чорного моря побачили світ дві нові його книжки «Введение в экологию Черного моря» і «Самое синее в мире».

З 1972 по 1989 рік Ювеналій Петрович Зайцев очолював Одеський філіал Інституту біології південних морів Академії наук України. Він і сьогодні натхненно працює—головним науковим співробітником філіалу, веде велику наукову роботу, сприяє становленню молодих вчених. На посаді професора кафедри гідробіології та загальної екології плідно працює зі студентами біологічного факультету ОНУ.

Ю.П. Зайцев — член спеціалізованої вченої ради Д.41.051.06 при біологічному факультеті Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Серед його учнів—кандидати та доктори наук, академіки, як у нашій країні, так і за кордоном. Ювеналій Петрович Зайцев має численні нагороди, але найбільше йому до вподоби «Срібний дельфін» № 1 — приз, заснований секретаріатом Міжнародної комісії ООН із захисту Чорного моря від забруднення.

Редколегія та редакція журналу «Мікробіологія і біотехнологія» від щирого серця вітає ювіляра з днем народження. Бажаємо Вам, шановний Ювеналію Петровичу, міцного здоров'я, творчої наснаги та плідної наукової роботи впродовж довгих років!



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

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

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

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

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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



При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абrevіатури 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 Е // Міжнародна наук. конф. „Мікробні біотехнології” (Одеса, вересень, 2006 р.): тез. доп. — О.: „Астропринт”, 2006. — С. 17.

На депоновані наукові роботи

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



На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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.

Здано до набору 22.04.2009 р. Підписано до друку 15.05.2009 р.
Формат 70x100/16. Друк офсетний. Обл.-вид. арк. 8,25. Ум.-друк. арк. 8,24.
Тираж 300 прим. Зам. № 0905-09.

Віддруковано з готового оригінал-макету:
СПД Карпенков О.І.
(Свідоцтво ОД № 21 від 20.01.2003 р.)
e-mail: odessaihp@breezein.net
Printed in Ukraine