

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

**МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ**  
**Microbiology & Biotechnology**

**№ 2(6)**  
**2009**

# MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 2(6)

•  
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.

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

## **PUBLISHERS**

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

Approved for publishing by Academic Council  
of Odesa National Mechnykov University

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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University  
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine

Tel.: 723-28-39, 748-11-01

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

**www.mbt.onu.edu.ua**

# МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ  
№ 2(6)

•  
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.*

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

## ВИДАВЦІ

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

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

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

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39, 748-11-01

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

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

© Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, 2009

## CONTENTS

### OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

<b>T.I. Davidenko, I.I. Romanovskaya, S.A. Andronati</b> IMMOBILIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS.....	8
--	---

### EXPERIMENTAL WORKS

<b>Zh. U. Sergeeva, F.I. Tovkach</b> THE COMPARATIVE DNA RESTRICTION ANALYSIS OF <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> MEGAPLASMIDS AND BACTERIOPHAGES .....	23
---	----

<b>Y.P. Hrubsky, O.V. Aravitska, M.L. Myronovskyy, O.M. Gromyko, B.O. Ostash, V.O. Fedorenko</b> N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE AND N-METHYL-N-NITROSOMETHYLUREA INFLUENCE ON ANTIBIOTIC ACTIVITY OF <i>STREPTOMYCES SIOYAENSIS</i> LV81.....	28
--	----

<b>V.O. Ivanytsya, N.Yu. Vasileva, G.V. Lisyutin, A.Y. Bukhtiyarov, T.V. Gudzenko</b> TOXIC AND MUTAGENIC ACTIVITY OF CONTAMINATION OF THE ZMIINY ISLAND AQUATORIUM .....	36
--	----

<b>A.F. Rylskiy, P.I. Gvozdyak</b> SUPPRESSION OF THE PIGMENT-SYNTHESIZING CAPACITY OF BACTERIA WITH HEAVY METALS IONS.....	43
--	----

<b>I.V. Krulko, S.A. Zaika, A.V. Kharina, N.S. Vodzynska, V.P. Polischuk</b> PORPHYRINS AS THE INHIBITORS OF VIRAL INFECTION IN PLANT TISSUE CULTURE.....	47
--	----

<b>H.V. Basyul, G.V. Yamborko, O.S. Bahaeva, V.O. Ivanytsya</b> PLEUROTUS OSTREATUS FERMENTATION BY BACTERIA OF THE GENUS <i>LACTOBACILLUS</i> .....	53
---	----

<b>V.A. Dumova, N.V. Patyka, Yu.V. Kruglov, V.F. Patyka</b> STUDYING BIODIVERSITY THE COMPLEX PROCARIOTIC MICROORGANISMS OF PODSOLIC SOILS.....	60
--	----

<b>Zh.U. Sergeeva, F.I. Tovkach</b> RESTRICTION SITE MAPPING OF THE <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> EXTRACHROMOSOMAL ELEMENT PCA25 .....	66
---	----

<b>M.Yu. Rusakova, B.N. Galkin, T.O. Filippova, L.M. Vostrova, M.V. Grenadjorova</b> THE FUNGICIDAL ACTIVITY OF SOME PHENOXYACETIC ACID HYDRAZIDES WITH RESPECT TO ROOT ROT AGENTS .....	69
---	----

## З М І С Т

### ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

<b>Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, С.А. Андронаті</b> ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН.....	8
---	---

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

<b>Ж.Ю. Сергеева, Ф.І. Товкач</b> ПОРІВНЯЛЬНИЙ РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ДНК МЕГАПЛАЗМІД І БАКТЕРІОФАГІВ <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> .....	23
---	----

<b>Я.П. Грубський, О.В. Аравіцька, М.Л. Мироновський, О.М. Громико, Б.О. Осташ, В.О. Федоренко</b> ВПЛИВ N-МЕТИЛ-N'-НІТРО-N-НІТРОЗОГУАНІДИНУ ТА N-МЕТИЛ-N-НІТРОЗОМЕТИЛСЕЧОВИНИ НА АНТИБІОТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТА СІОМЩИНУ <i>STREPTOMYCES SIOYAENSIS</i> LV81 .....	28
--	----

<b>В.О. Іваниця, Н.Ю. Васильєва, Г.В. Лісютін, А.Є. Бухтіяров, Т.В. Гудзенко</b> ТОКСИЧНА І МУТАГЕННА АКТИВНІСТЬ ЗАБРУДНЕННЯ АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЊНИЙ.....	36
---	----

<b>О.Ф. Рильський, П.І. Гвоздяк</b> ПРИГНІЧЕННЯ ПІГМЕНТСИНТЕЗУВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ БАКТЕРІЙ ІОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ.....	43
---	----

<b>І.В. Крулько, С.А. Заїка, А.В. Харіна, Н.С. Водзінська, В.П. Поліщук</b> ПОРФІРИНИ ЯК ІНГІБИТОРИ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ В КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ ТКАНИН.....	47
--	----

<b>О.В. Басюл, Г.В. Ямборко, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця</b> ФЕРМЕНТАЦІЯ ГЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ БАКТЕРІЯМИ РОДУ <i>LACTOBACILLUS</i> .....	53
--	----

<b>В.А. Думова, М.В. Патика, Ю.В. Круглов, В.П. Патика</b> ВИВЧЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ КОМПЛЕКСУ ПРОКАРІОТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ПІДЗОЛИСТИХ ГРУНТІВ .....	60
--	----

<b>Ж.Ю. Сергеева, Ф.І. Товкач</b> РЕСТРИКЦІЙНЕ КАРТУВАННЯ ПОЗАХРОМОСОМНОГО ЕЛЕМЕНТА РСА25 <i>ERWINIA CAROTOVORA</i> .....	66
---	----

<b>М.Ю. Русакова, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, Л.М. Вострова, М.В. Гренадьорова</b> ФУНГЦИДНА АКТИВНІСТЬ ГІДРАЗІДІВ ФЕНОКСІОЦТОВОЇ КИСЛОТИ ЩОДО ЗБУДНИКІВ ПРИКОРЕНЕВОЇ ГНИЛІ.....	69
--	----

GLIMPSE OF HISTORY

**V.A. Kuznetsov**  
YAKIV YULIJOVYCH BARDAKH (1857–1929)..... 75

CHRONICLE OF SCIENTIFIC LIFE

SUMMER SCHOOL “MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY”  
IN ODESA NATIONAL I.I. MECHNYKOV UNIVERSITY..... 97

INFORMATION FOR THE AUTHORS..... 99

## СТОРІНКИ ІСТОРІЇ

**В.О. Кузнецов**

ПРОФЕСОР ЯКІВ ЮЛІЙОВИЧ БАРДАХ (1857–1929)..... 75

## ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

IV ЛІТНЯ ШКОЛА “МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ” В  
ОДЕСЬКОМУ НАЦІОНАЛЬНОМУ УНІВЕРСИТЕТІ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА.... 97

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ ..... 99

УДК 577.15:663.15:615.012:504.06

**Т.И. Давиденко, И.И. Романовская, С.А. Андронати**

Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины,  
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина,  
тел.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

*Анализ методов и носителей для иммобилизации биологически активных веществ, физико-химических свойств, полученных с их использованием препаратов, показали перспективность их применения в ферментативной химии, для получения потенциальных диагностических и лекарственных средств и решения экологических проблем.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* биологически активные вещества, иммобилизация, ферментативный синтез, медицина, экология.

Инженерная энзимология — классическая область биотехнологии, остается актуальной, поскольку иммобилизованные разными методами биологически активные вещества находят широкое применение в различных областях науки, тонком органическом синтезе, медицине, экологии.

Биотехнологические исследования в ФХИ имени А.В. Богатского НАН Украины проводятся на протяжении 30 лет и осуществляются в трех основных направлениях.

1. Ферментативный синтез БАВ: использование микроорганизмов, клеточных структур, ферментов в свободном и иммобилизованном виде в реакциях нитровосстановления, окисления, ацетилирования и гидролиза азотсодержащих соединений.

2. Медицинская биотехнология: создание потенциальных диагностических и лекарственных средств на основе иммобилизованных белков, ферментов, аллергенов, лекарственных препаратов.

3. Экологическая биотехнология: разработка ферментативных методов удаления фенольных поллютантов.

В результате исследований в области ферментативного синтеза впервые показано, что штаммы и бесклеточные экстракты *E. coli* ВКМБ-471, -870, -835, супернатант 9000 г и микросомы печени крыс селективно и эффективно восстанавливают нитрозамещенные бензойные кислоты, фенолы, бензо-2,1,3-тиадиазолы [6,10], 1,4-бенздиазепин-2-оны, дибензо-[b,f]-1,4-дiazепины [1,5,9], хиноксалиноны, бензофеноны, хинолоны [10] с образованием соответствующих аминопроизводных. Рис. 1 иллюстрирует образование аминопроизводных бензо-2,1,3-тиадиазола и 1,4-бенздиазепин-2-она с высокими выходами (70–90 %) и стереоспецифичностью восстановления нитрогруппы дибенздиазепина и хиноксалинона.

© Т.И. Давиденко, И.И. Романовская, С.А. Андронати, 2009





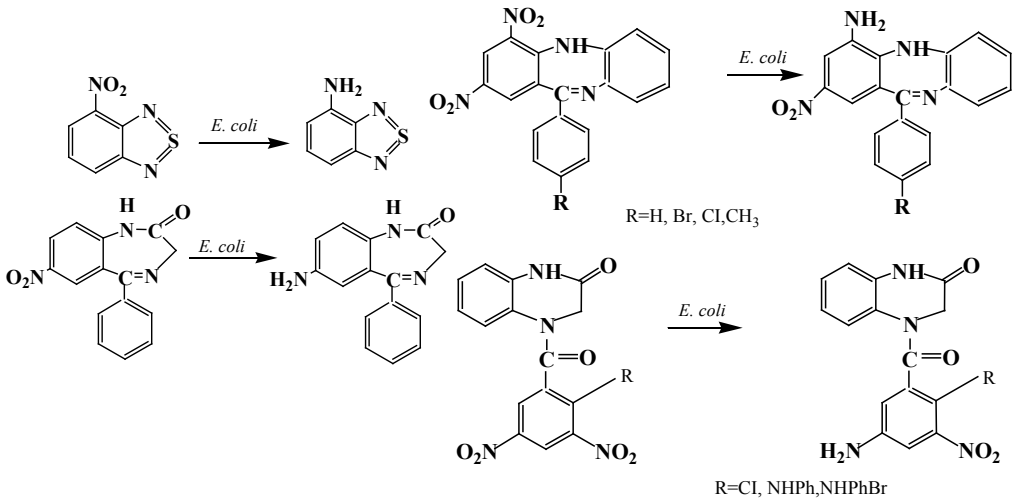


Рис.1. Восстановление нитросоединений клетками *E. coli* (37 °C, pH 7,4–8,5)

Fig.1. Reduction of nitro compounds by *E. coli* cells (37 °C, pH 7,4–8,5)

Установлено, что актиномицеты эффективно катализируют гидроксирование 1,4-бенздиазепин-2-онов с образованием оптически активных изомеров (40–50 %), обладающих более выраженной фармакологической активностью [9] (рис. 2), флуорена и флуоренона [8], а также с высокими выходами, проводят N-ацетилирование аминобензофенонов [3], аспергиллы – катализируют гидролиз 3-ацетокси- и гемисукцината 3-оксипроизводных 1,2-дигидро-3H, 1,4 бенздиазепин-2-онов с максимальными выходами 3-оксипроизводных – 50 %.

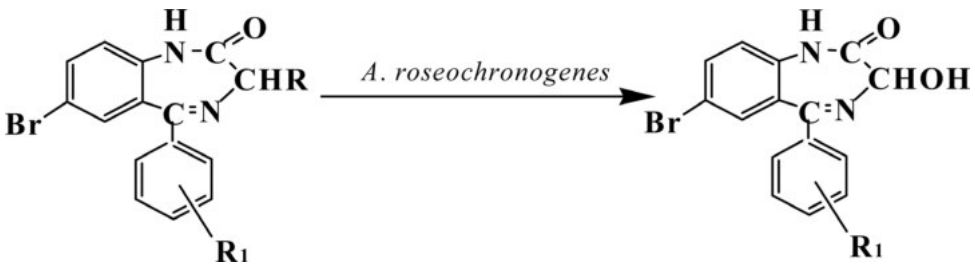


Рис. 2. Микробное гидроксирование 1,4-бенздиазепин-2-онов

Fig.2. Microbial hydroxylation of 1,4-benzodiazepene-2-ones

В неводных средах осуществлен катализируемый липазой *Penicillium solitum* синтез сложных эфиров n-бутилацетата и олеилолеата с высокими выходами и использованием фермента в ходе 3-х каталитических циклов.

В результате иммобилизации в каррагинан были получены активные и стабильные, многократного использования (до 11 раз), биокатализаторы восстановления нитропроизводных бенздиазепинов, бензо-2,1,3-тиадиазолов [7, 23, 25].

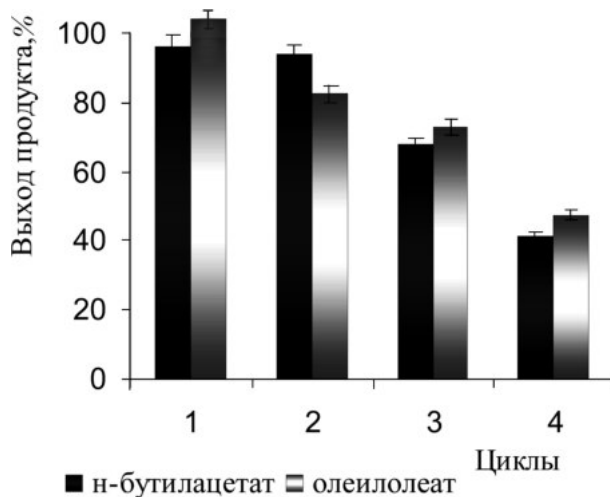


Рис. 3. Циклы использования свободной липазы *P. solitum* в синтезе н-бутилацетата и олеилолеата

Fig. 3. Cycles of free *P. solitum* lipase usage in n-butylacetate and oleoyl oleate synthesis

Иммобилизованная микросомальная фракция печени крыс на полиэтилене с привитыми полиаллиловым спиртом и полиакриловой кислотой, позволили оценить влияние ксенобиотиков на монооксигеназы печени млекопитающих и нарабатывать метаболиты 1,4-бенздиазепин-2-онов [2].

Эффективность энзимотерапии ограничена быстрой инактивацией ферментов, нестабильностью при хранении, стерилизации, автолизом, действием ингибиторов и др.

Фиксация ферментов и др. БАВ на носителе позволяет получать экономичные и стабильные препараты пролонгированного действия и разрабатывать новые пути их введения.

Выбор метода иммобилизации базируется на сведениях о химической структуре фермента или БАВ, физико-химических свойствах матрицы.

Возможно образование как ковалентной связи, так и невалентных взаимодействий между функциональными группами (амино-, карбоксильными, гидроксильными, сульфгидрильными, оксифенильными) боковых цепей аминокислот, стабилизирующих молекулы белка, и молекулами носителя [16].

При создании потенциальных диагностических и лекарственных средств на основе иммобилизованных БАВ особое внимание уделяли: выбору матрицы медицинского назначения, методу иммобилизации, соответствующему применению препарата, исследованию условий иммобилизации (рН, температуры, соотношения реагентов, пористости носителя, содержания реакционноспособных групп и др.), комплексному изучению физико-химических свойств полученных препаратов.

Результаты оценивали по сохранению ферментативной активности, содержанию белка или БАВ в сравнении со свободной формой, во времени, после стерилизации. Детально анализировались рН термозависимости ферментативной активности, кинетические параметры функционирования, термостабильность, устойчивость в кислых и щелочных средах.

Образование модифицированных форм доказано комплексом физико-химических методов (ИК-, УФ-спектроскопия, вискозиметрия, масс-спектрометрия и др.). С использованием гидролитических ферментов различного происхождения разработаны препараты для терапии ран и ожогов, заместительной терапии недостаточности пищеварения.

Для иммобилизации применяли различные носители (гидрофильные полимеры – ПЭГ, ПВК, ПВП, ПВС, ПЭО, перевязочные средства, угольные материалы, пищевые волокна, полисахариды, аэросилы) и физические (адсорбция, включение в гель, импрегнация) методы иммобилизации.

Для закрепления гидролитических ферментов с широкой субстратной специфичностью (на марле, нетканом материале, угольной ткани, при разработке глазных лекарственных пленок (ГЛП), пленочных форм аллергенов белковой природы) использовали перспективный метод модификации полимеров (ПВС, ПЭО) бурой [12-14,16]. Стабилизация и пролонгирование БАВ достигается за счет невалентных взаимодействий с полимером и включения в структуру сшитого полимера.

С использованием  $\beta$ -циклодекстрина, образующего клатраты с различными органическими соединениями, способствующего повышению биодоступности и растворимости БАВ [4], иммобилизовали пихтовое масло [16]. Комплексообразование подтверждено методами термогравиметрии, ИК- и ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектроскопии; определена структура клатрата  $\beta$ -циклодекстрина с основным компонентом пихтового масла – борнилацетатом (рис. 4). Молекула борнилацетата почти полностью погружена во внутреннюю гидрофобную полость  $\beta$ -циклодекстринового конического браслета. Борнеольный фрагмент размещен внутри полости матрицы, ацетильный – выходит из нее и образует водородную связь с одной из семи групп  $\text{CH}_2\text{OH}$ .

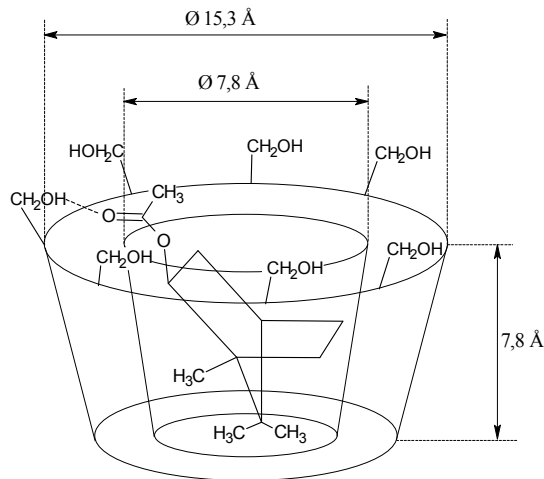


Рис. 4. Модель клатрата борнилацетата с  $\beta$ -циклодекстрином

Fig. 4. The clathrate model of bornyl acetate with  $\beta$ -cyclodextrin

Показана перспективность поли-N-винилкапролактама (ПВК), образующего комплексы включения с фенолами, антимикробными средствами: бронополом (рис. 5) и триклозаном, солями металлов, для иммобилизации БАВ [15–17, 27, 32].

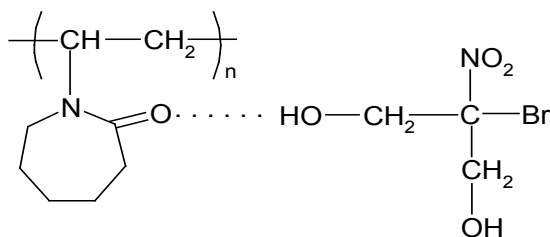


Рис.5. Образование комплекса ПВК-бронопол

Fig.5. Complex formation of PVC-bromopol

Методами ЯМР  $^{13}\text{C}$ - и ИК-спектроскопии установлено, что комплексообразование осуществляется за счет образования водородной связи между карбонильной группой капролактамных звеньев и гидроксильными группами стабилизаторов (фенольных соединений, бронопола, белков), а также в результате вытеснения воды из структуры полимера и происходящего при этом уплотнения структуры. Макромолекулы белка конкурируют со стабилизатором за связывание с ПВК, однако молекулы стабилизатора остаются включенными в полимерную матрицу.

Итогом более чем 20-летней работы в области иммобилизации протеолитических ферментов явилось создание противораневых и противоожоговых повязок пролонгированного действия — «Эластотеразы иммобилизованной» (совместно с Институтом микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного и Институтом фармакологии и токсикологии НАН Украины) — препарата, разрешенного к производству и клиническому применению в Украине и России [12, 16]. Препарат представляет собой салфетки из марли или нетканого материала, на которых закреплен фермент эластотераза (щелочная сериновая протеиназа *Bacillus subtilis* 316 М) с активностью 160–240 ПЕ/г. Препарат сохраняет 70–80 % исходной активности, стабилен после  $\gamma$ -стерилизации (20 кГр) и при 2-х летнем хранении, отличается высокой удельной активностью.

На стадии клинической апробации находится эффективный ранозаживляющий препарат «Иммобилизованная на АУВМ щелочная протеаза», отличающийся высокими некролитическими и адсорбционными свойствами, дренирующим эффектом, стабильный в условиях хранения и  $\gamma$ -стерилизации, пролонгированного действия [11]. Эксперименты на лабораторных животных показали его большую активность по сравнению с профезимом, имозимазой, ируксомом. Сроки очищения экспериментальных гнойных ран сокращались с 11 до 3 суток.

Для лечения ран и ожогов были получены мази, гели, пленки, пластыри с включенными протеолитическими и литическими ферментами, комплексные препараты, содержащие протеиназы и антибактериальные средства (диоксидин, полимиксин, декаметоксин) [13, 16, 38].

Особый интерес представляют полимерные гидрогелевые раневые покрытия пленочного типа [41], которые, в отличие от сорбционных ферментных перевязочных средств (марлевых, нетканых материалов и др.), обладают рядом достоинств: пластичностью, возможностью визуального контроля за состоянием раны, охлаждающим действием. Они лизируют некротические образования, предотвращают развитие инфекции, создают влажную среду, оптимальную для регенерации, способствуют элиминации экссудата, подавлению микрофлоры.

В настоящее время совместно с Московской государственной академией тонкой химической технологии имени М.В. Ломоносова получено гидрогелевое раневое покрытие на основе модифицированного поли-N-винилпирролидона (ПВП)) с иммобилизованной щелочной протеазой (пленки диаметром 9 см, площадью 63,6 см<sup>2</sup>, толщиной 0,35 мм, средней массой 3 г), с количественным сохранением активности, стабильностью при хранении, устойчивостью к действию повышенных температур (k термоинактивации для свободного и иммобилизованного препарата составили  $2,76 \cdot 10^{-2}$  и  $8,42 \cdot 10^{-4}$  мин<sup>-1</sup>, соответственно), пролонгированного действия [37].

Полимерный гидрогелевый материал представляет собой органо-неорганический гибрид (рис.6) — продукт объединения кремнийсодержащего соединения и ПВП в целостную структуру с образованием множественных водородных связей между кислородом карбонильной группы лактамного кольца ПВП и водородом силанольной группы золя поликремниевой кислоты.

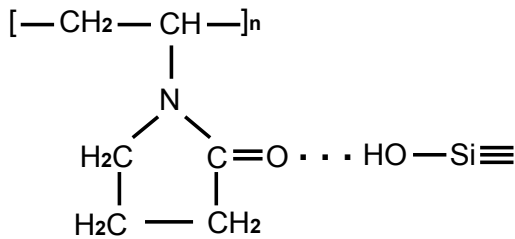


Рис.6. Формирование органо-неорганического гибрида ПВП-поликремниевая кислота

Fig. 6. Formation of PVP/polysilicic acid organo-inorganic hybrid

При разработке препарата для заместительной терапии недостаточности пищеварения осуществлена иммобилизация липазы *Penicillium solitum* (фермент полностью инактивируется в среде желудочного сока) на углеродном волокнистом материале АУВМ “ДНЕПР-МН” (Институт проблем материаловедения НАН Украины) с помощью ПВС, сшитого бурой.

Выбор носителя обусловлен его широким использованием в аппликационной терапии, энтеросорбции и гемосорбции [19] вследствие высоких адсорбционных характеристик, развитой пористости. Предложенный метод позволяет, при использовании АУВМ с  $V_s$  0,41–1,3 см<sup>3</sup>/г и массовом соотношении фермент:матрица 1:30–1:60 (рис. 7), получать высокоактивные (20–40 ЛЕ/мг) иммобилизованные препараты, стабильные в кислой среде и при длительном хранении, пролонгированного действия [40, 44], с высокими адсорбционными характеристиками. Разработанный препарат «Энсоферм» находится в стадии клинических исследований.

Медико-биологические исследования (НИИ педиатрии, акушерства и гинекологии МЗ Украины) подтвердили высокие адсорбционные свойства препарата, наличие дозозависимого эффекта; нормализацию функций печени при экспериментальном токсическом поражении, хроническом гепатохолецистите. Показана безвредность препарата и отсутствие побочного действия на интегральные показатели организма при хроническом введении.

Показано, что разработанное пленочное покрытие на основе ацетилфталилцеллюлозы для иммобилизованной липазы в два раза увеличивает активность фермента в кислой среде, моделирующей желудочный сок [30].

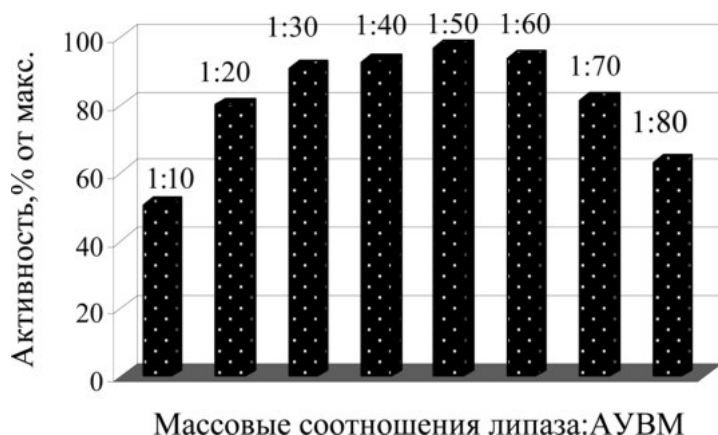


Рис. 7. Влияние массового соотношения фермент: матрица на активность липазы, иммобилизованной на АУВМ с использованием ПВС, сшитого бурой

Fig. 7. Influence of enzyme/matrix mass ratio on lipase activity immobilized on ACFM with using of borax-linked PVA

В качестве основы для ГЛП, содержащих торфот и протеазы, использовали биосовместимые сополимеры акриламида, винилпирролидона и этилакрилата, поливиниловый спирт, сшитый бурой [13,16].

Экспериментальные исследования ГЛП в комплексной терапии ожогов глаз кроликов (Институт глазных болезней и тканевой терапии имени В.П. Филатова АМН Украины) показали, что признаки ожоговой болезни купировались в 1,5 раза быстрее по сравнению с контрольной группой. Иммобилизованный препарат (матрица ПВС) проходит стадию клинической апробации.

Учитывая, что папаин — препарат выбора в офтальмологии, получены его стабильные, иммобилизованные совместно с мочевиной ГЛП (матрица ПВС) [39]. Добавление мочевины (обусловлено ее действием, денатурирующим белковую молекулу) приводит к усилению протеолитической активности в 1,7 раза; введение активаторов (смесь L-цистеина и динатриевой соли ЭДТА), способствует повышению активности свободного и иммобилизованного фермента в 4,3 и 10,6 раз, соответственно. Полученные результаты позволяют значительно уменьшить концентрацию фермента в ГЛП, что экономически выгодно.

На моделях тяжелых щелочных ожогов роговицы глаз кроликов (Институт глазных болезней и тканевой терапии имени В.П.Филатова АМН Украины) показан оптимальный некролитический эффект локального характера без повреждения здоровой ткани после 45 мин действия препарата, что позволяет проводить неотложную кератопластику [45].

При изучении иммобилизации литических ферментных комплексов (ЛФК) *Streptomyces sp.* — стерилазы и лизорицефина, предоставленных НТУУ КПИ, Днепропетровским национальным университетом, препаратов широкого спектра действия, способных лизировать клеточные стенки ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей, — определено, что их совместная иммобилизация с протеазами позволяет увеличить бактериолитическую активность в 1,5–3 раза (рис. 8) [14, 25, 38].

Получены препараты бактериолитического действия, закрепленные на перевязочных средствах, комплексные препараты с бактериолитической и протеолитической активностями, ГЛП. Первичная апробация показала их перспективность при лечении заболеваний ЛОР-органов (мезотимпанитов, эпитимпанитов, отитов грибковой этиологии), в терапии ожогов глаз кроликов [38].

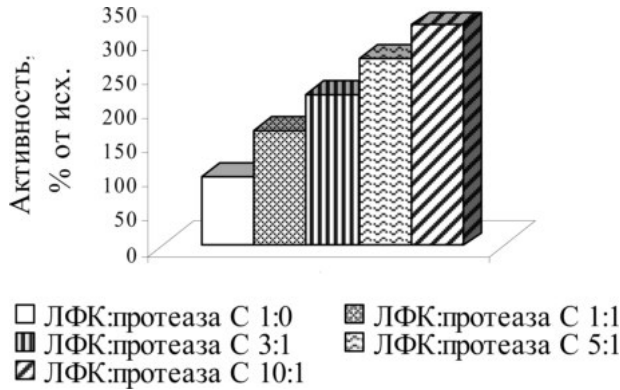


Рис. 8. Совместная иммобилизация лизорицефина и протеазы С

Fig. 8. Joint immobilization of lyzoricifine and protease C

Постоянно возрастающая частота аллергических заболеваний, в т.ч. аллергических ринитов (АР), основные принципы диагностики и терапии, включая СИТ, недостатки парентерального метода введения (введение аллергенов не в «шоковый орган», быстрое всасывание, сложность создания субдозировки, возможность возникновения анафилактических реакций, болезненность процедур для пациента, неэкономичность [22]) — вызвали необходимость разработки их иммобилизованных форм и новых путей введения: перорального и интраназального.

Исследования осуществляются совместно с ООО «Имунолог», Одесским и Винницким государственными медицинскими университетами. В работе использовали коммерческие препараты пищевых (аллерген белка куриного яйца — АБКЯ), бытовых (аллерген домашней пыли — АДП), аллергенов пыльцы березы (АПБ) и ржи (АПР), стандартизованные в ед. РНУ (белковый азот), стабилизированные 0,4 % фенолом, новокаином, ацелизин-КМП, метиленовый синий (МС).

При разработке стабильных форм аллергенов для введения *per os* изучили их фиксацию на природных и синтетических носителях [24, 26, 27, 29]. Отмечены положительные результаты иммобилизации на ПВК и аэросиле А-380: высокая степень связывания, устойчивость при хранении, получение гранул ПВК с аллергенами, стабилизированными менее токсичными, чем фенол, аспирином и резорцином, селективное связывание белка аэросилом А-380, пролонгированность действия при моделировании рН желудка и кишечника.

Разработка иммобилизованных аллергенов для интраназального пути введения проводилась с целью лечения и диагностики АР, диагностики непереносимости новокаина и аспирина, диагностики состояния слизистой оболочки носовой полости с помощью метиленового синего и индикатора для измерения рН носовой слизи.

Учитывая преимущества ПП-полимерных пленок (точность дозировки, пролонгирующее действие, удобство применения), были получены стабильные пленочные

формы (матрица ПВС) АДП, АБКЯ, АПБ в возрастающих дозах [31]. Для диагностики АР разработали ПП с аллергенами в дозе 200 PNU, временем выхода из пленки — 20–25 мин. [20, 31].

Усиление пролонгирования достигается при модификации носителя бурой. Время выхода аллергена из пленки зависит от концентрации модификатора. Образование комплекса белка с носителем и бурой доказано исследованием кинематической вязкости растворов ПВС до и после иммобилизации и подтверждено методом УФ-спектроскопии на модельных аллергенах овальбумине (рис. 9) и лизоциме.

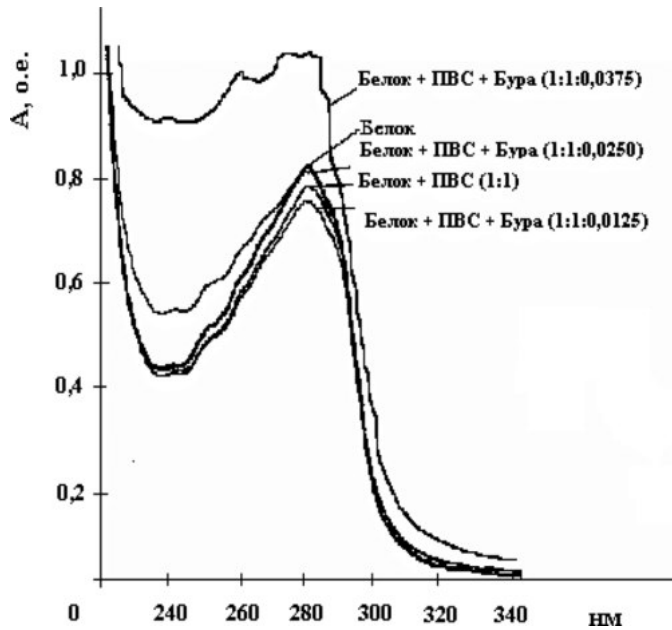


Рис. 9. Образование комплекса ПВС-белок-бура

Fig 9. Complex formation of PVA-protein-borax

Для диагностики непереносимости новокаина и аспирина, функционального состояния слизистой носа разработаны ПП на основе ПВС, желатины, желатины в комбинации с ПВП для интраназального введения с количественным содержанием ЛС. Изучены их свойства, проведена биофармацевтическая оценка [33].

С использованием ПП с аллергенами (матрица ПВС) впервые предложен метод интраназальной диагностики и СИТ аллергических ринитов (АР), апробированный на 35 больных-добровольцах круглогодичным АР (КАР), вызванном АДП. Положительные результаты суммарно составили 88,5 %, отличные и хорошие — 71,4 % (Одесский и Винницкий государственные медицинские университеты) [20–22, 46]. Интраназальная СИТ ПП с пыльцевыми аллергенами проводилась на 40 больных КАР и показала отличные результаты в 72,5 % случаях, положительные — у 20 % пациентов (НИИ оториноларингологии имени А.С. Коломейченко АМН Украины) [46].

Интраназальная провокационная проба ПП с АДП (28 пациентов) показала нарастание симптоматики АР в соответствии с выходом аллергена из пленки у 89,3 % больных КАР. Отмечена достоверность и относительная безвредность метода [22, 46]. С помощью желатиновых ПП с новокаином (50 мкг/ПП) и ацелизином (матрица ПВС, 3 мг аспирина/ПП) были достигнуты высокие результаты в диагностике не-



переносимости этих ЛС больных, сенсibilизированных к новокаину, с аспириновой бронхиальной астмой [28, 33, 48]. На рис. 10 представлены достоверные отличия клинических показателей: местных симптомов и состояния носового дыхания у больных с аспириновой бронхиальной астмой и нечувствительных к аспирину.

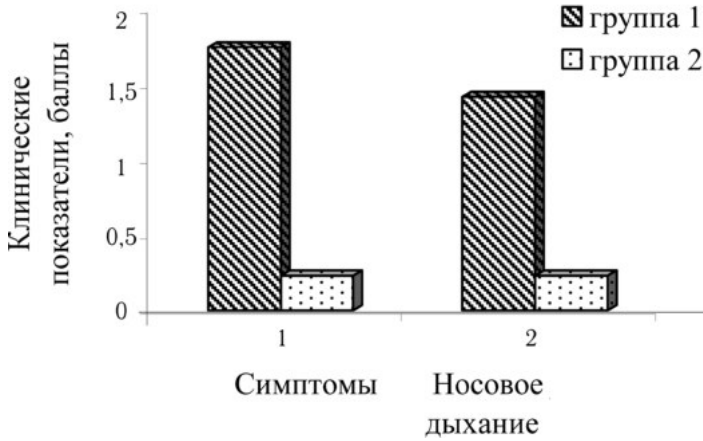


Рис. 10. Сравнительная оценка клинических показателей при проведении назального провокационного теста с помощью ДП с ацелизином  
Группа 1 – пациенты с чувствительностью к аспирину, группа 2 – пациенты, нечувствительные к аспирину

Fig 10. Comparative assessment of clinical indices of diagnostic films with acelysine at nasal provocational test. Group 1 – patients with aspirin sensitivity, group 2 – patients with aspirin insensitivity

Рис. 11 иллюстрирует выход из пленки и продвижение метиленового синего в носовой полости; время продвижения по слизистой оболочке носа позволяет достоверно оценить ее транспортную функцию в норме и при патологии [28, 47].

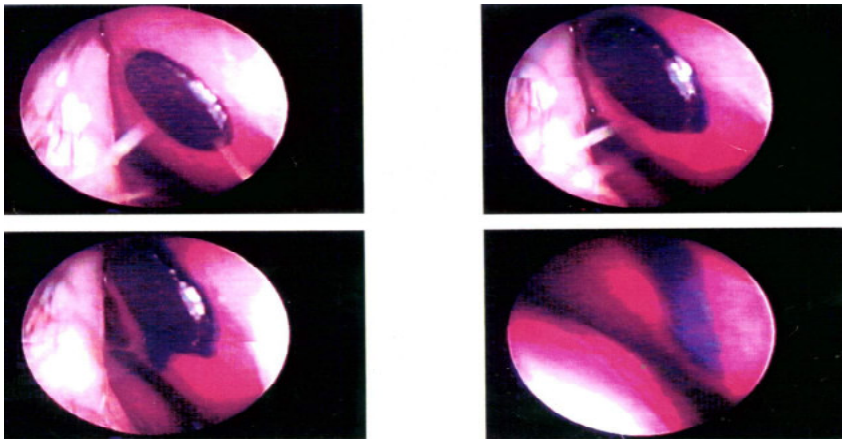


Рис. 11. Исследование функции мерцательного эпителия слизистой оболочки носовой полости с помощью диагностической пленки с метиленовым синим

Fig. 11. Investigation of nasal cavity ciliated epithelium mucuous membrane with methylene blue containing diagnostic film

Особое внимание уделяется проблеме элиминации высокотоксичных поллютантов — фенолов из растворов и сточных вод ферментативными методами. Их преимуществом являются: возможность проведения реакции в широких диапазонах рН и температуры с образованием нетоксичных продуктов. Однако существенными недостатками ферментативного окисления фенолов являются однократность использования и нестабильность фермента, поэтому его стабилизация с возможностью многократного использования путем иммобилизации — актуальная задача.

Активным биокатализатором конверсии фенолов является пероксидаза хрена (ПОХ). Механизм биоконверсии состоит в следующем: ПОХ катализирует процесс окисления фенолов в присутствии  $H_2O_2$  с образованием соответствующих феноксильных радикалов, диффундирующих из активного центра фермента в раствор, которые неферментативно полимеризуются с образованием полиароматических продуктов [42].

Исследованы физико-химические свойства свободного фермента, разработаны условия трансформации фенолов (рН 4,0–7,5, температура 20–45 °С, время инкубации 0,5–1 ч, мольное соотношение субстрат: пероксид водорода 0,1(0,5):1, диапазон концентраций фенолов 0,025–1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>. Активность ПОХ 0,025–1,0 Ед/мг) [43], с высокой степенью их биоконверсии. Определены кинетические параметры ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) реакции. Методами QSAR и QSPR [34, 35] осуществлен анализ реакционной способности фенолов (41 соединение) в реакциях пероксидазного окисления (совместно с лабораторией теоретической химии ФХИ имени А.В. Богатского НАН Украины).

С помощью методов множественной линейной регрессии получены модели, адекватно описывающие реакционную способность замещенных фенолов с использованием электронных параметров молекул, липофильности, рефракции и параметров формы (рис. 12). Подтверждено влияние электронных свойств заместителей в ароматическом кольце фенолов на степень их биоконверсии.

Полученные модели позволяют с достаточной надежностью прогнозировать реакционную способность новых фенольных субстратов ПОХ.



Рис. 12. Вклады структурных дескрипторов в изменение: а)  $K_m^{-1}$ ; б)  $V_{max}$  ( $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_z$  — моменты инерции вдоль координатных осей, Log P — липофильность, DM — дипольный момент, EN — сумма электроотрицательностей атомов,  $q_o$  — заряд на фенольном атоме кислорода,  $\Delta E = E_{HOMO}^2 - E_{LUMO}^3$ )

Fig. 12. Structural descriptors contributions to the change of а)  $K_m^{-1}$ ; б)  $V_{max}$  ( $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_z$  — moments of inertia lengthways the coordinate axes, Log P — lipophilicity, DM — dipole moment, EN — total electronegativity of atoms,  $q_o$  — phenolic oxygene atom partial charge,  $\Delta E = E_{HOMO}^2 - E_{LUMO}^3$ )

Впервые исследованы различные методы иммобилизации пероксидазы (в каррагинан, поли-N-винилкапролактан, на гидратцеллюлозной мембране), свойства иммобилизованных препаратов. Получены стабильные и активные биокатализаторы с возможностью многократного использования (до 22 раз при ковалентном связывании с гидратцеллюлозной мембраной методом периодатного окисления (рис. 13) для элиминации фенольных соединений (25,0–100,0 ммоль/дм<sup>3</sup>) [18, 32, 36].



Рис. 13. Многократное использование ковалентно иммобилизованной на гидратцеллюлозной мембране ПОХ в реакции окисления фенола

Fig 13. Repeated using of HRP covalently immobilized on cellulose hydrate membrane in the reaction of phenol oxidation

Таким образом, изученные методы инженерной энзимологии позволяют получать стабильные высокоактивные препараты БАВ, перспективные для применения в области ферментативной химии, медицины, экологии.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Богатский А.В., Давиденко Т.И., Бондаренко Г.И., Котляр И.И. Ферментативное восстановление нитразепама // Докл. АН УССР. — Сер. биол. — 1979. — № 1. — С. 132-134.
2. Богатский А.В., Давиденко Т.И., Севастьянов О.В. Использование иммобилизованной фракции микросом печени животных для реакций превращения 1,4-бенздиазепин-2-онов // Укр. биохим. журн. — 1979. — Т. 51, № 4. — С. 382-386.
3. Богатский А.В., Андронати С.А., Давиденко Т.И., Середа Н.П. и др. Ферментативный синтез 2-(ациламино-R-пропиониламида)-бензофенонов // Докл. АН СССР. — 1980. — Т. 252, № 5. — С. 1129-1132.
4. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. — Одесса: Астропринт, 2004. — 720 с.
5. Давиденко Т.И., Котляр И.И., Бондаренко Г.И., Богатский А.В. Ферментативное восстановление нитразепама и 2,4-динитро-5Н-11-п-Р-фенилбензо- (b,f)-1,4-бензодиазепинов при поражении крыс циррозом // Докл. АН УССР. — Серия. биол. — 1981. — № 8. — С. 58-61.
6. Давиденко Т.И., Котляр И.И., Беленькая И.А., Андронати С.А. Микробиологическое восстановление нитропроизводных бензо-2,1,3-тиадиазола // Хим.-фарм. журн. — 1984. — Т. 18, № 4. — С. 467-470.



7. Давиденко Т.И., Котляр И.И., Бондаренко Г.И. и др. Восстановление нитропроизводных 1,2-дигидро-3Н-1,4-бензодиазепин-2-онов иммобилизованными клетками *E. coli* // Хим.-фарм. журн. — 1984. — Т. 18., № 9. — С. 1105-1110.
8. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В. Ферментативное гидроксирование флуорена // Хим.-фарм. журн. — 1984. — № 7. — С. 66-68.
9. Давиденко Т.И., Заболотская Н.И., Мищенко Н.П., Андронати С.А., Кузнецов В.Д. Гидроксирование 1,4-бензодиазепин-2-онов актиномицетами // Докл. АН СССР. — 1984. — Т. 278, № 4. — С. 878-880.
10. Давиденко Т.И., Бондаренко Г.И. Региоспецифичное нитровосстановление клетками *E. coli* // Докл. АН УССР, сер. Б. — 1988. — № 5. — С. 71-75.
11. Давиденко Т.И., Севастьянова Е.В., Сергеев В.П. и др. Иммобилизация протеолитических ферментов на угольной ткани АУВМ «Днепр» // Хим.-фарм. журн. — 1992. — Т. 26, № 6. — С. 40-42.
12. Давиденко Т.И., Чуенко А.В., Захарова И.Я. и др. Иммобилизованная эластотераза // Хим.-фарм. журн. — 1997. — Т. 31, № 8. — С. 7-9.
13. Давиденко Т.И., Бондаренко Г.И., Сотникова Е.П. и др. Совместная иммобилизация террилитина и торфота // Хим.-фарм. журн. — 1998. — Т. 32, № 3. — С. 54-56.
14. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Чуманова М.А. и др. Литическая активность иммобилизованной стерилизы // Хим.-фарм. журн. — 2001. — Т. 35, № 10. — С. 14-17.
15. Давиденко Т.И., Пашкин И.И., Шапиро Ю.Е. и др. Стабилизация поли-N-винилкапролактама // Доп. НАН України. — 2002. — № 12. — С. 108-113.
16. Давиденко Т.И. Иммобилизация ферментных препаратов // Вісник ОНУ, Серія хім. — 2003. — Т. 8, № 4. — С. 135-147.
17. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Осейчук О.В., Декина С.С. Структура и образование комплексов включения фенолов в поли-N-винилкапролактамы // Доповіді НАН України. — 2005. — № 9. — С. 145-150.
18. Декина С.С., Осейчук О.В., Романовская И.И. Иммобилизация пероксидазы в каррагинане из *Rhyllophora nervosa* // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2005. — Т. 10. — № 9. — С. 120-126.
19. Пимоненко Н.Ю., Сергеев В.П., Соколова Ю.А. и др. IV Республ. конф. «Сорбенты медицинского назначения и механизмы их лечебного действия»: Тез. докл. — Донецк, 1988. — С. 23-24.
20. Пухлик С.М., Романовская И.И., Давиденко Т.И. Клинико-экспериментальное исследование изготовления и применения иммобилизованных аллергенов в ринологии // Ринология. — 2002. — № 1. — С. 42-44.
21. Пухлик С.М., Дедикова И.В., Романовская И.И. Иммобилизация аллергена на носителе — новая технология для специфической иммунотерапии круглогодичного аллергического ринита // Журн. вушних, носових та горлових хвороб. — 2003. — № 3. — С. 24-25.
22. Пухлик Б.М., Пухлик С.М., Корицкая И.В. и др. Современные взгляды на проблему лечения аллергического ринита // Укр.пульмонолог.журн. — 2004. — №2. — С. 18-21.
23. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Восстановление нитрозамещенных бензо-2,1,3-тиадиазолов иммобилизованными клетками *E. coli* // Хим.-фарм. журн. — 1989. — Т. 23, № 4. — С. 473-476.
24. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация аллергенов белка куриного яйца и домашней пыли // Доп. НАН України. — 2000. — № 1. — С. 160-164.
25. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация литического ферментного комплекса лизорицефина // Прикл. биохим. и микробиол. — 1999. — № 1. — С. 68-71.
26. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация аллергенов на полимерных носителях // Вісник ОНУ. Серія хім. — 2002. — Т. 6, № 1. — С. 146-151.
27. Романовская И.И., Давиденко Т.И., Арбид А. и др. Включение аллергенов пыльцы ржи и белка куриного яйца в поли-N-винилкапролактамы // Фізіологічно — активні речовини. — 2002. — Т.34, № 2. — С. 87-90.
28. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Диагностические полимерные пленки с новокаином и метиленовым синим // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2004. — Т.9, № 3 — С. 108-113.
29. Романовская И.И., Давиденко Т.И., Эльсаббаг А. и др. Адсорбция аллергенов пыльцы ржи и белка куриного яйца аэросилом // Хим.-фарм. журн. — 2004. — № 10. — С. 15-17.



30. Романовская И.И., Давиденко Т.И. Создание кислотоустойчивой формы иммобилизованной на углеродной ткани АУВМ „Днепр-МН” липазы *Penicillium solitum* // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2005. — Т. 10, № 1. — С. 72-79.
31. Романовська І.І., Пухлік С.М., Пухлік Б.М. Іммобілізація алергенів для створення потенційних діагностичних та лікарських засобів інтраназального способу введення // Одеський медичний журн. — 2006. — Т. 94, № 2. — С. 25-29.
32. Романовская И.И., Осейчук О.В., Севастьянов О.В., Давиденко Т.И. Иммобилизация пероксидазы в поли-N-винилкапролактаме // Вісник ОНУ. — Серія хім. — 2005. — Т. 10, № 8 — С. 49-54.
33. Романовська І.І., Пухлік С.М. Полімерні плівки для інтраназальної діагностики непереносимості до аспірину // Досягнення біології та медицини. — 2006. — № 2 (8). — с.16-20.
34. Романовская И.И., Кузьмин В.Е., Осейчук О.В., Муратов Е.Н., Артеменко А.Г., Андронати С.А. GSPR анализ реакционной способности субстратов пероксидазы // Вісник ОНУ.— Серія хім. — 2006.— Т. 11, № 5.— С. 59-77.
35. Романовская И.И., Муратов Е.Н., Кузьмин В.Е., Осейчук О.В., Артеменко А.Г., Андронати С.А. Анализ влияния структуры фенольных соединений на степень их ферментативной конверсии // Доп. НАН України. — 2006. — № 9. — С. 161-166.
36. Романовська І.І., Осійчук О.В. Фізико-хімічні дослідження іммобілізованого на гідратцелюлозній мембрані препарату пероксидази хрону // Медична хімія. — 2006.-№ 6.-С.55-61.
37. Романовська І.І., Декіна С.С. Розробка раневого гідрогелевого покриття з іммобілізованою лужною протеазою *Vacillus subtilis* на основі модифікованого полі-N-вінілпіролідону // Досягнення біології та медицини, 2007. — № 1. — С. 88-91.
38. Романовська І.І., Тагунова І.К., Пухлік С.М., Чаланова Р.І. Іммобілізація літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis var lyticus* // Одеський медичний журнал. — 2007. — Т.99, № 1. — С. 19-23.
39. Романовська І.І., Декіна С.С. Іммобілізація папаїну та сечовини в полівініловий спирт // Медична хімія, 2007 — №1. — С. 35 — 40.
40. Романовская И.И., Бондаренко Г.И., Давиденко Т.И. Иммобилизация липазы *Penicillium solitum* на углеродном волокнистом материале «ДНЕПР-МН»// Хим.-фарм. журн. — 2008. — Т.42, № 6. — С.49-51.
41. Юданова Т.Н., Решетов И.В. Современные раневые покрытия: получение и свойства (обзор) // Хим.-фарм. журн. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 24-31.
42. Veitch N.C., Smith A.T. Horseradish peroxidase // Adv. Inorg. Chem. — 2001. — Vol. 51. — P. 107-162.
- 43 Т. І. Давиденко, О. В. Осейчук, О. В. Севастьянов, І. І. Романовська. Peroxidase oxidation of phenols // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2004. — V. 40, № 6. — P. 542-546.
44. Пат. 7861, Україна, МПК 7 С 12N 11/00 Спосіб іммобілізації ліполітичних ферментів / Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, Г.І. Бондаренко (Україна ). — Заявка № 20041209892; Заявл. 03.12.2004; Опубл. 15.07.2005. Бюл.№ 7.
45. Пат. № 13238. Україна. МПК А61F 9/007. Композиція інгредієнтів для очної лікарської плівки /І.І. Романовська, С.С. Декіна, Г.І. Бондаренко, Р.І. Чаланова., С.А Якименко, Т.І Давиденко. — № 200509628; Заявл. 13. 10. 2005; Опубл. 15.03.2006. Бюл. № 3.
46. Пат. 4268А Україна, МПК 7 А61В 10/00. Спосіб специфічної імунотерапії алергічних ринітів /Б.М. Пухлік, С.М. Пухлік, Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, Д.І. Заболотний. — № 2000074259; Заявл. 17.07.2000; Опубл. 15.10.2001. Бюл. № 9.
47. Пат. 9349, Україна, МПК 7 А61В 6/02 Композиція інгредієнтів для діагностичних плівок /Романовська І.І., С.М. Пухлік, Т.І. Давиденко, Б.М. Пухлік, — № 200502712; Заявл. 25.03.2005; Опубл. 15.09.2005. Бюл. № 9.
48. Пат. 17899, Україна, МПК 7 А61К 9/56 Спосіб діагностики непереносимості аспірину / І.І. Романовська, С.М. Пухлік, № 200604451; Заявл. 20.04.2006; Опубл. 16.10.2006. Бюл. № 10.

**Т.І. Давиденко, І.І. Романовська, С.А. Андронаті**

Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України,  
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна,  
тел.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

## **ІММОБІЛІЗАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН**

### **Реферат**

Дослідження методів і носіїв для іммобілізації біологічно активних сполук, аналіз фізико-хімічних властивостей отриманих з їх використанням препаратів, показали перспективність застосування розроблених БАР у галузі ферментативної хімії, для отримання потенційних діагностичних і лікарських засобів та вирішення екологічних проблем.

**К л ю ч о в і с л о в а:** біологічно активні сполуки, іммобілізація, ферментативний синтез, медицина, екологія.

**T.I. Davidenko, I.I. Romanovskaya, S.A. Andronati**

A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine  
Lustdorfskaya Rd, 86, Odessa, 65080, Ukraine  
тел.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

## **IMMOBILIZATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

### **Summary**

Investigation of the methods and carriers for immobilization of biologically active compounds, the analysis of physico-chemical features of the preparations obtained with their using have shown the prospects of application of biologically active developed compounds in the field of enzymatic chemistry for creation of potential diagnostic and medical products as well as solution of the environmental problems.

**К e y w o r d s:** biologically active compounds, immobilization, enzymatic synthesis, medicine, ecology.



УДК 579.842.1/.2:579.252

Ж. Ю. Сергеева<sup>1</sup>, Ф. И. Товкач<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина, тел.: 8 (044) 526 61 57, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ДНК МЕГАПЛАЗМИД И БАКТЕРИОФАГОВ *ERWINIA CAROTOVORA*

На основании проведённого сравнительного рестрикционного анализа ДНК мегаплазмид размерного класса 64,5–129 т.п.н., полученных из различных штаммов фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora*, установлено, что все исследованные плазмиды имеют разные рестрикционные узоры. Сравнительный анализ картин рестрикции мегаплазмиды рСА16-1 и бактериофага NF16 *E. carotovora* штамма ЗЗА выявил несовпадение плазмидной и фаговой ДНК по сайтам рестрикции.

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* *Erwinia carotovora*, мегаплазмиды, бактериофаги, рестрикционный анализ.

Внехромосомные генетические элементы, такие как плазмиды и бактериофаги, достаточно широко распространены у фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* [3]. Для некоторых штаммов эрвиний характерно одновременное наличие мегаплазмид и индуцируемых профагов. В своём большинстве плазмиды *E. carotovora*, в том числе и мегаплазмиды, являются криптическими [6]. Так как *E. carotovora* представляет собой полилизогенную систему, не исключена возможность, того что мегаплазмиды этой бактерии являются молчащими профаговыми репликаонами.

Целью работы было определение совпадений в расположениях сайтов рестрикции на плазмидных и фаговых ДНК на основании проведенного сравнительного рестрикционного анализа мегаплазмид и геномов бактериофагов *E. carotovora*.

### Материалы и методы

В работе были использованы штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora* ЗЗА, NSPPB 549<sup>T</sup>, NSPPB 312<sup>T</sup>, С366 и бактериофаги NF16 и ZF40/421.

Выделение плазмид из клеток *E. carotovora* проводили щелочным методом [5]. Выделение фаговой ДНК осуществляли детергент-фенольным методом [4]. Полученные плазмидные ДНК осаждали этанолом и растворяли в воде или в буфере Т:



10 мМ Трис-НСl, рН 7,8. Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы *HpaI*, *EcoRI*, *SalI*, *PstI*, *HindIII* и *BamHI*. Состав рестрикционной смеси был следующий: 5 мкл плазмидного образца, 2 мкл соответствующего 10-кратного буфера для рестрикции, 1 мкл эндонуклеазы и 12 мкл Н<sub>2</sub>О. Время рестрикции составляло 2–3 ч при температуре 37 °С. Фрагменты разделяли в 0,9–1,0% агарозных гелях. В качестве маркера размера использовали фрагменты ДНК фага λ, полученные с помощью эндонуклеазы *HindIII*.

Частицы бактериофага NF16 очищали, разделяли и концентрировали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (DEAE 23 SS, Serva 09047). Через колонку диаметром 1,6 см и высотой 32,5 см, уравновешенную 0,02 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,0, пропускали 1000 мл лизата клеток. Затем колонку поэтапно элюировали растворами 0,25 М и 0,4 М NaCl. В составе каждой фракции определяли наличие опалесценции, характерной для растворов вирусных частиц. В результате было получено две пиковые фракции фага NF16: NF16/0,25 М NaCl и NF16/0,4 М NaCl.

### Результаты и их обсуждение

В результате рестрикционного анализа мегаплазмид четырёх штаммов *E. carotovora* рестриктазами *SalI*, *HpaI* и *EcoRI* было выявлено, что ДНК каждой мегаплазмиды имеет уникальную первичную последовательность (рис. 1).

Данные штаммы эрвиний содержат по две различные плазмиды. В клетках штамма 33А мегаплазмиды рСА16-1 (129 т.п.н.) соседствует с плазмидой небольшого размера рСА16-2 (5,3 т.п.н.).

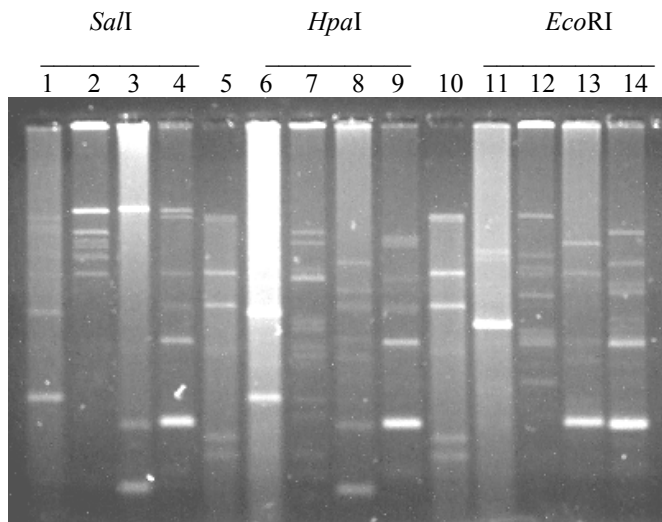


Рис. 1. Электрофореграмма фрагментов рестрикции мегаплазмид *E. carotovora*:  
1, 6, 11 – рСА16-1 (Есс 33А); 2, 7, 12 – рСА 549-1 (NCPPB 549<sup>T</sup>); 3, 8, 13 –  
рСА 312-1 (NCPPB 312<sup>T</sup>); 4, 9, 14 – рСА 42-1 (Есс С366);  
контроль 5, 10 – λ / *HindIII*

Fig. 1. The electrophoregram of the restriction fragments of *E. carotovora* megaplasmids: 1, 6, 11 – рСА16-1 (Есс 33А); 2, 7, 12 – рСА 549-1 (NCPPB 549<sup>T</sup>);  
3, 8, 13 – рСА 312-1 (NCPPB 312<sup>T</sup>); 4, 9, 14 – рСА 42-1 (Есс С366);  
control 5, 10 – λ / *HindIII*



Клетки штамма С366, помимо мегаплазмиды рСА42-1 (129 т.п.н.), содержат также плазмиду рСА42-2, размером 4,3 т.п.н. [3]. Мегаплазмиду рСА549-1 (129 т.п.н.) в штамме NCPPB 549<sup>T</sup> сопровождает плазида малочисленного среди эрвиний размерного класса (47,7 т.п.н.) — рСА549-2 [2]. Клетки штамма NCPPB 312<sup>T</sup> содержат две плазмиды: рСА312-1 (64,5 т.п.н.) и рСА312-2 (3,8 т.п.н.) [3].

В связи с наличием в штаммах нескольких плазмид, мы сравнивали только самые верхние фрагменты на электрофореграмме в диапазоне размеров от 25 до 9 т.п.н. (рис. 1), представляющие собой фрагменты рестрикции мегаплазмид.

Установлено, что на ДНК плазмид рСА16-1, рСА42-1 и рСА549-1 имеются сайты рестрикции для каждой из трёх использованных нами эндонуклеаз рестрикции (*SalI*, *HpaI* и *EcoRI*). Рестриктаза *SalI*, однако, не гидролизовала ДНК плазмиды рСА 312-1 (рис. 1, трек 3) из-за отсутствия соответствующих сайтов узнавания и разрезания на плазмиде. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рестрикционные картины мегаплазмид уникальны, и плазмидные ДНК не имеют одинаковых по размеру рестрикционных фрагментов.

Предполагаем, что различное происхождение данных штаммов *E. carotovora* и несовпадение первичных последовательностей их мегаплазмид может быть связано с тем, что большие внехромосомные ДНК играют важную роль в формировании патогенности эрвиний по отношению к некоторым растениям в соответствующих экологических нишах.

Способность клеток эрвиний провоцировать появление опухолей и возможную причастность к данному явлению мегаплазмиды рСА16-1 проверялись на растениях каланхое Дегремона (*Kalanchoe daigremontiana*). Так как клетки *E. carotovora* вызывают после инфекции растений развитие сильной реакции гиперчувствительности и генерализованную инфекцию всего растения, необходимо было получить диссоцианты исследуемого штамма. С помощью каротоворицина из штамма 48А получены штаммы-диссоцианты 1/1, 1/2, 2/1, 2/2, 2/3, 3/1, 3/2 *E. carotovora* 33А.

Ткани листьев каланхое инфицировали суточными суспензиями исходного штамма и его диссоциантов. Штаммы-диссоцианты вызывали более выраженную реакцию гиперчувствительности у растений по сравнению с исходным штаммом. Отличий между отдельными диссоциантами в реакции гиперчувствительности, проявленной растениями, обнаружить не удалось. Было установлено, что клетки эрвиний не осуществляют трансформацию растительных клеток и не провоцируют рост опухолей на растениях каланхое Дегремона, в то же время в контрольных опытах с *Agrobacterium tumefaciens* С58 был получен позитивный результат. Таким образом, мегаплазмиды рСА16-1, очевидно, не является туморогенной.

Клетки *E. carotovora* штамма 33А являются псевдолизогенными и несут бактериофаг NF16 и, после индукции бактериоцинами, начинают продуцировать фаговые частицы. Возможная причастность мегаплазмиды рСА16-1 к профаговому геному NF16 была проверена с помощью сравнительного рестрикционного анализа их геномов эндонуклеазами *HpaI* и *BamHI* (рис. 2).

В результате анализа полученных картин рестрикции (рис. 1, треки 6 и 11, рис. 2, треки 1, 2, 8 и 9), было установлено, что ДНК мегаплазмиды рСА16-1 и бактериофага NF16 отличаются по первичной последовательности и не содержат идентичных по подвижности фрагментов ДНК.

Сравнение картин рестрикции генома бактериофага NF16 и генома другого эрвиниофага ZF40/421 для эндонуклеаз *HpaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* и *HindIII* показало, что геном бактериофага NF16 фракции NF16/0,4 М NaCl совпадает по рестрикционной картине с геномом фага ZF40/421 (рис. 2). На треках видно, что геномы обоих фагов содержат идентичные фрагменты ДНК, однако на рестрикционной картине



фага NF16 фракции NF16/0,25 М NaCl в верхних частях треков имеются также дополнительные фрагменты ДНК (рис. 2, треки 1, 4, 8, 12 и 15), которые, возможно, отражают разный характер пермутаций их первичных последовательностей [1].

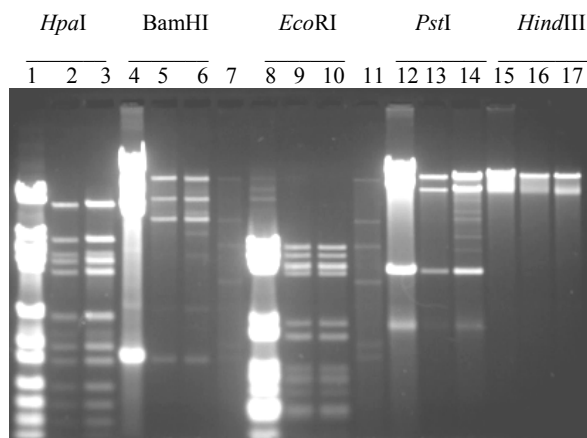


Рис. 2. Электрофореграмма фрагментов рестрикции ДНК бактериофагов NF16 и ZF40/421 *E. carotovora*: 1, 4, 8, 12, 15 – NF16 / 0,25 М NaCl; 2, 5, 9, 13, 16 – NF16 / 0,4 М NaCl; 3, 6, 10, 14, 17 – ZF40/421; контроль 7, 11 –  $\lambda$  / *HindIII*

Fig. 2. The electrophoregram of the restriction fragments of the DNA of *E. carotovora* bacteriophages NF16 and ZF40/421: 1, 4, 8, 12, 15 – NF16 / 0,25 М NaCl; 2, 5, 9, 13, 16 – NF16 / 0,4 М NaCl; 3, 6, 10, 14, 17 – ZF40/421; control 7, 11 –  $\lambda$  / *HindIII*

Таким образом, в отличие от плазмид *E. carotovora* размером около 10 т.п.н., имеющих схожие картины рестрикции [2], все исследованные нами мегаплазмиды эрвиний представлены уникальными последовательностями.

Рестрикционный анализ выявил, что геномы мегаплазмиды рСА16-1 и бактериофага NF16 не содержат идентичных рестрикционных фрагментов ДНК. Однако это не исключает возможной причастности мегаплазмид других штаммов эрвиний к профаговым элементам полилизогенной бактерии *E. carotovora*.

Работа выполнена при поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований (проект Ф25/134-2008) и МОН Украины (проект НУ/448-2009).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Панцина А.И., Товкач Ф.И. Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2006. – Т. 68, № 6. – С. 35-43.
2. Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* // Доповіді НАН України. – 2008. – № 12. – С. 149-153.
3. Товкач Ф.И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 804 – 810.
4. Товкач Ф.И., Григорян Ю.А., Рубан В.И., Данилейченко В.В., Кишко Я.Г. Рестрикционная карта пермутированной ДНК умеренного бактериофага 59 *Erwinia carotovora* // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. – 1988. – № 1. – С. 20-24.
5. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. – 1981. – V. 145, № 3. – P. 1365-1373.
6. Vivian A., Murillo J., Jackson R. W. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? // Microbiology. – 2001. – V. 147. – P. 763-780.



**Ж.Ю. Сергєєва<sup>1</sup>, Ф.І. Товкач<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **ПОРІВНЯЛЬНИЙ РЕСТРИКЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ДНК МЕГАПЛАЗМІД І БАКТЕРІОФАГІВ *ERWINIA CAROTOVORA***

### **Реферат**

В результаті проведеного рестрикційного аналізу ДНК мегаплазмід, отриманих з різних штамів фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora*, показано, що усі досліджені плазміди представлені унікальними послідовностями. Порівняльний аналіз картин рестрикції мегаплазмід рСА16-1 і бактеріофага NF16 *E. carotovora* штаму 33А виявив відсутність співпадінь плазмідної і фагової ДНК за первинною послідовністю.

**К л ю ч о в і с л о в а:** *Erwinia carotovora*, мегаплазмід, бактеріофаги, рестрикційний аналіз.

**Zh.U. Sergeeva<sup>1</sup>, F.I. Tovkach<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup> Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Acad. Zabolotno str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **THE COMPARATIVE DNA RESTRICTION ANALYSIS OF *ERWINIA CAROTOVORA* MEGAPLASMIDS AND BACTERIOPHAGES**

### **Summary**

As the result of the restriction analysis of the DNA of phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora* megaplasmids from different strains it has been shown that all the studied plasmids are represented with the unique sequences. The comparative analysis of the restriction sites of *E. carotovora* pCA16-1 megaplasmid and NF16 bacteriophage from the strain 33A has detected that plasmid and phage DNAs differ in primary sequences.

**К e y w o r d s:** *Erwinia carotovora*, megaplasmids, bacteriophages, restriction analysis.



**Я.П. Грубський, О.В. Аравіцька, М.Л. Мироновський,  
О.М. Громико, Б.О. Осташ, В.О. Федоренко**

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,  
тел.: 8 (032) 239 44 75, e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua

## **ВПЛИВ N-МЕТИЛ-N'-НІТРО-N-НІТРОЗОГУАНІДИНУ ТА N-МЕТИЛ-N-НІТРОЗОМЕТИЛСЕЧОВИНИ НА АНТИБІОТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ПРОДУЦЕНТА СІОМІЦИНУ *STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81**

*Досліджено вплив N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ) та N-метил-N-нітрозометилсечовини (НМС) на життєздатність та антибіотичну активність продуцента сіоміцину *S. sioyaensis* Lv81. Встановлено, що оптимальними для отримання клонів з підвищеною антибіотичною активністю є дози НГ і НМС, при яких виживає, відповідно, 20–30 % і близько 0,2 % спор досліджуваного штаму. Для виявлення клонів *S. sioyaensis* Lv81 з підвищеним синтезом сіоміцину можна використовувати метод, що ґрунтується на стимулюванні сіоміцином росту на середовищі з канаміцином штаму *Streptomyces lividans* TK24, який містить плазмиду pMO16 з геном канаміцин-і неоміцин-стійкості neo під контролем tirA-промотора.*

*К л ю ч о в і с л о в а: Streptomyces sioyaensis, сіоміцин, N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин, N-метил-N-нітрозометилсечовина, мутант.*

Актиноміцети продукують більшість відомих сьогодні антибіотиків [8]. Серед вторинних метаболітів актиноміцетів значний інтерес становлять тіопептиди, зокрема тіострептон та найближчий до нього за будовою сіоміцин. Ці антибіотики виявляють активність щодо грампозитивних бактерій, у тому числі *Mycobacterium tuberculosis*, блокуючи білковий синтез. Крім того, вони пригнічують розвиток збудника малярії *Plasmodium falciparum*, а також діють як імуносупресанти та протипухлинні агенти. Тіопептиди відкриті ще в 50-х роках ХХ століття, однак у медицині їх не використовували насамперед через погану розчинність цих сполук у воді [5, 7, 12, 15].

Значне розповсюдження резистентності збудників інфекцій та ракових клітин до антибіотиків зумовлює необхідність пошуку та використання нових антибактерійних і протипухлинних агентів. За цих умов тіопептиди знов привернули велику увагу дослідників, оскільки на їхню мішень у бактерійній клітині, а саме комплекс рибосомного білка L11 і 23S рРНК [5], не діють інші, широко вживані антибіотики.

Сіоміцин продукується штамом *Streptomyces sioyaensis* Lv81 (=NRRL-B5408). Механізм біосинтезу цього антибіотика, його генетичний контроль, а також генетичні особливості штаму-продуцента вивчені недостатньо. Лише нещодавно клоновано кластери генів біосинтезу тіострептон та сіоміцину і доведено, що їхній пептидний



попередник синтезується на рибосомах [11], а також створено систему клонування генів у клітинах *S. sioyaensis* [13]. Умовою успішного вивчення закономірностей біосинтезу сіоміцину, а також отримання його біотехнологічних продуцентів з високим рівнем антибіотичної активності, є створення системи селекції мутантів *S. sioyaensis*.

Метою роботи є визначення умов виділення клонів *S. sioyaensis* зі зміненою здатністю до біосинтезу сіоміцину з використанням алкілувальних мутагенів N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ) і N-метил-N-нітрозометилсечовини (НМС).

### Матеріали і методи

У роботі використано штами *Streptomyces sioyaensis* Lv81(=NRRL-B5408), *S. globisporus* 1912-2 (продуцент ландоміцину Е), *S. nogalater* IMET 43360 (продуцент ногаламіцину) і *S. kanamyceticus* (продуцент канаміцину) з Колекції культур мікроорганізмів — продуцентів антибіотиків ЛНУ імені Івана Франка, а також подібні *S. sioyaensis* Lv81, виділені у цій роботі. Штам *Sarcina lutea* використали як тест-культуру для визначення антибіотичної активності *S. sioyaensis*. Для аналізу біосинтезу сіоміцину використали також штам *Streptomyces lividans* ТК24, який містить плазмиду рМО16.

Для отримання спор штами *S. sioyaensis* вирощували на вівсяному середовищі [3] при температурі 28 °С. Антибіотичну активність *S. sioyaensis* вивчали на соєвому середовищі СС-14 [3] та середовищі SG [10]. Штам *Sarcina lutea* і *Streptomyces lividans* ТК24 (рМО16) вирощували на триптозному агарі [10] при температурі 37 °С та 28 °С, відповідно. У роботі використано N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин (НГ) фірми “Fluka” та N-метил-N-нітрозометилсечовину (НМС) фірми “Sigma”.

Антибіотичну активність *S. sioyaensis* визначали методом дифузії в агар з пригніченням при цьому росту тест-культур. Визначали індекси продуктивності (ІП) окремих клонів культури [2, 4, 14]. Екстракцію сіоміцину з біомаси *S. sioyaensis* і тонкошарову хроматографію (ТШХ) екстрактів проводили як описано [13]. Для порівняльного аналізу рівня біосинтезу сіоміцину вихідним штамом та його мутантами застосували також тест-систему *S. lividans* ТК24 (рМО16) [9, 13].

Спори *S. sioyaensis* обробляли НГ та НМС, як описано [1, 4].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel 2003.

### Результати та їх обговорення

Досліджено вплив різних доз НГ і НМС на життєздатність спор *S. sioyaensis* та порівняно його з іншими актиноміцетами за чутливістю до цих мутагенів. НГ використали в трьох концентраціях: 5, 7 і 10 мг/мл і обробляли спори актиноміцетів протягом 10—40 хв. У всіх варіантах дослідів, де використали 10 мг/мл НГ, спостерігали повну загибель спор *S. sioyaensis* та *S. globisporus*. Натомість обробка спор *S. nogalater* НГ у концентрації 10 мг/мл протягом 10 хв зумовлювала лише падіння виживання спор приблизно у 2 рази. Оброблення спор *S. sioyaensis* НГ у концентраціях 5 і 7 мг/мл протягом 10 хв знижувало їхнє виживання до 60 %. Якщо ж спори обробляли НГ у концентрації 5 мг/мл протягом 20 хв, то їхнє виживання знижувалося до 40 %, а через 30 хв — до 20 %. При концентрації 7 мг/мл НГ спостерігали більш істотні відмінності у виживанні спор: близько 20 % при дії мутагену протягом 20 хв і 3 % при 30 хв інкубації. Зростання тривалості обробки



НГ до 40 хв знижує виживання спор ще у 10 разів. Характер кривих виживання свідчить про те, що *S. siوياensis* значно стійкіший до дії НГ, ніж *S. globisporus*, але чутливіший, ніж *S. nogalater* (рис. 1).

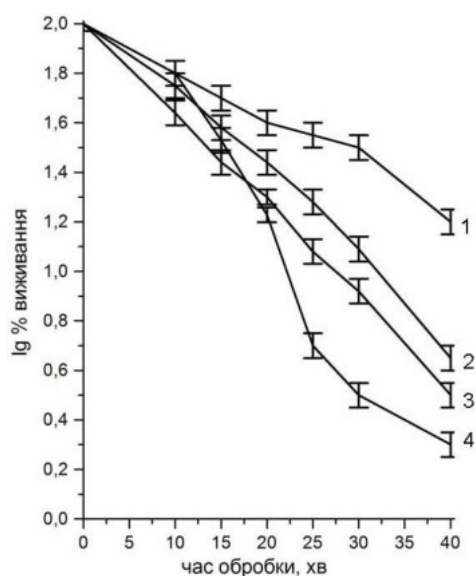


Рис. 1. Вплив НГ на виживання спор штамів: *S. siوياensis* (1 – концентрація НГ 5 мг/мл; 4 – 7 мг/мл), *S. nogalater* ІМЕТ 43360 (3 – 10 мг/мл), *S. globisporus* 1912-2 (2 – 3 мг/мл)

Fig. 1. The influence of NG on the spores survival of the following strains: *S. siوياensis* (1 – concentration of NG 5 mg/ml; 4 – 7 mg/ml), *S. nogalater* ІМЕТ 43360 (3 – 10 mg/ml), *S. globisporus* 1912-2 (2 – 3 mg/ml)

НМС використовували в концентраціях 20, 30 та 50 мг/мл. Тривалість обробки спор *S. siوياensis* – з 2 до 5 год (рис. 2). При концентрації мутагену 20 мг/мл і збільшенні часу експозиції з 2 до 5 год виживання спор знижується з 96 % до 5 %. Не спостерігали значних відмін між загибеллю спор при концентраціях НМС 30 і 50 мг/мл (рис. 2, 2 і 3). Якщо після 3 год обробки виживало близько 90 % спор, то після 4 і 5 годин – 0,1–0,2 % і  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  %, відповідно. *S. siوياensis* більш стійкий до НМС порівняно з *S. kanamyceticus* (рис. 2, 4 і 5). Наприклад, 0,2 % спор *S. kanamyceticus* виживали при 30 мг/мл НМС за дії мутагену протягом 30 хв.

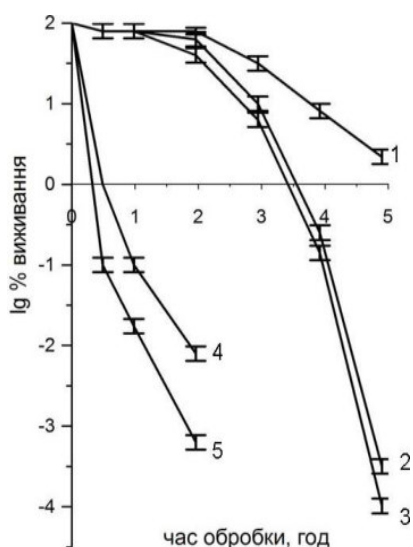


Рис. 2 Вплив НМС на виживання спор штамів: *S. siوياensis* (1 – концентрація НМС 20 мг/мл, 2 – 30 мг/мл, 3 – 50 мг/мл) та *S. kanamyceticus* (4 – 20 мг/мл), 5 – 30 мг/мл)

Fig. 2. The influence of NMU on the spores survival of the following strains: *S. siوياensis*, (1 – concentration of NMU 20 mg/ml, 2 – 30 mg/ml, 3 – 50 mg/ml) та *S. kanamyceticus* (4 – 20 mg/ml), 5 – 30 mg/ml)



Важливою особливістю НГ як мутагену є його здатність індукувати виникнення мутацій, не спричиняючи високої летальності клітин. Діапазон ефективних доз НГ досить широкий. Для актиноміцетів це дози, при яких виживає від 10 до 50 % спор [6]. Натомість НМС дає найкращий ефект в іншому діапазоні доз — тих, що зумовлюють виживання на рівні 0,1–1,0 % [1]. Тому на наступному етапі роботи, присвяченому вивченню впливу НГ і НМС на антибіотичну активність *S. siouyaensis* використали мутагени у дозах, при яких досягалися такі рівні виживання спор штаму — 7 мг/мл НГ і час обробки 15–30 хв, а також 30 мг/мл НМС і час обробки 4 год (табл. 1).

В таблиці 1 наведено порівняння за ІП спонтанних клонів вихідного штаму дикого типу Lv81 з клонами культури, яку обробили мутагенами. Дійсно, використані дози НГ збільшували мінливість *S. siouyaensis* за рівнем антибіотичної активності: коефіцієнт варіації CV зріс на 5–10 %. Спостерігається незначне збільшення цього коефіцієнту після обробки НМС. У всіх випадках після мутагенізації спор зростало середнє значення ІП, особливо сильно (на 40,3 %) при використанні 7 мг/мл НГ протягом 15 хв. За цих умов більш, ніж в п'ять разів зростала частка «плюс»-варіантів з рівнем антибіотичної активності, вищим від  $+2\sigma$ . Саме ці варіанти вважають найбільш цінними у селекційному відношенні [2]. Більш, ніж вдвічі зростала частка «плюс»-варіантів і за інших режимів мутагенної обробки НГ і НМС. Натомість лише в одному випадку (30 хв обробки НГ) спостерігали значне зростання частки „мінус”-варіантів, які мають антибіотичну активність, меншу від  $-2\sigma$ . Після обробки НГ вдалося виділити один мутант, який не продукує біоміцину зовсім.

Таблиця 1  
Вплив НГ та НМС на антибіотичну активність *S. siouyaensis* Lv81

Table 1  
The NG and NMU influences on antibiotic activity of *S. siouyaensis* Lv81

Мутаген	Час обробки спор, хв	Кількість клонів	Середнє значення ІП, %	Частка «плюс»-варіантів, %	Частка «мінус»-варіантів, %	Коефіцієнт варіації, CV, %
Контроль	0	395	100,0	4,5	1,4	39,8
НГ	15	186	140,3	26,2	0	45,3
НГ	20	185	103,8	11,3	1,6	49,0
НГ	30	164	103,8	9,7	4,3	48,1
НМС	240	533	109,6	9,3	0,6	41,3

**Примітка:** за 100 % приймали середнє значення ІП спонтанних клонів штаму *S. siouyaensis* Lv81, вирощених на ВС.

Отримані дані свідчать про те, що обробку НГ у вказаних дозах доцільно використовувати для мутагенізації *S. siouyaensis* з метою виділення клонів зі збільшеним рівнем синтезу сіоміцину. Найкращі результати отримано при обробці спор штаму НГ у концентрації 7 мг/мл протягом 15–20 хв, коли виживання спор становить 20–30 %.



У результаті виділено та проаналізовано 87 “плюс”-варіантів, індукованих НГ і 23 — НМС. На рис.1 наведено порівняння їхніх ІП з показниками “плюс”-варіантів, виділених серед окремих клонів вихідного (немутагенізованого) штаму. Більше половини (52,2 %) “плюс”-варіантів вихідного штаму мали ІП від 9,8 до 11,0, третина (34,8 %) — від 11,1 до 14,0 і 13,0 % — від 14,1 до 17,0. Зі збільшенням часу експозиції спор *S. siolyaensis* з 15 до 30 хв при концентрації НГ 7 мг/мл зростала частка “плюс”-варіантів з відносно найменшими ІП — від 9,8 до 11,0. Серед клонів, отриманих після мутагенізації протягом 20 і 30 хв, їх навіть більше, ніж в контролі. Однак частка клонів з більшими ІП (від 11,1 до 14,0) майже однакова як у контролі, так і після обробки НГ протягом 15 і 20 хв. За більшого інтервалу часу (30 хв), за якого сильно знижується виживання спор (до 3,5 %), таких клонів вже значно менше. Максимальні ІП, які спостерігали як у контролі, так і після дії НГ становили 14,1–17,0. Найбільше клонів з такими ІП (18 %) виявили серед тих, що отримані після 15 хв обробки мутагеном. У той же час застосування НМС дало змогу виділити 30,5 % клонів з найвищими ІП — 17,1–20,0 (рис. 3). Ідентичність сіюміцину тих антибіотичних сполук, які синтезують досліджені “плюс”-варіанти, доведено за допомогою ТШХ.

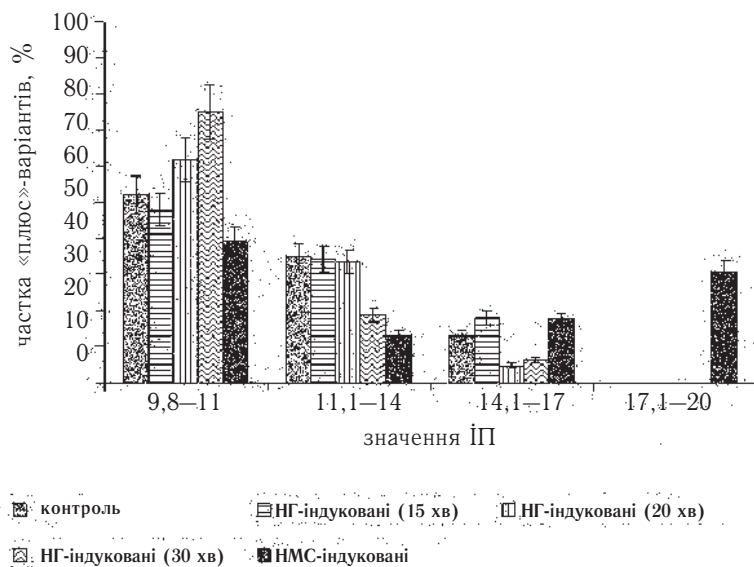


Рис. 3. Розподіл “плюс”-варіантів *S. siolyaensis*, отриманих після обробки НГ (у концентрації 7 мг/мл протягом 15 – 30 хв) і НМС (30 мг/мл, 4 год) за індексами продуктивності

Fig. 3. The productivity index distribution of “plus”-variants of *S. siolyaensis* obtained after treatment with NG (in concentration of 7 mg/ml for 15–30 minutes) and NMU (30 mg/ml, 4 hours)

Проведено порівняння вихідного штаму *S. siolyaensis* Lv81, 14 НГ- та 10 НМС-індукованих „плюс”-варіантів за здатністю стимулювати ріст *S. lividans* ТК24 (рМО16). На диски наносили однакові кількості екстрактів, виділених з однакової кількості біомаси досліджуваних штамів та накладали їх на поверхню середовищ, засіяних газоном *S. lividans* ТК24 (рМО16). Плазмідна рМО16 містить ген стій-





кості до неоміцину та канаміцину *neo*, що злитий з промотором *tipA*. Тіопептидні антибіотики, у тому числі сіоміцин та тіострептон, індукують експресію генів, які знаходяться під контролем цього промотора [9]. Якщо сіоміцин присутній у середовищі, то штам *S. lividans* ТК24 (рМО16) набуває стійкості до неоміцину та канаміцину та росте на ньому. За цих умов інтенсивність росту *S. lividans* ТК24 (рМО16) зростає із збільшенням кількості сіоміцину в екстрактах, нанесених на диски [13]. Діаметри зон росту *S. lividans* ТК24 рМО16 навколо дисків з екстрактами з клітин цих мутантів були на 30 – 50 % більшими, ніж діаметри зони росту навколо дисків з екстрактом з клітин вихідного штаму Lv81.

На рис. 4 наведено приклад стимулювання росту штаму *S. lividans* ТК24 (рМО16) екстрактами, виділеними з двох “плюс”-варіантів *S. sioyaensis*: Sng50 та Sms275. Отримані дані свідчать про доцільність використання *S. lividans* ТК24 (рМО16) для виявлення штамів з підвищеним синтезом сіоміцину поряд з методом оцінювання антибіотичної активності *S. sioyaensis* по пригніченню росту тест-культури *Sarcina lutea*.

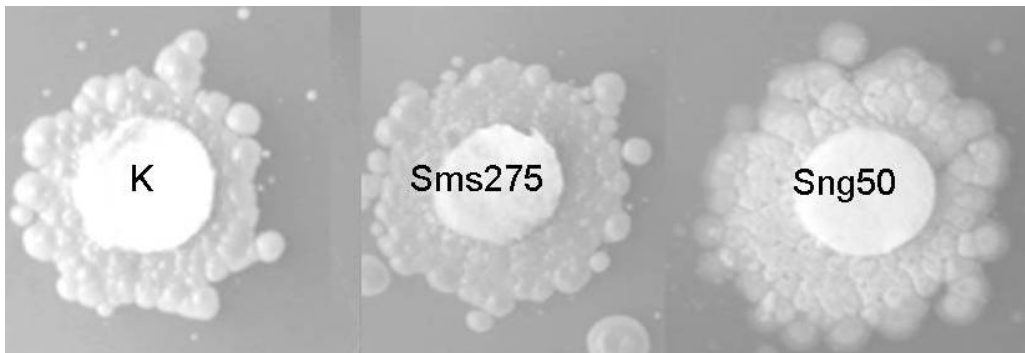


Рис. 4. Зони росту *S. lividans* ТК24 рМО16 навколо дисків з екстрактами сіоміцину з клітин *S. sioyaensis* Lv81 (К) та його мутантів Sms275 і Sng50

Fig. 4. The growth zones of *S. lividans* ТК24 рМО16 around the discs with siomycin extracts from *S. sioyaensis* Lv81 (K) cells and its mutants Sms 275 and Sng 50

Таким чином, у результаті проведених експериментів визначено залежність виживання штаму *S. sioyaensis* Lv81 від дози НГ та НМС, а також вивчено вплив цих мутагенів на антибіотичну активність. Обробка *S. sioyaensis* Lv81 НГ у дозах, що знижують виживання спор до 20–30 %, є ефективним способом отримання клонів культури з підвищеним рівнем синтезу сіоміцину.

Натомість інший алкілувальний мутаген НМС — доцільно використовувати з цією метою у дозах, що зменшують виживання спор приблизно до 0,2 %. Виявлення штамів з підвищеною продукцією сіоміцину можна здійснювати використовуючи метод, що ґрунтується на стимулюванні сіоміцином росту штаму *S. lividans* ТК24, який містить плазмиду рМО16 з геном канаміцин- і неоміцин-стійкості *neo* під контролем *tipA*-промотора. Отримані результати будуть використані у подальшій селекції штамів *S. sioyaensis*.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Голец Л.М., Базилия Л.И., Мазена А.И., Федоренко В.А. Получение и изучение свойств мутантов *Streptomyces kanamyceticus* с нарушениями биосинтеза канамицина // Антибиот. химиотер. — 1995.— т. 40, №1. — С. 3-7.
2. Жукова Р.А., Коммунарская А.Д., Пронина М.И., Терешин И.М., Журавлева Н.П., Шабас М.Н. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов. — Л.: Медицина, 1978. — 160 с.
3. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. — М.: Агропромиздат, 1990. — 240 с.
4. Федоренко В.О., Остах Б.О., Гончар М.В., Ребець Ю.В. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2007. — 279 с.
5. Bagley M.C., Dale J.W., Merritt E.A., Xiong X. Thiopeptide antibiotics // Chem. Rev. 2005. — Vol.105, N2. — P. 685-714.
6. Baltz R. Mutation in *Streptomyces* // The bacteria. The treatise on structure and function. Vol.IX. Antibiotic-producing *Streptomyces* / Ed. by S.W.Qbeener, E.Day. — Orlando: Academic Press Inc., 1986. — P.61-94.
7. Bhat U.G., Zipfel P.A., Tyler D.S., Gartel A.L. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells // Cell Cycle. — 2008. —Vol.7. № 12. —P. 1851- 1855.
8. Demain A.L., Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress // J. Antibiot. — 2009. — Vol. 62, N1. — P. 5-16.
9. Holmes D.J., Caso J.L., Thompson C.J. Autogenous transcriptional activation of a thiostrepton-induced gene in *Streptomyces lividans* // EMBO. J. — 1993. — Vol. 12, N8. — P. 3183-3191.
10. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. — Norwich, England: John Innes Foundation, 2000. — 634 p.
11. Liao R., Duan L., Lei C. Liao R, Duan L, Lei C, Pan H, Ding Y, Zhang Q, Chen D, Shen B, Yu Y, Liu W. Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications // Chem. Biol. — 2009. — Vol.16. № 2. — P. 141-147.
12. McConkey G.A., Rogers M. J., McCutchan T. F. Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton. // J. Biol. Chem. — 1997. — Vol.272, N4. — P. 2046-2049.
13. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I., Fedorenko V. A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* NRRL-B5408 // Folia Microbiologica 2009. — Vol. 54, №2 — P. 91-96.
14. Trilli A., Costanzi I., Lamanna F., DiDio N. Development of agar disc method for the rapid screening of strains with increased productivity // J. Chem.Technol. Biotechnol. — 1982. — Vol.32. — P. 281-291.
15. Ueno M, Furukawa S, Abe F, Ushioda M, Fujine K, Johki S, Hatori H, Ueda H. Suppressive effect of antibiotic siomycin on antibody production // J. Antibiot. — 2004. — Vol. 57, № 9. — P. 590-596.



Я.П. Грубский, А.В. Аравицька, М.Л. Мироновский, А.Н. Громыко, Б.Е. Осташ,  
В.А. Федоренко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина,  
тел.: 8 (032) 239 44 75, e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua

**ВЛИЯНИЕ N-МЕТИЛ-N'-НИТРО-N-НИТРОЗОГУАНИДИНА И  
N-МЕТИЛ-N-НИТРОЗОМЕТИЛМОЧЕВИНЫ НА АНТИБИОТИЧЕСКУЮ  
АКТИВНОСТЬ ПРОДУЦЕНТА СИОМИЦИНА *STREPTOMYCES  
SIOYAENSIS* LV81**

**Реферат**

Исследовано влияние N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (НГ) та N-метил-N-нитрозометилмоченины (НММ) на жизнеспособность и антибиотическую активность продуцента сиомицина *S. sioyaensis* Lv81. Установлено, что оптимальными для получения клонов с повышенной антибиотической активностью являются дозы НГ и НММ, при которых выживает, соответственно, 20–30 % и около 0,2 % спор штамма. Для обнаружения клонов *S. sioyaensis* Lv81 с повышенным синтезом сиомицина можно использовать метод, основанный на стимулировании сиомицином роста на среде с канамицином штамма *Streptomyces lividans* TK24, несущего плазмиду pMO16 с геном канамицин- и неомицин-устойчивости *neo* под контролем *tipA*-промотора.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** *Streptomyces sioyaensis*, сиомицин, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин, N-метил-N-нитрозометилмочевина, мутант.

Y.P. Hrubsky, O.V. Aravitska, M.L. Myronovskyy, O.M. Gromyko, B.O. Ostash,  
V.O. Fedorenko

Ivan Franko National University of Lviv, Grushevkiy str., 4, Lviv, 79005, Ukraine  
tel.: 8 (032) 239 44 75, e-mail: v\_fedorenko@franko.lviv.ua

**N-METHYL-N'-NITRO-N-NITROSOGUANIDINE AND N-METHYL-  
N-NITROSOMETHYLUREA INFLUENCE ON ANTIBIOTIC  
ACTIVITY OF *STREPTOMYCES SIOYAENSIS* LV81**

**Summary**

The influences of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NG) and N-methyl-N-nitrosomethylurea (NMU) on both viability and antibiotic activity of *S. sioyaensis* Lv81 were investigated. We have determined that the optimal doses of NG and NMU for screening of the clones with increased antibiotic production are those leading to 20-30% and approximately 0,2 % spore survival, respectively. For detection of *S. sioyaensis* Lv 81 clones with increased level of siomycin biosynthesis, a *tipA*-based reporter method can be used. It is based on stimulation of the growth of *S.lividans* TK24 carrying pMO16 plasmid (carries kanamycin/neomycin resistance gene fused to thiopeptide-responsive *tipAp* promoter) by siomycin on the medium supplemented with kanamycin.

**К е у w o r d s:** *Streptomyces sioyaensis*, siomycin, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-methyl-N-nitrosomethylurea, mutant.



**В.О. Іваниця, Н.Ю. Васильєва, Г.В. Лісютін, А.Є. Бухтіяров,  
Т.В. Гудзенко**

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

## **ТОКСИЧНА І МУТАГЕННА АКТИВНІСТЬ ЗАБРУДНЕННЯ АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЙНИЙ\***

*Виявлено, що полютанти в пробах морської води, відібраних в акваторії острова Зміїний у ході проведення двох комплексних експедиційних робіт в 2008 р., викликали неоднозначну реакцію у тест-бактерій *Salmonella typhimurium* TA100 та показали як стимулюючу, так і токсичну дію. Встановлено, що рівень мутагенної активності хімічного забруднення води по сезонах року варіював і перевищував фоновий до 7,7 рази улітку й до 9,2 рази восени.*

*К л ю ч о в і с л о в а: острів Зміїний, морська вода, хімічне забруднення, тест-бактерії, токсичність, мутагенність.*

Вивчення екологічного стану акваторії острова Зміїний становить інтерес у зв'язку з унікальним місцем його розташування на шляху гідрофронтів ріки Дунай, що несе забруднюючі речовини з 18 європейських країн [9]. В останні роки на прибережні води острова зросло антропогенне навантаження внаслідок розбудови інфраструктури й початком його використання в рекреаційних цілях. Одним із проявів погіршення екологічної ситуації є акумуляція в навколишньому середовищі хімічних сполук з мутагенними властивостями. На тлі інтенсивної евтрофікації токсиканти сприяють збільшенню частоти й накопиченню індукованих мутацій, що призводить до зміни чисельності мікроорганізмів, структури мікробних ценозів і еколого-фізіологічних властивостей бактерій [3].

Виявлення мутагенної й токсичної дії полютантів дозволяє оцінити рівень їхньої біологічної небезпеки для подальшої розробки заходів, спрямованих на поліпшення екологічної обстановки.

Мешканцями будь-якої екосистеми є бактерії, що беруть участь у трансформації полютантів. Реакція мікроорганізмів на присутність у водному середовищі антропогенних забруднюючих речовин дає можливість оцінити мутагенну й токсичну активність ксенобіотиків у морській воді без визначення складу забруднювачів [1].

Метою роботи було визначення токсичної й мутагенної активності забруднюючих речовин акваторії острова Зміїний із використанням мікробної системи *Salmonella typhimurium* у тесті Еймса.

---

\* Робота виконана в рамках тем № ЗМ/321-2008, ДЗ/300-2008, Д/Б 422, що фінансується Міністерством освіти і науки України



### Матеріали і методи

Для проведення досліджень акваторії острова Зміїний проби морської води відбиралися на 12 прибережних станціях (рис. 1) з поверхневого шару (0–50 см) у серпні й жовтні 2008 р. відповідно до загальноприйнятих методик.

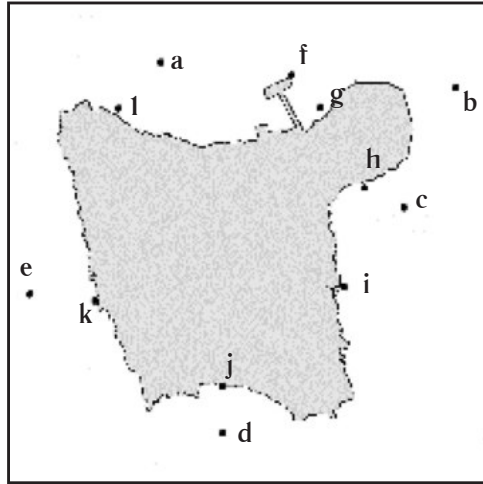


Рис. 1. Карта-схема відбору проб у прибережних водах острова Зміїний

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

Для оцінки токсичності й мутагенної активності проб морської води застосовували метод обліку генних мутацій — тест Еймса [7]. Для цього використовували тест-штам бактерій *Salmonella typhimurium* TA100, що ревертують від ауксотрофності до прототрофності по гістидину в результаті мутацій типу заміни пар основ. Культивування тест-організму здійснювали в рідкому живильному середовищі з введенням досліджуваної проби морської води (дослід) і штучної морської води (контроль).

У колбу поміщали 9 мл досліджуваного матеріалу й стерилізували його при 1 атм (121 °С), після чого додавали 0,1 мл 18 добової культури *S. typhimurium* TA100 (у титрі  $5 \cdot 10^8$  КУО/мл), культивованої в МПБ при 37 °С, 1 мл мінерального середовища М9 і по 0,1 мл розчинів 0,011% L-біотина і 0,012% D-гістидина. Середнє значення токсичної й мутагенної активності води станцій визначали по 5 повторностям. Культури вирощували на гойдалці протягом 3,5 годин при 120 об/хв при 37 °С. Після інкубації проводили посів тест-об'єкту на щільні поживні середовища.

Для визначення токсичності проби морської води проводили поверхневий посів 0,1 мл досліджуваного матеріалу на повноцінне середовище (МПА) і підраховували кількість життєздатних клітин по чисельності колоній, що вирости. Для визначення мутагенної активності 0,1 мл проби, до якої додавали “м'який агар” (0,6% агару, 0,5% NaCl) і розчин біотину, заливали другим шаром на щільне селективне живильне середовище — бактеріальний агар (БА).

Мутагенний ефект, з обліком можливої токсичної дії, розраховували за формулою:  $K_m = (A_{\text{БА}}/A_{\text{МПА}}) \cdot 100\%$ , де  $K_m$  — концентрація мутацій;  $A_{\text{БА}}$  — кількість клітин на БА;  $A_{\text{МПА}}$  — кількість клітин на МПА.

Відносну концентрацію мутацій клітин сальмонели визначали за формулою:  $K_{\text{відн}} = K_{\text{п}}/K_{\text{м}}$ , де  $K_{\text{відн}}$  – відносна концентрація мутацій;  $K_{\text{п}}$  – концентрація мутацій дослідженої проби;  $K_{\text{м}}$  – концентрація мутацій у контролі [2].

Доказом мутагенної дії забруднювачів морської води, вважається більш ніж дворазове збільшення чисельності бактерій-ревертантів у досліді, у порівнянні з контролем [7].

Статистичну обробку результатів проводили згідно стандартних методик [4] з використанням програми “SPSS 9.0 для Windows”.

### Результати та їх обговорення

У ході проведення двох комплексних експедицій в 2008 р. були відібрані проби морської води в прибережній частині острова Зміїний і вивчена токсична й мутагенна активність полютантів. Результати визначення токсичної дії аналізованих проб на тест-бактерії *Salmonella typhimurium* TA100 представлені в таблиці 1.

Таблиця 1  
Вплив морської води досліджуваних станцій на життєздатність клітин *Salmonella typhimurium* TA100

Table 1  
Influence of marine water from the investigated stations on *Salmonella typhimurium* TA100 cell viability

Станція	Літо		Осінь	
	Кількість клітин ( $\times 10^7$ ) в мл $M \pm \Delta_{0,05}$ (n=5)	%	Кількість клітин ( $\times 10^7$ ) в мл $M \pm \Delta_{0,05}$ (n=5)	%
Контроль	625,2 $\pm$ 48,5	100	835,2 $\pm$ 57,3	100
a	841,6 $\pm$ 79,1**	135	-***	-
b	156,8 $\pm$ 19,6**	25	-	-
c	142,4 $\pm$ 13,5**	23	-	-
d	627,2 $\pm$ 26,5	100	-	-
e	371,2 $\pm$ 30,8**	59	-	-
f	648,0 $\pm$ 112,6	104	1085,2 $\pm$ 47,4**	129,9
g	1496,0 $\pm$ 80,7**	239	994,0 $\pm$ 109,7*	119,1
h	2360,0 $\pm$ 433,2**	377	305,0 $\pm$ 53,2**	36,5
i	662,4 $\pm$ 109,8	106	58,2 $\pm$ 5,6**	7,0
j	1019,2 $\pm$ 106,2**	163	2000,0 $\pm$ 224,0**	239,5
k	291,2 $\pm$ 24,1**	47	6821,2 $\pm$ 567,9**	816,7
l	812,8 $\pm$ 302,6	130	830,4 $\pm$ 33,0	99,4

Примітка: \* –  $P < 0,01$ ; \*\* –  $P < 0,001$ ; \*\*\* – дослідження не проводили.



Речовини, що забруднюють морську воду, викликали неоднозначну реакцію та здійснювали як токсичну, так і стимулюючу дію. Представлені дані можуть бути згруповані у два ряди, розташовані по обидва боки від значень контролю.

До першої групи відноситься група проб, що сприяла збільшенню чисельності тест-бактерій щодо контролю при  $P < 0,001$ . Так, стимулююча дія відзначена для проб, отриманих зі станцій **a, g, h, j** у літній період і **f, g, j, k** в осінній період.

Виділяється також група проб (**b, c, e, k**) у літній і (**h, i**) в осінній період спостережень, під впливом яких відзначене зниження числа життєздатних клітин тест-бактерій. Вірогідність розходження між показниками чисельності клітин цієї групи й контролем вища за 99,9 %. У межах зазначеної групи статистично вірогідно ( $P < 0,001$ ) виділені три підгрупи, що відрізняються між собою за токсичною дією. Група А (потужний токсичний ефект полютантів морської води, виявлений улітку на станціях **b, c** і восени – **i**), група Б (помірна токсична дія влітку – **k** і восени – **h**) і група В (слабка токсична дія влітку – **e**). Навколо показника контролю також групуються дані, розходження між якими не виявляється навіть при  $P < 0,1$  улітку (**d, f, i**) і восени (**l**).

Речовини, що забруднюють морську воду в проведених дослідженнях, індукували мутації до прототрофності у використовуваного тест-мікроорганізму (табл. 2).

Таблиця 2  
Мутагенна дія забруднення морської води на *Salmonella typhimurium* TA100

Table 2  
Mutagenic action of marine water contamination on *Salmonella typhimurium* TA100

Станція	Літо		Осінь	
	Концентрація мутацій, %	Концентрація мутацій по відношенню до контролю	Концентрація мутацій, %	Концентрація мутацій по відношенню до контролю
Контроль	1,38	1,00	1,46	1,00
a	1,09	0,79	-****	-
b	5,10	3,71	-	-
c	7,72**	5,62	-	-
d	2,33***	1,69	-	-
e	6,20***	4,50	-	-
f	0,71*	0,52	0,41***	0,28
g	3,25***	2,36	1,93***	1,32
h	1,17***	0,85	0,92**	0,63
i	1,39	1,01	13,4**	9,17
j	0,35***	0,26	1,82***	1,25
k	1,65***	1,20	0,16	0,11
l	0,32**	0,23	0,36***	0,25

Примітка: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P < 0,01$ ; \*\*\* –  $P < 0,001$ ; \*\*\*\* – дослідження не проводили.



Проби морської води, отримані зі станцій **f, j, l** влітку й **f, h, l** – восени, не викликали мутагенної дії. Для інших проб був відзначений мутагенний ефект, що статистично вірогідно ( $P < 0,01$ ) перевищував показники контролю. Виключення склали проби **a, b, i**, отримані влітку, й **k** – восени, для яких перевищення щодо контролю виявилось статистично не достовірним при  $P < 0,10$ . Серед оброблених проб значною мутагенністю володіли проби **c, e** влітку й **i** – восени. Для проб **g, d, k**, відібраних улітку, й **g, j** – восени – характерно зниження мутагенного ефекту. Значне зниження чисельності колоній-ревертантів у досліді відносно контролю може бути пов'язано із загальною токсичною дією проби морської води й не обов'язково вказує на наявність антимутагенної дії.

Виявлена стимулююча дія досліджуваних проб може бути пояснена посиленням ферментативної активності тест-бактерій в результаті формування крапкових мутацій під впливом забруднювачів морської води [6].

Отже, проведені дослідження не виявили кореляцію між величинами токсичної й мутагенної дії й вмістом у пробах морської води акваторії о. Зміїний важких металів (Сг, Со, Ni, Cd, Pb, Cu, Hg) і загальним рівнем рідких вуглеводнів і окремих фракцій (мастил і смолистих сполук) як улітку, так і восени. Виключення склали наявність кореляційних зв'язків між токсичною дією проб морської води на тест-об'єкти й вмістом міді влітку ( $r=0,834$ ) і смолистими сполуками восени ( $r=0,757$ ) при  $P < 0,05$ .

Проведений у ході досліджень хімічний аналіз проб морської води виявив, що концентрація в них токсичних металів мінімальна і не перевищувала значення ГДК протягом усіх сезонів року, за виключенням міді, вміст якої стабільно відмічався на рівні 6 ГДК. Розподіл рідких вуглеводнів у прибережних водах острова Зміїний восени був значно вищим, ніж у літній період спостережень і досягав 51 мг/л [5]. З літературних даних відомо, що для вивченої акваторії Чорного моря притаманні високі концентрації міді  $> 3,0$ – $13,4$  мкг/л, що перевищує значення ГДК до 3 разів та може бути пов'язано як із геологічною активністю, так і впливом ріки Дунай [8].

Встановлено виражений нелінійний характер залежності між величинами мутагенного ефекту й вмістом хрому ( $r=0,820$ ), мастил ( $r=0,713$ ) улітку й свинцю ( $r=0,698$ ) восени при  $P < 0,05$ .

Проведені дослідження у серпні й жовтні 2008 р. показали, що токсикологічна ситуація акваторії острова Зміїний піддана динамічним змінам, що обумовлено впливом різних факторів: спрямованістю течій, джерелами забруднень, гідролого-гідрохімічними показниками морської води, теригенним стоком, зміною властивостей і вмістом поліютантів, які спільно здійснюють негативну дію.

У жовтні 1992 р. у пробах води гирла Дунаю (зона гідрофронту, навпроти гирла Швидке) виявлена мутагенна дія поліютантів, що перевищує спонтанний рівень мутацій у 5 разів [3]. Отже, присутність сполук із мутагенною активністю в пробах води вказує на антропогенне навантаження на досліджуваний регіон.

Таким чином, уперше проведені дослідження виявили високі значення токсичної й мутагенної активності поліютантів у пробах морської води, отриманих на станціях **c, e** влітку й **i** – восени. Проведення подальших досліджень прибережних вод острова Зміїний необхідно направити у бік вивчення внеску поліютантів різної хімічної природи в генотоксичну ситуацію дослідженої акваторії.





## ЛІТЕРАТУРА

1. *Бутаев А.М., Костров Б.П., Исцув А.Р. и др.* Токсико-генетическое состояние природных вод Дагестана // Вестник Дагестанского научного центра РАН. — 2002. — № 12. — С. 42-49.
2. *Васильева Т.В., Панченко Н.Н., Васильева Н.Ю.* Методика комплексной оценки токсичности и мутагенности в бактериальной и водорослевой тест-системах // Интеллектуальные информационно-аналитические системы и комплексы. — Киев: Ин-т кибернетики им. В.М. Глушко НАН Украины, 2000. — С. 78-84.
3. *Иваница В.А., Худченко Г.В., Панченко Н.Н., Бухтияров А.Е., Мединец В.И.* Микробиологические исследования прибрежной части Черного моря в районе дельты Дуная и дельты Днепра. Исследования экосистемы Черного моря // Сб. науч. труд. Укр. науч. цент. экол. моря. — Одесса: ИРЭН, 1994. — С. 54-67.
4. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. *Лісютін Г.В., Бухтіяров А.Є., Білоіваненко С.О., Пономарьова Л.П., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О.* Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — Т. 5. — № 1. — С. 88-94.
6. *Рапопорт И.А.* Химические мутагены, опасные для человека // Проблемы медицинской генетики. — М.: Медицина, 1970. — С. 249-287.
7. *Ames B.N., Lee F.D., Durston W. E.* An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1973. — Vol. 70. — № 3. — P. 782-786.
8. *Black Sea transboundary diagnostic analysis.* UNDP BSERP. — 2007. — 228 p. — Режим доступа до журн.: <http://www.sesame-ip.eu/scientist/documents>
9. *Kataoka H., Hayatsu T., Hietsch G. et al.* Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AaC) in the water of the Danube river // Mutat Res. — 2000. — Vol. 466. — № 1. — P. 27-35.

**В.А. Иваница, Н.Ю. Васильева, Г.В. Лисютин, А.Е. Бухтияров, Т.В. Гудзенко**

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

## ТОКСИЧЕСКАЯ И МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ АКВАТОРИИ ОСТРОВА ЗМЕИНЫЙ

## Реферат

Обнаружено, что поллютанты в пробах морской воды, отобранных в акватории острова Змеиный в ходе проведения двух комплексных экспедиционных работ в 2008 г., вызывали неоднозначную реакцию у тест-бактерий *Salmonella typhimurium* TA100 и показали как стимулирующее, так и токсическое действие. Установлено, что уровень мутагенной активности химического загрязнения воды по сезонам года варьировал и превышал фоновый до 7,7 раза летом и до 9,2 раза осенью.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** остров Змеиный, морская вода, химическое загрязнение, тест-бактерии, токсичность, мутагенность.



**V.O. Ivanytsya, N.Yu. Vasileva, G.V. Lisyutin, A.Y. Bukhtiyarov,  
T.V. Gudzenko**

Odesa National I.I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,  
Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: v\_ivanit@te.net.ua

## **TOXIC AND MUTAGENIC ACTIVITY OF CONTAMINATION OF THE ZMIINY ISLAND AQUATORIUM**

### **Summary**

Pollutants of marine water samples selected in the Zmiiny island aquatorium during two complex expeditions in 2008 caused an ambiguous reaction of the test-bacteria *Salmonella typhimurium* TA100 and showed both stimulant and toxic actions. The level of mutagenic activity of chemical contamination of water in different seasons varied and exceeded the background levels up to 7,7 times in summer and up to 9,2 times in autumn.

**К e y w o r d s:** the Zmiiny island, marine water, chemical contamination, test-bacteria, toxicity, mutagenicity.



О.Ф. Рильський<sup>1</sup>, П.І. Гвоздяк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Запорізький національний університет, вул. Жуковського, 66, Запоріжжя, 69600, Україна; тел.: 8 (061) 289 12 53; e-mail: Rylsky@mail.ru

<sup>2</sup> Інститут колоїдної хімії та хімії води НАН України, бульвар Академіка Вернадського, 42, Київ-142, МСП 03680, Україна; тел.: 8 (044) 424 35 79; e-mail: honch @ iccwc.kiev.ua

## ПРИГНІЧЕННЯ ПІГМЕНТСИНТЕЗУВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ БАКТЕРІЙ ІОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

*У роботі представлені результати досліджень пігментсинтезувальної здатності бактерій в умовах дії стресових факторів. Встановлено, що Sn (II), Co (II), Cu (II), V (V) – блокують синтез пігментів при концентраціях 60–80 мг/л, а Ag – при концентрації на рівні 7 мг/л. Рівні концентрацій металів, що блокують синтез пігментів, відрізняються від рівнів, що припиняють ріст бактерій на 25-57 %. Доданий до середовища пролін викликає посилення синтезу продигіозину у *S. marcescens* MP-141 при концентрації Cu (II) металу 80 мг/л.*

*Ключові слова: бактерії, пігменти, важкі метали.*

Серед багатьох забруднювачів (полутантів) навколишнього середовища особливе місце займають іони важких металів (ВМ). Це пов'язано з їх високою токсичністю, а також з можливістю накопичення ВМ в організмах рослин і тварин організмами і передачею їх по харчових ланцюгах.

Відомо, що солі срібла, ртуті, кадмію, нікелю, міді, кобальту порушують бар'єрні властивості цитоплазматичних мембран (ЦПМ) клітин, що призводить до зменшення трансмембранного потенціалу. Під дією іонів срібла і ртуті змінюються електрофізичні властивості ЦПМ і цитоплазми клітин [1-4]. Ванадій, як один з широко розповсюджених ВМ, поглинається зеленими, бурими і жовто-зеленими водоростями. Він також міститься в нітрогеназах деяких ґрунтових бактерій, хоча і не є необхідним елементом для розвитку більшості прокариотів. Найактивнішими біоаккумуляторами ванадію є бактерії роду *Pseudomonas*, а також ряд ціанобактерій [5]. Такі властивості бактерій, як здатність до адаптації і швидкого розмноження сприяють розповсюдженню мікроорганізмів, стійких до ВМ. Найбільшу стійкість до металів мають бактерії, виділені в місцях з промисловими забрудненнями і в родовищах відповідних металів.

Діагностування забруднень навколишнього середовища, ступінь їх «стресовості» для макро- і мікроорганізмів є актуальним завданням сьогодення.

Метою нашої роботи було вивчення пігментсинтезувальної здатності бактерій родів *Serratia* і *Pseudomonas* в умовах тривалої дії на них іонів важких металів.

### Матеріали і методи

Для експериментів готували модельні розчини, що містять іони важких металів:  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{V}^{5+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{1+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ . Для їх приготування використовували солі:  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  і оксид  $\text{V}_2\text{O}_5$ .



В роботі використовувалися такі концентрації металів: Cu, Cr — 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150 мг/л; Ag — 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12 мг/л; Sn, Co, V — 10, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150 мг/л. Для кожної концентрації засів виконували в 5-ти повторах.

Тест-культурами були пігментсинтезувальні бактерії *P. aeruginosa* МР-2, *P. fluorescens var pseudo-iodinum* МР-11 і *S. marcescens* МР-141, отримані з колекції мікроорганізмів відділу мікробіології очищення води Інституту колоїдної хімії і хімії води НАН України.

Контролем були культури бактерій, вирощені на твердому середовищі МПА без металу.

Тверде живильне середовище (МПА) готували на основі води з певною концентрацією солей VM. Застиглий в чашках Петрі МПА засівали суцільним газоном 18-годинними колекційними культурами і інкубували їх протягом 48 годин в термостаті при температурі 28–30 °С. Після цього візуально порівнювали інтенсивність пігментоутворення в досліді та в контролі. Культивування бактерій в досліді з металами здійснювали в термостаті ТЕС-1.

### Результати та їх обговорення

У досліді з клітинами *P. aeruginosa* МР-2, *P. fluorescens var pseudo-iodinum* МР-11, *S. marcescens* МР-141 відмічається зниження інтенсивності синтезу пігменту бактеріями із збільшенням концентрацій всіх досліджуваних металів. Проте, втрата здатності до утворення пігментів і поява безбарвних колоній спостерігається при різних концентраціях металів [6]. В даній роботі ця залежність наведена в таблиці. Під дією Ag (I) блокування синтезу пігментів у трьох досліджених культур спостерігається при найнижчій концентрації — 7 мг/л; Cr (VI) займає проміжне положення — блокує синтез пігменту при концентрації 30 мг/л (*P. aeruginosa* МР-2). Ряд металів — Sn (II), Cu (II), Co (II) і V (V) — блокує синтез пігментів при відносно високих концентраціях 60-80 мг/л (*P. aeruginosa* МР-2 і *P. fluorescens var pseudo-iodinum* МР-11).

Різниця в концентраційних рівнях металів між блокуванням синтезу пігменту бактеріями і припиненням їх росту досягає 57 % (наприклад, дія Cr (VI) на *P. aeruginosa* МР-2), а при дії V(V) на *P. aeruginosa* МР-2 і *S. marcescens* МР-141 ця різниця мінімальна і дорівнює 25%. Таким чином, між блокуванням росту бактерій і появою безбарвних колоній завжди спостерігається концентраційний інтервал.

Одним з вірогідних механізмів втрати пігментсинтезувальної здатності у *S. marcescens* МР-141 може бути утворення хелатних комплексів металів з попередниками синтезу пігменту. Відомо, що попередником синтезу пігмента у *S. marcescens* МР-141 — продигіозіна — є пролін [7, 8].

Нами виконані досліді по вивченню впливу «надмірного» проліну на синтез пігменту у *S. marcescens* МР-141 у присутності іонів  $\text{Cu}^{2+}$ . У МПА, до якого задалегідь вносили  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрації, що викликає пригнічення синтезу продигіозіну, додавали пролін в концентрації 250 мг/л.

Нами встановлено, що синтез пігменту у *S. marcescens* МР-141 у присутності проліну проходив інтенсивніше і по насиченості кольору наближався до контролю. Це свідчить про те, що доданий пролін не весь був зв'язаний металом в хелатний комплекс і його надлишок був використаний бактеріями в синтезі продигіозіну.



Таблиця

Концентрації іонів важких металів (мг/л), що пригнічують пігментоутворення та ріст бактерій родів *Pseudomonas* і *Serratia*

Table

Concentrations of ions of heavy metals (mg/l) on pigment production and bacteria growth of *Pseudomonas* and *Serratia* (mg/l)

Штам	Sn <sup>2+</sup>		V <sup>5+</sup>		Co <sup>2+</sup>		Ag <sup>1+</sup>		Cr <sup>6+</sup>		Cu <sup>2+</sup>	
	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> МР-2	80,0 ±8,2	120,0 ±10,1	60,0 ±7,5	80,0 ±9,0	70,0 ±6,1	100,0 ±5,5	7,0 ±0,5	10,0 ±1,5	30,0 ±5,7	70,0 ±8,2	70,0 ±10,1	150,0 ±3,4
<i>Serratia marcescens</i> МР-141	70,0 ±6,6	100,0 ±9,8	60,0 ±6,3	80,0 ±7,1	70,0 ±4,5	110,0 ±10,1	7,0 ±0,3	10,0 ±0,8	40,0 ±6,3	50,0 ±7,2	70,0 ±5,9	100,0 ±6,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> МР-11	80,0 ±5,2	120,0 ±9,8	60,0 ±4,7	80,0 ±6,5	60,0 ±5,1	90,0 ±7,3	7,0 ±0,9	10,0 ±1,5	65,0 ±3,6	100,0 ±5,3	70,0 ±7,1	100,0 ±9,8

Отримані результати переконують в тому, що втрата пігментсинтезувальної здатності бактеріями під дією важких металів носить універсальний характер і є відповіддю бактеріальної клітини на дію стресового чинника. Під дією іонів важких металів спостерігається пригнічення та втрата пігментсинтезувальної здатності бактерій при зростанні на твердому живильному середовищі. Блокування синтезу пігменту у тест-культур іде при меншій концентрації іонів важких металів, ніж припинення росту бактерій. Додавання проліну в середовище призводить до синтезу пігмента у *S. marcescens* МР-141 при концентрації іонів Cu<sup>2+</sup> 80 мг/л, яка блокує синтез пігменту в середовищі без проліну.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гусев М.В., Лебедева А.Ф., Саванина Я.В., Барский Е.Л. Устойчивость культур цианобактерии *Anacystis nidulans* и микроводоросли *Dunaliella maritima* к токсическому действию ванадия: влияние фосфата железа и цистеина // Вестн. МГУ. Сер. Биология. — 1997. — №3. — С. 12-17.
2. Reddy G. N., Prasad M. N. V. Heavy metal binding protein/ Polypeptide: occurrence, structure, synthesis and function // Environ. Exp. Bot. — 1990. — V. (30), № 3. — P. 251-264.
3. Таширєв А.Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами // Микробиол. журнал. — 1994. — Т. 56, № 6. — С. 89-100.
4. Подгорский В.С., Касаткина Т.П., Лозовая О.Г. Дрожжи — биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журнал. — 2004. — Т. 66, №3. — С. 91-103.
5. Popper H.H., Woldrich A., Grigar E. Comparison of chromate and vanadate toxicity and its relationship to oxygen radical formation // Zentralb. Hyg. und Umweltmed. — 1991. — V. 194, №4. — P. 373-379.
6. Рильський О.Ф., Гвоздяк П.І. Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій // Доповіді НАН України. — 2007. — № 1. — С. 161-164.
7. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. — М.: Наука, 1974. — 242 с.
8. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. — М.: Мир, 1986. — 422 с.



**А.Ф. Рильский<sup>1</sup>, П.И. Гвоздяк<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Запорожский национальный университет, ул. Жуковского, 66,  
Запорожье, 69000, Украина;  
тел.: 8 (061) 289 12 53; e-mail: Rylsky@mail.ru

<sup>2</sup> Институт коллоидной химии и химии воды НАН Украины, бульвар Академика  
Вернадского, 42, Киев-142,  
ГСП 03680, Украина; тел.: 8 (044) 424 35 79; e-mail: honch @ iccwc.kiev.ua

## **УГНЕТЕНИЕ ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ БАКТЕРИЙ ИОНАМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ**

### **Реферат**

В работе представлены результаты исследований пигментсинтезирующей способности бактерий в условиях действия стрессовых факторов. Установлено, что Sn (II), Co (II), Cu (II), V (V) — блокируют синтез пигментов при концентрациях 60–80 мг/л, а Ag — при концентрации на уровне 7 мг/л. Уровни концентраций металлов, блокирующие синтез пигментов, отличаются от уровней, прекращающих рост бактерий на 25–57 %. Добавленный в питательную среду пролин вызывает усиление синтеза продигиозина у *S. marcescens* MP-141 при концентрации Cu (II) 80 мг/л.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** бактерии, пигменты, тяжелые металлы.

**O.F. Rylskiy<sup>1</sup>, P.I. Gvozdyak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Zaporizky National University, Zhukovsky Str. 66, Zaporizhzhja, 69000, Ukraine;  
tel.: 8 (061) 289 12 53; e-mail: Rylsky@mail.ru

<sup>2</sup> Institute of Colloid and Water Chemistry, NAS of Ukraine, Acad. Vernadsky  
boulevard, 42, Kyiv-142, GSP 03680, Ukraine;  
tel.: 8 (044) 424 35 79; e-mail: honch @ iccwc.kiev.ua

## **SUPPRESSION OF THE PIGMENT-SYNTHESIZING CAPACITY OF BACTERIA WITH HEAVY METALS IONS**

### **Summary**

The results obtained during the investigation of the pigment-synthesizing capacity of bacteria in conditions of stressful factors action are represented. The major attention was payed on the study of heavy metals action on the pigment-synthesizing capacity of bacteria. The concentration limit to the loss of the pigment-synthesizing capacity and bacteria growth for some metals, has been established. Synthesis of a pigment at *S. marcescens* MP-141 at concentration of Cu (II) of 80 mg/l amplifies at addition of prolin in medium.

**Key words:** bacteria, pigments, heavy metals.



**І.В. Крулько<sup>1</sup>, С.А. Заїка<sup>1</sup>, А.В. Харіна<sup>1</sup>, Н.С. Водзінська<sup>2</sup>,  
В.П. Поліщук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка,  
вул. Володимирська 64, Київ, 01033, Україна, тел.: 8 (044) 521-35-02,  
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 63-57-61,  
e-mail: nsvod@ukr.net

## **ПОРФІРИНИ ЯК ІНГІБІТОРИ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ В КУЛЬТУРІ РОСЛИННИХ ТКАНИН**

*Встановлено, що в темнових умовах найвищу антифiтовiрусну активнiсть у системi ВТМ – культура тканин *Nicotianum tabacum* виявляють вiльнi основи асиметрично мезо-замiщених синтетичних порфiринiв. Їх металокомплекси з цинком i марганцем були менш ефективними. У той же час, Си-вмiсний симетрично замiщений мезо-тетра(*N*-метил-4-пiридил)порфiрин тетраозилат суттєво пригнiчував розвиток вiрусної iнфекцiї в культурi тканин *N. tabacum*. Зроблено припущення про можливий механiзм антивiрусної дiї порфiринiв.*

*К л ю ч о в i с л о в а: порфiрини, ВТМ, *Nicotiana tabacum*, iнгiбування вiрусної iнфекцiї.*

Особливі властивості та велике різноманіття тетрапірольних сполук — порфіринів, а особливо металопорфіринів, є причиною їх широкого використання в різних наукових дослідженнях фізичного, хімічного та біологічного характеру, в промисловості барвників, напівпровідників, в нанотехнологіях та медицині. На сьогодні дані речовини визнані перспективними поліфункціональними агентами, що разом з антибактеріальною [1, 9] і антипухлинною діями показали антивірусну активність відносно ряду вірусів збудників хвороб людини і тварин [12].

Дослідження показали, що опромінення видимим світлом безоболонкових вірусних часток у присутності порфіринів ефективно нейтралізує їх інфекційність. Час та особливості інактивації залежать від характеристик груп-замісників у порфіриновому ядрі. Взаємодія з безоболонковими віріонами вірусу гепатиту А, ймовірно, зумовлена електростатичним притяганням між негативно зарядженими білками капсиду та катіонною структурою порфіринів. Дослідження фотодинамічної інактивації вірусу простого герпесу I типу, виділеного від хом'яків, коней та пацюків, аніонними похідними 5,10,15,20-тетра-(сульфонато-феніл)порфірину в культурі клітин показали наявність віруліцидного та віростатичного ефекту [12]. Відмічено пряму залежність активності порфірину від його концентрації [5, 7].

На сьогодні питання дії порфіринів на віруси рослин є майже не вивченим. Тому, важливим напрямком досліджень є пошук нових препаратів порфіринів, які б мали виражену антифiтовiрусну дію. Метою даної роботи було вивчення противірусних властивостей синтетичних порфiринiв на модельній системi ВТМ-культура тканин *Nicotiana tabacum* у темнових умовах.



## Матеріали і методи

Вивчалася дія порфіринів на модельну систему вірус-культура рослинних тканин (вірус тютюнової мозаїки штам U1 (ВТМ) — культура тканин тютюну *Nicotiana tabacum* сорту *Trapeson*).

Досліджувані сполуки були представлені вільними основами порфіринів (№ 1, 3) та їх металокомплексами (№ 2, 4, 5, 6): № 1 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)порфірин тритозилат (Мм=789); № 2 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-гексадецил)порфіринато-цинк тритозилат (Мм=850); № 3 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфірин тритозилат (Мм=1267); № 4 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринато-цинк тритозилат (Мм=1292); № 5 — 5,10,15-три(N-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринато-марганець(III) хлорид (Мм=1070); № 6 — мезо-тетра(N-метил-4-піридил)порфіринато-мідь тетратозилат (Мм=1429). В ході роботи досліджували речовини використовували в кінцевих концентраціях 10 мкМ, 20 мкМ та 40 мкМ. Вихідні розчини порфіринів мали концентрацію 2 мМ/мл. Отриманий розчин стерилізували шляхом холодної стерилізації через бактеріальний фільтр (d пор=450 нм). Робоча концентрація ВТМ складала 0,8 мг/мл.

Вивчення впливу порфіринів на накопичення ВТМ при регенерації рослин *Nicotiana tabacum* з калусної тканини проводили за наступною схемою (рис.1).

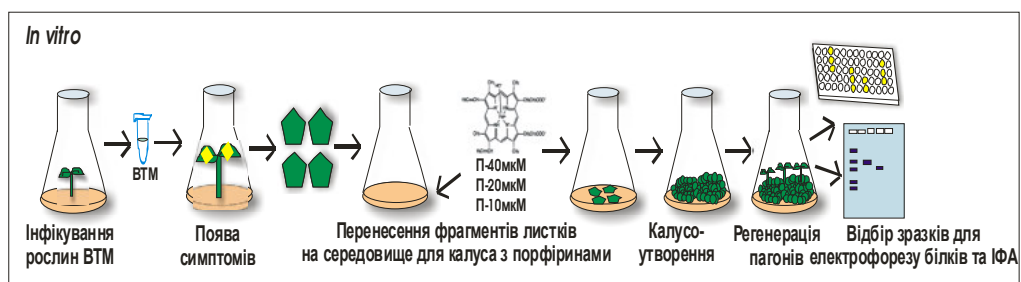


Рис. 1. Схема дослідження впливу порфіринів на накопичення ВТМ в культурі тканин *Nicotiana tabacum* при регенерації рослин з калусної тканини

Fig. 1. Study of porphyrin influence on the TMV accumulation in the *Nicotiana tabacum* tissue culture while plant regeneration from the callus tissue

Фрагменти стерильних листових пластинок інфікованих ВТМ рослин *Nicotiana tabacum* переносили на гормонвмісне поживне середовище MS-1 [2], що містило досліджувані порфірини № 1–6 у кінцевих концентраціях 40, 20 та 10 мкМ. За контроль слугували експланти з рослин, інфікованих ВТМ та посаджених на середовище без речовин, а також експланти із здорових рослин *N. tabacum*. Через 30–40 днів з утвореного калусу відбирали зразки для дослідження наявності вірусу в експериментальних і контрольних зразках за допомогою непрямого імуноферментного аналізу (ІФА). Після проведення ІФА зразки білків гомогенату калусу подавали електрофорезу з використанням додецил-сульфату натрію (SDS).

## Результати та їх обговорення

Порфірини — складні макрогетероциклічні сполуки, в основі яких лежить цикл порфіну. Унікальність структури та біологічних функцій порфіринів пов'язана з особливостями їх електронної системи. Наявність 20 електронів в макроциклічному кільці забезпечує високу реакційну здатність порфіринів. Метал-іон, що вступає в



комплекс з порфірином, передає свій вплив на найвіддаленіші атоми молекули та змінює властивості порфірину, включаючи окисно-відновні, кислотно-основні, електронно-оптичні тощо [3]. Тому, в ході роботи досліджувався антивірусний вплив синтетичних порфіринів: як вільних основ (№ 1, 3), так і металовмісних (№ 2, 4, 5, 6).

Для звільнення рослинного матеріалу від вірусу ефективним є метод регенерації рослин з калусної тканини [8, 11]. Цей метод застосовується поряд з методом хіміотерапії, що дозволяє досягти більш високого антивірусного ефекту. Саме тому, було зроблене припущення, що використання методу регенерації рослин тютюну з калусної тканини на середовищі з різними концентраціями синтетичних порфіринів може підвищувати відсоток виходу безвірусних рослин.

Проведене дослідження виявило антивірусну активність усіх сполук у системі ВТМ—культура тканин *N. tabacum*.

Результати ІФА свідчать, що найбільший ефект зниження вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусній тканині, що не залежить від концентрації речовини, проявляє сполука № 1 (табл.). Її металвмісний аналог — сполука № 2, показав дещо слабшу антивірусну дію, що проявлялась в зниженні вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусі приблизно на 68–73 %. Речовина № 3 виявила вищий рівень антивірусної активності порівняно з речовиною № 4.

Таблиця 1

**Зниження вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусній тканині (%)  
під впливом порфіринів**

Table 1

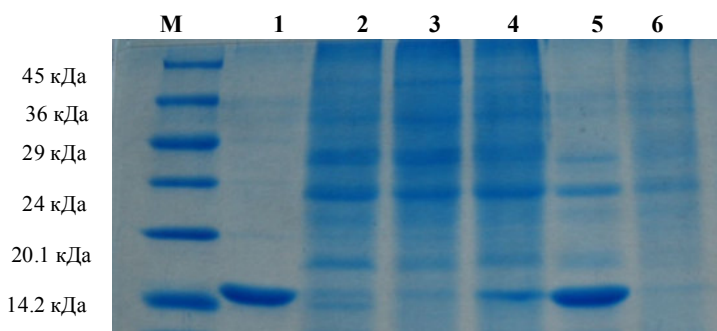
**Decrease of TMV antigenic determinants content in the callus tissue (%)  
under influence of porphyrins**

Концентрація речовини	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
10 мкМ	84	68	40	33	16	82
20 мкМ	95	68	60	34	21	58
40 мкМ	84	73	70	45	25	66

Вона знижувала вміст вірусу в калусі приблизно на 40–70 %, в той час як для речовини № 4 максимальний антивірусний ефект досягав приблизно 45 %. Сполука № 6 знижувала кількість антигенних детермінант ВТМ в калусі приблизно на 58–82 %. Найнижчий відсоток зниження кількості антигенних детермінант ВТМ показала речовина № 5 — приблизно на 16 % в концентрації 10 мкМ та 25 % при 40 мкМ.

Результати електрофорезу білків з гомогенату калусу (рис. 2), отриманого з експлантів з інфікованих ВТМ рослин на середовищі в присутності речовини № 1, свідчать, що досліджувана сполука значно знижує вміст специфічного для ВТМ білку в калусі.

Таким чином, в ході досліджень виявлено антивірусну дію порфіринів, що проявлялась у зниженні вмісту антигенних детермінант ВТМ в калусній культурі. Антивірусний ефект сполук майже не залежав від наявності іону металу, що говорить про можливу роль лігандів молекули в антивірусній дії.



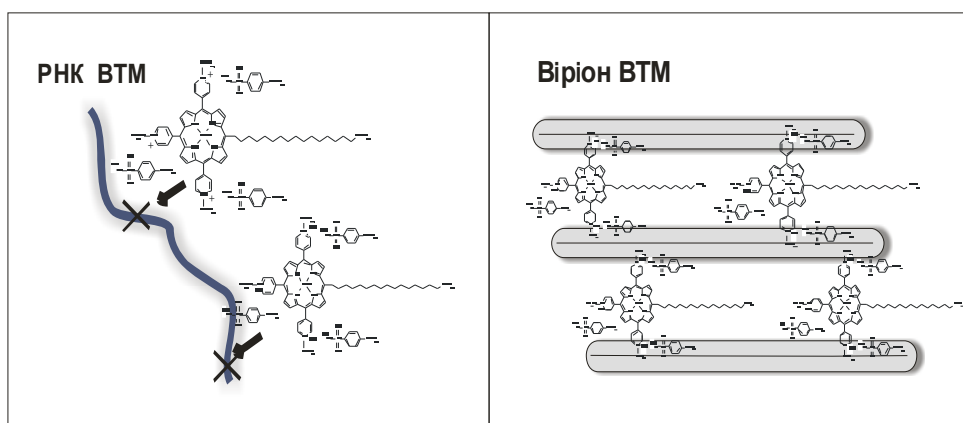
**Рис. 2.** Електрофореграма зразків гомогенату з калусу *N. tabacum*, отриманого на середовищі в присутності речовини № 1

М — маркерні білки; 1 — препарат виділеного ВТМ; 2, 3, 4 — зразки з калусів інфікованих ВТМ *N. tabacum*, отриманих на середовищі з 40, 20 та 10 мкМ сполуки № 1, відповідно; 5 — зразок з калусу з інфікованого ВТМ *N. tabacum*; 6 — зразок з калусу із здорового *N. tabacum*

**Fig. 2.** Electrophoregram of homogenate samples from *N. tabacum* callus obtained on the medium in presence of compound № 1

М — marker proteins; 1 — released TMV specimen; 2, 3, 4 — samples from the *N. tabacum* callus infected by TMV in presence of 40, 20 and 10  $\mu\text{M}$  of compound № 1; 5 — the sample from the *N. tabacum* callus infected by TMV; 6 — the sample from the intact *N. tabacum* callus

З літературних даних відомо, що порфірини володіють високою здатністю до агрегації. В природі порфірини в основному знаходяться в комплексі з білками. Так, наприклад, при обробці лектину *Artocarpus integriflora* мезо-тетра (сульфонатофеніл) порфірином (Н2ТРПС) відбувається з'єднання молекул порфірину з білковими молекулами з утворенням «білкової сітки» [6].



**Рис. 3.** Можливий механізм дії порфіринів на РНК та віріони ВТМ

**Fig. 3.** Possible mechanism of porphyrin action on the RNA and TMV virions

Порфірини здатні приєднуватись до ДНК або РНК та викликати їх деградацію [4,10]. Так, було показано, що дані сполуки можуть приєднуватися до кінців ДНК чи до малої заглибини в спіралі, причому атом металу утворює координаційні



зв'язки з пуриновими та піримідиновими основами, після чого може відбуватись їх руйнування або загальна дестабілізація спіралі та поява розривів в цукрофосфатному остові [5].

Зважаючи на отримані нами результати та враховуючи літературні дані, можна зробити припущення, що досліджувані в даній роботі синтетичні порфірини здатні інгібувати розвиток ВТМ в калусі шляхом приєднання до структурних білків ВТМ, таким чином зумовлюючи «склеювання» віріонів, та формування конгломератів. Іншим можливим механізмом віруліцидної дії порфіринів є деградація РНК вірусу (рис. 3). Таким чином досліджувані синтетичні порфірини, як вільні основи так і їх металокомплекси, можливо, є потенційно перспективними антифітовірусними сполуками. Проте, таке ствердження має бути підтверджено низкою експериментів у системі вірус-рослина.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Зінченко О.Ю. Антибактеріальна активність синтетичних порфіринів: Автореф. дис. канд. біол. наук. К., 2006. — 21 с.
2. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 34 с.
3. Якубов С.П. Молекулярные комплексы цинк(II)- и железо(III)порфиринов с пиридином, н-пропиламиноом, метиловым эфиром глицина: Автореф. дис. канд. биол. наук. Иваново, 2006. — 25 с.
4. Bejune A.S., Shelton A.H., McMillin D.R. New dicationic porphyrin ligands suited for intercalation into B-Form DNA // *Inorg. Chem.* — 2003. — V. 42, № 25. — P. 8465-8475.
5. Chikako T., Takuya M., Tomoji K. Single molecular morphology of Porphyrin/DNA Complex // *Chemistry Letters.* — 2006. — V. 35, № 1. — P. 46-51.
6. Goel, M. et al. Porphyrin binding to jacalin is facilitated by the inherent plasticity of the carbohydrate-binding site: novel mode of lectin-ligand interaction // *Acta Crystallographica.* — 2004. — V. 60, № 2. — P. 281-288.
7. Liu J., Shi S., Ji L., Me W. Investigation on DNA binding and photo-cleavage properties of water-soluble porphyrin and metalloporphyrins // *Transition Metal Chemistry.* — 2006. — V. 30, № 6. — P. 684-690.
8. Lazarraga R., Panta A., Jaysinghe U., Dodds J.H. Tissue culture for elimination of pathogens // *CIP Research Guide of International Potato Center (CIP).* — 1991. — V. 23, № 4. — P.56-59.
9. Maisch T. et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104, № 17. — P. 7223-7228.
10. Specht K.G. The role of DNA damage in PM2 viral inactivation by methylene blue photosensitization // *Photochem. Photobiology.* — 1994. — V. 59, № 5. — P. 435-437.
11. Walker J. M. *New Nucleic acid techniques.* — London: Humana Press, 1988. — 248 p.
12. Zecasin S.A. Giovanni N. et al. Photodynamic inactivation of herpes simplex viruses with porphyrin derivates // *Photochemistry and Photobiology.* — 2000. — V. 27. — P. 52-55.



**И.В. Крулько<sup>1</sup>, С. А. Заика<sup>1</sup>, А.В. Харина<sup>1</sup>, Н.С. Водзинская<sup>2</sup>, В.П. Полищук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
ул. Владимирская, 64, Київ, 01033, Україна, тел.: 8 (044) 521-35-02  
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 63-57- 61  
e-mail: nsvod@ukr.net

## **ПОРФИРИНЫ КАК ИНГИБИТОРЫ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЕЙ**

### **Реферат**

Показано, что в темновых условиях наибольшую антифитовирусную активность в системе ВТМ — культура тканей *N. tabacum* проявляют свободные основания асимметрично мезо-замещенных синтетических порфиринов. Их металлокомплексы с цинком и марганцем были менее эффективными. В то же время, Cu-содержащий симметрично замещенный мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) порфирин тетратозилат существенно угнетал развитие вирусной инфекции в культуре тканей *N. tabacum*. Сделано предположение о возможном механизме антивирусного действия порфиринов.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** порфирины, ВТМ, *Nicotiana tabacum*, ингибирование вирусной инфекции.

**I.V. Krulko<sup>1</sup>, S.A. Zaika<sup>1</sup>, A.V. Kharina<sup>1</sup>, N.S. Vodzynska<sup>2</sup>, V.P.Polischuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Taras Shevchenko Kyiv National University  
Volodymyrska Str. 64, Kyiv. 01033, Ukraine, tel.: 8 (044) 521-35-02  
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

<sup>2</sup>Odesa National Mechnykov University  
Dvoryanska Str. 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (0482) 63-57-61  
e-mail: nsvod@ukr.net

## **PORPHYRINS AS THE INHIBITORS OF VIRAL INFECTION IN PLANT TISSUE CULTURE**

### **Summary**

It was shown that free bases of asymmetric meso-substituted synthetic porphyrins possess the most high antiphytovirus activity under the dark conditions in the model system TMV- *N. tabacum* tissue culture. Their Zn and Mn complexes were less effective. In the same time Cu-containing symmetric substituted meso-tetra(N-methyl-4-piridyl)porphyrin tetratosilat inhibited viral infection in *N. tabacum* tissue culture. The assumption of possible mechanism of antiviral activity of porphyrins was made.

**К e y w o r d s:** porphyrins, TMV, *Nicotiana tabacum*, inhibition of viral infection.



**О.В. Басюл, Г.В. Ямборко, О.С. Багаєва, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, sparklesea@mail.ru

## **ФЕРМЕНТАЦІЯ ГЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *LACTOBACILLUS***

*Виділені штами лактобактерій з ферментованих субстратів та ідентифіковані на основі тинкторіальних, морфологічних та біохімічних властивостей. Проведено заквашування гливи звичайної з використанням штамів лактобактерій: *Lactobacillus casei* ОНУ-ТС1, *L. plantarum* ОНУ-КК1, *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ4 та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18. Встановлено вплив лактобактерій на склад речовин, біохімічні, мікробіологічні властивості та покращення органолептичних властивостей ферментованої гливи у порівнянні з самоквасною. Штами лактобактерій *L. plantarum* ОНУ-КК1 та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18 рекомендовано для заквашування гливи та створення нового функціонального продукту харчування.*

*К л ю ч о в і с л о в а:* лактобактерії, глива звичайна, ферментація.

Вибір бактерій роду *Lactobacillus* як заквашувальних культур у виробництві ферментованих продуктів дієтичного та лікувального харчування закономірний і обумовлений особливим значенням лактобактерій у мікроекології організму людини. Являючи собою частину нормальної мікробіоти, лактобактерії не викликають патологічних процесів і перешкоджають розмноженню умовно-патогенних мікроорганізмів [8]. Одним із перспективних напрямів вирішення проблеми оздоровлення населення є підвищення засвоюваності ферментованих лактобактеріями продуктів [6]. До таких продуктів відносяться і квашені гриби.

Харчова цінність та хімічний склад квашених грибів відрізняються від сировини, що використовується, зниженим вмістом або повною відсутністю цукрів та підвищеними фізіологічною й органолептичною цінностями за рахунок новоутворення молочної кислоти, смакових та ароматичних речовин. Вітамінна цінність квашених грибів залишається майже без змін, оскільки кисле середовище, що утворюється, сприяє їх збереженню [4, 6].

Таким чином, завдяки процесам, що відбуваються за квашення грибів, покращується засвоюваність готової продукції, тому її можна використовувати до їжі без додаткової теплової обробки. Поєднання корисних властивостей гливи з імуномодельовальними властивостями лактобактерій є перспективним напрямком конструювання нових видів функціональної їжі.

Метою роботи було виявлення здатності бактерій роду *Lactobacillus* ферментувати гливу звичайну, а також вивчення впливу лактобактерій на якість кінцевого продукту.



### Матеріали і методи

У роботі були використані штами бактерій роду *Lactobacillus*: *L. casei* ОНУ-ТС1 (виділений з сиру) і *L. plantarum* ОНУ-КК1 (виділений з кислоти капусти), та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ4 і *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18 (виділені з ферментованих молочних продуктів).

Ізольовані штами лактобактерій ідентифікували з огляду на морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні, тинкторіальні властивості.

Ідентифіковані штами бактерій роду *Lactobacillus* використовували як стартерні культури при квашенні гливи звичайної.

Підготовлені гриби вміщували у стерильні скляні банки на 500 мл, пересипаючи сіллю кожен шар грибів.

У роботі використовували контрольний варіант (без внесення бактеріальної закваски) та чотири дослідні варіанти, у які додавали штами *L. casei* ОНУ-ТС1, *L. plantarum* ОНУ-КК1, *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ4 та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18.

Робочі заквашувальні культури були підготовлені шляхом внесення до MRS-бульону штамів *L. casei* ОНУ-ТС1, *L. plantarum* ОНУ-КК1, *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ4 і *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18, у кількості 5 % та вирощування при температурі 37 °С, протягом доби. Концентрація клітин досліджуваних штамів була визначена шляхом вимірювання значень оптичної щільності за 600 нм ( $ОЩ_{600}$ ) та нанесення на агарові пластини розведених суспензій [7].

До грибів додавали бактеріальну закваску у кількості 5 мл бактеріальної суспензії, що складала  $5 \cdot 10^{11}$  КУО/мл. У розсолі були отримані концентрації клітин  $10^9$  КУО/мл.

Після внесення бактеріальної закваски банки накривали бавовняною тканиною, ставили гніт. Зразки зберігали при кімнатній температурі (близько 20 °С) протягом 3 діб, після чого гриби зберігали при температурі 4 °С протягом 3 тижнів.

Мікробіологічне та біохімічне дослідження проводили одразу після внесення закваски та після експозиції. У ферментованих грибах визначали методом Коха наявність мезофільно аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів (МАФАНМ), БГКП, *Staphylococcus aureus*, бактерій роду *Salmonella*, дріжджів, молочнокислих бактерій. Крім цього, у грибах визначали вологість — шляхом висушування наважки до сталої маси при температурі 130 °С, вміст сухих речовин — рефрактометричним методом за щільністю у пікнометрі [2], білкових речовин — методом Лоурі у модифікації Хартрі [9], вуглеводів — методом рідинної хроматографії; глікогену (після вилучення трихлороцтовою кислотою та гідролізу) — методом Бертрана, кислотність, що титрується — методом об'ємного титрування; рН — потенціометричним методом [2].

Мікроскопічне дослідження розсолу та поверхні грибів проводили за допомогою світлової мікроскопії.

Дегустація готового продукту була проведена з огляду на органолептичні властивості готової продукції. Якість ферментованих грибів оцінювали за 10-ти бальною шкалою (смак і запах — по 3 бали; консистенція і зовнішній вигляд — по 2 бали).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою метода варіаційної статистики [3].

### Результати та їх обговорення

Штами лактобактерій *L. casei* ОНУ-ТС1, *L. plantarum* ОНУ-КК1, *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ4 та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18 використані у квашенні грибів виду *Pleurotus ostreatus*.



На початку ферментації, показники вмісту (%) сухих речовин, вуглеводів та білків були однаковими для усіх зразків та становили:  $11,49 \pm 0,02$ ;  $13,52 \pm 0,01$ ;  $14,76 \pm 0,01$ , відповідно.

Після тритижневої експозиції грибів вивчено зміни у складі речовин ферментованих грибів, проведені їх мікробіологічні та біохімічні дослідження. У складі речовин ферментованих грибів виявили тенденцію до збільшення кількості сухих речовин у дослідних зразках (ферментованих лактобактеріями) більшою мірою, ніж у самоквасних глинах, які були використані як контроль (табл. 1).

У ферментованих лактобактеріями грибах відзначено зменшення кількості вуглеводів, які витрачаються на бродіння, та накопичення органічних кислот.

У грибах, заквашених лактобактеріями, підвищилася кислотність, що титрується, за рахунок накопичення молочної кислоти та відповідно зменшилося значення рН (табл. 2). Відомо, що згідно з нормативною документацією, значення рН квашених грибів не повинно бути вищим за 3,9 [1]. Таким чином, контрольний варіант за значенням рН не відповідав нормативній документації.

Таблиця 1

Вміст білків і вуглеводів у ферментованих грибах *Pleurotus ostreatus*

Table 1

The proteins and carbohydrates compound of fermented mushrooms  
*Pleurotus ostreatus*

Штам	Сухі речовини, %	Білки, %	Вуглеводи, %
<i>L. casei</i> ОНУ-ТС1	$11,96 \pm 0,02$	$12,94 \pm 0,01$	$11,84 \pm 0,01$
<i>L. plantarum</i> ОНУ-КК1	$11,68 \pm 0,02$	$12,88 \pm 0,01$	$12,43 \pm 0,01$
<i>L. acidophilus</i> ОНУ-ОЛ4	$11,72 \pm 0,02$	$12,90 \pm 0,01$	$12,42 \pm 0,01$
<i>L. acidophilus</i> ОНУ- ОЛ18	$11,70 \pm 0,02$	$12,89 \pm 0,01$	$12,44 \pm 0,01$
Контроль	$11,57 \pm 0,02$	$11,06 \pm 0,01$	$14,29 \pm 0,01$

Критерієм безпечності ферментованих грибів є відсутність патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. Для знищення збудників псування й токсиноутворювальних патогенних мікроорганізмів гриби були піддані комбінованій дії органічних кислот, з яких домінує молочна, кухонної солі та термічної обробки [5].

Кількість мезофільно аеробних та факультативно анаеробних мікроорганізмів у грибах перед ферментацією була у межах норми. Після експозиції кількість МАФАНМ у дослідних варіантах знизилася, а у контрольному варіанті перевищила норму. Кількість молочнокислих бактерій одразу після внесення закваски становила  $1,1 \cdot 10^9$  КУО/г у дослідних варіантах, у контрольному варіанті кількість МКБ була на сім порядків нижчою. Після закінчення строку ферментації, у дослідних варіантах МКБ зберегли життєздатність, на відміну від контрольного варіанту (табл. 2).

Таблиця 2

Біохімічні та мікробіологічні показники ферментованих грибів *Pleurotus ostreatus*

Table 2

The biochemical and microbiological indicators of fermented mushrooms *Pleurotus ostreatus*

Варіант	Кислотність, що титрується, Т <sub>о</sub>		рН		МАФАнМ, КУО/г		МКБ, КУО/г	
	до	після	до	після	до	після	до	після
	експозиції		експозиції		експозиції		експозиції	
Глива + <i>L. casei</i> ОНУ-ТС1	64 ± 0,01	74 ± 0,01	4,8 ± 0,01	3,8 ± 0,01	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	0,5 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	1,1 x 10 <sup>9</sup> ±0,01	1,8 x 10 <sup>6</sup> ±0,01
Глива + <i>L. plantarum</i> ОНУ-КК1	64 ± 0,01	79 ± 0,01	4,8 ± 0,01	3,8 ± 0,01	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	0,4 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	1,1 x 10 <sup>9</sup> ±0,01	1,4 x 10 <sup>6</sup> ±0,01
Глива + <i>L. acidophilus</i> ОНУ-ОЛ4	64 ± 0,01	72 ± 0,01	4,8 ± 0,01	3,8 ± 0,01	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	0,6 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	1,1 x 10 <sup>9</sup> ±0,01	1,3 x 10 <sup>6</sup> ±0,01
Глива + <i>L. acidophilus</i> ОНУ-ОЛ18	64 ± 0,01	76 ± 0,01	4,8 ± 0,01	3,8 ± 0,01	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	0,5 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	1,1 x 10 <sup>9</sup> ±0,01	1,4 x 10 <sup>6</sup> ±0,01
Контроль (самоквасна глива)	62 ± 0,01	64 ± 0,01	4,8 ± 0,01	4,0 ± 0,01	1,2 x 10 <sup>2</sup> ±0,03	2,0 x 10 <sup>5</sup> ±0,03	0,2 x 10 <sup>2</sup> ±0,01	відсутні





БГКП, бактерії роду *Salmonella*, золотистий стафілокок (*S. aureus*) були відсутні у всіх зразках як на початку, так і в кінці експозиції.

Після завершення ферментації, як і на її початку, у дослідних варіантах були відсутні дріжджі. При цьому, у контрольному зразку після експозиції з'явилися дріжджі, кількість яких перевищувала норму [1] і становила  $1,6 \cdot 10^3 \pm 0,01$  КУО/г.

Дані щодо зміни складу основних речовин ферментованих грибів, а також щодо мікробіологічних та біохімічних показників, відповідні до результатів дегустаційної оцінки наведені у табл. 3.

У ході бактеріологічного дослідження зразків грибів виявлено домінування лактобактерій у ферментованих ними грибах, і відсутність лактобактерій та наявність дріжджів у контрольному варіанті.

Дев'ять з п'ятнадцяти представників дегустаційної комісії поставили максимальну оцінку дослідним зразкам грибів, які були заквашені штамами *L. plantarum* ОНУ-КК1 та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18.

Таким чином, гливи, заквашені лактобактеріями, за мікробіологічними та біохімічними показниками, відповідали вимогам нормативної документації, на відміну від самоквасних грибів, а також характеризувалися кращими органолептичними властивостями. Використання лактобактерій для квашення гливи робить цей процес більш прогнозованим. Досліджувані штами лактобактерій *L. plantarum* ОНУ-КК1 та *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18 рекомендовані для розробки промислової технології заквашування гливи та створення нового функціонального продукту харчування.

Таблиця 3

Дегустаційні показники ферментованих грибів *Pleurotus ostreatus*

Table 3

The tasting indicators of fermented mushrooms *Pleurotus ostreatus*

Варіант	Смак, запах	Зовнішній вигляд	Консистенція	Сума балів
Глива + <i>L. casei</i> ОНУ-ТС1	смак кисло-молочний, відчувається підвищена кислотність, запах грибний, кисло-молочний	характерний для квашених грибів	пружна, щільна	9
Глива + <i>L. plantarum</i> ОНУ-КК1	смак кисло-молочний, запах кисло-молочний без домішок	характерний для квашених грибів	пружна, хрустка, щільна	10
Глива + <i>L. acidophilus</i> ОНУ-ОЛ4	смак кисло-молочний, відчувається підвищена кислотність, запах кисло-молочний	характерний для квашених грибів	пружна, м'яка, щільна	9
Глива + <i>L. acidophilus</i> ОНУ-ОЛ18	смак кисло-молочний, запах кисло-молочний без домішок	характерний для квашених грибів	пружна, хрустка, щільна	10
Самоквасна глива (контроль)	запах і смак різкі, з гіркотою	колір темніший	м'яка	7

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Гигиенические* требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.3.2.1078 – 01. – М.: ИНФРА – М, 2002. – 216 с.
2. *Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П.* Методы биохимического исследования растений. Под ред. Ермакова А. И. – Л.: Агрпроомиздат, 1987. – С. 430, 38-40.
3. *Зайдель А. Н.* Погрешности измерений физических величин. – Л.: Наука, 1985. – 112 с.
4. *Карташова Л. В., Николаева М. А., Печникова Е. Н.* Товароведение продовольственных товаров. – М.: Издат. Дом Деловая литература, 2004. – 664с.
5. *Квасников Е. И., Нестеренко О. А.* Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – С. 85-341.
6. *Матюхина З. П., Королькова Э. П.* Квашеные (соленые) овощи и грибы // Товароведение пищевых продуктов. – М., 2000. – С. 91-94.
7. *Шендеров В. А.* Медицинская микробная экология и функциональное питание. – М., 1998. – 263 с.
8. *Bernardeau M., Guguen M., Jean Paul Vernoux.* Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments //FEMS Microbiology Review. – 2006. – V. 30. – P. 487-513.
9. *Hartee E. E.* Determination of protein by modification Lowry method that gives a linear photometric response //Anal. Biochem. – 1972. – V. 48. – № 1. – P. 422-455.

**Е.В. Басюл, А.В. Ямборко, О.С. Багаева, В.А. Иваница**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, sparklesea@mail.ru

## ФЕРМЕНТАЦИЯ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ БАКТЕРИЯМИ РОДА *LACTOBACILLUS*

### Реферат

Из ферментированных субстратов выделены штаммы лактобактерий и идентифицированы на основе тинкториальных, морфологических и биохимических свойств. Проведено заквашивание вешенки обыкновенной с использованием штаммов лактобактерий: *Lactobacillus casei* ОНУ-ТС1, *L. plantarum* ОНУ-КК1, *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ4, и *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18. Показано влияние лактобактерий на состав веществ, биохимические, микробиологические и органолептические показатели ферментированных грибов. Отмечено улучшение органолептических свойств ферментированной лактобактериями вешенки, по сравнению с самоквашеной. Штаммы лактобактерий *L. plantarum* ОНУ-КК1 и *L. acidophilus* ОНУ-ОЛ18 рекомендованы для заквашивания вешенки и создания нового функционального продукта питания.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лактобактерии, вешенка обыкновенная, ферментация.



H.V. Basyul, G.V. Yamborko, O.S. Bahaeva, V.O. Ivanytsya

Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2,  
Odesa, 65082, Ukraine, sparklesea@mail.ru

## PLEUROTUS OSTREATUS FERMENTATION BY BACTERIA OF THE GENUS *LACTOBACILLUS*

### Summary

The lactobacilli strains were selected from fermented substrates and identified on the tinctorial, morphological and biochemical properties basis. The *Pleurotus ostreatus* fermentation, using such lactobacilli strains as *Lactobacillus casei* ONU-TC1, *L. plantarum* ONU-KK1, *L. ONU-OL4 acidophilus* and *L. acidophilus* ONU-0L18 has been led. The lactobacilli influence on substances composition, biochemical, microbiological and organoleptic parameters of fermented mushrooms was shown. The organoleptic properties improvement of *P. ostreatus* fermented by lactobacilli was noted in comparison with auto-fermented mushrooms. *L. plantarum* ONU-KK1 and *L. acidophilus* ONU-18 lactobacilli strains are recommended for *Pleurotus* fermentation and for new functional food product creation.

**K e y w o r d s:** lactobacilli, *Pleurotus ostreatus*, fermentation.



В.А. Думова<sup>1</sup>, Н.В. Патыка<sup>1</sup>, Ю.В. Круглов<sup>1</sup>, В.Ф. Патыка<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, 3, e-mail: n\_patyka@mail.ru

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

## ИЗУЧЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ КОМПЛЕКСА ПРОКАРИОТНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОДЗОЛИСТЫХ ПОЧВ

*Используя метод клонирования ДНК, проведен сравнительный анализ комплекса прокариотных микроорганизмов подзолистых почв при сверхдлительном возделывании льна долгунца и в чистом паре. Проведена оценка биоразнообразия почвенных прокариотов, на основе которых можно судить о почвенных микробиологических сообществах, сформировавшихся под влиянием различных агроприемов. Установлено, что, в конечном счете, бессменная культура растений способствует обеднению генетических ресурсов микробиоты почв и изменению ее качественного состава.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: почва, лен-долгунец, ДНК почвенных микроорганизмов, биоразнообразие.*

Известно, что микроорганизмы являются неотъемлемым гомеостатическим составляющим компонентом почвы, который осуществляет и определяет в ней важнейшие функции трансформации веществ и энергии. Микробиоте принадлежит важная роль в функционировании различных экосистем. Развитию детального изучения микробного биоразнообразия в окружающей среде препятствовали ограниченные прикладные возможности. За прошедшее десятилетие в области биологии широкое развитие получили молекулярно-биологические методы, при помощи которых появилась возможность преодолеть проблемы, возникающие в практике классических микробиологических методов исследований [3, 10].

На сегодняшний день многие работы базируются на исследованиях нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), непосредственно извлеченных из образцов различных почв [3, 4]. При помощи ПЦР с соответствующими филогенетическими маркерами (16S рРНК, 18S рРНК и др.) проводится определение генов, кодирующих малую или большую субъединицу рибосомальной РНК, что способствует дальнейшему развитию исследований разнообразных изолятов и некультивируемых видов микробных сообществ биогеоценозов [5]. Следует отметить, что сравнительный анализ природных микробных сообществ способствует ускоренному изучению их структурно-функциональных особенностей, учитывая специфичность уникальных или доминирующих групп при определенных условиях [1].



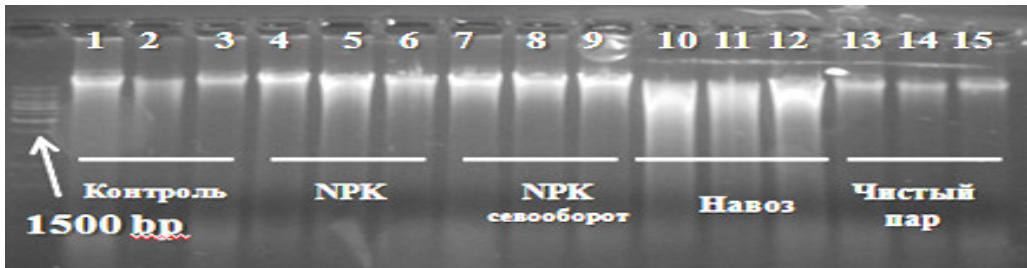
**Матеріали і методи**

Изучение почвенных микробных сообществ осуществлялось на базе сверхдлительного (с 1912 года) стационарного полевого опыта Российского государственного аграрного университета Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева. Почва дерново-слабоподзолистая, старопашотная кислая и запыляющая (по классификации ФАО-Podsolluvisol). Согласно данным гранулометрического анализа, в пахотном (0–20 см) слое почвы содержалось фракций менее 0,01 мм 22,0 % [9].

Образцы почв отбирались осенью после сбора урожая льносоломки (*Linum usitatissimum* L) из верхнего 15 см пахотного горизонта. Отбор почвенных образцов для микробиологического анализа осуществлялся из следующих вариантов опыта:

Бессменная культура	1.	Лен-долгунец (контроль)
	2.	Лен-долгунец+ N <sub>100</sub> P <sub>150</sub> K <sub>120</sub>
	3.	Лен-долгунец + навоз
Севооборот	4.	Лен-долгунец (без удобрений)
Чистый пар	5.	Без удобрений

ДНК почвенных микроорганизмов экстрагировали методом, описанным в работах Doyle J.J., Doyle J.L. [4, 5]. После визуальной детекции полученных образцов ДНК после электрофоретического разделения в однопроцентном агарозном геле (рис. 1), проводили очистку полученной почвенной ДНК от примесей гуминовых кислот по D. Moreira [8].



**Рис. 1. Электрофореграмма тотальной ДНК почвенных организмов**  
 Маркер молекулярной массы (1500 bp), 2–15 повторности вариантов отбора

**Fig. 1. Electrophoregram of soil organisms total DNA**  
 Molecular mass marker (1500 bp), 2–15 variants of choice repeatability

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили зубактериальным праймером Eu3. Полученный таким образом ПЦР продукт разрезали рестриктазой *HaeIII*. Визуальную детекцию фрагментов из библиотеки клонов (рис. 2-3) полученных образцов ДНК осуществляли после электрофоретического разделения в 1% агарозном геле. После этого проводили идентификацию нуклеотидных последовательностей 16S рРНК в автоматическом секвенаторе Beckman CEQ 8000. Видовую принадлежность полученных нуклеотидных последовательностей 16S рРНК проводили в соответствии с международной базой данных NSBI и GENBANK.

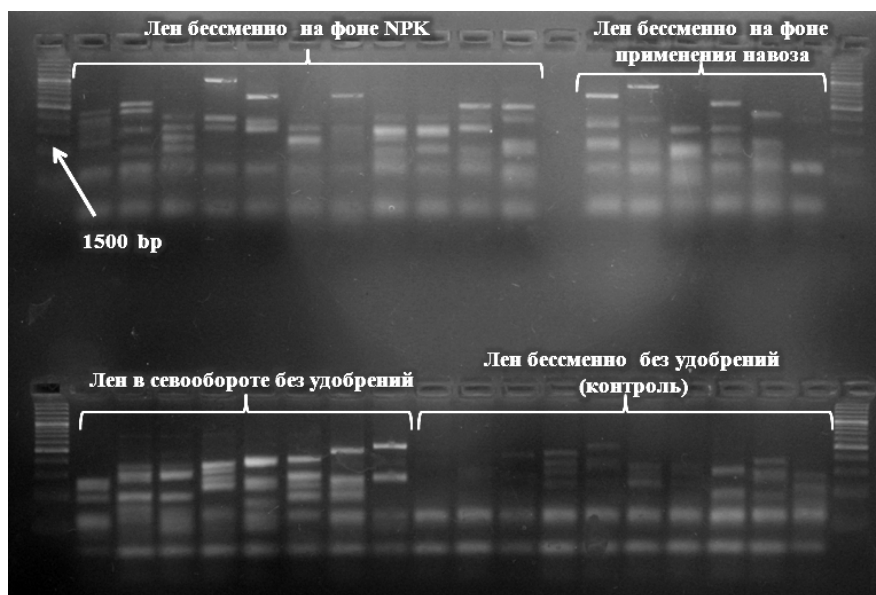


Рис. 2. Электрофореграмма рестрикции (*Hae III*) клонов 16S рРНК полученных из тотальной ДНК почвенных организмов в различных вариантах полевого опыта

Fig. 2. Electrophoregram of clones 16S рRNA restrictions (*Hae III*) obtained from soil organisms total DNA in different variants of the field experiment

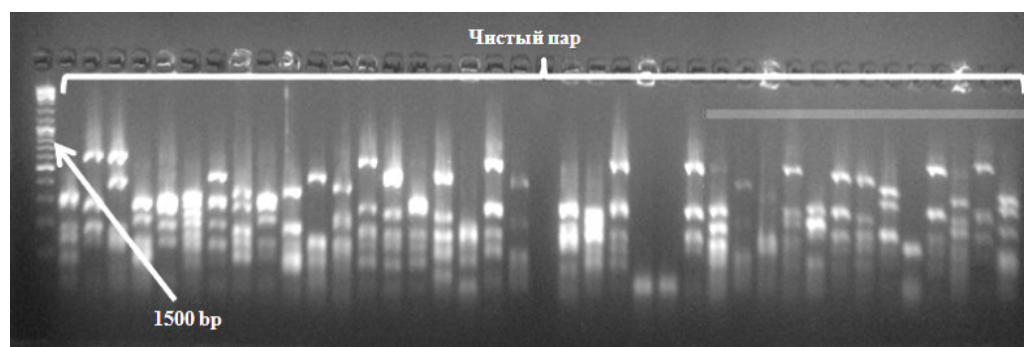


Рис. 3. Электрофореграмма рестрикции (*Hae III*) клонов 16S рРНК полученных из тотальной ДНК почвенных организмов в варианте чистый пар полевого опыта

Fig. 3. Electrophoregram of clones 16S рRNA restrictions (*Hae III*) obtained from soil organisms total DNA in the variant bare fallow of the field experiment

### Результаты и их обсуждение

Исследованиями установлено, что при возделывании льна-долгунца на дерново-подзолистых почвах (табл.) при бессменном возделывании, севообороте и чистом паре, сформировались микробоценозы, доминирующее положение в которых заняли разные представители бактерий. Молекулярно-генетический анализ состава этих сообществ в варианте бессменного возделывания льна-долгунца выявил численное доминирование представителей филогенетических групп *Planctomycetes* и *beta Proteobacteria*.

Список доминантов является одним из репрезентативных показателей таксономической структуры микробных комплексов, тесно связанным с типом агроэкосистемы. Встречаемость *Planctomyces* и *beta Proteobacteria* составила от 5,7 до 11,5 %.

В севообороте доминировали представители *Actinobacteria* – 10 % и некультивируемые бактерии – 13 %. Большой процент некультивируемых бактерий выявлен в варианте чистый пар – 37,1 %.

При изучении влияния культуры льна-долгунца и чистого пара на видовой состав почвенных бактерий отмечено, что при бессменном возделывании льна широко представлены некультивируемые бактерии *Planctomyces*, *beta Proteobacteria*, *alpha Proteobacteria*, уровень сходства которых составляет 95–99 %.

В варианте чистого пара некультивируемые виды составляли 4,7–23 % при уровне их сходства – 85–94 %. В севооборотном варианте с применением НРК уровень сходства бактерий рода *Actinobacteria* составил 97 %, а некультивируемых бактерий – 98 %, что подтверждает представленные ранее данные о сложившихся гомеостатических взаимосвязях в почвенном микробном комплексе.

Таблица

**Состав доминирующих фило типов бактерий в почве под культурой льна-долгунца и чистым паром**

Table

**Flex-fibre culture and bare follow effect on the composition of dominated bacteria filotypes in soil**

Вариант опыта	Филотип прокариот	Сходство, %	Представленность, %
лен бессменно	Uncultured planctomyces clone A12_MO02 EF220755.1	95	11,5
	Uncultured planctomyces bacterium clone 711 EU370852.1	95	5,7
	Uncultured beta proteobacterium clone GASP-KA1W2_B02 EU297276.1	97	11,5
	Uncultured alpha proteobacterium clone EB1032 AY395351.1	99	5,7
севооборот НРК	Uncultured actinobacterium clone GASP-KA1S1_D02 EU296947.1	97	10
	Uncultured bacterium clone GAS19 FJ178020.1	98	13
чистый пар	Uncultured bacterium clone H79S2_12b11 EU451814.1	94	23
	Uncultured bacterium clone 1790b-16 AY917485.1	89	4,7
	Uncultured bacterium clone ST_37 AM921478.1	85	4,7
	Uncultured bacterium clone sb8 EU327149.1	87	4,7

Таким образом, методом молекулярно-генетического анализа было установлено биоразнообразие прокариотического комплекса дерново-подзолистых почв при бессменном возделывании льна-долгунца, севообороте и чистом паре, что позволяет научно-обоснованно судить о земледельческих агроприемах и управлять ими.

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 07-04-13527 офу-ц.*



## ЛІТЕРАТУРА

1. *Длительному* полевому опыту ТСХА 90 лет: итоги научных исследований /Под ред. Сафонова А.Ф. — М.: Изд-во МСХА, 2002. — 246 с.
2. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd. ed. (Ed. D.R. Boone, R.W. Castenholz) Springer-Verlag, N.Y., Berlin, Heidelberg. — 2001. — Vol. 1. — 721 p.
3. *Buckley D.H., Schmidt T.M.* The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation //Microbial Ecology. — 2001. —Vol. 42. — P. 11 — 21.
4. *Doyle J.J., Doyle J.L.* Isolation of plant DNA from fresh tissue //Focus. — 1987. — Vol. 12. — P. 13-15.
5. *Felske, A., Wolterink A., Van Lis R., De Vos W.M., Akkermans A.D.L.* Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes //Applied and Environmental Microbiology. — 2000. —Vol. 66. — P. 3998-4003.
6. *Hugenholtz P., Goebel B. M., Pace N. R.* Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. — 1998. — P. 173-198.
7. *Moreira D.* Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations //Nucleic Acids Research. — 1998. — Vol. 26. — N 13. — P. 3309-3310.
8. *Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J.* The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences //Adv. Microbial. Ecol. — 1986. — Vol. 9. — P. 1-55.
9. *Torsvik V., Goksoyr J., Daae F. L.* High diversity in DNA of soil bacteria //Applied and Environmental Microbiology. -1990. —Vol. 56. — P. 782-787.
10. *Widmer F., Fliessbach A., Laczko E., Schulze-Aurich J., Zeyer J.* Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and BiologTM-analyses //Soil Biology & Biochemistry. - 2001. —Vol. 33. — P. 1029-1036.

<sup>1</sup>В.А. Думова, <sup>1</sup>М.В. Патица, <sup>1</sup>Ю.В. Круглов, <sup>2</sup>В.П. Патица

<sup>1</sup>Державна наукова установа Всеросійський науково-дослідний інститут сільськогосподарської мікробіології РАСГН, 196608, Санкт-Петербург, Пушкін, шосе Подбельского, 3, e-mail: n\_patyka@mail.ru

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

## ВИВЧЕННЯ БІОРИЗНОМАНІТТЯ КОМПЛЕКСУ ПРОКАРІОТНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ПІДЗОЛИСТИХ ҐРУНТІВ

### Реферат

Використовуючи метод клонування ДНК, проведено порівняльний аналіз комплексу прокаріотних мікроорганізмів підзолистих ґрунтів при надтривалому вирощуванні льону-довгунця та в чистому парі. Виявлено та проведено оцінку біорізноманіття ґрунтових прокаріот, на основі яких можна судити про ґрунтові мікробіологічні угруповання, що сформувалися під впливом різних агротехнічних заходів. Встановлено, що беззмінна культура рослин сприяє збідненню генетичних ресурсів ґрунтової мікробіоти і зміні її якісного складу.

К л ю ч о в і с л о в а: льон-довгунець, прокаріотні мікроорганізми, ДНК ґрунтових мікроорганізмів, біорізноманітність.





**<sup>1</sup>V.A. Dumova, <sup>1</sup>N.V. Patyka, <sup>1</sup>Yu.V. Kruglov, <sup>2</sup>V.F. Patyka**

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, RAAS, 196608, Russia,  
St. Petersburg, Puskin, Podbelsky str., 3.

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU of Ukrain, Zabolotnoho str.,  
154, Kiev, D03680, Ukraine.

## **STUDYING BIODIVERSITY OF THE PROCARIOTIC MICROORGANISMS COMPLEX OF PODSOLIC SOILS**

### **Summary**

Using the method of DNA cloning the comparative analysis of the complex procaryotic microorganisms of podsolic soils is carried out for a long term cultivation of flax and in bare fallow. The method has allowed to reveal and identify the species belonging, to estimate the biodiversity of soil procaryots on which basis it is possible to judge the soil microbiological communities generated under the influence of various agrotechnologies. It is established that finally the permanent culture of plants causes genetic resources degradation of soils microflora and basic change of its qualitative structure. It is directly connected with decrease in stability of plants to natural and anthropogenic stresses. Crop succession of agricultural crops in the crop rotation link causes specific updating of microocenosis.

**Key words:** flax-fibre, procaryotic microorganisms, soil organisms DNA, biodiversity.



**Ж.Ю. Сергеева<sup>1</sup>, Ф.И. Товкач<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина, тел.: 8 (044) 526 61 57, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **РЕСТРИКЦИОННОЕ КАРТИРОВАНИЕ ВНЕХРОСОМОМНОГО ЭЛЕМЕНТА pCA25 *ERWINIA CAROTOVORA***

*Проведено физическое картирование внехромосомного элемента pCA25 Erwinia carotovora и его транспозонного варианта pCA25::Tn9. На основе полученных данных построена предварительная рестрикционная карта плазмиды и определено место встраивания транспозона в плазмидную ДНК.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: Erwinia carotovora, плазмиды, транспозон Tn9, рестрикционный анализ, рестрикционная карта.*

Плазмиды размером 9,8 тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.) и их делеционно-вставочные варианты представляют собой наиболее распространённую группу внехромосомных элементов, выявленных у *Erwinia carotovora*. Рестрикционный анализ этих внехромосомных ДНК с помощью эндонуклеаз *HpaI* и *EcoRV* показал, что они гомологичны по сайтам рестрикции [1]. Одним из наиболее изученных генетических элементов бактерии *E. carotovora*, размером 9,8 т.п.н., является плазида pCA25 [2].

Целью данного исследования было создание рестрикционной физической карты сайтов плазмиды pCA25 *E. carotovora* и её транспозонного варианта pCA25::Tn9 [3].

### **Материалы и методы**

В работе были использованы штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48A (pCA25) и *E. carotovora* subsp. *carotovora* 48A 7/4b (pCA25::Tn9).

Выделение плазмид из клеток *E. carotovora* проводили щелочным методом [4]. Полученные плазмидные ДНК осаждали этанолом и растворяли в воде. Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы *HpaI*, *BglI*, *EcoRI*, *EcoRV* и *PstI*. В качестве маркера размера использовали фрагменты ДНК фага  $\lambda$ , полученные с помощью эндонуклеаз *HindIII* и *PstI*.

### **Результаты и их обсуждение**

На рестрикционной карте плазмиды pCA25::Tn9 показано, что все три сайта для рестриктазы *HpaI* расположены на небольшом расстоянии друг от друга, приводя, таким образом, при рестрикции к появлению одного большого и двух небольших фрагментов (рис.).



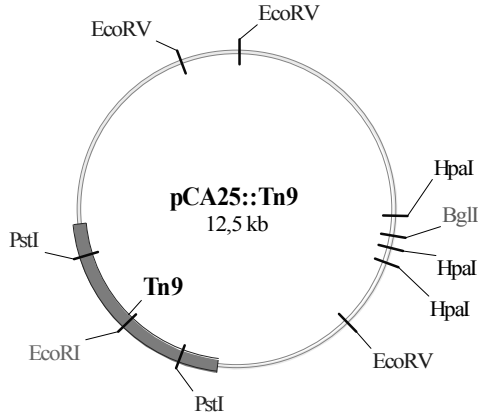


Рис. Рестрикционная карта плазмиды рСА25::Тn9

Fig. Restriction map of plasmid рСА25::Тn9

Сайт для эндонуклеазы *BglII* также расположен в этой области плазмидной ДНК между сайтами эндонуклеазы *HpaI* (рис.). Сайты для рестриктаз *HpaI* и *BglII* расположены в пределах фрагмента А *EcoRV*, непосредственно на небольшом расстоянии от одного из трёх сайтов эндонуклеазы *EcoRV*. Было установлено, что транспозон *Tn9* встраивается в ДНК плазмиды рСА25 в фрагмент В *EcoRV*, также на небольшом расстоянии от сайта рестрикции *EcoRV* (рис.). Встраивание транспозона *Tn9* только в определённую область ДНК плазмиды рСА25 было подтверждено при исследовании значительного числа клонов с плазмидой рСА25::Тn9, которые были получены независимо [2]. Сайты для рестриктаз *EcoRI* и *PstI* отсутствуют на ДНК нативной плазмиды рСА25. На ДНК транспозона *Tn9* плазмиды рСА25::Тn9 имеется один сайт для *EcoRI*, расположенный в гене *CAT*, и два сайта для *PstI*, расположенные в пределах IS1 последовательностей транспозона *Tn9*.

Таким образом, в результате физического картирования плазмид рСА25 и рСА25::Тn9, была предложена рестрикционная карта криптоической плазмиды *E. carotovora*, являющейся представителем наиболее распространённого размерного класса внехромосомных ДНК для данной бактерии. Благодаря наличию транспозонной метки в плазмиде стало возможным уточнение взаимного расположения сайтов рестрикции, а также местоположения транспозона *Tn9* в плазмидной ДНК.

Работа выполнена при поддержке государственного фонда фундаментальных исследований (проект Ф25/134-2008) и МОН Украины (проект НУ/448-2009).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Сергеева Ж.Ю., Товкач Ф.И. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* // Доповіді НАН України. — 2008. — № 12. — С. 149-153.
2. Бурова Л.М., Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Природа криптоической плазмиды рСА25 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 48A // Мікробіол. журн. — 2007. — т. 69, № 2. — С. 23-28.
3. Сергеева Ж.Ю., Бурова Л.М., Товкач Ф.И. Внесение транспозона *Tn9* в эндогенные плазмиды *Erwinia carotovora* при лизогенизации клеток колифагом P1 // Мікробіол. журн. — 2006. — 68, №4. — С. 34-39.
4. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. — 1981. — 145, №3. — P. 1365-1373.



**Ж.Ю. Сергеева<sup>1</sup>, Ф.І. Товкач<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **РЕСТРИКЦІЙНЕ КАРТУВАННЯ ПОЗАХРОМОСОМНОГО ЕЛЕМЕНТА рСА25 *ERWINIA CAROTOVORA***

### **Реферат**

Проведено фізичне картування позахромосомного елемента рСА25 *Erwinia carotovora* і його транспозонного варіанта рСА25::Tn9. На основі отриманих даних побудовано попередню рестрикційну карту плазмиди і виявлено місце вбудовування транспозона Tn9 в плазмідну ДНК.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, плазмиди, транспозон Tn9, рестрикційний аналіз, рестрикційна карта.

**Zh.U. Sergeeva<sup>1</sup>, F.I. Tovkach<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: SergeevaZh@gmail.com

<sup>2</sup> Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Acad. Zabolotnoho str., 154, Kyiv, 03143, Ukraine, e-mail: fedir.i.tovkach@gmail.com

## **RESTRICTION SITE MAPPING OF *ERWINIA CAROTOVORA* EXTRACHROMOSOMAL ELEMENT рСА25**

### **Summary**

The restriction site mapping of *Erwinia carotovora* extrachromosomal element рСА25 and its transposon variant рСА25::Tn9 has been carried out. The preliminary restriction map of the plasmid has been created and the site of the Tn9 transposon incorporation has been detected corresponding to the obtained data.

Key words: *Erwinia carotovora*, plasmids, transposon Tn9, restriction analysis, restriction map.



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

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,  
Одесса, 65058, Украина, тел.: 8 (0482) 635761, e-mail: rusamariya@yandex.ru

## **ФУНГИЦИДНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРАЗИДОВ ФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ ПО ОТНОШЕНИЮ К ВОЗБУДИТЕЛЯМ ПРИКОРНЕВОЙ ГНИЛИ**

*Изучена фунгицидная активность некоторых гидразидов феноксиуксусной кислоты по отношению к *Fusarium oxysporum* v. *arth.*, *F. sporotrichiella* var. *poae* и *F. graminearum*. В ходе исследования было установлено, что чувствительность возбудителей прикорневых гнилей к действию веществ зависела от концентрации соединений, а также штамма микроорганизма. Наиболее активным оказался хиноксалиновый гидразид феноксиуксусной кислоты, вызывающий 2–3-кратное подавление развития *F. sporotrichiella* var. *poae*.*

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

Грибы рода *Fusarium* широко распространены в природе и представлены большим количеством видов. Они могут развиваться на различных органических субстратах, в почве, воде и т. д. [1]. Большинство видов рода *Fusarium* являются возбудителями болезней культурных и дикорастущих растений [2]. Поражение зерновых культур возбудителями фузариоза в значительной степени зависит от экологических условий региона, от их патогенности и видового состава [5]. На территории восточной Европы ядро фузариозного комплекса среди зерновых культур в основном состоит из *F. oxysporum* v. *arth.*, *F. sporotrichiella* var. *poae* и *F. graminearum* [4]. В настоящее время ведутся активные поиски фунгицидных средств, которые позволили бы снизить частоту возникновения фузариозов, не вызывая токсического поражения самих растений. Среди наиболее перспективных соединений можно выделить класс гидразидов. Так, гидразид малеиновой кислоты используется как экологически безопасное химическое вещество для предотвращения прорастания картофеля и лука, а также в качестве гаметоцидов некоторых других сельскохозяйственных культур [3].

Целью данного исследования являлось изучение активности некоторых гидразидов феноксиуксусной кислоты по отношению к основным возбудителям фузариозов.

### **Материалы и методы**

В качестве объектов исследований были использованы штаммы 3 видов грибов рода *Fusarium*: *F. oxysporum* v. *arth.* ПНДЛ-1, *F. sporotrichiella* var. *poae* ПНДЛ-2

© М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, Л.Н. Вострова, М.В. Гренадерова, 2009



и *F. graminearum* ПНДЛ-3, полученных из коллекции ИТИ «Биотехника». Хранение и выращивание культур проводилось при температуре 5 °С и 22 °С, соответственно, на скошенном картофельном агаре (КА), содержащем 2 % D-глюкозы [6].

Исследуемые вещества относятся к производным гидразидов феноксиуксусной кислоты (рис. 1). Ряд данных соединений, синтезированных в Проблемной лаборатории синтеза лекарственных препаратов Одесского национального университета им. И.И. Мечникова, представлен производными с различными гетероциклическими радикалами: пиридиновым (I), хинолиниловым (II) и хиноксалиновым (III). Диапазон концентраций, изучаемый в работе, составлял  $10^{-5}$ – $10^{-3}$  М; исходные растворы веществ, полученные с использованием диметилсульфоксида (ДМСО), автоклавировали при 0,5 атм [3, 9].

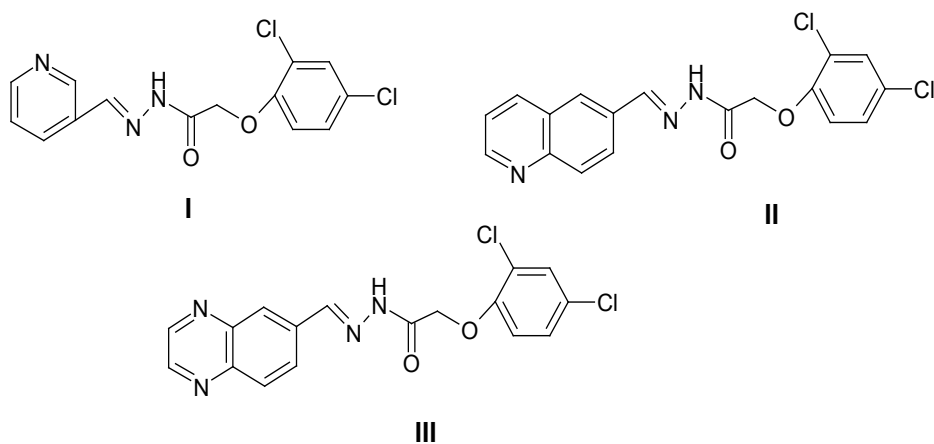


Рис. 1. Структура исследуемых гидразидов феноксиуксусной кислоты

Fig. 1. The studied phenoxyacetic acid hydrazide structures

Для определения эффективности данных производных в отношении *Fusarium spp.* был использован метод агаровых блоков [8]. При этом 7-суточную культуру микроорганизмов заливали 10 мл стерильного физиологического раствора, встряхивали, после чего отбирали 2 мл. Полученную суспензию вносили в расплавленный и охлажденный до 40–45 °С КА, затем разливали по чашкам Петри. После застывания в среде вырезали лунки, куда вносили соответствующие количества исследуемых соединений. Через 24 часа инкубации при температуре 22 °С определяли диаметр зоны отсутствия роста (в мм). В качестве контроля были использованы ДМСО (контроль отрицательный, К–) и тетраметилтиурамидсульфид (ТМТД) (контроль положительный, К+) [7]. Соединение считалось перспективным для дальнейших исследований, если коэффициент торможения роста ( $K_{тр}$ ) превышал 1,0. Количество повторов для каждой концентрации составило 6.

На втором этапе проводимых исследований была определена динамика роста *Fusarium spp.* в присутствии отобранных соединений. Так, после застывания КА, содержащего 2 % глюкозы и соответствующее количество исследуемого вещества, на его поверхность помещался мицелиальный диск [9]. Данный диск, диаметр которого составлял 7 мм, был вырезан из края колонии соответствующего штамма *Fusarium spp.*, предварительно выращенной на КА в течение 7 суток

при температурі 22 °С. Скорість росту (мм/сутки) определяли каждые 24 часа в течение 12 суток, измеряя диаметр растущей колонии. Величину диаметра колонии рассчитывали как среднее арифметическое трех измерений случайно выбранных проекций. Для каждого соединения эксперимент проводили дважды, количество повторов в каждом составляло три.

Статистическую обработку результатов, полученных в ходе экспериментов, проводили общепринятыми методами с использованием критерия Стьюдента.

### Результаты и их обсуждение

В таблице представлены данные, полученные в результате сравнения фунгицидной активности исследуемых соединений с положительным контролем — ТМТД — препаратом, используемым в сельском хозяйстве для подавления фузариозной гнили [3, 7].

Среди грибов наиболее чувствительным к действию веществ оказался *F. sporotrichiella var. poae*. Большинство соединений способствовало угнетению роста данной культуры уже в минимальной концентрации. Что касается 0,1 мМ и 1,0 мМ, то  $K_{тр}$  по сравнению с положительным контролем составил 1,2–3,0. Наибольшей активностью характеризовалось производное III, которое способствовало 2–3-кратному подавлению *F. sporotrichiella var. poae*.

Таблица

Кoeffициент торможения роста тест-культур ( $K_{тр}$ ) в присутствии исследуемых соединений

Table

The growth inhibition coefficient of cultures ( $C_{gin}$ ) in the studied compound presence

Штамм	Вещество	Концентрация, мМ		
		0,01	0,1	1,0
<i>F. oxysporum v. arth.</i> ПНДЛ-1	I	0,2	0,2	1,4
	II	0,2	0,2	1,0
	III	0,3	0,2	0,2
<i>F. sporotrichiella var. poae</i> ПНДЛ-2	I	1,1	1,4	1,2
	II	0,9	1,1	1,1
	III	1,8	3,1	2,5
<i>F. graminearum</i> ПНДЛ-3	I	0,1	0,2	0,2
	II	0,1	0,2	0,2
	III	0,2	0,3	0,8

Изучение влияния соединений на другие штаммы *Fusarium spp.* позволило установить, что для *F. oxysporum v. arth.* и *F. graminearum* характерна устойчивость к действию данных веществ. Так, определяемый  $K_{тр}$  практически не превышал 0,3 для всех исследуемых концентраций гидразидов. Исключение составило только воздействие 1,0 мМ соединений I и II на *F. oxysporum v. arth.*, для которых подавление роста культуры происходило на уровне положительного контроля.



В дальнейшем для соединения III (хиноксалинового гидразида феноксиуксусной кислоты), осуществлявшего максимальное подавление *F. sporotrichiella var. poae*, было проведено более подробное изучение влияния на рост тест-штаммов (рис. 2). Вещество добавляли в КА, после чего на поверхность среды помещали диск, содержащий мицелий 7-суточной культуры.

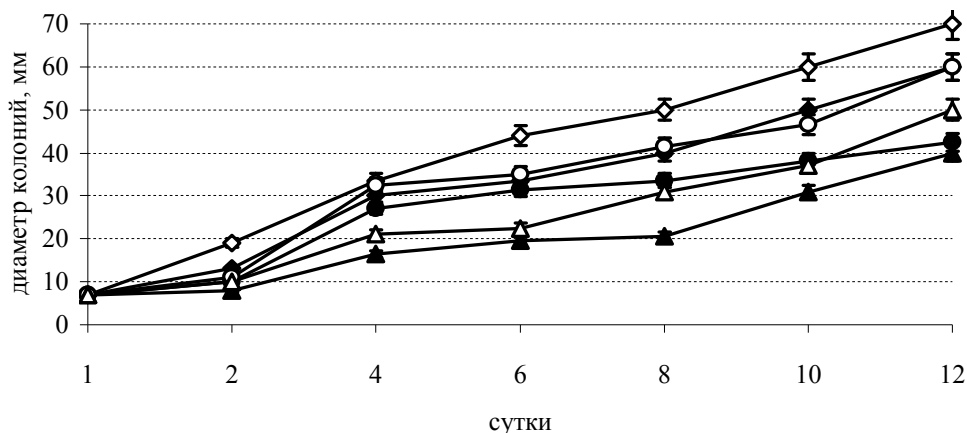


Рис. 2. Характеристика роста тест-штаммов в присутствии хиноксалинового гидразида феноксиуксусной кислоты

Примечание: рост *F. oxysporum v. arth.* ПНДЛ-1 (◆), *F. sporotrichiella var. poae* ПНДЛ-2 (●), *F. graminearum* ПНДЛ-3 (▲) в присутствии хиноксалинового гидразида феноксиуксусной кислоты; контроль роста *F. oxysporum v. arth.* ПНДЛ-1 (◇), *F. sporotrichiella var. poae* ПНДЛ-2 (○), *F. graminearum* ПНДЛ-3 (△).

Fig. 2. The characteristics of test strain growth rate in the quinoxalin-hydrazide of phenoxyacetic acid presence

Note: *F. oxysporum v. arth.* PNDL-1 (◆), *F. sporotrichiella var. poae* PNDL-2 (●), *F. graminearum* PNDL-3 (▲) growth in the quinoxalin-hydrazide of phenoxyacetic acid presence; the control growth of *F. oxysporum v. arth.* PNDL-1 (◇), *F. sporotrichiella var. poae* PNDL-2 (○), *F. graminearum* PNDL-3 (△).

Как показали проведенные исследования, данные штаммы микроорганизмов характеризовались различной скоростью роста на КА. Так, уже на вторые сутки культивирования значение диаметра колоний *F. oxysporum v. arth.* практически в 2 раза превышало для *F. sporotrichiella var. poae* и *F. graminearum*. Различие в скорости роста двух последних штаммов было отмечено только спустя 4 суток, составляя 10–15 мм диаметра колоний. К концу культивирования в соответствии со значениями диаметра колоний исследованные виды *Fusarium spp.* были распределены следующим образом: *F. oxysporum v. arth.* > *F. sporotrichiella var. poae* > *F. graminearum*.

Добавление соединения III в КА вызвало существенные изменения динамики роста тест-культур. В течение первых 48 часов наблюдалось резкое снижение скорости роста *F. oxysporum v. arth.* — в 2 раза по сравнению с контролем. В дальнейшем разница линейных размеров колоний сохранялась на уровне 10 мм. Для *F. sporotrichiella var. poae* и *F. graminearum* было установлено практически



полное замедление роста на четвертые-восьмые сутки от начала культивирования. Впоследствии рост тест-микроорганизмов возобновился, при этом средняя скорость составила от 3 до 5 мм/сутки. Максимальная разница диаметра колоний — в 1,5 раза по сравнению с контролем — была зафиксирована для *F. sporotrichiella* var. *poae* на 12-е сутки.

Таким образом, изучение фунгицидной активности по отношению к *Fusarium* spp. позволило выделить наиболее перспективные для исследований гидразиды феноксиуксусной кислоты. Исследуемые *Fusarium* spp. характеризовались различной степенью чувствительности к гидразидам феноксиуксусной кислоты: *F. sporotrichiella* var. *poae* > *F. oxysporum* v. *arth.* > *F. graminearum*, уровень которой зависел от концентрации данных производных. Наиболее активным соединением оказалось вещество III (хиноксалиновый гидразид феноксиуксусной кислоты), которое вызывало 2–3-кратное снижение скорости развития *F. sporotrichiella* var. *poae* в концентрации 1,0 мМ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. — М., 1988. — 230 с.
2. Буга С.Ф., Артемова О.В., Ильюк А.Г. Особенности патогенеза колоса озимой пшеницы при инокуляции грибами *Fusarium* spp. // Вести Национальной Академии Наук Беларуси: Серия Аграрных Наук. — 2005. — № 4. — С. 45-48.
3. Горовой Л.Ф., Кошевский И.И. Препараты нового поколения для защиты растений // VI конференция «Защита растений» (Москва—Щелково, октябрь, 2001 г.): тез. докл. — М.: «ВНИРО», 2001. — С. 85-87.
4. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. — М., 1992. — 245 с.
5. Рудаков В.О., Рудаков О.Л. Природа почвенных фитотоксикозов и проблема защиты растений // АГРО XXI. — 2009. — № 1 — 3. — С. 12-16.
6. Сэги Й. Почвенная микробиология. — М.: Мир, 1985. — 370 с.
7. Desjardins A.E., Hohn T.M. Mycotoxins in plant pathogenesis // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1997. — 2. — P. 147-152.
8. Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H. Compendium of soil fungi. London: Academic Press, 1992. — 590 p.
9. Guarro J., Llop C., Aguilar C. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi // Antimicrob. Agents Chemother. — 1997. — 41. — P. 2760-2762.



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

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,  
Одеса, 65058, Україна, тел. 8 (0482) 635761, e-mail: rusamariya@yandex.ru

## **ФУНГІЦИДНА АКТИВНІСТЬ ГІДРАЗИДІВ ФЕНОКСІОЦТОВОЇ КИСЛОТИ ЩОДО ЗБУДНИКІВ ПРИКОРЕНЕВОЇ ГНИЛІ**

### **Реферат**

Вивчено фунгіцидну активність деяких гідразидів феноксиоцтової кислоти щодо *Fusarium oxysporum* v. *arth.*, *F. sporotrichiella* var. *poae* та *F. graminearum*. Під час дослідження було встановлено, що чутливість збудників прикореневої гнилі залежала від концентрації сполук, а також штама мікроорганізма. Найбільш активною виявилася сполука III (хіноксалиновий гідразид феноксиоцтової кислоти), яка спричиняла 2–3-кратне пригнічення росту *F. sporotrichiella* var. *poae*.

**К л ю ч о в і с л о в а:** гідразиди феноксиоцтової кислоти, *Fusarium spp.*, фунгіцидна активність.

**М.Ю. Rusakova, B.N. Galkin, T.O. Filippova, L.M. Vostrova,  
M.V. Grenadjorova**

I.I. Mechnykov Odesa National University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65058,  
Ukraine, phone: 8 (0482) 635761, e-mail: rusamariya@yandex.ru

## **THE FUNGICIDAL ACTIVITY OF SOME PHENOXYACETIC ACID HYDRAZIDES WITH RESPECT TO ROOT ROT AGENTS**

### **Summary**

The fungicidal activity of some phenoxyacetic acid hydrazides with respect to *Fusarium oxysporum* v. *arth.*, *F. sporotrichiella* var. *poae* и *F. graminearum* was studied. The sensitivity of deuteromycetes that caused root rots to the substance action depended on the compound concentration and microorganism strain. The most active compound was derivative III (quinoxalin-hydrazide of phenoxyacetic acid) that inhibited *F. sporotrichiella* var. *poae* growth in 2–3 times.

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



УДК: 579:923 Бардах (477.74)

**В.О. Кузнецов**

Центр досліджень з історії освіти, науки і техніки на півдні України  
імені В. І. Липського, вул. Новаторів, 5-а, м. Одеса, 65010, Україна,  
тел. 8 (0482) 37 96 73, e-mail: cuznetsov@meta.ua

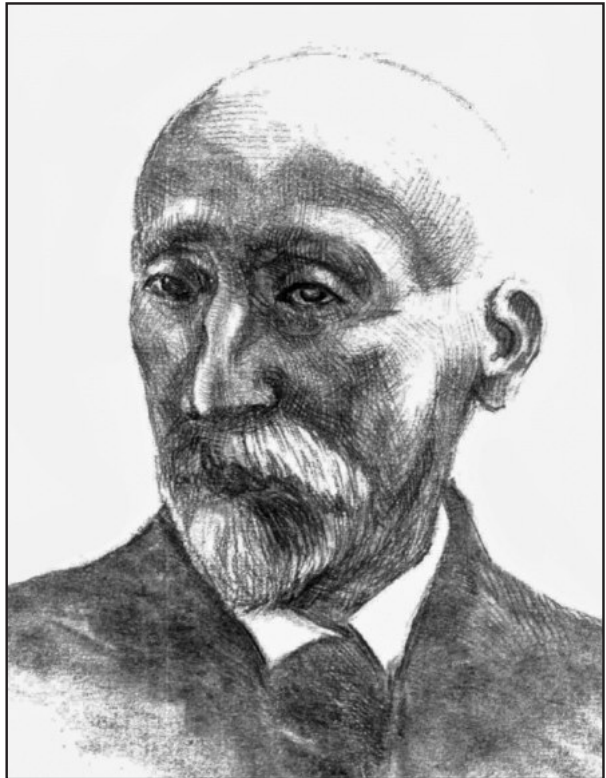
## ПРОФЕСОР ЯКІВ ЮЛІЙОВИЧ БАРДАХ (1857–1929)

*Стаття присвячена 80-ій річниці з дня смерті (17.06.1929) видатного вченого-мікробіолога. На підставі вивчення архівних матеріалів Державного архіву Одеської області, наукового архіву Інституту архівознавства НБУ імені В.І. Вернадського АН України, особистого архіву родини Я.Ю. Бардаха та літературних джерел розглянуто основні події життя та науково-педагогічної діяльності Я.Ю. Бардаха.*

*К л ю ч о в і с л о в а: історія мікробіології, Я.Ю. Бардах, Одеський університет.*

Бардах Яків Юлійович народився у 1857 році в м. Одесі у незаможній сім'ї учителя (точної дати дня і місяця народження за документами не встановлено). Після закінчення Рішельєвської гімназії (1875) вступив до природничого відділення Імператорського Новоросійського університету (ІНУ). Для одержання медичної освіти у 1880 р. продовжив навчання у Петербурзькій медико-хірургічній академії, яку закінчив у 1883 р. і розпочав приватну лікарську практику в м. Одесі (рис. 1). Одночасно проводив мікроскопічні дослідження в лабораторії, яку організував у себе на квартирі І.І. Мечников, на вул. Херсонській (нині вул. Пастера, 36) [37, 62].

Подальша доля Я.Ю. Бардаха тісно пов'язана з заснуванням



© В.О. Кузнецов, 2009



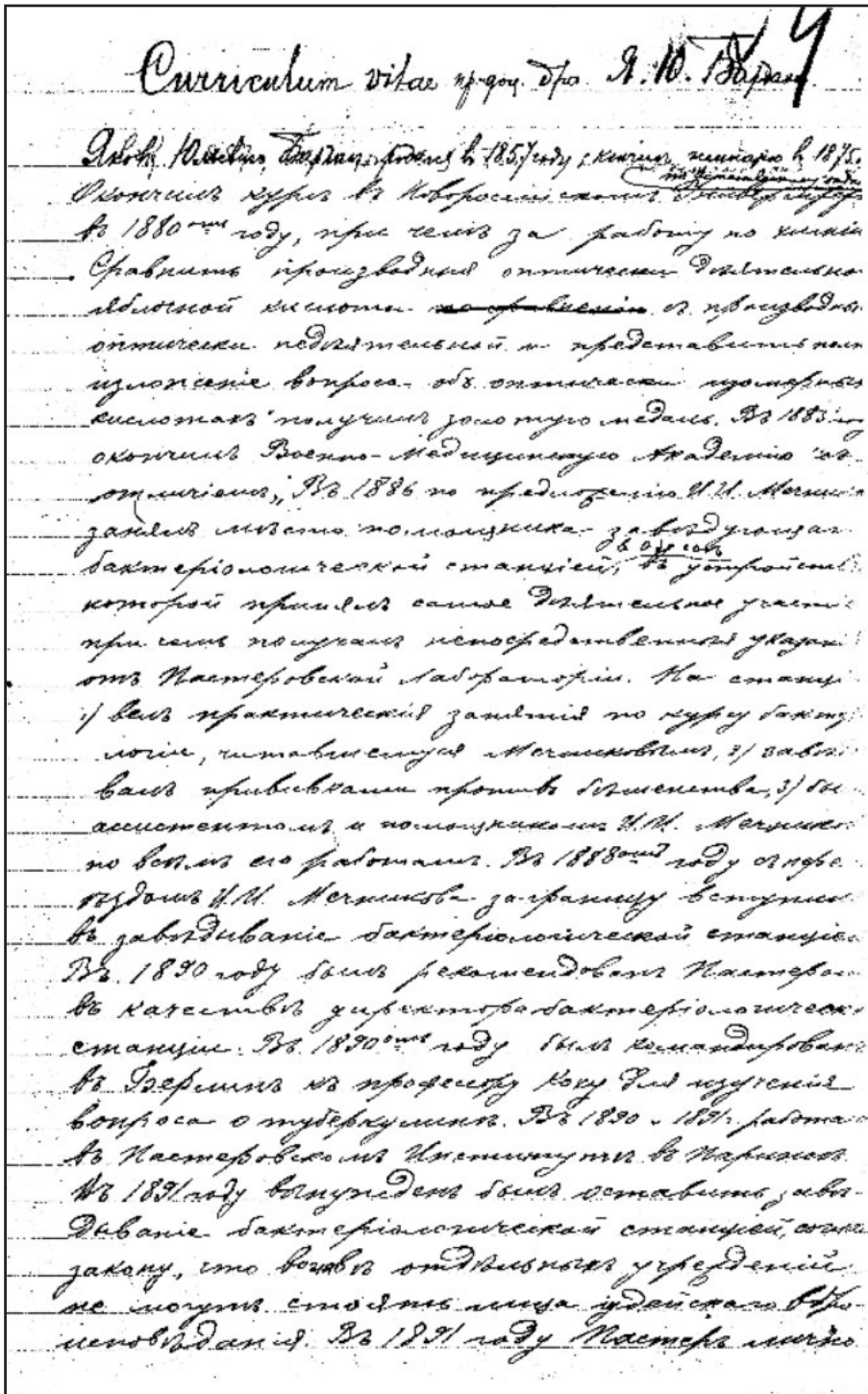


Рис. 1. Сторінка з автобіографії Я.Ю. Бардаха, 1917  
Оригінал [74]. Друкується вперше

Fig. 1. Page from J.J. Bardach's autobiography, 1917  
Original [74]. Published first

в Одесі другої у світі, після Пастерівської у Парижі і першої у Російській імперії бактеріологічної станції, яка розпочала свою роботу 24 червня (11 червня за ст. ст.) 1886 р. Перші тижні свого існування станція розташовувалась на квартирі М.Ф. Гамалії (вул. Канатна, 14), а вже в кінці червня була переведена до приміщення по вул. Гульовій (нині вул. Льва Толстого, 4). Штат станції складався з чотирьох посад: директор — І.І. Мечников, помічник — М.Ф. Гамалія, лаборант і службовець. У зв'язку з тим, що М.Ф. Гамалія постійно знаходився у відрядженнях, Ілля Ілліч запросив на посаду свого заступника Я.Ю. Бардаха, який ще студентом працював у лабораторії професора О.А. Веріго і мав досвід бактеріологічної роботи [28, 29, 45].

Щоб перевірити нешкідливість вакцини від сказу, Я.Ю. Бардах зробив щеплення собі і тільки після цього розпочав щеплення пацієнтам. “Вже за перші 6 місяців до станції звернулося 326 людей, покусаних тваринами, з різних місцевостей Росії і навіть з-за кордону (Румунія та Туреччина)” [43, 7].

Паралельно з проведенням вакцинації на станції розпочалися наукові дослідження. Значення цих робіт, результати яких друкувалися Одеською бактеріологічною станцією, були відзначені професором Бруарделем на засіданні Французької Медичної Академії 12 липня 1887 року, де він наводив як взірець наукові праці І.І. Мечникова, Я.Ю. Бардаха та М.Ф. Гамалії. До речі, у захисті Л. Пастера проти кампанії, яка загрожувала згубити його відкриття, показники Одеської бактеріологічної станції відіграли чи не вирішальну роль.

Під безпосереднім керівництвом Я.Ю. Бардаха співробітники Одеської бактеріологічної станції звертаються до вивчення чуми великої рогатої худоби.

Але ці дослідження викликали занепокоєння серед місцевого населення, для якого саме слово “чума” нагадувало про страшні епідемії у недалекому минулому, і ці роботи припинили [53].

Велику роботу проводила станція з вивчення проблем запобігання захворюванням рогатої худоби на сибірку, досліджувалися тиф, холера, туберкульоз, малярія, розроблялися методи боротьби з ховраками за допомогою бактерій курячої холери, знищення хлібного жука з використанням мюскардини (*Botrytis sp.*), вивчалися причини епізоотій серед птахів. Було започатковано систематичний бактеріологічний контроль молока та інших продуктів харчування [3, 6, 36].

Станція також здійснювала велику просвітницьку діяльність серед місцевого населення, вперше в Російській імперії Я.Ю. Бардахом були розроблені і втілені у навчальний процес практичні заняття з бактеріології для земських лікарів. Він з гордістю пригадував, що “...мав честь ознайомити Л.С. Ценковського з новітніми бактеріологічними методами, які тоді тільки-но починали входити у життя” [81]. У 1887 р. створено курси з бактеріології для санітарних лікарів Російської імперії. Деякі з слухачів у подальшому не поривали наукових зв'язків зі станцією протягом багатьох років (Ч.І. Хенцинський, Л.Б. Бухштаб, Є.М. Брусилівський, П.М. Дятров і багато інших) [14]. На станції під керівництвом Я.Ю. Бардаха розпочав свої перші бактеріологічні дослідження майбутній академік АН СРСР, Президент АН України Д.К. Заболотний [31, 44, 45].

Але майже з моменту заснування бактеріологічного закладу проти нього розпочались суворі протидії. Роботи з винищення ховрахів з застосуванням бактерії курячої холери були сприйняті ворожо. І.І. Мечникова звинуватили у тому, що він культивує бактерії, які можуть перетворитися у вібріони азійської холери і тому становлять величезну небезпеку для населення. Ці твердження ніякими фактами не були підкріплені, проте місцева влада заборонила подальше проведення



дослідів [43]. Особливо важким видався 1888 рік. Влітку цього року Я.Ю. Бардах, розпочав щеплення вівців проти сибірки. Вакцини Одеської станції були успішно використані у багатьох господарствах, але у серпні відбулась катастрофа, яка увійшла до історії під назвою “Панкеевська справа” за прізвиськом власника отар овець у маєтку “Каховка” [64].

У своїх спогадах М.Ф. Гамалія так описує цю історію: “Бардах продовжував проводити вакцинацію у великих розмірах. Він домовився з поміщиком Панкеевим і прищепив у нього декілька тисяч вівців. Коли він закінчив вакцинацію останньої партії, ті що були прищеплені першими почали гинути” [20, 92-93]. Ветеринарний лікар, бактеріолог і епізоотолог І.Й. Гордзяловський, який вивчав цей випадок, категорично відкинув причину загибелі вівців від сибірки і висловив припущення про забруднення вакцини збудником правця. Міністерство внутрішніх справ виказало сумнів у користі та безпеці щеплень і заборонило проводити їх [35].

Після термінового від'їзду за кордон І.І. Мечникова і М.Ф. Гамалії (1888), навколо станції утворилася атмосфера підозри і недовіри, але вона продовжувала свою роботу. Керівництво закладом взяв на себе Яків Юлійович Бардах, який очолював його до 1891 року. Тут 29-річний біолог і лікар виявив себе неабияким організатором, талановитим і вдумливим вченим [4, 5, 6]. Я.Ю. Бардах продовжує вивчення сибірки і методів одержання сироватки з крові коней і собак, облаштовує “собачник” та “крільчатник” для забезпечення станції постійним матеріалом для роботи, проводить вивчення імунітету при поворотному тифі [65, 66, 74].

До цього періоду належить також початок санітарно-бактеріологічного контролю питної води у місті. У жовтні 1888 р. Я.Ю. Бардах провів аналізи водопровідної води і виявив у ній черевнотифозних бактерій. Лікарі, які відповідали за санітарний стан міста, не погодилися з його висновками про можливість перенесення цього небезпечного захворювання з водою і розпочали бурхливу кампанію проти нього. Для з'ясування істини була призначена комісія з професорів Новоросійського університету та лікарів.

Р. Кох, до якого звернулася з запитом медична група зі складу комісії, категорично відкинув можливість зараження людей черевним тифом від бацил з водопровідної води. Його погляд на цю проблему було швидко розповсюджено у місцевій пресі, що вплинуло на формування негативної громадської думки, як до станції, так і її завідувача [41].

Тоді О.О. Ковалевський, як член комісії, звернувся за роз'ясненням ситуації до інституту Пастера і отримав від І.І. Мечникова підтримку поглядів Я.Ю. Бардаха.

І.І. Мечников [38, 125] так прокоментував відповідь Р. Коха: “Не варто випускати з уваги, що [Р.] Кох, взагалі дуже обережний у своїх працях та висновках, відрізняється надзвичайною сквапливістю у міркуваннях про досліди інших вчених. Варто лише пригадати, як різко він відкидав можливість ослаблення сили бактерій, впливом запобіжних щеплень, наявність поліморфізму бактерій та багато інше, що твердо встановлено в науці, щоб віднести до його скептичної критики з достатньою стриманістю”.

Це був дуже важливий козир у руках комісії, яка у подальшому довела правоту саме Я.Ю. Бардаха.

На станції активно продовжувались дослідження з проблем щеплення від сказу. Особливо важливими були роботи Я.Ю. Бардаха з вивчення інтенсифікації пастерівських щеплень [55, 56, 57, 58].



Результати наукових досліджень цього періоду Я.Ю. Бардах оприлюднив на 7-му Міжнародному Конгресі з гігієни та демографії (Лондон, 1889), де зробив дві доповіді на Бактеріологічній секції і отримав високу оцінку фахівців [4, 5, 7].

У 1890 році Я.Ю. Бардах разом з лікарем О.О. Мачутковським були на півроку відряджені Одеською міською управою до Берліну з метою вивчення методики лікування туберкульозу доктором Р. Кохом. Але у Р. Коха вони працювали тільки три місяці, а решту часу стажувалися у Пастерівському інституті в Парижі [63].

На станції також проводилися дослідження з проблем загальної мікробіології. Я.Ю. Бардах цікавився, зокрема, солоноводними бактеріями. Співробітники станції у своїх дослідах в галузі морської мікробіології тісно співпрацювали з університетською хімічною лабораторією професора О.А. Веріго. У той час там працював майбутній академік АН СРСР М.Д. Зелінський, якого О.О. Ковалевський залучив до участі в глибоководній експедиції з вивчення Чорного моря (липень 1891 р.) [14, 22, 23, 24]. Ці дослідження мали значний вплив на розвиток морської мікробіології взагалі: на їх підґрунті було сформовано погляд на бактерії, як на важливий чинник кругообігу речовин у солоноводних водоймищах. Дослідами М.Д. Зелінського і Є.М. Брусиловського було доведено можливість розвитку бактерій на середовищі, у якому не містилося б “органічної сірки”, а була б присутня лише сірка у вигляді сульфатів, гідросульфідів та сіркуватистокислих солей. Ці дослідження були першими в історії Одеського університету в галузі морської мікробіології, які у подальшому були продовжені і розвинуті багатьма поколіннями дослідників [30].

Бактеріологічним роботам Я.Ю. Бардаху цього періоду високу оцінку дав засновник світової бактеріології Л. Пастер у своєму листі до Одеської міської управи (рис. 2):

“Інститут Пастера  
25, вул. Дюта

Париж, 17 квітня.

Вельмишановний пане.

Поспішаю відповісти на вашого листа від 11 квітня. Ви виявляєте до мене надзвичайну довіру, звертаючись з проханням указати Вам особу, яку я вважаю найбільш придатну для керівництва науковими та практичними роботами бактеріологічної станції в Одесі.

Дозвольте мені зазначити Вам, що у Вас під руками є видатний вчений, який став відомим в останні роки своїми важливими науковими працями і значні успіхи якого, як керівника станції щеплення проти сказу в Одесі, привернули увагу всіх антирабічних лабораторій.

Міська Управа Одеси учинить найкраще, якщо доручить керівництво бактеріологічною станцією п.[ану] доктору Бардаху.

Прийміть, Вельмишановний пане, з моєю вдячністю запевнення у моїй відданості.  
1890 р.

Підпис [Л. Пастер]” [76].

Не дивлячись на позитивні відгуки Л. Пастера і І.І. Мечникова про роботу станції під керівництвом Я.Ю. Бардаху, у 1891 р. його віддаляють від завідування нею.

В документах Одеської міської управи зберігається лист з грифом “Цілковито таємно” від начальника жандармського управління м. Одеси, датований 5 червня 1890 р. за № 1549, в якому він повідомляє міського голову: “Директор Департаменту Поліції у відгуку від 31 минулого травня за № 2247 повідомив мені, що клопотання Одеської Міської Управи про призначення лікаря Якова Бардаху на посаду завіду-



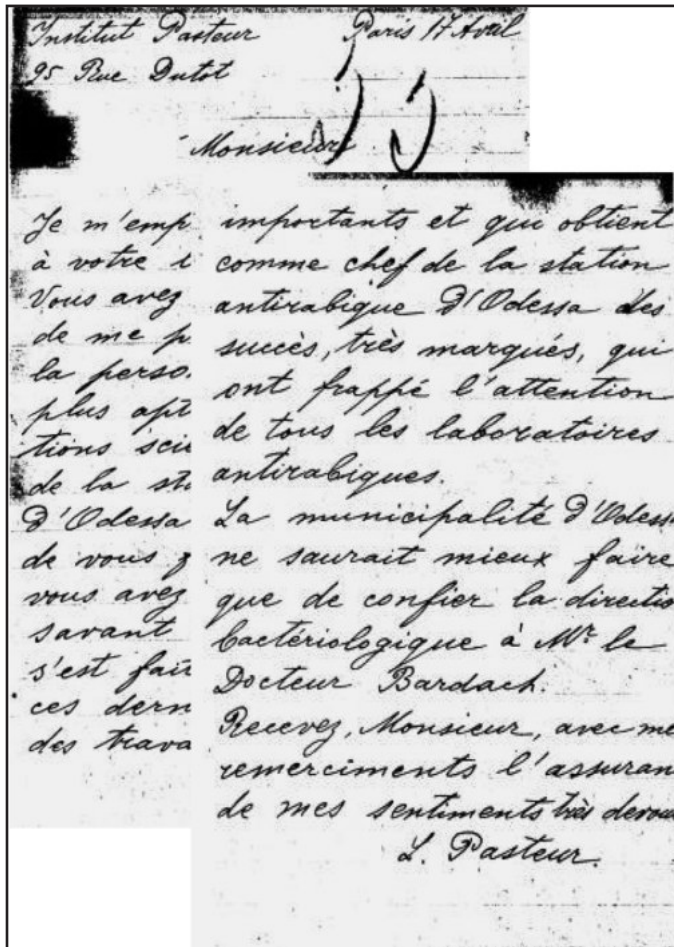


Рис. 2. Фрагменти сторінок листа Л. Пастера до Одеської міської управи, 17 квітня 1890 р. Оригінал [76]. Друкується вперше

Fig. 2. Fragments of the pages of Louis Pasteur's letter to Odessa Town Council, 17 April 1890. Original [76]. Published first

вача місцевої бактеріологічної станції належить відхилити” (рис. 3) [60]. Можливо підставою було і те, що за свідченням Д.К. Заболотного, “Станція набула репутації сховища для гнаних та ображених. У Я.Ю. Бардаха були постійні черги пацієнтів і серед них чимало студентів зі всілякими потребами. Станція приваблювала студентство, і нам було приємно її відвідувати”[23]. Як видно з документів Таємного столу Градоначальника такі місця апіорі вважалися неблагонадійними і за ними встановлювався нагляд поліції.

Директор медичного департаменту Міністерства внутрішніх справ у листі від 13 червня 1890 р. за № 85 робить категоричну заяву градоначальнику П.О. Зеленому: “... завідування цією станцією у жодному разі не може бути залишено за п. Бардахом, і просимо Таємного Радника Маразлі якомога швидше усунути цього лікаря від виконання будь-яких обов’язків на Бактеріологічній станції”, – якщо це буде неможливо зробити, то він радить взагалі закрити Станцію [61].



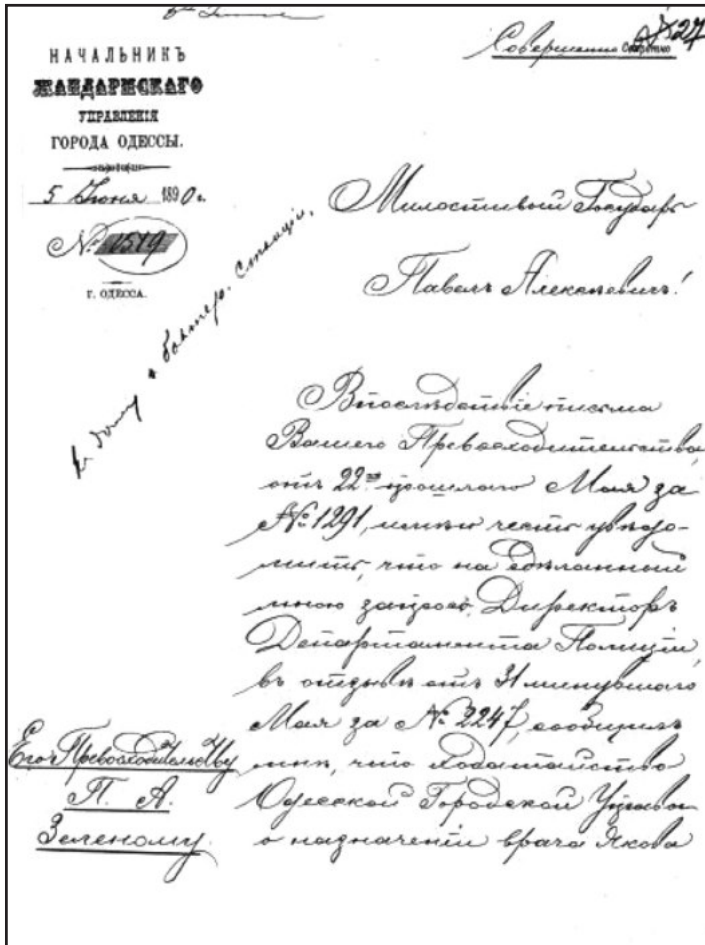


Рис. 3. Лист Одеському міському голові П.О. Зеленому від начальника жандармського управління м. Одеси. Оригінал [60]. Друкується вперше

Fig. 3. Letter to Odessa Town Mayor P.O. Zelenoy from the Chief of Odessa Gendarmery Department. Original [60]. Published first

Була ще одна підстава — відлуння Панкеєвської справи.

Це глибоко вразило О.О. Ковалевського, і у своїх листах до І.І. Мечникова він декілька разів повертається до цього питання: “Чи не врятуєте Ви нашого все ж талановитого юнака, який, якщо міг би зануритись у лабораторну справу, напевно зробив би багато...” і, у наступному листі — “Я думаю, що Бардах дуже здібний, і з Вашими порадами та коштами лабораторії принца [Ольденбургського], не відволікаючись на інші справи, міг би багато зробити..., а де у нас люди, щоб не цінувати таких, як Яків Юлійович?!” [48]. І.І. Мечников рекомендував Я.Ю. Бардаху до складу Петербурзького інституту, але ці рекомендації були марними [39].

Треба відзначити, що ці події не пройшли поза увагою і Л. Пастера, і він запропонував Якову Юлійовичу місце у своєму інституті, яке той відхилив, посилаючись на бажання працювати на Батьківщині і для Батьківщини [21].

Звільнений з офіційної посади Я.Ю. Бардах розгорнув приватну лікарську практику і швидко став одним з найвідоміших лікарів в Одесі і далеко за її межами. Але відрив від лабораторної роботи пригнічував його, і він звертається з проханням до нової адміністрації бактеріологічної станції про дозвіл продовжити досліди з дифтерії.

Вивчення Я.Ю. Бардахом саме цієї хвороби було не випадковим. На початку 90-х років XIX ст., за своїми наслідками дифтерія майже наблизилась до чумної епідемії [26, 27]. Дуже висока смертність населення і особливо дітей спонукала Я.Ю. Бардаху зайнятися розробкою ефективних засобів боротьби з нею [57, 58]. Він розробив оригінальний метод імунізації тварин дозами дуже отруйних культур, що поступово підвищувались. В результаті цих дослідів Я.Ю. Бардах вперше в Росії одержав антидифтерійну сироватку з крові собак, що запобігала захворюванню від 24000 летальних доз дифтерійного токсину. Отримані дані він доповів у січні 1893 р. на засіданні Товариства одеських лікарів і надрукував у “Южнорусской медицинской газете” (№4) у вигляді попереднього повідомлення, яке було оприлюднене раніше, ніж аналогічні роботи Е. Берінга та П.П.Е. Ру [17, 89].

У 1894 р. Я.Ю. Бардах узагальнив результати своїх дослідів у монографії “Исследования по дифтерии. К учению о предохранении и лечении дифтерии кровяной сывороткой искусственно невосприимчивых собак” [9] і захистив у Московському університеті докторську дисертацію.

З 1895 р. починається нова сторінка у житті Я.Ю. Бардаху — він розпочинає науково-педагогічну діяльність на посаді приват-доцента в Імператорському Новоросійському університеті, де вперше у Російській імперії вводить курс бактеріології на природничому відділенні (рис. 4). Він майже припиняє досліди з медичної бактеріології і акцентує свою увагу на вивченні загальної мікробіології.

Слід зауважити, що у списках особистого складу фізико-математичного факультету ІНУ за 1895-96 н.р. він значиться як приват-доцент кафедри зоології. Можливо, що перший рік роботи йому дав притулок на своїй кафедрі В.В. Заленський, а у подальшому він перейшов на кафедру ботаніки, не виключено, що це просто помилка укладача списку, так як підтвердження в інших документах не знайдено [70].

Загальний обсяг курсу Бактеріологія становив 272 години, на три семестри, з яких: лекційних — 68 годин, практичні роботи — 102 години і ще 102 години, користуючись сучасною термінологією, консультації та самостійна робота студентів. Такого за обсягом курсу мікробіології не мають більшість сучасних вищих навчальних закладів, тому стає ясно, чому випускників Новоросійського університету із задоволенням приймали до Пастерівського інституту [40, 41].

Залишилось багато спогадів про викладацьку діяльність Я.Ю. Бардаху. Ми звернемо увагу лише на деякі з них — це “Характеристика наукової діяльності приват-доцента доктора Я.Ю. Бардаху”, яка підписана чотирма професорами ботаніки Новоросійського університету: Б.Б. Гриневецьким, Ф.М. Порошко, А.О. Сапегіним і М.М. Зеленецьким. Всі вони довгий час пліч-о-пліч працювали на кафедрі ботаніки з Яковом Юлійовичем як асистенти, приват-доценти і професори, допомагали йому у підготовці і проведенні лекцій та практичних занять, а А.О. Сапегін слухав лекції ще будучи студентом університету. Вони відзначають: “Бардах перший у Росії вводить бактеріологію як самостійну дисципліну на природничому факультеті. В цьому його заслуга перед природознавством.



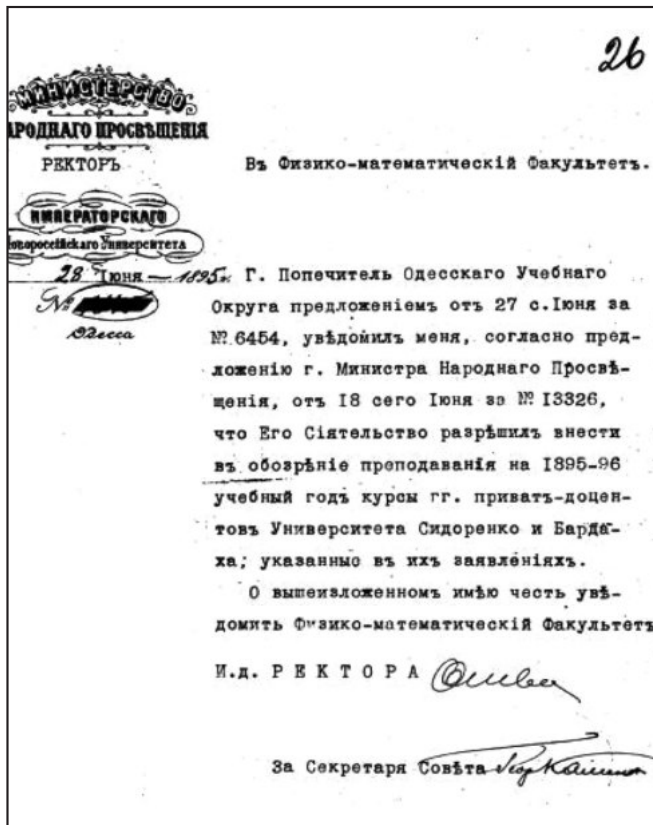


Рис. 4. Повідомлення ректора ІНУ до фізико-математичного факультету про дозвіл Я.Ю. Бардаху викладати курс «Бактеріологія». Оригінал [67]. Друкується вперше

Fig. 4. Information of the Head of ENU to the faculty of physics and mathematics about the permission given to J.J. Bardach to teach "Bacteriology". Original [67]. Published first

На своїх лекціях він з першого року викладання свого курсу наголошує на найвищому ступені важливого значення мікробів у процесі кругообігу речовини. Щільний зв'язок мікробіології з іншими науками — зоологією, фізіологією, хімією, агрономією, підкреслює на лекціях і практичних роботах і у тематиці робіт його лабораторії" [74; 78]

Друге джерело — це спогади професора Г.О. Машталера, які наводять у своїй роботі І.Л. Сендерович і Л.Е. Матліс [89, 10]: "Яків Юлійович був надзвичайним педагогом, прекрасним лектором і організатором навчального процесу. Будучи головою предметної комісії на природничому відділенні університету, він зробив дуже багато для підвищення наукового рівня лекцій, практичних занять, для організації практики студентів, витратив багато сил для створення навчальних планів, програм, брав активну участь у роботі наукових студентських гуртків".

Велику увагу Я.Ю. Бардах приділяв просвітницькій діяльності. З першого дня існування Лекційного комітету при Новоросійському Товаристві Природознавців він був його постійним лектором. Д.К. Заболотний пригадував: "Відгукуючись на попит сучасності, Яків Юлійович залюбки віддавав свій час просвітницькій діяль-

ності, і його популярні лекції завжди приваблювали велику аудиторію і сприяли проникненню позитивних знань у маси” [23, 2].

На лекції Я.Ю. Бардаха збиралося так багато слухачів, що керівництво курсів постійно зверталось до ректора університету за дозволом проводити їх у великій актовій залі (рис. 5) і не турбувати слухачів, які часто затримувалися майже до півночі.

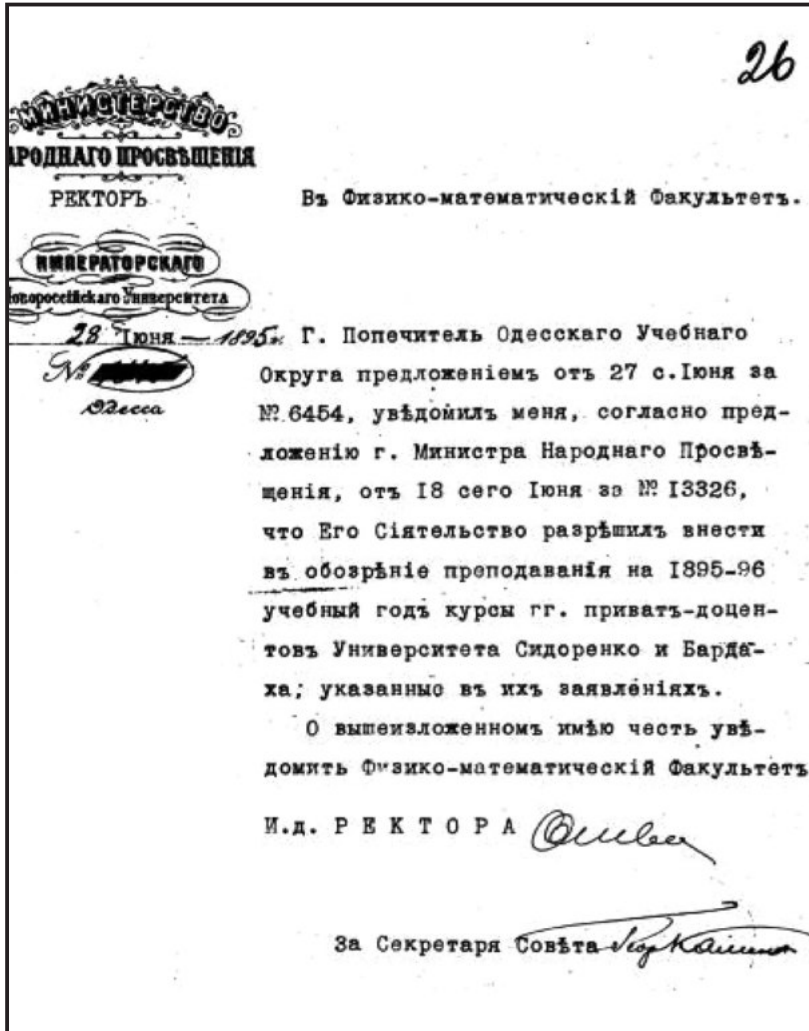


Рис. 5. Лист голови Лекційного комітету НТП до ректора ІНУ від 27 лютого 1896 р. Оригінал [70]. Друкується вперше

Fig. 5. Letter of the Chief of Lecture's Committee of NSS to the Head of ENU 27 February 1896. Original [70]. Published first

Крім “Бактеріології” Я.Ю. Бардах читав також курс “Гігієна” і виступав з окремими публічними лекціями з різних тем: “Про чуму в Одесі та Кишиневі”, “Пам’яті О.О. Ковалевського”, “Значення Пастера у медицині та бактеріології” та багато інших.

Щоб уявити собі стиль викладання лекцій Я.Ю. Бардахом, наведемо невеликий уривок з його доповіді, присвяченій значенню Пастера в медицині і бактеріології, в оригіналі:

“Перед вами только что была развернута картина работ Пастера в области химии и биологии. Вы видели, с какой точностью, с какой проникающей способностью, можно сказать, проникновением Пастер исследует строение вещества, разъясняет весь казавшийся столь таинственным процесс брожения. Царство хаоса, в котором были смешаны факты, правильные и неправильные наблюдения, верные и неверные толкования, — в руках его гения преобразилось в стройную естественно-историческую систему.

Оказалось, что громадная масса процессов разложения, которые мы прежде мыслили, как процессы смерти, обязаны своим существованием жизни. Не только брожение, но и тление и гниение, — все, как показал Пастер, происходит, благодаря низшим организмам, — не будь их, вечный обмен вещества прекратился бы, и органическая жизнь на земном шаре застыла бы. Помимо высокого философски-научного значения этих работ, они имели и громадное практическое значение в области промышленной техники” [8, XXIX-XXX].

Яка гарна, багата, емоційна, навіть поетична мова. Його лекції завжди користувались успіхом, їх відвідувала найбільша кількість слухачів курсів. Як писав у звіті голова лекційного комітету П.М. Бучинський: “Заняття ці іноді затягувались до 12 годин ночі, причому кількість відвідувачів, не дивлячись на такі незручності, не зменшувалась” [16, 72].

Я.Ю. Бардах з головою занурився у викладацьку роботу, яка стала для нього головною справою у житті, але і на хвилину він не припиняв наукової роботи і лікарської практики. З першого дня служби в університеті він починає бактеріологічні дослідження у лабораторії ботанічного кабінету. Завідувач кабінету — видатний вчений професор Ф.М. Каменський з зацікавленістю сприймав всі нові дослідження у галузі ботаніки, тому з задоволенням виділив Я.Ю. Бардаху “куточок для бактеріологічних експериментів”. За спогадами А.С. Заславського, все обладнання для мікробіологічних дослідів було придбано на власні кошти Я.Ю. Бардаху [84].

Таким чином, у 1895–96 навчальному році Я.Ю. Бардахом була створена перша у Росії університетська наукова бактеріологічна лабораторія, яка швидко розвивалася.

Особливу увагу серед архівних документів цього періоду, що стосуються розвитку мікробіологічної науки в Новоросійському університеті, притягує Справа № 67 “Про заснування кафедр ґрунтознавства, бактеріології та розширенню викладання агрономії” [71]. Міністерство освіти надіслало до всіх університетів Росії циркуляр за № 16729, у якому рекомендувало розглянути питання щодо відкриття на природничих відділеннях кафедр ґрунтознавства та мікробіології. Для розгляду цього питання в ІНУ була створена комісія, до складу якої увійшли п’ять професорів: геолог І.Ф. Синцов, ботанік Ф.М. Каменський, зоолог В.М. Репяхов, фізіолог Б.Ф. Веріго та хімік П.Г. Мелікішвілі (Меліков).

Комісія ретельно вивчила всі документи і у травні 1897 р. доповіла Раді фізико-математичного факультету про своє рішення. Текст доповіді займає 10 рукописних сторінок, але, щоб позиція комісії була зрозумілою, наведемо деякі уривки з неї:

“Комісія вважає, що вельми бажане створення нових кафедр на фізико-математичних факультетах необхідно вважати передчасним до тих пір, доки не буде визнано можливим покращити стан тих кафедр, що вже існують [підкреслено в оригіналі].

Щодо питання про розширення викладання агрономії в університетах, то воно, за думкою Комісії, може і повинно бути розв’язано зовсім незалежно від створення нових кафедр “чистого” (наукового) ґрунтознавства і “чистої” (наукової) бактеріології (...)” [72; 73].



Після знайомства з цими документами стає ясно, чому до 1920 року кафедри мікробіології при Новоросійському університеті відкрито не було.

22 роки доктор медицини Я.Ю. Бардах служив своїй Alma mater на посадах “приват-доцента з предмету бактеріологія” або “приват-доцента з бактеріології”, відкидаючи пропозиції зайняти посаду завідувача відділом Пастерівського інституту у Парижі, Директора Пастерівського інституту у Ріо де Женейро, професора на медичному факультеті ІНУ. Попри всі негаразди він залишився вірним своїй Батьківщині, Новоросійському університету і науці — загальній мікробіології.

У 1898 році Я.Ю. Бардах одружується на Генрієті Яківні Кон (1880-1958). «Вона стала йому вірним другом, матір'ю трьох синів [Михайло (1899-?), Євген (1900-1946) і Олександр (1902-1988)], помічником, особистим секретарем» [18, 13].

Я.Ю. Бардах продовжує викладати бактеріологію в Новоросійському університеті і веде приватну лікарську практику. З довідника «Вся Одеса» за 1900 рік у розділі «Лікарі» дізнаємось: «Бардах Я. — Внутрішні і дитячі хвороби. Дворянська вул., 18» [19, 243]. У цьому будинку Я.Ю. Бардах проживав з родиною до 1903 року.

1903 рік був надзвичайним роком як в історії мікробіології в Новоросійському університеті, так і в особистому житті Я.Ю. Бардаха.

Як голова вже немалої родини Я.Ю. Бардах придбав власний будинок на вул. Гульовій (нині вул. Льва Толстого, 6). Дім знаходився за два квартали від будівлі університету, тому він швидко перетворився на науковий, навчальний і політичний центр у місті. Тут збиралася еліта Одеси для обговорення наукових проблем, обговорювалися перспективи створення станції швидкої допомоги, Одеського товариства лікарів, проходили засідання наукових товариств, у 20-ті роки — це був штаб з боротьби з висипним тифом і холерою. Саме тут відбувалися і засідання партії «Народна воля», більше відомої як “Одеська партія кадетів”, одним з найактивніших керівників якої був Я. Ю. Бардах [79].



Рис. 6. План другого поверху південно-західного флігелю головного корпусу університету, де розташовувалась ботанічна лабораторія, 1903 [47]

Fig. 6. The plan of the first floor of the south-western wing of the main building of the University where Botanical Laboratory was settled, 1903 [47]

За історію свого існування цей дім був завжди притулком для декількох поколінь видатних науковців. Тут отримували дах над головою, іноді разом з родинами, В.А. Хавкін, М.Д. Зелінський, Д.К. Заболотний, Л.Й. Рубенчик, Д.Л. Шаміс, А.А. Сапегін, В.М. Петріашвілі, П.Г. Мелікішвілі, А.М. Криштофович, Ф.І. Успенський і багато інших.

В цьому ж 1903 році відбулася ще одна значна подія у житті Я.Ю. Бардаха — до керівництва кафедрою ботаніки ІНУ було обрано видатного вченого В.А. Ротерта, який гаряче підтримав наукову роботу Я.Ю. Бардаха і виділив приміщення для обладнання лабораторії. Саме про неї писав академік АН УРСР М.Г. Холодний: "... із усіх університетів колишньої Росії тільки Одеський мав невелику бактеріологічну лабораторію на природничому факультеті, де проводились досліді з загальної мікробіології під керівництвом проф. Бардаха" [54].

Архівні документи дозволяють абсолютно точно визначити розташування приміщень, які приділялись Я.Ю. Бардаху для роботи: "Кімната [№ 4] з 1 вікном на подвір'я призначена для розміщення бібліотеки, терезів та термостату... Кімната [№ 7] з двома вікнами на Херсонську вулицю, призначена для фізіолого-хімічних та бактеріологічних робіт. У ній є витяжна шафа, і планується розмістити стерилізаційне обладнання..." [47, 49-50]. Всю необхідну апаратуру Я. Ю. Бардах, знову ж таки, купував за власні кошти [12].

А.С. Заславський [1957] пригадував, що в лабораторії мали змогу працювати всі бажаючі, а не тільки студенти університету. На жаль, сьогодні неможливо відновити списки всіх, хто вів тут досліді, але перелік надрукованих наукових праць, що вийшли з лабораторії дає можливість уявити рівень, на якому вони виконувались і їх основну тематику.

У "Характеристиці наукової діяльності приват-доцента Я.Ю. Бардаха" читаємо: "Из лаборатории приват-доцента Я.Ю. Бардаха вышли сделанные под его непосредственным руководством следующие работы:

1. К вопросу о бактериях рапы и грязи Куяльницкого лимана — студентов Л.А. Зильберберга и М.С. Вейнберга. Записки Новороссийского Общества Естествоиспытателей, Т. XXII, 1898.
2. К вопросу о сероводородном брожении в одесских лиманах и Черном море. Л.А. Зильберберга. Записки Новороссийского Общества Естествоиспытателей, Т. XXIII, 1900.
3. Стрептококк и антистрептококковая сыворотка. Диссертация на степень доктора медицины Е.М. Вайнштейна, Одесса, 1899.
4. К вопросу о процессе нитрификации в воде. Е. Гредич. Записки Новороссийского Общества Естествоиспытателей, Т. XXIII, 1900.
5. О так называемых бактериях уровня Тотти. Доклад в Обществе естествоиспытателей, 1902.
6. Специфичны ли бактерии лиманной грязи. Доктор Зильберберг. Русский Архив патологии, химической медицины и бактериологии. Петербург, 1902.
7. К морфологии и физиологии нового вида *Oospora cretacea*. — С.К. Бернштейн. Записки Новороссийского Общества Естествоиспытателей, Т. XXXII, 1908.
8. К морфологии и физиологии термофильных бактерий. — С.К. Бернштейн. Записки Новороссийского Общества Естествоиспытателей, Т. XXXII, 1908" [77].

До цього списку можна додати — всі автори, що перераховані у ньому, у подальшому стали відомими вченими.

Починаючи з 1904 року, на титульних листах студентських робіт, з'являються надписи, що вказують на спеціалізацію студентів: "ботанік", "ботанік-фізіолог", "ботанік-бактеріолог" [34; 67; 68; 69]. Це свідчить про те, що вже на початку ХХ



століття на природничому факультеті де-факто існує підготовка спеціалістів-бактеріологів, що підтверджується також і у Звітах про стан і діяльність ІНУ тих років.

Ще однією важливою подією був відзначений 1903 рік у житті Я.Ю. Бардаха — відкриття в Одесі першої у Російській імперії Станції швидкої допомоги. Він доклав багато зусиль для створення і розвитку цієї Станції, завідувачем і головним лікарем якої залишався до останнього свого подиху.

Одеська станція відіграла велику роль у створенні і розвитку системи аналогічних закладів в усіх містах царської Росії. Вона розповсюджувала свій досвід на виставках, приймала на стажування лікарів з інших міст, проводила курси лекцій з організації роботи, розробляла прилади та засоби надання медичної допомоги в екстремальних умовах [33; 80].

Активна робота Я.Ю. Бардаха у галузі загальної мікробіології набуває в ІНУ багато послідовників. На кафедрі ботаніки Ф.М. Порошко починає досліджувати вплив фізичних чинників на розвиток і життєдіяльність бактерій. Про результати своїх досліджень він робить доповідь «Верхние и нижние границы кислородной жизни различных микроорганизмов» на засіданні природничого відділення Новоросійського Товариства Природознавців у 1904 році. Він визначив для анаеробних бактерій верхні межі тиску кисню, і довів, що при низькому вмісті кисню в атмосфері зникає різниця між анаеробами і аеробами, і перших можна розглядати як аеробів, що пристосувались до життя за відсутністю кисню [25; 59].

В агрономічній лабораторії О.І. Набоких розпочав свої бактеріологічні досліди О.Ф. Лебедев. [46, 30, 13]. Він довів, що енергетичні процеси у водневих бактерій можуть бути різними, а асиміляція вуглецю відбувається завжди з  $\text{CO}_2$ . Таким чином питання про можливість використання  $\text{CO}_2$  гетеротрофами було вперше поставлене О.Ф. Лебедевим в ІНУ [51]. На медичному факультеті приват-доцент Л.О. Тарасевич вів необов'язковий курс практичних занять з бактеріології. «Заняття проводилися групами (по 20 студентів), протягом осіннього семестру було проведено 10 серій» [2, 47].

Таким чином, під впливом Я.Ю. Бардаха у перші десятиліття ХХ ст. Новоросійський університет стає могутнім науковим центром з вивчення мікробіології в Російській імперії. Тут почали розвиватися всі основні напрями мікробіологічної науки, які існують у світовій науці до сьогодення.

Весна 1920 року була останнім періодом в історії існування Новоросійського університету. У квітні 1920 року з Новоросійського університету було виділено, як самостійний навчальний заклад медичний інститут. Були створені Інститут гуманітарно-суспільних наук та Фізико-математичний інститут. У 1921 році обидва інститути ліквідовано і створено Інститут Народної Освіти (ІНО), який отримав головний корпус університету. Але, не дивлячись на всі соціальні негаразди, вищий навчальний заклад продовжував працювати.

Під впливом лекцій професора Я.Ю. Бардаха нові покоління студентів захоплюються мікробіологією і починають працювати в його лабораторії.

А. С. Заславський так пригадував ті часи: «Хоча розруха і голод, що були породжені громадянською війною, ще не були ліквідовані, засоби для існування як мікробіологічної, так і інших лабораторій університету майже не відпускалися, лабораторні приміщення не опалювалися, але саме з 1920 р. значно пошавилася робота у мікробіологічній лабораторії. Сюди буквально хлинув потік бажаючих працювати. (...) Одеський губернський відділ охорони здоров'я доручив мікробіологічній лабораторії університету роботу з вивчення стічних вод і ґрунтів полів зрошення і виділив з цієї метою деякі кошти» [84, 2-3].





На базі лабораторії ІНО була створена мікробіологічна лабораторія Санітарно-епідеміологічного підвідділу Губздорову. Про умови, в яких проводились дослідження, ми дізнаємось зі статей Я.Ю. Бардаха [10] і його учнів, які були надруковані у 1924 р.: «Суворі зима 1921—1922 рр. в Одесі і неопалення інститутських лабораторій склали умови, при яких єдиною можливою бактеріологічною роботою було вивчення бактерій, здатних розвиватися за дуже низьких температур» [52, 17; 90]. У ці роки в лабораторії Я.Ю. Бардаха починає працювати майбутній член-кореспондент АН УРСР Л.Й. Рубенчик. Тут він робить свої перші кроки в науці.

За ініціативою Я.Ю. Бардаха у червні 1920 р. в Одесі було створено Клінічний інститут [83]. Метою створення цього закладу було ознайомлення лікарів, що практикують з останніми досягненнями медичної науки, а також удосконалення підготовки молодих лікарів, які у період Першої світової війни вчилися на медичному факультеті за прискореними програмами. Інститут розташовувався на базі 3-ї Радянської лікарні (Єврейська лікарня) (вул. Богдана Хмельницького, 7). Керівництво інститутом спочатку здійснювала Рада інституту, а з 22 квітня 1921 р. до закриття інституту (1923) — Ректор, посаду якого обіймав Я.Ю. Бардах [92].

Клінічний інститут проводив спеціальні курси з висипного тифу, епідемічного енцефаліту, туберкульозу, віспи, чуми і т. ін. До викладання залучалися найкращі спеціалісти у певній галузі. Не дивлячись на недовготривалий період існування інституту, він вніс великий доробок у підвищення рівня медичного обслуговування не тільки м. Одеси, а і усього Півдня України.

Через чотири роки (1927) на базі тієї ж лікарні започатковано Інститут удосконалення лікарів, першим ректором якого призначено знову ж таки Я.Ю. Бардаха.

Розформування в Україні університетів дуже швидко відбилосся на зниженні рівня розвитку науки, тому з метою відродження наукової роботи і підготовки наукових кадрів у 20-ті роки почали створюватись «Науково-дослідчі Катедри», які об'єднували учених різних навчальних закладів для сумісних наукових досліджень.

«Науково-дослідча Катедра Біології в Одесі (...), яка була запланована Науковим Бюро Одесгубпрофосу, сформувалась і розгорнула свою діяльність в листопаді 1922 р., не чекаючи на остаточне затвердження Укрголовпрофосу. Це затвердження і офіційне відкриття відбулося лише в квітні 1923 р., (...)» [50, 10].

Кафедра не мала власних приміщень, де-факто вона розташовувалась у кабінетах та лабораторіях ІНО.

«Невеликих коштів, що призначається Науково-дослідчій Катедрі Біології, не вистачає ані щоб постачати її поточною закордонною літературою, ані щоб поповнювати лабораторне устаткування» [50, 12].

З моменту організації кафедри біології і до кінця 1926 року у її складі працював Я.Ю. Бардах на посаді завідувача Секції мікробіології [50, 10]. До складу Секції мікробіології також входили: завідувач — дійсний член кафедри Л.Й. Рубенчик (був обраний і затверджений на цій посаді у квітні 1923 р.) і аспіранти: С.З. Хаїт, А.С. Заславський, М.Б. Ройзін, П.М. Гіндіс» [49, 91].

Обсяг проблем, над якими працювали мікробіологи Науково-дослідчої кафедри видно із звіту: «Секція мікробіології проводить дослідження бактеріальної флори й біохімічних процесів в Одеських лиманах і на полях зрошення.

Відокремлено цікаві форми, що живуть тільки в середовищах з великою концентрацією солей. Вивчається кругообіг сірки, шумування мочника й клітковини, амонізування, утворення



амінових основ в Хаджибейському та Куяльницькому лиманах. Ця серія робіт (Бардах, Рубенчик, Хаїт, Заславський) шукає шляху до синтетичного утворення лікових грязів» [50, 11].

У 1926 р. аспірант Бардаха Л.Й. Рубенчик захистив дисертацію з теми «Уробактерии Хаджибеевского лимана» на ступінь доктора ботаніки [86, 87, 90].

В мікробіологічній лабораторії науково-дослідної кафедри розпочав також свій науковий шлях і Д.Л. Шаміс (Член-кор. АН Каз.РСР, Заслужений діяч науки Каз. РСР), який у 1941 році очолив кафедру мікробіології Одеського університету і керував нею до 1944 р. [1, 32, 42, 88].

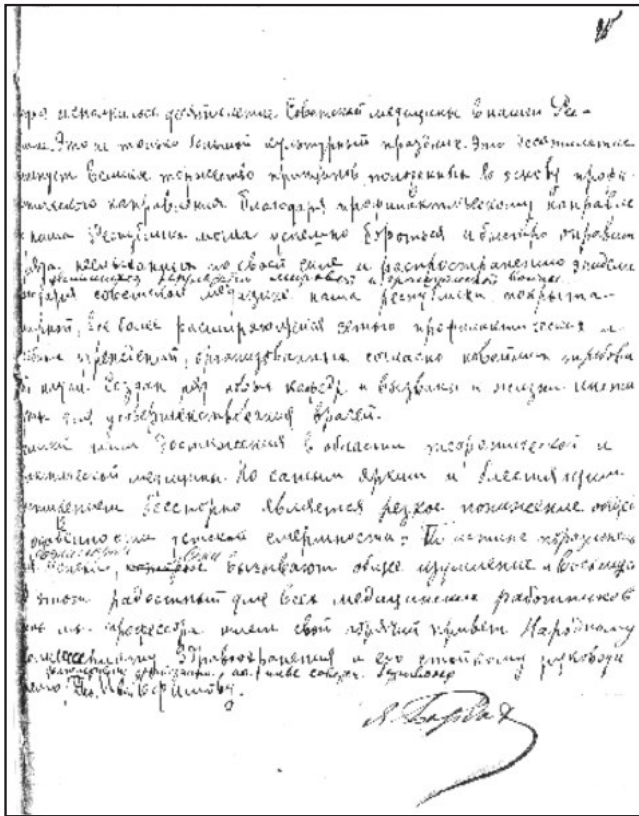


Рис. 7. Лист Я.Ю. Бардаха до народного комісаріату охорони здоров'я СРСР. 1928. Чорнетка. Оригінал. Друкується вперше

Fig. 7. Bardah's letter to the first Soviet Health Department. 1928. The draft. Original. First publication

Багато сил доклав Я.Ю. Бардах до організації в Одесі Українського інституту курортології. Для вивчення лиманів, за ініціативою Я.Ю. Бардаха було організовано великий і потужний сектор природничих наук, до складу якого входили лабораторії: фізико-хімічна (Є.С. Бурксер), гідробіологічна (М.О. Загорівський), геологічна (В.В. Степанов), біохімічна (Розенфельд). Мікробіологічну лабораторію після смерті Я.Ю. Бардаха було запрошено очолити Л.Й. Рубенчика і він керував нею до 1939 р. [11; 15; 87].



У мікробіологічній лабораторії інституту курортології вирішувалися наступні науково-практичні проблеми:

- « - Вивчення мікробіології лиманів у різні періоди їхнього життя.
- Вивчення ролі різних видів мікроорганізмів у процесах грязеутворення.
- Вивчення ролі органічних речовин у процесах грязеутворення.
- Вивчення впливу регенерації грязі на її мікрофлору (особливо на патогенні мікроорганізми).
- Методи стимулювання грязеутворення.
- Розробка методу штучного отримання лікувальної грязі з глини мікробіологічним шляхом» [11].

У 1928 році наукова спільнота м. Одеси широко відзначила 45-річний ювілей наукової, педагогічної та громадської діяльності професора Я.Ю. Бардаха. Урочистості відбулися 18 листопада у залі міськради. Газета «Известия» 20.11.1928 р. писала. «Урочисте ушанування проф. Я.Ю. Бардаха (...) перетворилося у велике свято. Величезна зала Міськради була переповнена (...). Президія міськради, враховуючи особливі заслуги Я.Ю. ухвалила порушити перед ВУЦВКом клопотання про присвоєння йому звання Заслуженого діяча науки.

Виступило загалом більше 50-ти представників науки, вузів і робітників з підприємств».

У Державному архіві Одеської області нам вдалося знайти клопотання Виконавчого комітету Одеського округу про присвоєння Я.Ю. Бардаху звання “Заслуженого діяча науки”. З цього приводу триває довга переписка і нарешті 2 квітня 1929 року Окрвиконком отримав кінцеву відповідь: «На в/лист з 7/III-29 р. за індексом 090130601 в справі надання проф. Бардаху звання заслуженого діяча науки, Управління Наукових Установ НКО повідомляє, що справа затримується через те, що загальний проект законоположення про надання звання заслужених діячів науки, культури, техніки, мистецтва тощо знаходиться в стадії проробки...» [82].

Через вісім місяців після цих урочистих святкувань — 17 червня 1929 року Я.Ю. Бардаха не стало (на жаль, у більшості довідкових видань наводиться невірна дата його смерті — 17 липня 1929 р.). Він був похований за державні кошти на II-му єврейському кладовищі м. Одеси. У 1977 році, коли це кладовище було знищено, його прах, за клопотанням Одеського університету [85], перенесено на центральну алею II-го християнського кладовища.

Таким чином, видатний учений, доктор медичних наук, приват-доцент Яків Юліїнович Бардах на підґрунті наукового напрямку, започаткованого Л.С. Ценковським і О.А. Веріго заснував в Імператорському Новоросійському університеті наукову школу загальної мікробіології. Він вперше в Росії увів бактеріологію як самостійну дисципліну на природничому факультеті університету.

За часи роботи в університеті Я. Ю Бардах детально розробив і втілював у навчальний процес професійний і спеціальний компоненти змісту мікробіологічної освіти. Він облаштував в університеті першу в Росії бактеріологічну навчально-наукову лабораторію. Тут він особисто проводив навчальні лабораторні роботи зі студентами, а в позанавчальний час проводив наукові дослідження разом із своїми учнями.

Я.Ю. Бардах велику увагу у підготовці майбутніх фахівців приділяв формуванню практичних умінь і навичок, а також поєднанню наукової і навчальної роботи.

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Александрович В.В.*, Кузнецов В.О., Стоянова М.А. Научно-педагогическая деятельность Давида Лазаревича Шамиса (1902-1972) // Десята конференция молодых историков освіти, науки і техніки України. 27 травня 2005, м. Київ: Матеріали конференції. — К., 2005. — С. 3-7.
2. *Александрович В.В.*, Протченко П.З., Кузнецов В.О. Развитие медицинской микробиологии в Одесском (Новороссийском) университете (1865-1920 гг.) // История украинской науки на межі тисячоліть: Зб. наук. Праць / Відп. редактор О.Я. Пилипчук. — К., 2005. — Вип. 20. — С. 4-12.
3. *Бардах Я.Ю.* Отчет бактериологической станции за вторую треть 1890 года. / Сборник Херсонского Губернского земства. — Одесса, 1890, — № 11, С. 184-188.
4. *Бардах Я.Ю.* Результаты предохранительных прививок бешенства // Труды 7-го Лондонского международного конгресса по гигиене и демографии, 1890-а.
5. *Бардах Я.Ю.* Экспериментальные данные применения туберкулина для предохранения и лечения обезьян. / Труды 7-го Лондонского международного конгресса по гигиене и демографии. — 1890-б. [ДАОО. — ф. Р1593. — Оп. 1. — Од. зб. 51].
6. *Бардах Я.Ю.* Отчет о деятельности Одесской бактериологической станции за 1890 г. // Сборник Херсонского земства. — Одесса, 1891. — С. 53-58.
7. *Бардах Я.Ю.* Отчет временно заведующего Одесской городской бактериологической станции о командировке за границу для изучения способа профессора Коха лечения туберкулеза // Ведомости Одес. Губ. Общ. Упр. — 1891. — 16 февр., № 13.
8. *Бардах Я.Ю.* Значение Пастера в медицине и бактериологии: речь, произнесенная в семидесятилетний день рождения Пастера 15 (27) декабря 1892 г. // ЗНОЕ. Т. 28, вып. 1, 1893. — С. XXIX-XLIV.
9. *Бардах Я.Ю.* Исследования по дифтерии: к учению о предохранении и лечении дифтерии кровяной сывороткой искусственно невосприимчивых собак.- М.: Тов. "Тип. А.И. Мамонтова", 1894. — 184 с.
10. *Бардах Я.Ю.* Жизнь микробов ниже нуля. // Журнал научно-исследовательских кафедр в Одессе. — Одесса: Изд-во. Одес. Губпрофобра, 1924. — № 10-11. — С. 1-5.
11. *Беленький М. С.* Очерки по истории грязелечения в Одессе. — [Белгород-Днестровский], Б.и., 1955 — 70 с.
12. *Боровиков Г.А.* Памяти профессора В.А. Ротерта / Записки Императорского Общества Сельского Хозяйства Южной России, 1916. — Т. 86, кн. — 1
13. *Браунер А.А.* Александр Игнатьевич Набоких, 1920. — Отд. отт. (С. 220-225)
14. *Брусиловский Е.М.* К вопросу о роли микроорганизмов в образовании лиманной грязи / Отчеты о деятельности Одесского бальнеологического общества. Вып. 4. С октября 1887 г. по январь 1891 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — Одесса: Рус. Тип. Исаковича, 1892. — 74 с; Прилож. 199 с.
15. *Брусиловський Є.М.* Короткий історичний нарис організації Всеукраїнського інституту бальнеології та курортології в Одесі // Бюлетень № 5-6 Всеукраїнського інституту бальнеології та курортології. Одеса, 1932. — С. 8-15.
16. *Бучинский П.Н.* Шестилетняя деятельность Лекционного комитета при Новороссийском Обществе Естествоиспытателей (1895-1901) // ЗНОЕ. — 1901. — Т. 24, вып. 1. — С. 59-80.
17. *Васильев К.Г.*, Зайцева О.И., Занчевська Т.О. Яков Юльевич Бардах // Микробиологический журнал. — 1973. — Т. 35. — С. 670-673.
18. *Владова М.Э.* Яков Юльевич Бардах: Ученый, врач, педагог, гуманист //Тиква — Ор Самеах. — 2006. — № 540. — С. 10-13.
19. *Вся Одесса:* Справочник недвижимых имуществ всего Одесского градоначальства до границы Одесского уезда включительно на 1900 г. — Одесса: Изд-во Фельберга, 1900. — 265 с.
20. *Гамалея Н.Ф.* Воспоминания. — Л.: Изд-во АН СССР, 1947. — 228 с.
21. *Ефременко А.А.* К 75-летию Пастеровского института в Париже // Советское здравоохранение. — 1964. — №9. — С. 68-70.
22. *Заболотный Д.К.* О Фосфорисценции Одесских лиманов // Южно-Русская Медицинская Газета. — 1892. — № 7.
23. *Заболотный Д.К.* О свечении живых организмов. / ЗНОЕ. — 1892. — Т. 17, вып. 2. — С. 73-78.



24. *Зелинский Н.Д.*, Брусиловский Е.М. О сероводородном брожении в Черном море и одесских лиманах // Южнорус. мед. Газ. — (Одесса), 1893. — №18. — С. 231-233; № 19. — С. 248-251.
25. *Исаченко Б.Л.* Микробиология // Очерки по истории ботаники. — М.: МОИП, 1947. — С. 275-311.
26. *Корчак-Чепурковский А.В.* Дифтерит в Херсонском уезде // Сборник Херсонского Земства. — 1891. — №11 (ноябрь). — С. 350-388.
27. *Крамаренко С.Н.* Дифтерит и возможная организация мероприятий противного в Одесском уезде. // Сборник Херсонского Земства. — 1891. — №8 (август). — С. 123-128.
28. *Кузнецов В.О.* Внесок польської інтелігенції у розвиток мікробіологічної наукової школи в Одеському (Новоросійському) університеті імені І.І. Мечникова // Поляки на півдні України та в Криму. — Одеса-Ополе-Вроцлав: Ізмаїльська міська друкарня, 2007. — С. 264-276.
29. *Кузнецов В.О.* Роль Олександра Андрійовича Веріго у становленні Української мікробіологічної науки // Історія Української науки на межі тисячоліть: Зб. наук. праць. / Відп. ред. О.Я. Пилипчик. — К., 2007. — Вип. 27. — С. 93-101.
30. *Кузнецов В.О.*, Александрович В.В. Развитие научной школы общей микробиологии в Одесском (Новоросийском) университете (1865-2005) // История украинской науки на межі тисячоліть: Зб. наук. праць. / Відп. ред. О.Я. Пилипчик. — К., 2006. — Вип. 23. — С. 135-142.
31. *Кузнецов В.О.*, Кузнецова Н.В. Життя та науково-педагогічна діяльність академіка Д.К. Заболотного в Одесі (28.12.1866-15.17.1929) // Мікробіологія і біотехнологія. — 2007. — Т. 1. — С. 82-92.
32. *Кузнецов В.О.*, Кузнецова Н. В., Пермітіна В. М. Шаміс Давид Лазаревич // Професори Одеського (Новоросійського) університету: біогр. словник. Т.: Р-Я. — 2-е вид., доп. / Відп. ред. В.А. Сминтина. — Одеса: Астропринт, 2005. — С. 405-408.
33. *Кузнецов В.О.* Життя та науково-педагогічна діяльність професора Якова Юліївича Бардаха (1857-1929) // Історія української науки на межі тисячоліть: Зб. наук. праць. / Відп. ред. О.Я. Пилипчик. — К., 2008. — Вип. 34. — С. 100-127.
34. *Манойленко К.В.* Владислав Адольфович Ротерт, 1863-1916. — Л.: Наука, 1978. — 142 с.
35. *Метелкин А.И.* Л.С. Ценковский основоположник отечественной школы микробиологов (1822-1887). М.: Гос. изд-во мед. лит. — 1950. — 263 с.
36. *Мечников И.И.* Болезни личинок хлебного жука (Одесса, 1879) // мечников И.И. Академическое собрание сочинений. Т. 4. — С. 339-360.
37. *Мечников И.И.* Страницы воспоминаний: Сборник автобиографических статей. — М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1946. — 279 с.
38. *Мечников И.И.* Письма (1863-1916)/ Под ред. А.Е. Гайсиновича и Б.В. Левшина. — М.: Наука, 1974. — 296 с.
39. *Мечников И.И.* Рассказ о том, как и почему я поселился за границей. // Новороссийский университет в воспоминаниях современников. — Одесса: Астропринт, 1999. — С. 67-69.
40. *Обозрение преподавания наук в Императорском Новороссийском университете за 1895-96 уч. г.* — Одесса, 1895.
41. *Обозрение преподавания наук в Императорском Новороссийском университете за 1896-97 уч. г.* — Одесса, 1896.
42. *Одеська Філія Зоолого-Біологічного Інституту* // Праці ОДНДЗБІ — Одеса, 1932, вип. 1. — С. 3-6.
43. *Отчет Одеського государственного санитарно-бактериологического института им. И.И. Мечникова за 1925-26 XL юбилейный год.* — Одесса: Изд. Одес. бакт. ин-та, 1927. — 114 с.
44. *Отчет о деятельности Новороссийского Общества Естествоиспытателей за 1886 г.* // ЗНОЕ. — 1887. — Т. 12, вып. 1. — С. I-VIII.
45. *Отчеты о деятельности Одесского бальнеологического общества.* Вып. V. С января 1891 г. по ноябрь 1898 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — Одесса: Тип. Южно-Рус. о-ва печатного дела, 1898. — Вып. 5. — 288 с.
46. *Отчет о состоянии и деятельности агрономической лаборатории ИНУ за 1906, 1907, 1908 гг. и д. экстрор-динарного профессора А.И. Набоких* // Отчет о состоянии и

деятельности Императорского Новороссийского Университета за 1904-1908 гг. Одесса: "Экономическая" тип., 1909. — С. 18-32

47. *Отчет* о состоянии и деятельности Императорского Новороссийского Университета за 1903 г. — Одесса: "Экономическая" тип., 1904. — Т. 99. — С. 5-198.

48. *Письма* А.О. Ковалевского к И.И. Мечникову — Л.: Наука, 1955. — 311 с.

49. *Породко Ф. М., Рубенчик Л. Й.* Звіт про склад і роботу науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі за термін з 1 січня 1927 до 31 грудня 1927 р. // Вісті науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі. Вип. 1, Одеса, 1929. — С. 13-23

50. *Породко Ф. М., Рубінштейн Д. Л.* Короткий звіт про склад і роботу науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі за термін з квітня 1923 до 31 грудня 1926 р./ Вісті науково-дослідчої катедри біології в м. Одесі. — Одеса, 1929. — Вип. 1. — С. 10-12.

51. *Работнова И.Л.* Приоритет русского микробиолога А.Ф. Лебедева в открытии способности гетеротрофных бактерий усваивать углекислоту. // Микробиология. — 1950. — Т. 19, вып. 3. — С. 275- 278.

52. *Рубенчик Л.И.* О брожении мочевины при температуре ниже нуля. // Журнал научно-исследовательских кафедр в Одессе. — Одеса: Изд. Одес. Губпрофобра, 1924. — № 10-11 (август-октябрь). — С. 17-26.

53. *Скрипченко Г.С., Целух А.В., Сокольская В.П.* Одесский научно-исследовательский институт вирусологии и эпидемиологии им. И.И. Мечникова. // Очерки развития науки в Одессе. — Одесса: Изд-во НАН Украины. Южный науч. центр, 1995. — С. 347-353.

54. *Холодний М.Г.* До історії мікробіології в Київському університеті // Розвиток науки в Київському університеті за сто років — К.: Вид-во Київ. Ун-ту, 1935. — С. 93-104.

55. *Bardach J.* Le virus rabique dans le lait // Annales de l'Institut Pasteur. — 1887. — Т. 1, № 4. — Р. 180-181.

56. *Bardach J.* Sur la vaccination intensive des chiens inocules de la rage par trepanation. // Annales de l'Institut Pasteur. — 1891. — Т. 1, № 2. — Р. 84-87.

57. *Bardach J.* Nouvelles recherches sur la rage. // Annales de l'Institut Pasteur. — 1891. — Т. 2, № 1. — Р. 9-17.

58. *Bardach J.* Role de la rate dans les maladies infectieuses. // Annales de l'Institut Pasteur. — 1891. — Т. 3, № 11. — Р. 577-603.

59. *Porodko F.* Studien über den Einfluss der Sauerstoffspannung auf pflanzlichen Mikroorganismen, Jahrb. f. wissensch. Botanik. 1904. — Bd.

## АРХІВНІ МАТЕРІАЛИ

60. ДАОО. — Ф. 2. — Оп. 2. — С. 2254. — А. 27.

61. ДАОО. — Ф. 2. — Оп. 2. — С. 2454. — Аа.- 25-30.

62. ДАОО. — Ф. 4. — Оп. 6. — Вяз. 1. — С. 2. — Аа.- 1-12.

63. ДАОО. — Ф. 16. — Оп. 66. — О.з. 163

64. ДАОО. — Ф. 22. — Оп. 1. — С. 124. — А. 1.

65. ДАОО. — Ф. 22. — Оп. 1. — С. 130. — А. 10.

66. ДАОО. — Ф. 22. — Оп. 1. — С. 130. — А. 66.

67. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 4. — С. 2408. — А. 26.

68. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 4. — С. 4033.

69. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 4. — С. 4034.

70. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 8. — С. 17. — А. 38.

71. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 8. — С. 67.

72. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 8. — С. 67. — Аа. 3, 3 зв.

73. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 8. — С. 67. — Аа. 12-16 зв.

74. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 11. — С. 19 — А. — А. 33.

75. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 11. — С. 19-А. — А. 34.

76. ДАОО. — Ф. 45. Оп. 11. — С. 19-А. — А. 35- 35 зв.

77. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 11. -С. 19-А. — Аа. 36 зв., 37.

78. ДАОО. — Ф. 45. — Оп. 11. — С. 19-А. — А. 38.

79. ДАОО. — Ф. 314. — Оп. 2. — С. 148. — Аа. 37-38 зв.

80. ДАОО.-Ф. Р-105. -Оп. 1. — С. 210. — Аа. 101, 101 зв.



81. ДАОО.-Ф. Р-105. -Оп. 1. — С. 210. — А. 104.
82. ДАОО.-Ф. Р-969. — Оп. 1. -С. 795. — А. 4.
83. ДАОО.-Ф. Р-1395. — Оп. 1. -С. 15. — А. 32.
84. *Заславский А.С.* Мои воспоминания о микробиологической лаборатории Одесского университета (к столетию со дня рождения проф. Я.Ю. Бардаха). Рукопис, 1957. Родинний архів Я.Ю. Бардаха.
85. *Письмо* ректора Одесского государственного университета им. И.И. Мечникова Сердюка В.В. № 51-2077, от 28.07.77. Копія. Родинний архів Я.Ю. Бардаха
86. *Рубенчик Л.И.* Автобиография. Копия. Машинопись, 1945. — 1.с. / Рукописний фонд Наукової бібліотеки ОНУ. — П. Біологи, Р-Я.
87. *Рубенчик Л. И.* Анкетные данные. Оригінал. Машинопис. 1952. Ін-т архівознавства НБУ ім. В. І. Вернадського. — Ф. — 156. — Оп. 1. — Од. зб. 33. — Л. 3.
88. *Рубенчик Л. И.* Список лиц, выполнивших диссертации под моим руководством: Оригінал. Рукопис / Ін-т архівознавства НБУ ім. В.І.Вернадського. Ф. 156. — Оп. 1. — Л. 1.
89. *Сендерович И.Л., Матлис Л.Е.* Жизнь и деятельность профессора Якова Юльевича Бардаха: Текст доклада к 40-летию со дня смерти. Одесса, 16.VI.1969 г. Рукопис. Родинний архів Я.Ю. Бардаха
90. *Свідощтво* № 70 від 30 березня 1929 р. про закінчення ІНО і присвоєння кваліфікації Л. Й. Рубенчику. Оригінал. Ін-т архівознавства НБУ ім. В. І. Вернадського. — Ф. 156. — Оп. 1. — О.зб. — 25.
91. *Списки* наукового складу Катедр Одеських Інститутів. Машинопис. Оригінал. Харківський ЦДАОР. — Ф. НКП УССР, 166. — Оп. 15. — С. — 492. — Л. 1.
92. *ЦДАОР УССР.* — Ф. 166. — Оп. 2. — С. 426,1105,1887.

УДК: 579:923 Бардах (477.74)

### В.А. Кузнецов

Центр исследований по истории образования, науки и техники на юге Украины  
имени В.И. Липского, ул. Новаторов, 5-а, г. Одесса, 65010, Украина,  
тел. 8 (0482) 37 96 73 , e-mail: cuznetsov@meta.ua

## ПРОФЕСОР ЯКОВ ЮЛИЕВИЧ БАРДАХ (1857—1929)

### Реферат

Статья посвящена 80-й годовщине со дня смерти (17.06.1929) выдающегося ученого-микробиолога. На основании изучения архивных материалов Государственного архива Одесской области, научного архива Института архивоведения НБУ имени В.И. Вернадского АН Украины, личного архива семьи Я.Ю. Бардаха и литературных источников рассмотрены основные события жизни и научно-педагогической деятельности Я.Ю. Бардаха.

К л ю ч е в ы е с л о в а: история микробиологии, Я.Ю. Бардах, Одесский университет.



**V.A. Kuznetsov**

South Ukrainian Education, Science and Technology History Research Centre  
named after V.I. Lypsky, Novatorov Str., 5a, Odessa, Ukraine, 65000,  
tel.: 8 (0482) 37 96 73, e-mail: cuznetsov @meta.ua

**YAKIV YULIJOVYCH BARDAKH (1857-1929)**

**Summary**

The article is devoted to 80th anniversary from the date of death (17.06.1929) of the prominent scientist of microbiology. The main events of life and scientific, pedagogical activity of Y. Y. Bardakh are considered on the basis of studying the archives materials of National Archive Odesa region, of the Archives Studies Institute of Vernadsky NBU of the Academy of Sciences of Ukraine, the private archive of Bardakh's family and literature sources.

**K e y w o r d s:** history, microbiology, Y.Y. Bardakh, Odesa University.





## IV ЛІТНЯ ШКОЛА “МОЛЕКУЛЯРНА МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ” В ОДЕСЬКОМУ НАЦІОНАЛЬНОМУ УНІВЕРСИТЕТІ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

## IV SUMMER SCHOOL “MOLECULAR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” IN ODESA NATIONAL I.I. MECHNYKOV UNIVERSITY

Традиція Літніх шкіл стає дедалі поширенішою у науковій спільноті. Проведення таких заходів сприяє передачі сучасних знань та вмінь між науковцями різних профілів та розкриває перед молодими вченими широкі горизонти застосування новітніх методів дослідження.

З 4 по 16 травня 2009 року на базі кафедри мікробіології і вірусології відбулася IV Літня школа “Молекулярна мікробіологія і біотехнологія”, організована Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова та Інститутом мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ.

У складі слухачів школи були наукові співробітники та викладачі науково-дослідних установ та вищих навчальних закладів Києва, Харкова, Одеси.

Згідно з програмою Літньої школи, слухачі мали змогу протягом двох тижнів прослухати лекції та виконати лабораторні роботи, присвячені актуальним питанням молекулярної біології, мікробіології, вірусології.

Лекції завідувача відділу молекулярної біології бактеріофагів доктора біологічних наук, професора Товкача Ф.І. висвітлювали такі питання як сучасні схеми класифікації прокариотних і еукаріотних мікроорганізмів та вірусів, бактеріальна геноміка, автономні генетичні елементи бактерій, ієрархія і мобільність автономних генетичних елементів, помірні і вірулентні бактеріофаги, фаготерапія, геноміка профагів і островів патогенності, фагова лізогенна конверсія, фагові токсини, концепція «моронів», острови патогенності і система секреції III типу.

Протягом двох тижнів слухачі лекцій знайомились з перспективами використання бактеріоцинів, геномікою плазмід, плазмідними детермінантами патогенності, формуванням множинної антибіотикостійкості у бактерій, геномним інженірингом, екологією бактеріальних вірусів, новими методами в екології бактеріофагів. Частина лекцій була присвячена методам кластерного аналізу та його застосуванню в нумеричній таксономії і філогенії.

На лабораторних заняттях учасники школи опановували методи титрування фагів, одержання та концентрування фагових часток, виділення ДНК, рестрикційного



аналізу, ідентифікації бактеріальних вірусів за рестрикційними патернами їх геномів, вивчення плазмідного профілю бактерій, транскон'югації та трансформації, вивчення плазмідних профілів транскон'югантів та трансформантів, метод полімеразної ланцюгової реакції, застосування кластерного аналізу у філогенії та інші методи. У ході проведення школи слухачі були забезпечені методичними вказівками.

На урочистому закритті слухачі отримали посвідчення про те, що вони пройшли курс IV Літньої школи.

Чекаємо молодих науковців, які бажають пройти курс V Літньої школи „Молекулярна мікробіологія і біотехнологія”, у травні наступного року!

В.О. Іваниця, Н.В. Ліманська



INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

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

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

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

**Article appearance:**

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

The following articles are accepted:

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

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

**Contents of manuscript**

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



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

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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

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

### Books

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

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

### Journals

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



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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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



*Наукове видання*

**“Мікробіологія і біотехнологія”**

**Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів, що надруковані у журналі “Мікробіологія і біотехнологія” можливі лише за умови посилання на джерело інформації та з дозволу редакційної колегії.**

**Усі права захищені згідно законодавства України.**

Підписано до друку 15.09.2009 р. Формат 70x108/16. Гарн. «Literaturnaja».

Тираж 100 прим.

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