

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
Microbiology & Biotechnology

№ 3(7)
2009

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 3(7)

•
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. Volyansky, Yu.P. Zaytsev, N.M. Zhdanova

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

Accepted for publishing articles are reviewed

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

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

PUBLISHERS

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

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

Address:

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

www.mbt.onu.edu.ua

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
№ 3(7)

•
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. Шербатенко

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.

**Журнал внесено до переліку наукових фахових видань України
(постанова Президії ВАК № 1-05/2 від 27.05.2009).**

ВИДАВЦІ

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

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

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

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

Тел.: 723-28-39, 748-11-01

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

www.mbt.onu.edu.ua

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

CONTENTS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

Yu.P. Zaitsev, N.I. Kopytina FUNGI IN THE MARINE ENVIRONMENT.....	6
---	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

D.V. Fedorovych, M.V. Gonchar, H.P. Ksheminska, T.M. Prokopiv, H.I. Nechay, P. Kaszycki, H. Koloczek, A.A. Sibirny MECHANISMS OF CHROMATE DETOXIFICATION IN YEASTS.....	15
---	----

Mariola Paściak, Ewelina Kasprów, Ying Huang, Andrzej Gamian POLAR LIPIDS OF <i>RUANIA ALBIDIFLAVA</i> , A NOVEL MEMBER OF THE SUBORDER <i>MICROCOCCINEAE</i>	22
--	----

O.G. Mameeva, A.N. Ostapchuk, S.S. Nagornaya, V.S. Podgorsky ANALYSIS OF THE 2-PHENYLETHANOL PRODUCTION BY YEASTS GENUS <i>KLUYVEROMYCES</i>	29
---	----

K. S. Marakasova, B. O. Ostash, V. O. Fedorenko NEGATIVE REGULATION OF MOENOMYCIN A BIOSYNTHESIS IN <i>STREPTOMYCES GHANAENSIS</i> ATCC14672.....	36
--	----

Jerzy Wielbo, Monika Marek-Kozaczuk, Andrzej Mazur, Agnieszka Kubik-Komar, Anna Skorupska THE DIVERSITY OF <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BV. <i>TRIFOLII</i> LOCAL POPULATIONS: GENETIC AND PHYSIOLOGICAL TRAITS CONNECTION	40
---	----

Dorota Chrobak, Magdalena Kizerwetter-Świda, Magdalena Rzewuska, Marian Binek CHARACTERIZATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME <i>MEC</i> TYPES IN METHICILLIN-RESISTANT <i>STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS</i> STRAINS ISOLATED FROM DOGS	49
---	----

Bogumila Szponar, Mariola Paściak, Bartosz Figiel, Andrzej Gamian CHEMOTAXONOMICAL IDENTIFICATION OF ACTINOBACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM DAMP-AFFECTED OFFICE BUILDING.....	57
--	----

A. I. Osadchaya, L. A. Safronova, L. V. Avdeeva, V.M. Ilyash ABILITY OF BACTERIA OF GENUS <i>BACILLUS</i> TO HYDROLYZE XYLANE.....	63
--	----

I.M. Stolyarchuk, T.P. Shevchenko, V.P. Polischuk, A.V. Kripka VIRUS INFECTION COURSE IN DIFFERENT PLANT SPECIES UNDER INFLUENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA.....	70
---	----

T.B. Peretyatko, S.P. Gudz PSYCHROPHILIC STRAINS OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA	76
--	----

THE CHRONICLE OF A SCIENTIFIC LIFE.....	83
---	----

INSTRUCTIONS TO AUTHORS	85
-------------------------------	----

З М І С Т

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

Ю.П. Зайцев, Н.І. Копитіна ГРИБИ У МОРСЬКОМУ СЕРЕДОВИЩІ	6
---	---

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

Д.В. Федорович, М.В. Гончар, Г.П. Кшемінська, Т.М. Прокопів, Г.І. Нечай, П. Кашицкі, Г. Колочек, А.А. Сибірний МЕХАНІЗМИ ДЕТОКСИКАЦІЇ ХРОМАТУ У ДРІЖДЖІВ	15
--	----

М. Пашак, Е. Каспров, Й. Хуанг, А. Гаміан ПОЛЯРНІ ЛІПІДИ <i>RUANIA ALBIDIFLAVA</i> – НОВОГО ПРЕДСТАВНИКА ПІДПОРЯДКУ <i>MICROCOCCINEAE</i>	22
--	----

О.Г. Мамєєва, А.М. Остапчук, С.С. Нагорна, В.С. Підгорський АНАЛІЗ СИНТЕЗУ 2-ФЕНІЛЕТАНОЛУ ДРІЖДЖАМИ РОДУ <i>KLUYVEROMYCES</i>	29
--	----

К. С. Маракасова, Б. О. Осташ, В. О. Федоренко НЕГАТИВНА РЕГУЛЯЦІЯ БІОСИНТЕЗУ МОЕНОМІЦИНУ А У ШТАМІ <i>STREPTOMYCES GHANAENSIS</i> ATCC14672	36
---	----

Е. Вільбо, М. Марек-Козачук, А. Мазур, А. Кубік-Комар, А. Скорупська ВІДМІННОСТІ ЛОКАЛЬНИХ ПОПУЛЯЦІЙ <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BV. <i>TRIFOLII</i> : ЗВ'ЯЗОК МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ І ФІЗІОЛОГІЧНИМИ ОЗНАКАМИ	40
---	----

Д. Хробак, М. Кізерветтер-Свіда, М. Ржевуська, М. Бінек ХАРАКТЕРИСТИКА СТАФІЛОКОКОВОЇ КАСЕТНОЇ ХРОСОМИ <i>MEC</i> ТИПУ У МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНИХ ШТАМІВ <i>STARPHYLOCOCCUS</i> <i>INTERMEDIUS</i> , ІЗОЛЬОВАНИХ ВІД СОБАК	49
--	----

Б. Шпонар, М. Пашак, Б. Фігел, А. Гаміан ХЕМОТАКСОНОМІЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМІВ АКТИНОБАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ З УРАЖЕНИХ ВОЛОГОЮ ОФІСНИХ БУДІВЕЛЬ	57
---	----

А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, Л.В. Авдєєва, В.М. Іляш ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>VACILLUS</i> ПІДРОЛІЗУВАТИ КСИЛАН	63
---	----

І.М. Столярчук, Т.П. Шевченко, В.П. Поліщук, А.В. Кріпка ПРОТІКАННЯ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РІЗНИХ ВИДІВ РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ АРБУСКУЛЯРНОЇ МІКОРИЗИ	70
---	----

Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь ПСИХРОФІЛЬНІ ШТАМИ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ	76
ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ	83

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	85
---	----

УДК: 574:579.68:582.28(26)

Ю.П. Зайцев, Н.И. Копытина

Одесский филиал института биологии южных морей имени А.А. Ковалевского
НАН Украины, ул. Пушкинская, 37, г. Одесса, 65125, Украина,
тел.: +38 (048) 725 09 17
e-mail: yu.zaitsev@paco.net, nade.kopytina@yandex.ru

ГРИБЫ В МОРСКОЙ СРЕДЕ

Дан краткий обзор опубликованных сведений о грибах как о компонентах биоты морей и океанов. Рассмотрено распространение грибов в различных биогеографических зонах и биотопах мирового океана. Показано влияние глубины, температуры, солености воды, характера донных отложений на видовой состав и плотность пропагул грибов. Отмечена роль грибов сапротрофов, паразитов, симбионтов и оппортунистов в экосистемах, а также трофические связи морских грибов и беспозвоночных. Названы некоторые перспективные направления изучения и использования морских грибов для решения научных и прикладных задач.

К л ю ч е в ы е с л о в а: грибы, пелагиаль, бенталь, животные.

Космополитический характер распространения грибов особенно ярко прослеживается на примере их распределения в морях и океанах. Грибы делятся на сапротрофов, паразитов, симбионтов и ассоциантов растений, животных и человека. Они занимают все биотопы галосферы, от поверхности до наибольших глубин, от воздушной супралиторали до сероводородных отложений абиссали, от опресненных участков у побережий до гипергалинных вод изолированных морей и озер. Достигая высокой численности, грибы играют существенную роль в процессах функционирования морских экосистем, потребляя и минерализуя органическое вещество, участвуя в биологическом очищении морской среды, создавая условия для развития биоценозов морских организмов. Споры и гифы грибов, а также обогащенные мицелием целлюлозосодержащие субстраты и детрит служат пищей для многих видов беспозвоночных и молоди рыб [4].

Несмотря на это, грибы в морской среде изучены недостаточно, специалистов в области морской микологии намного меньше, чем того требует познание этой исключительно интересной и важной группы организмов. Например, на Черном море микологические исследования в настоящее время проводятся лишь в Одесском филиале Института биологии южных морей НАН Украины.

Опубликованные в отечественной и зарубежной литературе материалы позволяют составить общее представление о грибах как о компонентах биоты морей и океанов.



Определение понятия «морские грибы»

По происхождению морские грибы делят на две группы: облигатные — первичноводные грибы (появились в водной среде и остались в ней) и факультативные — вторичноводные грибы (в ходе эволюции мигрировали в пресные воды и на сушу, а затем вновь вернулись в водную среду). Из морской среды выделено около 1500 видов грибов из отделов Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota (низшие грибы), Ascomycota, Basidiomycota и морфологической группы Anamorphic Fungi (высшие мицелиальные грибы), среди них 500 — представители высших облигатно морских грибов. В монографии Хайда и Пойтинга «Marine Mycology» [17] приведен список высших облигатно морских грибов (444 вида): грибы из отдела Ascomycota составляют 81%, отдела Basidiomycota — около 2%, морфологической группы Anamorphic Fungi — 17%.

Описание новых облигатно морских видов продолжается и в настоящее время. Большинство мицелиальных факультативно морских грибов — эвритопные представители родов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma*, *Trichoderma*, которые заносятся в море вместе с почвой, растительными, животными субстратами, а также воздушными потоками [1, 10].

В 1999 г. на VII-м Международном симпозиуме по морской и пресноводной микологии в Гонконге предложено в качестве главного критерия при определении морских грибов использовать их способность прорасти и формировать мицелий в естественных морских условиях [13].

Грибы в различных биогеографических областях мирового океана

В мировом океане грибы распространены во всех биогеографических областях. Облигатные грибы, обитающие в тропических районах, по отношению к температуре воды, делятся на две категории: тропические/субтропические виды и космополиты. Например, из 88 видов микромицетов прибрежных вод Индии, 36 встречаются в умеренной зоне. Тропические/субтропические грибы в экспериментах *in vitro* оптимально развиваются при температурах 35–40 °С, а для популяций грибов-космополитов оптимальный температурный режим роста совпадает с таковым в природных местах обитания [27]. Еще недостаточно изучены грибы арктической и антарктической областей, побережий Южной Америки и Южной Африки. Не исключено, что расширение ареала исследований позволит доказать правомерность утверждения, что грибы, обитающие в умеренных широтах, являются космополитами [18].

Грибы в пелагиали

Споры и обрывки мицелия грибов обнаружены от поверхностной пленки воды до больших глубин (4610 м), а в таком водоёме, как Черное море грибы выявлены даже из сероводородной зоны пелагиали (от 250 до 2000 м). В водной толще доминируют факультативные грибы из родов *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* и дрожжи *Candida*, *Rhodotorulaceae* [9, 25, 28]. Установлено, что плотность пропагул (структур дающих начало новому организму: споры, конидии, клетки гиф) грибов убывает по мере удаления от суши и увеличением глубины [1].

Споры облигатно морских грибов поднимаются в поверхностный слой воды и благодаря особенностям их строения и положительной плавучести удерживаются в пене. В ней можно обнаружить споры большого числа грибов изучаемых районов (до 70% видового состава). Численность спор и клеток гиф грибов в пене бывает на 1–4 порядка выше, чем в поверхностном слое воды. В морской пене преобладают



споры морских видов (более 70% случаев), в первую очередь *Corollospora maritima* Werdermann, *Arenariomyces trifurcatus* Höhnk, E.B.G. Jones и *Nia vibrissa* R. T. Moore, Meyers, а в пене соленых лиманов значительную долю (до 77%) составляют споры наземных грибов из родов *Alternaria*, *Chaetomium*, *Diplodia*, *Stemphylium*. Эти облигатные и факультативные микромицеты также развиваются в биотопах песка псевдолиторали и верхней сублиторали [7, 11].

Грибы в донных отложениях шельфа

В донных отложениях прибрежной зоны северо-западной части Черного моря и прилегающих лиманов разной солености на глубинах 0–20 м выявлено 60 видов грибов, из них 34 вида (56,7%) — облигатно морские. В видовом составе грибов преобладали представители группы Anamorphic fungi — 32 вида (53,3%). Максимальное число видов отмечено в родах *Chaetomium* (3) и *Cirrenalia* (3). В микокомплексах псевдолиторали по частоте встречаемости доминируют морские аскомицеты *C. maritima* (27,5%), *A. trifurcatus* (19,2%), сублиторали — *C. maritima* (34,7%) и эвритопный анаморфный вид *Stachybotrys chartarum* (Ehrend.) Hughes (10,4%) [8]. В грунтах Черного моря в районе мыса Херсонес (глубина до 15 м) выявлено 86 видов грибов, из группы Anamorphic fungi — 72 (80,9%) вида [1].

В донных отложениях шельфа острова Сахалин, Курильских островов (Охотское море) и Японского моря (глубина 10–200 м) обнаружены около 200 видов грибов, из них 95% — представители группы Anamorphic fungi [11, 12]. В Кандалакшском заливе Белого моря исследована микобиота маршевых почв, псевдолиторали и сублиторали (54–108 м, пролив Великая Салма). Выделено 73 вида грибов, из группы Anamorphic fungi — 61 (83,6%) вид [2]. В Белом, Черном (район мыса Херсонес) и Дальневосточных морях в микокомплексах донных отложениях облигатно морские грибы составляли около 5% от видового состава. В видовом составе в целом и в комплексах доминантов всех глубин были наиболее широко представлены грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, т.е. виды терригенного происхождения, обычные в окрестных наземных почвах или космополиты [1, 2, 11, 12].

В северо-западной части Черного моря не выявлено достоверных различий численности пропагул и видового состава грибов в донных отложениях псевдолиторали и верхней сублиторали [8]. В грунтах Дальневосточных морей зафиксировано уменьшение численности пропагул и биоразнообразия грибов с увеличением глубины (от 10 до 200 м) [12]. В Черном и Дальневосточных морях выявлена зависимость видового состава и плотности пропагул грибов от гранулометрического состава донных отложений, при этом максимальное количество видов и наивысшая численность пропагул отмечены в илистых грунтах [8, 11, 12]. В Белом море не выявлено какой-либо связи видового состава и численности пропагул грибов с глубиной и типом грунта [2].

Грибы в батииали и абиссали

К глубоководным принято относить грибы, растущие и размножающиеся на глубинах более 500 м (Kohlm., Kohlm. 1979). Микромицеты обнаружены в водной толще, донных отложениях, на створках моллюсков и целлюлозосодержащих субстратах в глубоководных районах Атлантического, Тихого и Индийского океанов, в Аравийском и Черном морях на глубинах от 600 м до 10500 м [8, 9, 20, 25, 28, 32]. В глубоководных донных отложениях преобладают эвритопные грибы из родов *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* и др. В Атлантическом и Тихом океанах на древесине обнаружены 5 новых для науки



видов облигатно морских грибов: *Abyssomyces hydrozoicus* Kohlm., *Allescheriella bathygena* Kohlm., *Bathyascus vermispurus* Kohlm., *Oceanitis scuticella* Kohlm. и *Periconia abyssa* Kohlm. [20].

Грибы и соленость морской воды

Морские грибы способны развиваться при широком диапазоне колебаний солености воды и расти даже на средах с дистиллированной водой, при этом галотолерантность грибов может быть широкого и узкого диапазона (табл.).

Таблица

Влияние солености морской воды на рост некоторых грибов

Table

The salinity effect marine water on the growth of selected fungi

Грибы с широкой галотолерантностью	Соленость воды, ‰	Грибы с узкой галотолерантностью	Соленость воды, ‰
<i>Asteromyces cruciatus</i> Moreau & R. Moreau	0 – 100 (90)	<i>Althornia crouchi</i> E.B.G. Jones & Alderman	40 – 100 (80 – 100)
<i>Corollospora maritima</i> Werderm.	0 – 100 (100)	<i>Labyrinthula</i> sp.	35 – 100 (60 – 100)
<i>Dendryphiella salina</i> (G.K. Sutherl.) Pugh & Nicot	0 – 100 (60 – 70)	<i>Ostracoblabe implexa</i> Bornet & Flahault	20 – 100 (70 – 100)
<i>Dendryphiella arenaria</i> Nicot	0 – 100 (20)	<i>Thraustochytrium multirudimentale</i> S. Goldst.	20 – 100 (70 – 100)

Примечание: В скобках указана соленость, соответствующая оптимальному росту грибов (по Jones, 2004).

Note: Figures in brackets indicate the optimum growth (according to Jones, 2004).

В гиперсоленых водоемах Франции (соленость до 300‰) с древесины, погруженной в воду, выделены 19 таксонов грибов, среди них *Phoma* sp., *Pleospora gaudefroyi* Pat., *Leptosphaeria* sp., *Savoryella* sp. Все изоляты оказались устойчивы к солености, но концентрация выше 120‰ подавляла их развитие [23]. В воде Мертвого моря с соленостью 340‰ обнаружены 58 видов мицелиальных грибов, 46 (80%) из которых отнесено к родам *Aspergillus* и *Penicillium*, а также выделен новый для науки вид *Gymnascella marismortui* Buchalo et al. Большинство микромицетов оптимально развивались на средах, приготовленных из расчета 10–30% концентрации солености воды Мертвого моря, однако, некоторые виды росли при солености 175‰ и выше [13].

Грибы *C. maritima*, *Halosphaeria appendiculata* Linder, *Halosphaeriopsis mediosetigera* (Cribb, J. W. Cribb) T. W. Johnson, *Nais inornata* Kohlm., *Savoryella lignicola* E. B. G. Jones, R. A. Eaton, *Clavatospora bulbosa* (Anastasiou) Nakagiri, Tubaki впервые описанные из морских мест обитания, впоследствии были обнаружены также в пресных водах [4, 18].

В воде и донных отложениях устьев рек и ручьев отмечено увеличение численности пропагул и разнообразия грибов за счет микромицетов, характерных для почв наземных ценозов, *Cephalosporium*-подобные несовершенные грибы, виды



родов *Aspergillus*, *Dendryphiella*, *Penicillium* темноокрашенные гифомицеты и стерильные мицелии [2, 12, 26].

Грибы на других гидробионтах

Большинство морских грибов — сапротрофы и развиваются на мертвых растениях и животных. Эвтрофикация и загрязнение морской среды способствуют ослаблению иммунитета гидробионтов и создают условия для массового развития патогенных и оппортунистических видов грибов. Это — широко распространенные сапротрофные грибы, продуцирующие микотоксины или способные при определенных условиях переходить к паразитизму. На водорослях обнаружены 79 видов высших облигатно морских грибов, из которых представители 12 родов — паразиты и 6 родов — симбионты [17]. В 30-х годах XX столетия в северном полушарии произошло значительное сокращение популяции морской травы *Zostera marina* L. в результате поражения ее низшим грибом *Labyrinthula macrocystis* Cienk. [1]. В Черном море на 27 видах макроводорослей обнаружено 67 таксонов грибов, в Японском море на промысловой бурой водоросли *Laminaria japonica* Agesch. (L.) Edmon. выявлено 37 видов микромицетов, в обоих морях преобладали мицелиальные оппортунистические грибы из родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Dendryphiella*, *Stemphylium*, *Fusarium* [1, 5].

В 1963—1969 гг. в территориальных водах Украины, Румынии, Болгарии и Турции (Черное море) наблюдали грибковые эпизоотии рачка *Penilia avirostris* (Dana), вызванные низшим грибом *Hyphochytrium peniliae* N.J. Artemczuk & Zelez., новым для науки видом [1]. В 1990-х годах XX века и начале 2000-х гг. внедрение мицелиального оппортунистического гриба *Aspergillus sydowii* (Bainier & Sartory) Thom & Church в экосистему Карибского моря вызвало катастрофическое сокращение популяции коралла *Gorgonia ventalina* Linnaeus [29].

Оппортунистические грибы (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl., *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire, *Aspergillus niger* Tiegh., *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Speare, *A. ochraceus* G. Wilh., *A. versicolor* (Vuill.) Tirab., *Chaetomium globosum* Kunze, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Penicillium citrinum* Thom, *P. simplicissimum* (Oudem.) Thom, *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) S. Hughes, *Trichoderma viride* Schumach., *T. koningii* Oudem., и другие), накапливающиеся во внутренних органах промысловых двустворчатых моллюсков (*Mizuhopecten yessoensis* Jay, *Mytilus trossulus* Gould, *Crenomytilus grayanus* Dunker, *Mytilus galloprovincialis* Lam., *Mytilus edulis* L.), вызывают микозы и микотоксикозы у человека, наземных и морских животных [3, 6].

Наиболее полно исследованы грибы вызывающие мягкую гниль древесины — разложение погруженных в воду одревесневевших частей растений до мягкого состояния. Эксперименты с высшими облигатно морскими (*Dendryphiella salina* (Suth.) Pugh et Nicot, *Monodictys pelagica* (Johnson) Jones, *Zalerion maritimum* (Linder) Anastasiou) и факультативно морскими грибами (*Alternaria* sp., *Cladosporium herbarum* (Pers.), *Stachybotrys atra* Corda, *Ch. globosum*, *Sordaria fimicola* (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.) показали, что максимальное разложение древесины в море происходит при температурах 15—25 °C и pH — 5,0—8,0. На плавающей древесине (плавнике) обнаруживают большее число видов грибов, чем на закрепленной (субстраты-приманки из древесины). В одних и тех же районах на плавнике выявили 26 и 104 вида, на блоках-приманках 9 и 77, соответственно [11].



На стволах и корнях мангровых растений, погруженных в морскую воду, обнаружено наибольшее число высших облигатно морских видов грибов — 450 (из 500), однако эти данные предварительные, так как исследования проводили всего на 9 видах мангровых растений из 100. Мангровые леса занимают территорию 181 тыс. км² на берегах 112 стран. В лесах Багамских островов выявлено 112 видов грибов, Брунея — 95, Индии — 88, Таиланда — 81, Макао — 6 [19, 30]. На древесине мангрового растения *Acanthus ilicifolius* Linn. обнаружили 120 видов грибов, микромицет *Caryospora mangrovei* K.D. Hyde выделен только на *Xylocarpus granatum* Коен., а *Aigialus mangrovis* Borse и *Eutypa* sp. на *Avicennia alba* Blume [18]. Многие мангровые морские грибы способны поселяться на других субстратах, поэтому встречаются повсеместно в тропиках [21]. На древесине разных видов доминируют облигатно морские грибы из отдела Ascomycota. На листьях мангровых деревьев и других высших растений, погруженных в морскую воду, преобладают широко распространенные сапротрофные факультативно морские грибы из группы Anamorphic fungi [12].

Исследования вертикального распределения грибов в приливной зоне мангровых зарослей выявили их четкую приуроченность к глубинам. В верхней зоне преобладают *Hypoxylon oceanicum* Whalley et al., *Savoryella lignicola*, *Nia vibrissa* R. T. Moore, Meyers, *Sphaerulina oraemaris* Linder, *Marinosphaera mangrovei* K. D. Hyde, в нижней — *Antennospora quadricornuta* (Cribb, & J. W. Cribb) T. W. Johnson, *Marinospora longissima*, *M. calyprata* (Kohlm.) Cavaliere, *Lulworthia* spp., *Halosphaeria appendiculata*, *Amylocarpus encephaloides* Currey, *Digitatispora marina* Doguet, *Remispora maritima* Linder, *R. pilleata* Kohlm., *R. stellata* Kohlm., *Cirrenalia tropicalis* Kohlm., *Clavatospora bulbosa* (Anastasiou) Nakagiri, Tubaki, *Cytospora rhizophorae* Kohlm. & Kohlm., *Periconia prolifica* Anastasiou. Максимальное число видов и наиболее распространенные грибы свойственны центральной зоне. На всех горизонтах присутствовали *Halocyphina villosa* Kohlm. & E. Kohlm., *Halosphaeriopsis mediosetigera* (Cribb, & J. W. Cribb) T. W. Johnson, *Leptosphaeria australiensis* (Cribb, & J. W. Cribb) G. C. Hughes, *Cirrenalia macrocephala* (Kohlm) Meyers, R. T. Moore, *Monodictys pelagica* (Johnson) E. B. G. Jones и *Zalerion maritimum* (Linder) Anastasiou [15, 16, 19, 30].

Древесина, пораженная грибами, становится доступной для нематод, моллюсков, клещей и ракообразных [22, 24]. Известна обоюдная зависимость морских грибов и беспозвоночных-древоточцев: моллюск *Teredo* и равноногий рачок *Limnoria* колонизируют только древесину, предварительно пораженную грибами; а плодовые тела аскомицета *Lulworthia* sp. развиваются только на древесине, перфорированной рачком *L. tripunctata*, который утрачивает способность к воспроизводству, если не питается грибами [14, 22]. В прибрежных водах Индии на мангровом растении *Mangifera indica* отмечены ассоциации грибов со сверлящими моллюсками. На поверхности и внутри древесины обнаружено 33 вида грибов и 8 видов сверлящих моллюсков из родов *Teredo* и *Pholas*. Среди наиболее активных грибов-деструкторов древесины выделяют представителей родов *Halosphaeria*, *Gnomonia*, *Nausitara*, *Martesia*, *Lulworthia*, *Sphaeroma* и виды *Torpedospora radiata* Meyers и *Corollospora pulchella* Kohlm., I. Schmidt, Nair. [31]. Свободноживущих нематод *Viscosia macramphida* Chitwood, *Leptolaimus plectoides* Chitwood привлекают древесина и листья, также пораженные грибами рода *Lulworthia* [24].



Перспективы дальнейших исследований грибов в морской среде

Выяснение топических, трофических и иных связей грибов и беспозвоночных древоточцев представляет несомненный научный и практический интерес. Сплавной лес, рыболовецкие снасти, деревянные суда и сооружения часто настолько повреждаются древоточцами и грибами, что вызывают серьезный экономический ущерб. В Индии и некоторых других тропических странах действует разработанная система страхования деревянных судов от повреждений древоточцами и грибами [11].

Обладая эффективным и разносторонним ферментным аппаратом, высшие морские грибы являются первичными деструкторами растительных и животных остатков в морской среде, они резистентны к действию токсических веществ и способны усваивать углеводороды нефти, серу, фенол. Поэтому специалисты считают перспективным исследование деструкции искусственных материалов в море, а также очистку промышленных и бытовых сточных вод с использованием грибов [10].

Биохимические исследования высших морских грибов выявили большое количество продуцируемых ими биологически активных веществ, перспективных для применения в фармакологии в качестве антибактериальных, антифунгальных и наркотических препаратов. При этом отмечено, что эвритопные грибы, обитающие в морских условиях, вырабатывают вещества химически более активные, чем те же виды, живущие в наземных биотопах [11].

Морские грибы входят в рацион многих гидробионтов, поэтому могут быть источником получения искусственных кормов и биодобавок для многих культивируемых беспозвоночных и рыб.

Можно с уверенностью присоединиться к мнению [11], что по мере освоения Мирового океана использование морских грибов будет приобретать все большее значение. Комплексное исследование морских грибов учеными разных специальностей — микологами, микробиологами, гидробиологами, экологами, биохимиками, химиками — безусловно, в дальнейшем принесет свои результаты, как в области теоретических исследований, так и в решении многих прикладных задач.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Артемчук Н. Я.* Микофлора морей СССР. — М.: Наука, — 1981. — 190 с.
2. *Бубнова Е.Н.* Грибы донных грунтов Кандалакшского залива Белого моря // 2 съезд микологов России «Современная микология в России» (Москва, 16–18 апр., 2008 г.): тез. докл. — М.: Национальная академия микологии, 2008. — Т. 2. — С. 54.
3. *Гаевская А. В.* Паразиты, болезни и вредители мидий (*Mytilus*, *Mytilidae*). III. Грибы (*Fungi*), лишайники (*Mycophycophyta*), растения (*Plantae*). — Севастополь, 2007. — 100 с.
4. *Дудка И. А.* Водные несовершенные грибы СССР. — К.: Наук. думка, 1985. — 187 с.
5. *Зверева Л. В.* Микобиота культивируемой бурой водоросли *Laminaria japonica* // Биол. моря. — 1998. — 24, № 1. — С. 21–25.
6. *Зверева Л.В., Орлова Т.Ю., Стоник И.В., Ушева Л.Н.* Исследование условно-патогенных и токсинообразующих мицелиальных грибов — ассоциантов гидробионтов // X съезд Гидробиологического общества при РАН (г. Владивосток, 28 сентября — 2 октября 2009 г.): тез. докл. — Владивосток, 2009. — С. 150.
7. *Зелезинская-Багрий-Шахматова Л. М., Зайцев Ю. П.* Флора, систематика, морфология и экология высших морских грибов // Гидробиологич. журн. — 1981. — 17. — Вып. 5. — С. 3–15.
8. *Копитина Н. И.* Высшие морские грибы пелагических и донных биотопов северо-западного региона Чёрного моря: Автореф. дис. канд. биол. наук. Севастополь, 2009. — 23 с.



9. *Kriss A. E.* Морская микробиология (глубоководная). — М.: Из-во АН СССР, 1959. — 455 с.
10. *Литвинов М. А., Дудка И. А.* Методы исследования микроскопических грибов пресных и соленых (морских) водоемов. — Л.: Наука, 1975. — 151 с.
11. *Пивкин М. В., Кузнецова Т. А., Сова В. В.* Морские грибы и их метаболиты. — Владивосток, из-во: Дальнаука, 2006. — 247 с.
12. *Слинкина Н. Н.* Грибы аквапочв шельфовой зоны острова Сахалин: Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток, 2009. — 19 с.
13. *Buchalo A.S.* Fungal life in the Dead Sea/ eds. by E. Nevo, A. Oren, S.P. Wasser A.R.G. Ganther Verlag K. G., Ruggell. — 2003—361 p.
14. *Corte A. M.* Osservazioni sul genere *Lulworthia* Suth. E sui suoi rapporti con *Limnoria* Menzies e segnalazioni di altro specie // *Bot. Ital.* — 1975. — 109. — P. 227—237.
15. *Hyde K. D.* Vertical zonal of interstitial, mangrove fungi: Abst. 5-th Int. Symp. Microb. Ecol., (Kyoto, Aug. 27 — Sep. 1, 1989): Kyoto, 1990. — P. 48.
16. *Hyde K. D., Jones E. B. J., Leano E., Poonyth S. B., Vrijmoed L. L. P.* Role of fungi in marine ecosystem // *Biodiversity and conservation.* — 1998. — 7, № 9. — P. 1147—1161.
17. *Hyde K. D., Pointing S. B.* Marine mycology. A Practical Approach. — Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2000. — 370 p.
18. *Jones, E.B.G.* Marine fungi: some factors influencing biodiversity // *Fungal Diversity.* — 2004. — P. 53—73.
19. *Kathiresan K. Bingham B. L.* Biology of mangroves and mangrove ecosystems // *Advances in marine biology.* — 2001. — 40. — P. 81—251.
20. *Kohlmeyer J.* New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615—5315 m) // *Revue de Mycologie.* — 1977. — 41. — P. 189—206.
21. *Kohlmeyer J.* Tropical Marine Fungi // *Marine Ecology.* — 1984. — 5, № 4. — P. 329—378.
22. *Kohlmeyer J., Bebout B.* On the occurrence of marine fungi in the diet of *Littorina angulifera* and observations on the behavior of the periwinkle // *P. S. Z. N. I. Mar. Ecol.* — 1986. — 7, № 4. — P. 333—343.
23. *Mallea M.* Fungi from a Mediterranean salt-pan / M. Mallea // *Bot. Mar.* — 1992. — № 3. — P. 283—290.
24. *Meyers S. P., Hopper B. E.* Studies on marine fungal nematode associations and plant degradation // *Helgol. Wiss. Meeresunfers.* — 1967. — 15. — P. 270—281.
25. *Meyers S. P., Ahearn D. G., Roth F. J., Jr.* Mycological investigations of the Black Sea // *Bull. Mar. Sci. Gulf. and Caribbean.* — 1967. — 17, №3. — P. 576—596.
26. *Mujdaba M.A.* Mycoplancton du Danube inferieur et de la zone marine d'influence // *Cercetări marine. IRCM Constanța.* — 1980. — № 13. — P. 63—75.
27. *Panebianco C.* Temperature requirements of selected marine fungi // *Bot. Mar.* — 1994. — 37, № 2. — P. 157—161.
28. *Raghukumar, C., Damare, S.* Deep-sea fungi. — Occurrence and adaptations *Ph. D. Thesis, Goa University — National Institute of Oceanography, Goa, India,* 2006. — 280 p.
29. *Rypien K. L., Andras J. P. and Harvell C. D.* Globally panmictic population structure in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus sydowii* // *Molecular Ecology.* — 2008. — 17, № 18. — P. 4068—4078.
30. *Sridhar K. R.* Mangrove fungi in India // *Current Science.* — 2004 — 86, № 12. — P. 1586—1587.
31. *Vishwakiran Y. N., Trakur L., Raghukumar S., Yennawar P. L., Anil A.* Spatial and temporal distribution of fungi and wood-borers in the coastal tropical waters of Goa, India // *Botanica Marina.* — 2001. — 44. — P. 225—230.
32. *Zaitsev Y. P., Polikarpov G. G.* Recently discovered new biospheric pelocontour function in the Black Sea reductive bathyal zone // *Journal of the Black Sea / Mediterranean Environment.* — 2008. — 14, №3. — P. 151—165.

Ю.П. Зайцев, Н.І. Копитіна

Одеський філіал Інституту біології південних морів
імені О.О. Ковалевського НАН України, вул. Пушкінська, 37, м. Одеса, 65125,
Україна, тел.: +38 (048)725 09 17
e-mail: yu.zaitsev@paco.net, nade.kopytina@yandex.ru

ГРИБИ У МОРСЬКОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Реферат

Дано огляд опублікованих матеріалів про гриби, як компоненти біоти морів та океанів. Розглянуто розподіл грибів у різних біогеографічних зонах та біотопах світового океану. Показано значення температури та солоності води, глибини, характеру донних відкладень для видового складу та щільності грибних пропагул. Відмічено роль грибів сапрофітів, паразитів, симбіонтів та опортуністів у морських екосистемах, а також трофічні зв'язки морських грибів та безхребетних тварин. Перелічено деякі перспективні напрямки досліджень морських грибів для теоретичних та практичних цілей.

К л ю ч о в і с л о в а: гриби, пелагіаль, бенталь, тварини.

Yu.P. Zaitsev, N.I. Kopytina

Odesa Branch of Institute of Biology of Southern Seas, NASU,
Pushkinska str., 37, Odesa, 65125, Ukraine; tel.: +38 (048) 725 09 17,
e-mail: yu.zaitsev@paco.net; nade.kopytina@yandex.ru

FUNGI IN THE MARINE ENVIRONMENT

Summary

The review of published data on fungi as the components of biota of the seas and oceans is presented. The distribution of fungi in different biogeographical regions and biotopes is considered. The importance of depth, temperature and water salinity, types of bottom sediments for the species composition and number of fungal propagules is revealed. The role of saprophytic, parasitic, symbiotic and opportunistic fungi in marine ecosystems as well as the relations of marine fungi and animals are shown. Some perspective lines of further investigations of marine fungi for theoretical and practical purposes are analysed.

К e y w o r d s: fungi, pelagic and benthic zones, animals.



UDK 582.282.23.017.7

**D.V. Fedorovych¹, M.V. Gonchar^{1,3}, H.P. Ksheminska¹,
T.M. Prokopiv¹, H.I. Nechay¹, P. Kaszycki², H. Koloczek²,
A.A. Sibirny¹**

¹Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Drahomanov str., 14/16, Lviv, 79005, Ukraine

²University of Agriculture in Krakow, al. 29 Listopada 54, 31–425 Krakow, Poland

³University of Rzeszow, Sokołowska str. 26, 36–100 Kolbuszowa, Poland

MECHANISMS OF CHROMATE DETOXIFICATION IN YEASTS

*The main pathway of Cr(VI) (hexavalent chromium) detoxification in microorganisms involves its reduction to Cr(III). Characteristics of chromate reduction in yeasts (isolation, purification and characterization of Cr(III)-biochelated complexes from the culture medium) and the non-enzymatic processes responsible for efficient detoxification of chromate are described. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was shown to be able to reduce chromate extra-cellularly by the formation of at least two types of stable Cr(III)-biochelated complexes. Selenite-resistant mutants of *Phaffia rhodozyma* were studied with respect to their ability to reduce Cr(VI). The cells of selenite-resistant mutant *sit11* which show strong sensitivity toward Cr(VI), generated an increasing pool of a very toxic radical Cr(V). The role of some extracellular agents such as sulfate and riboflavin in Cr(VI) detoxification in the flavin-overproducing yeast *Pichia guilliermondii* was also investigated. Our data on modulation of chromate toxicity by riboflavin provide some evidence for the involvement of riboflavin (or its derivatives) in chromate detoxification. The identification of the extracellular chromate-reducing compounds and elucidation of their role in detoxification of chromate will promote the application of the studied yeast cells for Cr(VI) bioremediation and its transformation to Cr(III) bio-complexes with potential pharmaceutical and nutritional importance.*

Key words: chromate, yeasts, detoxification, Cr(III)-biocomplexes, riboflavin.

Chromium in trace amounts is beneficial to humans, animals, plants and microorganisms; it is an element essential for glucose and fat metabolism, stabilization of the tertiary structure of proteins and nucleic acids [3, 15]. However, at high concentrations it is extremely toxic, mutagenic and carcinogenic, especially in its oxidized hexavalent form Cr(VI). The adverse health effects and diverse cellular and molecular reactions make the research on chromium toxicology and metabolism to be very crucial in terms of both environmental protection and clinical medicine. Parallel studies have been performed at molecular and cellular levels using yeasts, mammalian cells and transgenic mice. However the detailed mechanisms of the cell-chromium interactions are yet to be revealed.

© D.V. Fedorovych, M.V. Gonchar, H.P. Ksheminska, T.M. Prokopiv, H.I. Nechay, P. Kaszycki, H. Koloczek, A.A. Sibirny, 2009



Yeasts which proved to be effective in accumulation of chromium ions and were able to bioconvert them into stable, much less toxic and bioavailable forms, might be applied in the management of chromium-containing wastes, as well as in efforts to produce chromium-enriched biomass, containing biostabilized and nontoxic Cr species for balanced nutrition of mammals and humans [5]. The dual role of chromium in the cell metabolism implies the presence of effective mechanisms for controlling its entry into the cells, accumulation and detoxification. Yeast tolerance to Cr(VI) as well as chromium accumulation inside yeast cells were shown to be dependent on treatment time, metal concentration, biomass density and phase of growth [8, 9, 15].

The main pathway of Cr(VI) detoxification in microorganisms, and particularly in bacteria, involves its reduction to Cr(III) [5, 15]. In yeast, the role of chromate reduction to mitigate the toxicity of Cr(VI) is still open for discussion. It was suggested that the principal reason of the yeast resistance to chromium was a low ability to its absorption [4, 15]. However, for the chromate-resistant strains of *Candida maltosa* a NAD-dependent chromate reducing activity was observed [14]. Recently we have found that some reducing substances, secreted extracellularly by yeast played a significant role in Cr(VI)-detoxification [10, 11]. As a product of chromate reduction, trivalent Cr(III) formed complexes with some specific components of culture liquid which were not adsorbed by the cells. Besides, chromate-resistant mutants of this yeast that exhibited the increased chromate-reducing ability have been selected [2]. At the same time, the rate of chromate reduction did not correlate with chromium accumulation in the cells.

In this article, we present data on chromate reduction in several yeast species including isolation, purification and characterization of Cr(III)-biochelated complexes from the culture liquid. We also describe non-enzymatic processes responsible for efficient detoxification of chromate.

Materials and methods

In this work we have used the following yeast strains: 1) *Pichia guilliermondii* ATCC 201911 (L2) (*MAT-hisX-17*) (*MAT* is a mating type locus, *his* – a locus defining histidine biosynthesis); 2) an industrial strain “Effect” of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; 3) *Phaffia rhodozyma* NRRL Y-10921 as well as its selenite-resistant mutants selected by our team.

The yeast cells were cultivated at 30 °C (for *P. rhodozyma* – at 22 °C) in Erlenmeyer flasks on a circular shaker (200 rpm) in Burkholder’s medium with the addition of 0.1% yeast extract (a semi-rich medium) or 0.2% yeast extract +0.2% peptone (a rich medium). Cr(VI) was added to the medium as potassium chromate. Liquid media were inoculated with the cells from the early stationary growth phase in concentration of 5 mg d.w.cells/l. Yeast biomass was determined turbidimetrically at 600 nm (OD_{600}) using gravimetric calibration. The determination of total chromium content in the cells was performed using either atomic absorption spectrometer AAS-3 (Carl Zeiss, Germany). Cells for analyses were prepared using acid-hydrogen peroxide mineralization as described earlier [7]. The assay of residual Cr(VI) concentration in media was carried out using diphenylcarbazide method [12]. The content of the trivalent chromium was determined by the reaction with Chromazurol S [7]. The presented quantitative data are average values resulting from 2–3 independent experiments. All analytical measurements were performed in 3 duplicates.



Results and discussion

The cells of baker's yeast were shown to be capable of reducing chromate extra-cellularly and to form at least two types of stable Cr(III)-biochelated complexes. Such Cr(III)-complexes, isolated from a cultural liquid of *S. cerevisiae* industrial strain "Effect" grown for 3 days in the presence of 1 mM chromate, were characterized with respect to their molecular weight. Cr(III)-containing compounds were concentrated by freezing-thawing processes and supplied on a column with a molecular sieve Toyopearl HW-40 (80 x 1.4 cm) calibrated by a set of low molecular markers. Two Cr(III)-complexes were isolated differed in molecular weights ($M_I = 440 \pm 40$ and $M_{II} = 380 \pm 30$ Da). For preparative isolation of Cr(III)-biochelates we used ion-exchange chromatography for fractionation of the concentrated extra-cellular liquid from chromate-supplemented culture of *S. cerevisiae*. It was shown that Cr(III)-biochelates could be separated into at least two components on anion-exchanging resin Dowex 1x10 (14 x 2 cm). Both Cr(III)-complexes have a total negative charge. Absorption peaks were observed for Cr(III)-complex I at 572–574 nm and for Cr(III)-complex II – at 579–581 nm (Fig. 1).

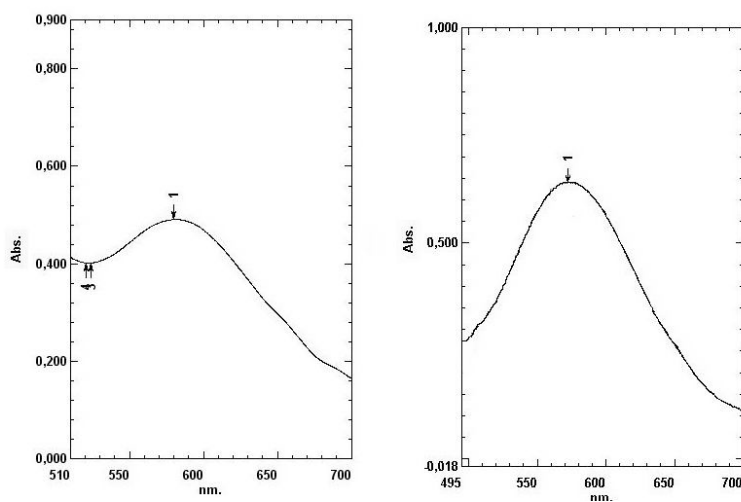


Fig.1. Absorbance spectra of Cr(III)-biocomplexes isolated from a cultural liquid of *S. cerevisiae*

The selenite-resistant mutants of carotene-synthesizing yeast *P. rhodozyma*, isolated by us previously [13] have been studied regarding their ability to reduce Cr(VI) and to produce astaxantin. The obtained results suggest that although the pathways of detoxification of chromate and selenite by *P. rhodozyma* were different, one common reductive type involved in transformation of these compounds was observed. The EPR spectrometry was employed to follow the reduction of chromate applied to cell cultures. It was shown for the case of the selenite-resistant mutant *sit11* which simultaneously revealed sensitivity to chromate, that this phenotype was accompanied with the increasing pool of the very toxic intermediate, free radical Cr(V) ($g=1.98$) generated in extra-cellular medium of the culture (Fig. 2). In contrast to the wild-type strain characterized by a relatively constant Cr(V) pool as observed in medium during incubation with chromate, the chromate-sensitive mutant *sit11* (Fig. 2B) generated gradually increasing pool of Cr(V) species.

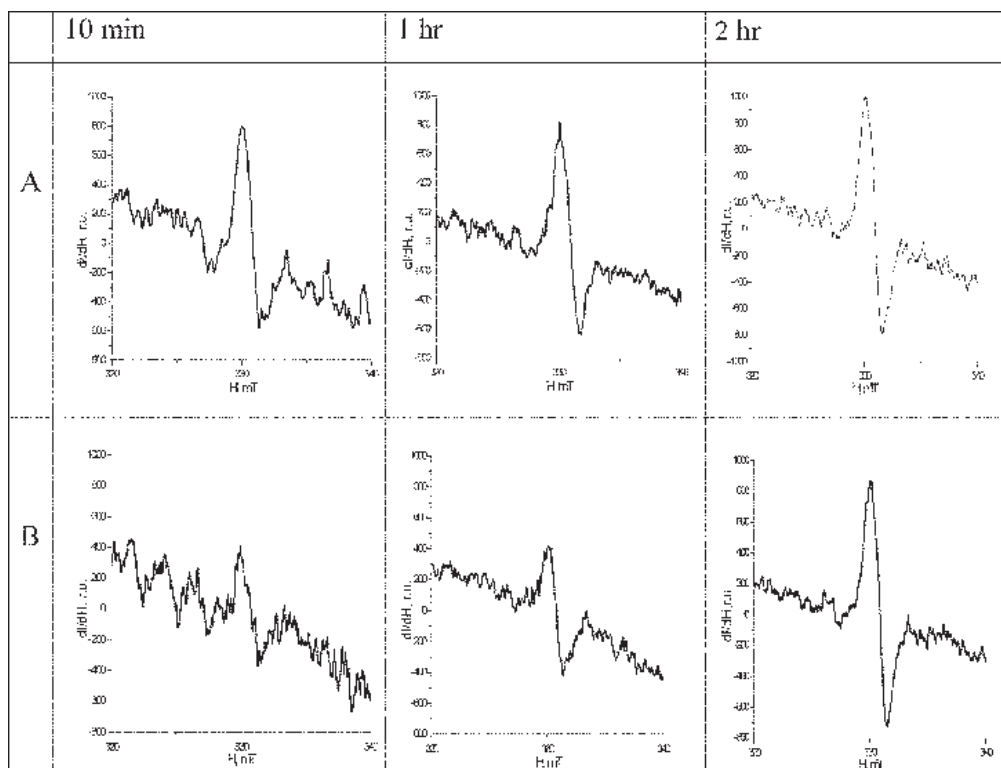


Fig. 2. EPR-spectra of Cr(V) ($g=1.98$) in cultural liquid of *P. rhodozyma* incubated with 1 mM chromate (10 min, 1 and 2 hours)

A – parental (“wild type”) strain as a control; B – mutant *sit11*. The EPR measurements were performed on the X-band spectrometer RADIOPAN using liquid nitrogen cooling system.

The role of some extracellular agents such as sulfate, iron (II), riboflavin, cysteine in Cr(VI) detoxification in flavin-overproducing yeast *P. guilliermondii* was investigated. The presence of sulfate, a typical media constituent, had a strong negative effect on Cr-bioaccumulation. Under conditions of sulfate deprivation, the cellular chromium content was approximately 20 times higher as compared to the cells grown in sulfur-sufficient media. The flavinogenic yeast *P. guilliermondii* responded to Cr(VI) by stimulation of riboflavin (RF) biosynthesis [6]. We hypothesized that the extensive flavinogenesis was a response to Cr(VI) treatment and that it served as a mechanism leading to higher yeast survival under chromate-induced stress. Nevertheless the sensitivity of the studied yeast strains to Cr(VI) did not correlate with the level of flavinogenic activity (data not shown). However when Cr(VI) was added to the cultures that actively synthesized RF the growth inhibition was suppressed. In order to determine the possible role of exogenous RF in diminishing the inhibitory effect of Cr(III) and Cr(VI) on the culture cell growth, *P. guilliermondii* flavinogenic strains UKD-66 and UKD 1453, unable to oversynthesize of RF in the media supplemented with chromate, were used. The yeast growth in the presence of 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RF was investigated and the cellular content of Cr and flavins was monitored. The incubation of biomass (2 $\text{OD}_{600}/\text{ml}$) with chromium and RF was performed during

18 h. In all the cases, the sensitivity of the cells to chromium depended strongly upon presence of exogenous RF. The treatment of the cells with Cr(VI) (0.6 mM) in medium supplemented with RF resulted in an increase of biomass and flavin content (Table), although the addition of RF did not cause any significant changes of cellular Cr content.

It was shown earlier [1] that RF could decrease the nephrotoxic effect of chromate in young and adult rats. Our data on RF protection of *P. guilliermondii* cells against chromium toxicity, for the first time it was provided the evidence on RF involvement in chromium detoxification.

Table

Effect of exogenous RF (200 µg/ml) on the growth, chromium and flavin content in *P. guilliermondii* cells of the strains UKD-66 and 1453 during incubation with chromate (0.6 mM)

Strains	Biomass, mg/ml		Flavins in the cells, µmol/g d.w.		Chromium content in the cells, mg/g d.w.	
	-RF	+RF	-RF	+RF	-RF	+RF
UKD-66	2.16	3.91	43.5	168.3	1.8	1.3
UKD-1453	1.03	3.12	44.2	212.1	1.24	0.8

Identification of the extracellular chromate-reducing compounds and elucidation of their role in detoxification of chromate will promote the application of yeast for chromate bioremediation and its transformation to Cr(III) bio-complexes with potential pharmaceutical and nutritional importance.

This work was supported by the Polish Research Committee grant for the project N N304 326136.

We are thankful to Yurii Usatenko for technical assistance in EPR measurements.

REFERENCES

1. Appenroth D., Shulz O., Winnefeld K. Riboflavin can decrease the nephrotoxic effect of chromate in young and adult rats // *Toxicol. Lett.* – 1996. – 87. – P. 47–52.
2. Babyak L.Ya., Ksheminskaya G.P., Gonchar M.V., Yanovich D.V., Fedorovich D.V. Selection and properties of mutant yeast *Pichia guilliermondii* resistant to chromium Cr(VI) // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2005. – 41. – P. 177–181.
3. Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J.C., Moreno-Sánchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2001. – 25, № 3. – P. 335–347.
4. Czaky-Vür K., Batiu M., Raspor P., Sipiczki M., Pesti M. Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1999. – 178, № 1. – P. 109–115.
5. Demirci A., Pometto A.L. Enhanced organically bound chromium yeast production // *J. Agric. Food. Chem.* – 2000. – 48. – P. 531–536.
6. Fedorovych D., Kszeminska H., Babjak L., Kaszycki P., Kołoczek H. Hexavalent chromium stimulation of riboflavin synthesis in flavinogenic yeast // *BioMetals.* – 2001. – 14. – P. 23–31.



7. Honchar T. M., Ksheminska H. P., Patsay I. O., Huta O. M., Gonchar M. V. Assay of chromium(III) in yeast cultures using Chromazurol S and surfactants for monitoring chromate remediation processes // *Biotechnology (Kyiv)*.— 2008. — 1, № 4. — P. 85–94.

8. Kaszycki P., Fedorovych D., Ksheminska H., Babjak L., Wojcik D., Koloczec H. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions // *Microbiol. Res.* — 2004. — 159. — P. 11–18.

9. Ksheminska H., Fedorovych D., Babyak L., Yanovych D., Kaszycki P., Koloczec H. Chromium (III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera // *Process Biochem.* — 2005. — 40. — P. 1565–1572.

10. Ksheminska H. P., Honchar T. M., Gayda G. Z., Gonchar M. V. Extra-cellular chromate-reducing activity of the yeast cultures // *Centr. Europ. J. Biol.* — 2006. — 1. — P. 137–149.

11. Ksheminska H., Fedorovich D., Honchar T., Ivash M., Gonchar M. Yeast tolerance to chromium depends on extra-cellular chromate reduction and Cr(III)-chelation // *Food Technol. Biotechnol.* — 2008. — 46. — P. 420–427.

12. Marchart H. Reaction of Chromium with Diphenylcarbazide and Diphenylcarbazone // *Anal. Chim. Acta.* — 1964. — 30. — P. 11–17 (in German).

13. Nechai H. Isolation spontaneous mutants of carotene-synthesizing yeast *Phaffia rhodozyma* which are resistant to sodium selenite // *Abs. II Intern. Conference of young scientist "Biology: from molecular to biosphere"* (Kharkiv, Nov. 2007). — 2007.— P. 386.

14. Ramirez-Ramirez R., Calvo-Múndez C., Avila-Rodríguez M., Lappe P., Ulloa M., Vázquez-Jubrez R., Gutiérrez-Corona JF. Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry // *Antonie Van Leeuwenhoek.* — 2004. — 85, № 1. — P. 63–68.

15. Raspor P, Batic M, Jamnik P, Josic D, Milacic R, Pas M, Recek M, Rezac-Dereani V, Skrt M. The influence of chromium compounds on yeast physiology (a review) // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* — 2000. — 47. — P. 143–173.

**Д.В. Федорович¹, М.В. Гончар^{1,3}, Г.П. Кшеминская¹, Т.М. Прокопів¹, Г.И. Нечай¹,
П. Кашицкі², Г. Колочек², А.А. Сибірний¹**

¹Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова 14/16,
Львов, 79005, Украина;

²Краковский аграрный университет, пр. 29 Листопада 54, 31–425 Краков, Польша;

³Жешувский университет, ул. Соколовская 26, 36-100 Кольбушова, Польша

МЕХАНИЗМЫ ДЕТОКСИКАЦИИ ХРОМАТА У ДРОЖЖЕЙ

Реферат

Основным путем детоксикации Cr(VI) у микроорганизмов является его восстановление к Cr(III). Приведены данные о редукции хромата (выделение, очистка и характеристика Cr(III)-биохелатирующих комплексов из культуральной жидкости), а также описаны неферментативные процессы, обеспечивающие эффективную детоксикацию хромата. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* способны к внеклеточному восстановлению хромата с образованием, по крайней мере, двух типов стабильных Cr(III)-биохелатирующих комплексов. Исследована способность к восстановлению Cr(VI) селенитрезистентных мутантов дрожжей *Phaffia rhodozyma*. Показано, что клетки селенитрезистентного мутанта *sit11*, обладающие повышенной чувствительностью к Cr(VI), при инкубации с хроматом образуют стабильный пул очень токсичного радикала Cr(V). Исследована роль некоторых внеклеточных агентов, в частности сульфата и рибофлавина, в детоксикации Cr(VI) у дрожжей *Pichia*



guilliermondii, способных к сверхсинтезу рибофлавина. Приведенные данные о влиянии рибофлавина на изменение токсичности хромата свидетельствуют об участии рибофлавина (или его производных) в детоксикации хромата. Идентификация внеклеточных хроматредуцирующих веществ и выяснение их роли в детоксикации хромата свидетельствуют о возможности использования дрожжевых клеток для биоремедиации хромата, а также превращении его в Cr(III)-биокомплексы, имеющие фармацевтическое и кормовое значение.

К л ю ч е в ы е с л о в а: хромат, дрожжи, детоксикация, Cr(III)-биокомплексы, рибофлавин.

**Д.В. Федорович¹, М.В. Гончар^{1,3}, Г.П. Кшемінська¹, Т.М. Прокопів¹, Г.І. Нечай¹,
П. Кашицкі², Г. Колочек², А.А. Сибірний¹**

¹Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова 14/16, Львів, 79005, Україна;

²Краківський аграрний університет, пр. 29 Листопада 54, 31–425 Краків, Польща;

³Жешувський університет, вул. Соколовська 26, 36-100 Кольбушова, Польща

МЕХАНІЗМИ ДЕТОКСИКАЦІЇ ХРОМАТУ У ДРІЖДЖІВ

Реферат

Основним шляхом детоксикації Cr(VI) у мікроорганізмів є його відновлення до Cr(III). Представлено дані з редукції хромату (виділення, очищення і характеристика Cr(III)-біохелатуючих комплексів з культуральної рідини) та описано неферментативні процеси, що забезпечують ефективну детоксикацію хромату. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* здатні до позаклітинного відновлення хромату з утворенням щонайменше двох типів стабільних Cr(III)-біохелатуючих комплексів. Вивчено здатність селеніт-резистентних мутантів дріжджів *Phaffia rhodozyma* до відновлення Cr(VI). Показано, що клітини селенітрезистентного мутанта *sit11*, які володіють підвищеною чутливістю до Cr(VI), при інкубації з хроматом утворюють стабільний пул дуже токсичного радикалу Cr(V). Досліджено роль деяких позаклітинних агентів, зокрема сульфату і рибофлавіну, у детоксикації Cr(VI) у дріжджів *Pichia guilliermondii*, здатних до надсинтезу рибофлавіну. Наведені дані про вплив рибофлавіну на зміну токсичності хромату свідчать про участь рибофлавіну (або його похідних) у детоксикації хромату. Ідентифікація позаклітинних хроматвідновлювальних сполук та з'ясування їх ролі в детоксикації хромату свідчать про можливість використання клітин дріжджів для біоремедіації хромату та перетворенні його в Cr(III)-біокомплекси, що мають фармацевтичне та кормове значення.

К л ю ч о в і с л о в а: хромат, дріжджі, детоксикація, Cr(III)-біокомплекси, рибофлавин.



**Mariola Paściak¹, Ewelina Kasprów¹, Ying Huang²,
Andrzej Gamian¹**

¹Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland, tel. +48 71 370 99 22, e-mail: pasciak@iitd.pan.wroc.pl

²Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, PR China.

**POLAR LIPIDS OF *RUANIA ALBIDIFLAVA*,
A NOVEL MEMBER OF THE SUBORDER
*MICROCOCINEAE***

Ruania albidiflava represents a novel species and new genus within the suborder Micrococineae in Actinobacteria classis. The aim of the studies was to establish a polar lipid profile of *Ruania* and to compare it with other representatives of actinobacteria. Additionally, isolation, purification and chemical characteristics of major lipid compounds were elaborated. Major lipids were isolated using column adsorption chromatography and purified by TLC and high performance liquid chromatography. The polar lipids of *Ruania* were phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and two unknown lipids containing sugar and phosphorus. GLC-MS and methylation analysis of sugar part of major glycolipids revealed the presence of glycerol, inositol; and terminal residues of mannose and galactosamine. Fatty acids were mainly iso and anteiso C15:0 branched. Comparative TLC showed its glycolipid profile of *Ruania* different from previously reported for *Rothia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* and *Propionibacterium*, but was similar to *Oerskovia* which belongs to Micrococineae suborder.

Key words: bacterial lipids, glycolipids, *Ruania*, chemical markers.

Actinobacteria class was introduced by Stackebrandt and coworkers in 1997 and contains phylogenetically related microorganisms on the basis of 16 S rRNA and rDNA sequence similarity, previously known as actinomycetes [10].

During the past several years numerous novel taxa in the class *Actinobacteria* were cultured and described. One of them is *Ruania albidiflava*, which represents a novel species and new genus within the suborder *Micrococineae* [3]. Besides that new families in this suborder are created, *Ruania* up to now represents a separate genus [4] and the nearest phylogenetic neighbour was determined as *Georgenia muralis* [3].

The strain was isolated from farmland soil from Shandong province in China [3]. Characteristic feature of this genus is new murein type, L-Lys—Gly—L-Glu—L-Glu (A4 α) in the peptidoglycan of a cell wall.

Valuable markers in chemotaxonomy are polar lipids i.e. phospho- and glycolipids. Phospholipids are broad and important markers in actinomycete taxonomy [5]. The early observations showed that polar lipid profile was useful in the differentiation of actinomycetes and allied taxa giving the reference glycolipid



patterns. Studies of our group revealed some specific glycolipids markers f. ex. in *Propionibacterium* [9], *Rothia* [8], *Saccharopolyspora* [2] and many other genera [6].

The aim of the study was to establish a polar lipid profile of *Ruania* and to compare it with other representatives of actinobacteria. Additionally, isolation, purification and chemical characteristics of major lipid compounds were performed.

Materials and methods

Ruania albidiflava PCM 2644^T (PCM – Polish Collection of Microorganisms) was originally obtained from Chinese partners. Strains used in comparative experiments: *Micrococcus luteus* PCM 525^T, *Rothia dentocariosa* PCM 2249^T, *Propionibacterium propionicum* PCM 2431^T and *Oerskovia xantineolytica* PCM 2385^T.

Ruania was grown on Rich medium [3] on a rotary shaker under aerobic conditions at 37 °C for 48 h. *Micrococcus luteus*, *Rothia dentocariosa* and *Oerskovia xantineolytica* were cultivated on medium 79 [6] but *Propionibacterium propionicum* according to [9].

After cultivation biomass was centrifuged (6000rpm, 20 min) and washed twice with phosphate buffer (PBS).

The wet biomass was extracted twice with chloroform-methanol (2:1 v/v) [7]. The obtained lipid samples were analyzed by thin layer chromatography using specific spray reagents: vanillin, orcinol, ninhydrin and Dittmer & Lester reagent for phosphorus [7].

Major lipids were isolated using column adsorption chromatography and purified by TLC and high performance liquid chromatography [9].

Fatty acid, neutral sugar and methylation analyses were performed by GLC-MS [9].

MALDI-TOF mass spectra were performed in the positive ion mode with DHB matrix on Kratos Kompact-SEQ instrument.

Results and discussion

After 48 h incubation of *R. albidiflava* cells in submerged culture the biomass was obtained with yield 11.8 g from 1l of medium. Morphology of colonies and Gram staining smears are presented in Fig. 1.

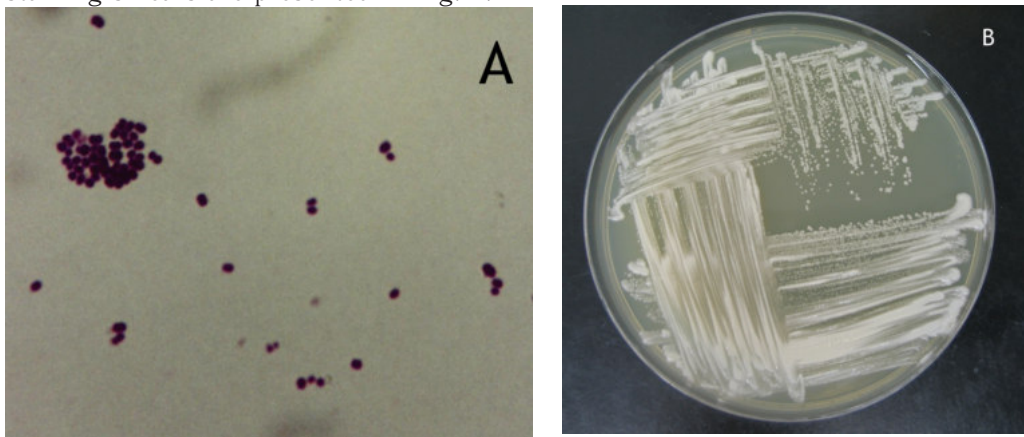


Fig. 1. *Ruania albidiflava*

A – Gram stain of cells from Rich medium (48h submerged culture, magnification 1000x;
B – colonies on nutrient agar (72h, 28 °C)

Chloroform-methanol extract of bacterial biomass of *R. albidiflava* was obtained with yield of 0.32%. The polar lipids of *Ruania* were phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and two unknown lipids labelled G1 and G2. TLC analysis of these compounds showed that they were reactive with vanillin, orcinol reagent and Dittmer and Lester reagent, so these lipids contained sugar and phosphorus (Fig. 2). No reaction with ninhydrin was reported (Fig. 2).

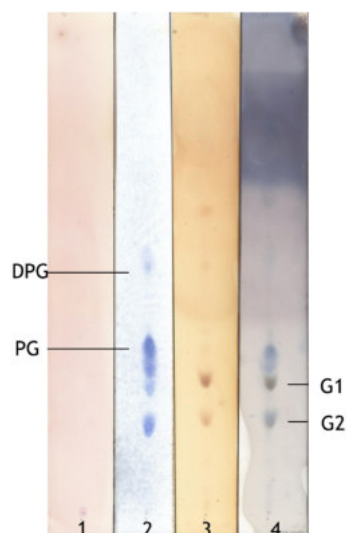


Fig. 2. TLC chromatogram of lipid extract from *Ruania albidiflava*

Abbreviation: G1, G2 – major lipid compounds, DPG – diphosphatidylglycerol, PG – phosphatidylglycerol. Solvent system: chloroform – methanol – water (65:25:4 v/v/v), detection: 1 – ninhydrin reagent, 2 – Dittmer and Lester reagent, 3 – orcinol reagent, 4 – vanillin reagent.

Comparative TLC showed that glycolipid profile of *Ruania* differed from previously reported in *Rothia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* and *Propionibacterium*, but was similar to *Oerskovia xantineolytica* which belongs to *Micrococccineae* suborder (Fig. 3).

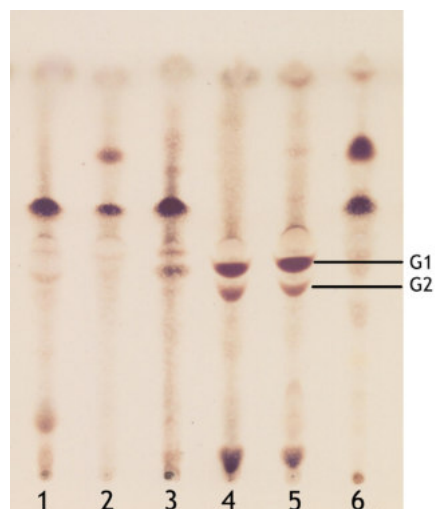
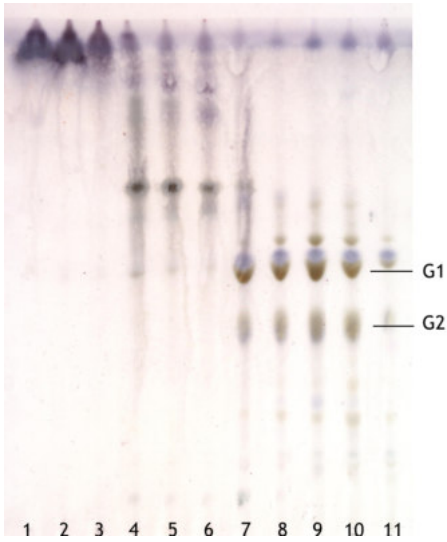


Fig. 3. TLC chromatogram of glycolipids from *Actinobacteria*

1 – *Micrococcus luteus*, 2 – *Arthrobacter globiformis*, 3 – *Rothia dentocariosa*, 4 – *Oerskovia xantineolytica*, 5 – *Ruania albidiflava*, 6 – *Propionibacterium propionicum*. Solvent system like on Fig. 2, detection: orcinol reagent.

Glycolipids G1 and G2 were separated and purified by different chromatographic methods. The crude lipid extract of *R. albidiflava* was separated on a column of silica gel eluted with solvents: chloroform, acetone and methanol (Fig. 4).



The methanol fractions were partially purified by preparative TLC. Pure glycolipids were obtained by HPLC.

Fig. 4. TLC of *Ruania albidiflava* lipid fractions from column chromatography eluted subsequently with chloroform, acetone and methanol

1-3 – chloroform fractions, 4-6 – acetone fractions, 7-10 – methanol fractions, 11-crude lipid extract. Solvent system as on Fig. 2, detection: vanillin reagent.

GLC-MS analysis of sugar part of major glycolipids revealed the presence of glycerol, inositol, mannose and galactosamine in both compounds (Fig. 5). Methylation analysis showed that mannose and galactosamine were in terminal positions.

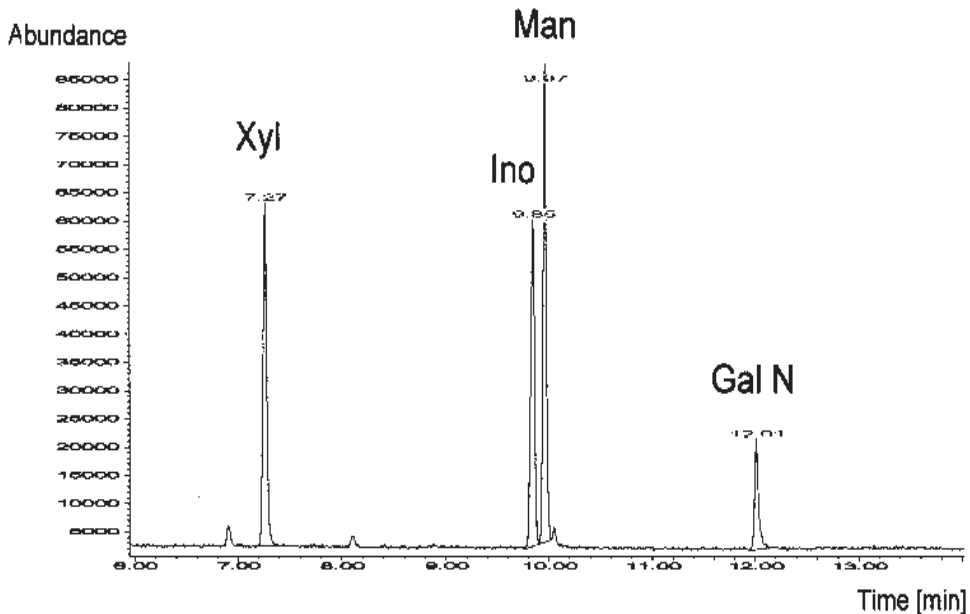


Fig. 5 GLC/MS chromatogram of the sugars present in glycolipid G1 of *R. albidiflava*

Peak 1 – (Rt=7.27 min) xylose represents internal standard, 2 – (Rt=9.85 min) inositol, 3 – (Rt=9.97 min) mannose, 4 – (Rt=12.01) galactosamine.

Fatty acids compositions of both glycolipids were similar and were mainly *iso* and *anteiso* branched pentadecanoic acids (Tab.). Similar results were obtained for whole cell fatty acids analysis in *Ruania albidiflava* [3].

Fatty acids composition of major lipid compounds of *R. albidiflava*

Fatty acids	Retention time Rt [min]	GL 1 (%)	GL 2 (%)
<i>n</i> C _{14:0}	5.40	14.4	13.9
<i>iso</i> C _{15:0}	6.29	26.6	20.4
<i>anteiso</i> C _{15:0}	6.40	30.8	43.1
<i>n</i> C _{15:0}	6.76	3.1	tr
<i>iso/anteiso</i> C _{16:0}	7.62	6.3	4.0
<i>n</i> C _{16:0}	8.10	15.0	18.6
<i>n</i> C _{17:0}	9.02	3.8	tr

MALDI-TOF analysis of intact glycolipids revealed that molecular mass of G2 was lower than G1. On MALDI spectra four major peaks were seen, differed by 14 mass units, that was connected with heterogeneity of fatty acids (Fig. 6). The difference in molecular mass between G2 and G1 indicates probably loss of one fatty acid residue.

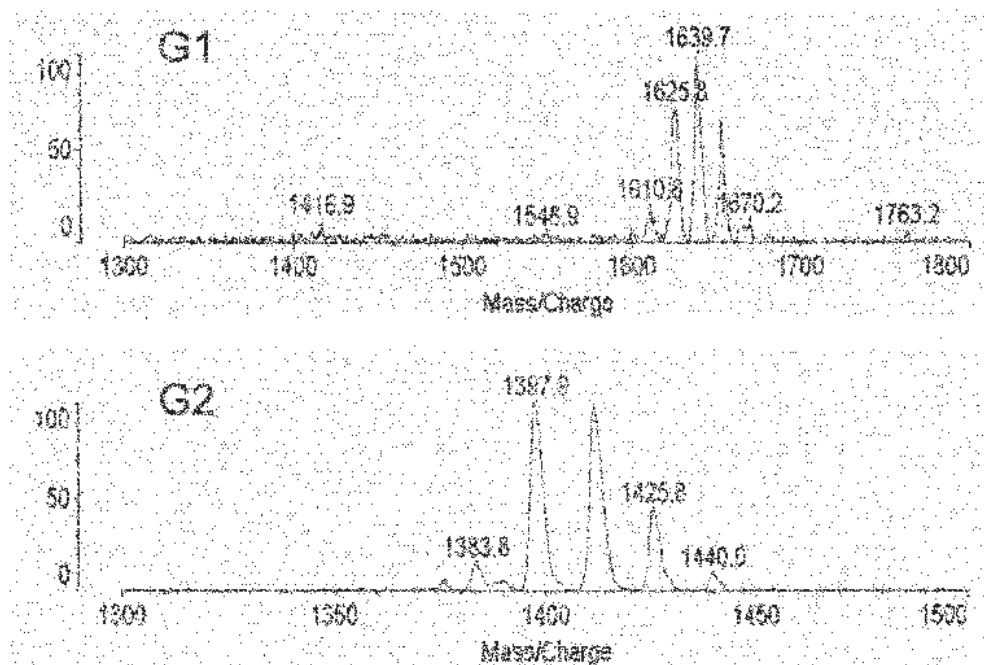


Fig. 6 MALDI-TOF mass spectra of glycolipid G1 and G2 of *Ruania albidiflava* Kratos Kompact-SEQ instrument, linear positive mode, DHB matrix.

Lipid compounds of *R. albidiflava* appeared to be related to phosphatidylinositol mannosides (PIM). PIM are abundant in some actinobacteria f. ex. in *Mycobacterium* and are involved in the interactions of mycobacteria with host cells [11, 1].

Ruania albidiflava represents characteristic lipid profile consisted of two unknown lipid compounds, both belonging to glycerophospholipids.

REFERENCES

1. de Libero G., Lucia M., Recognition of lipid antigen by T cells // Nature Reviews. – 2005. – 5. – P. 484–496.
2. Gamian A., Mordarska H., Ekiel I., Ulrich J., Szponar B., Defaye J. Structural studies of the major glycolipid from *Saccharopolyspora* genus // Carbohydr. Res. – 1996. – 296. – P. 55–67.
3. Gu Q., Paściak M., Luo H., Gamian A., Liu Z., Huang Y. *Ruania albidiflava* gen. nov., sp. nov., a novel member of the suborder *Micrococcineae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – 57. – P. 809–814.
4. Hamada M., Iino T., Tamura T., Iwami T., Harayama S., Suzuki K. *Serinibacter salmoneus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the intestinal tract of a fish, and emended descriptions of the families *Beutenbergiaceae* and *Bogoriellaceae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009; 0: ijs.0.011106-0v1-ij.0.011106-0.
5. Lechevalier M.P., Stern A.E., Lechevalier H.A. Phospholipids in the taxonomy of actinomycetes. in: Actinomycetes, eds.: K.P. Schaal, G. Pulverer // Zentbl. Bakteriol. Hyg. 1 Abt Suppl 11. – Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1981. – P. 111–116.
6. Mordarska H. Taxonomic value of glycolipids of actinomycetes and allied taxa // The Actinomycetes. – 1985/1986. – 19. – P. 11–32.
7. Mordarska H., Paściak M.: A simple method for differentiation of *Propionibacterium acnes* and *Propionibacterium propionicum* // FEMS Microbiology Letters. – 1994. – 123. – P. 325–329.
8. Paściak M., Holst O., Lindner B., Mierzchała M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A. Structural and serological characterization of the major glycolipid from *Rothia mucilaginoso* // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – 1675. – P. 54–61.
9. Paściak M., Holst O., Lindner B., Mordarska H., Gamian A. Novel bacterial polar lipids containing ether linked alkyl chains. The structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T) // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 3948–3956.
10. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1997. – 47. – P. 479–491.
11. Vergne I. and Daffü M. Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells // Frontiers in Bioscience. – 1998. – 3. – P. 865–876.

М. Пащак¹, Э. Каспров¹, Й. Хуанг², А. Гамиан¹

¹Институт иммунологии и экспериментальной терапии имени Людвика Хиршфельда, Польская Академия наук, ул. Рудольфа Вейгля, 12, 53-114, Вроцлав, Польша; тел.: + 48 71 370 99 22, e-mail: pasciak@iitd@pan.wroc.pl

²Институт микробиологии, Академия наук Китая, Бейинг, 100101, Китай

ПОЛЯРНЫЕ ЛИПИДЫ *RUANIA ALBIDIFLAVA* – НОВОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ПОДПОРЯДКА *MICROCOCCINEAE*

Реферат

Ruania albidiflava представляет собой новый вид и род подпорядка *Micrococcineae* в классе *Actinobacteria*. Целью исследований было изучение профиля полярных липидов *Ruania* и сравнение его с профилями других представителей актинобактерий. Дополнительно было проведено выделение, очистка и изучение химических характеристик основных липидных соединений. Выделение основных липидов осуществляли методом колонково-адсорбционной хроматографии, а очи-



щали методами тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полярные липиды *Ruania* были представлены фосфатидилглицеролом, дифосфатидилглицеролом и двумя неизвестными липидами, содержащими сахар и фосфор. Газово-жидкостная хроматография—масс-спектрофотометрия и метиляционный анализ сахаров большинства гликолипидов выявили наличие глицерола, инозитола и терминальных остатков маннозы и галактозамина. Жирные кислоты были представлены в основном разветвленными изо- и антиизо- С15:0. Сравнительная тонкослойная хроматография показала, что гликолипидный профиль *Ruania* отличался от ранее изученных профилей *Rothia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* и *Propionibacterium*, но был схож с таковым у *Oerskovia*, принадлежащих к подпорядку *Micrococccineae*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериальные липиды, гликолипиды, *Ruania*, химические маркеры.

М. Пашак¹, Е. Каспров¹, Й. Хуанг², А. Гаміан¹

¹Інститут імунології і експериментальної терапії імені Людовіка Хіршфельда, Польська Академія наук, вул. Рудольфа Вейгля, 12, 53-114, Вроцлав, Польща
тел.: + 48 71 370 99 22, e-mail: pasciak@iitd@pan.wroc.pl

²Інститут мікробіології, Академія наук Китаю, Бейїнг, 100101, Китай

ПОЛЯРНІ ЛІПІДИ *RUANIA ALBIDIFLAVA* – НОВОГО ПРІДСТАВНИКА ПІДПОРЯДКУ *MICROCOCCCINEAE*

Реферат

Ruania albidiflava являє собою новий вид і рід підпорядку *Micrococccineae* у класі *Actinobacteria*. Метою досліджень було вивчення профілю полярних ліпідів *Ruania* і порівняння його з профілем інших представників актинобактерій. Додатково було проведено виділення, очищення та вивчення хімічних характеристик основних ліпідних сполук. Виділення основних ліпідів здійснювали методом колонково-адсорбційної хроматографії, а очищення методами тонкошарової хроматографії і вискоефективної рідинної хроматографії. Полярні ліпіді *Ruania* були представлені фосфатидилглицеролом, дифосфатидилглицеролом та двома невідомими ліпідами, які містять цукор та фосфор. Газо-рідинна хроматографія-масспектрометрія та метиляційний аналіз цукру більшості гліколіпідів виявили наявність глицеролу, інозитолу та термінальних залишків манози і галактозаміну. Жирні кислоти були представлені в основному розгалуженими ізо- та антиізо- С15:0. Порівняльна тонкошарова хроматографія показала, що гліколіпідний профіль *Ruania* відрізнявся від раніше вивчених профілів *Rothia*, *Arthrobacter*, *Micrococcus* і *Propionibacterium*, але був подібним до таких у *Oerskovia*, що належать до порядку *Micrococccineae*.

К л ю ч о в і с л о в а: бактеріальні ліпіді, гліколіпіді, *Ruania*, хімічні маркери.



O.G. Mameeva, A.N. Ostapchuk, S.S. Nagornaya, V.S. Podgorsky

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

ANALYSIS OF THE 2-PHENYLETHANOL PRODUCTION BY YEASTS GENUS *KLUYVEROMYCES*

The present study is focused on the determination of the 2-phenylethanol production by yeasts genus Kluyveromyces. The most productive strain was K. marxianus UCM Y-305. It can be concluded that 2-phenylethanol production by K. marxianus UCM Y-305 can be improved from 0.0268 g/l to 0.37 g/l by selecting the suitable cultivating conditions.

Key words: Kluyveromyces marxianus, producer, 2-phenylethanol, conditions.

Many yeasts have been found to produce *de novo* odours compounds with fruity or floral flavours [1–5, 7]. The yeasts of the genus *Kluyveromyces* can produce significant amounts of important flavor compound with the rose-like odor 2-phenylethanol (2-PE) and it can achieve high product yields; this depends on different cultivation conditions. Previously five strains of *K. marxianus* and one strain of *K. lactis* by Etschmann et al. (2003) [2], *K. marxianus* ATCC 10022 by Medeiros et al. (2001) [8], *K. marxianus* CBS 5670 by Wittmann et al. (2002) [7], twenty-one yeast strains of *K. marxianus* by Fabre et al. (1997) [9] were tested for 2-PE production with high product yields. From this yeasts *K. marxianus* are receiving an increasing interest for the development of biotechnological production processes for 2-phenylethanol [2, 7]. It is one of the best producers of 2-PE described in the literature [1–3, 7]. Also, *K. marxianus* is Crabtree-negative which is an advantage for future production processes, because the ethanol formation as a toxic by-product under aerobic conditions can be avoided [10].

The purpose of the present study is to determine the levels of the 2-phenylethanol production by yeasts genus *Kluyveromyces* under the influence of different conditions.

Materials and methods

The 20 yeast strains *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. africanus*, *K. lactis var. lactis*, *K. lactis var. drosophilum*, *K. thermotolerans*, *K. wickerhamii* from the collection of yeasts (UCM) of the Industrial Microorganisms Physiology Department, Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev were used in this study.

The yeasts inoculums (10^6 – 10^7 cells/ml) were grown in media for initial screening (medium № 1), containing (g/l): 80.0 sucrose, 7.0 L-phenylalanine, 22.8



$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10.3 citric acid, $0.5 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.17 Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, adjusted to pH 5.0 [2] and medium № 2, containing (g/l): 77.0 glucose, 7.0 L-phenylalanine, $0.5 \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.17 Bacto Yeast Nitrogen Base without amino acids, additionally amended $1.25 \text{ KH}_2\text{PO}_4$ and $0.16 \text{ K}_2\text{HPO}_4$, pH 5.0 [7].

Sucrose was determined by cleavage with invertase and measuring glucose concentration with by the dinitrosalicylic acid method [6].

1 ml aliquot of sell suspension (10^6 – 10^7 cell/ml) was transferred to a test-tube containing 9 ml of medium: 1–8% carbon sources, 0.05–0.25% L-phenylalanine, and 0.25–1.25% yeast extract. The effect of carbon sources (glucose, sucrose, maltose, trehalose, raffinose, and ethanol), cultivating temperatures (12–14 °C, 20–22 °C, 28–30 °C, and 42–48 °C), pH value (2, 4, 5, 7, and 9), medium amount (50, 100 and 150 ml) on the production of 2-phenylethanol and biomass production were determined. The effect of the various concentration of sucrose in medium from 1% to 8% on growth of yeast biomass and a level of synthesis 2-phenylethanol were investigated.

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

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

Results and discussion

It was determined that the presence of the 2-phenylethanol in the medium reaches the maximal values in the beginning of stationary growth phase (18–24 h, strain specific). Among the twenty yeast strains tested, nine strains *K. marxianus* produced 2-phenylethanol. These strains were isolated previously from wine and beer making industries. *K. marxianus* UCM Y-305 gained the highest yield at 0.0268 g/l after 18 h of cultivation and reached biomass yield $1.54 \pm 0.16 \text{ g/l DWB}$ (tab.). The strains *K. lactis*, *K. africanus*, *K. lactis var. lactis*, *K. lactis var. drosophilorum*, *K. thermotolerans*, *K. wickerhamii* did not exhibit any 2-phenylethanol production.

High concentration of precursor of carbon source (sucrose or glucose), L-phenylalanine provide shift of biochemical reactions for 2-phenylethanol syntheses that is more typical for *Kluyveromyces* yeasts [2, 3, 5, 7]. Different carbon sources in the culture media also resulted in the changes of the qualitative and quantitative production of aromatic compounds by microorganisms [4].



The initial analysis of *K. marxianus* yeast strains ability to synthesize 2-phenylethanol

<i>K. marxianus</i> UCM Y-	Medium № 1 (Etschmann M.M.W. et al., 2003)		Medium № 2 (Wittmann C. et al., 2002)	
	2-PE concentration, g/l	Biomass, g/l CDW	2-PE concentration, g/l	Biomass, g/l CDW
12	0.0189	1.69 ± 0.11	0.0203	1.78 ± 0.10
13	0.0112	1.78 ± 0.10	0.0145	1.50 ± 0.13
17	0.0151	1.57 ± 0.10	0.0141	1.62 ± 0.15
301	0.0242	1.67 ± 0.15	0.0261	1.36 ± 0.10
305	0.0268	1.54 ± 0.16	0.0271	1.50 ± 0.10
320	0.0175	1.66 ± 0.10	0.0177	1.42 ± 0.12
2096	0.0098	1.58 ± 0.20	0.0099	1.66 ± 0.20
2098	0.0127	1.79 ± 0.14	0.0143	1.58 ± 0.10
2387	0.0080	1.54 ± 0.16	0.0086	1.67 ± 0.12

Obtained results revealed that among six carbon sources tested, sucrose was suitable carbon sources for *K. marxianus* UCM Y-305 resulting in production high amounts of 2-phenylethanol (Fig. 1). In the medium containing 1–8% sucrose, the production of biomass increased, but the production of 2-phenylethanol was found to be the highest at 8% (Fig. 2). The same results were obtained after studying the ranges of the L-phenylalanine and yeast extract. It was established that the highest level of biomass and 2-PE synthesized at 1.25% yeast extract and 0.25% L-phenylalanine in cultivating medium. This phenomenon may be caused by high sucrose concentration like inhibitory factor (increasing osmotic pressure due to increasing sucrose concentration) for 2-phenylethanol and biomass production [4]. We can note that the yeast extract demonstrated its ability to affect 2-phenylethanol syntheses. This could be explained by the fact that yeast extract in addition to providing adequate nitrogen contains various vitamins increased the yeast strains the growth. The received results completely coincided with the results of other authors [4, 11]. Previously, we received such results for *S. cerevisiae* UCM Y-514 and UCM Y-524 which confirmed this statement [12]. The further increasing of the sucrose concentrations (up to 15%, data are not shown) in the media of not reduced amounts of the 2-phenylethanol.

Medium contained 0.25% yeast extract, 0.05% L-phenylalanine and 5.0% carbon source.

The final pH ranged from 5.0 to 3.2–4.8 in media with different carbon sources. This is probably due to the production of 1–2% acidic acid by tested yeasts strains under these conditions (Fig. 1B). Significantly higher amount of 2-phenylethanol was detected in medium containing sucrose than in media containing other carbon sources (Fig. 1).

The temperature is one of the most important parameters for the development of alcoholic fermentation since it can affect both the kinetics of the process in terms of duration and rate of fermentation and the production of metabolites and the fi-

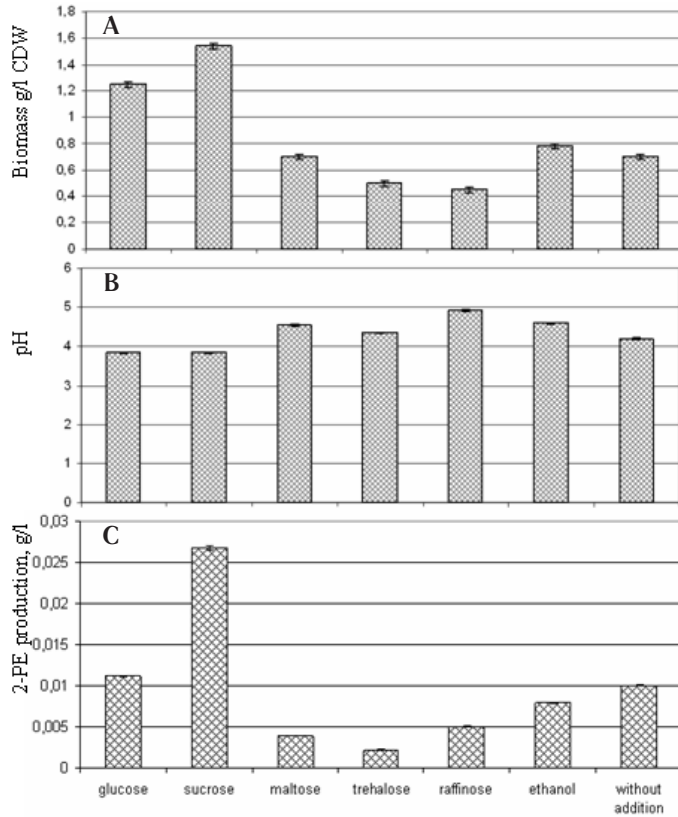


Fig. 1. The growth (A), final pH (B), and production of 2-PE (C) by *K. marxianus* UCM Y-305 in medium containing various carbon sources

nal quality of wine, for example. As expected, the strain *K. marxianus* UCM Y-305 gained the highest yield at 1.6 g/l biomass CDW after 18 h at temperature 28–30 °C, respectively.

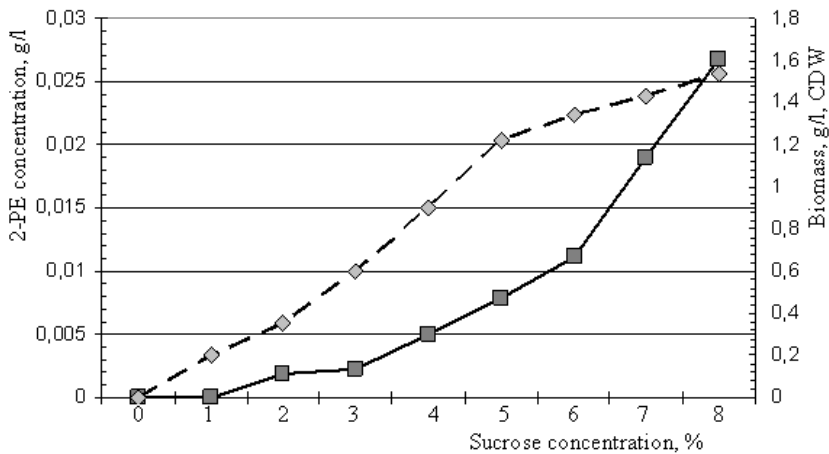


Fig. 2. Production of biomass and 2-phenylethanol by *K. marxianus* UCM Y-305 in medium with different range of sucrose



Data are means derived from three replicated determinations. The straight line – SEM \leq 0.1 for biomass yield; the dash line – SEM \leq 0.001 for 2-PE production.

Laboratory fermentations in 750 ml Erlenmeyer flasks have some characteristic properties. Limited aeration and thus limitation of oxygen can be a strong challenge for yeast due to its necessity for 2-phenylethanol production. The effects of the medium value, from 25 to 150 ml, and as sequent aeration levels changing were investigated. The data showed that with reduction of cultivation medium's quantity, the level of oxygen saturation increased; at that biomass yields (Fig. 3) and 2-phenylethanol production for *K. marxianus* UCM Y-305 increased too.

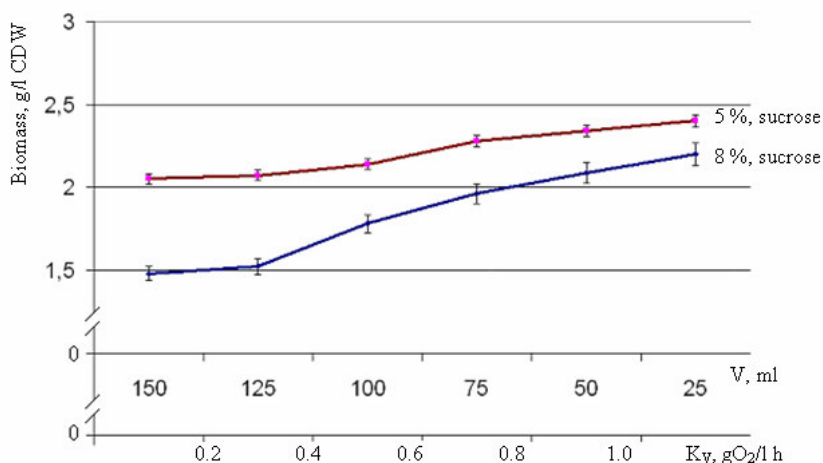


Fig. 3. Biomass yields depending on aeration level and sucrose concentration

Thus, the best cultivating conditions for *K. marxianus* UCM Y-305 were 8% sucrose, 1.25% yeast extract, 0.25% L-phenylalanine, 18 h of cultivation time, 28–30 °C cultivating temperatures, 150 ml medium with aeration 0.48–1.12 g O₂/lh (Fig. 3.), pH value 5.0. Sucrose was completely consumed after 18–26 h of cultivation under different conditions.

After cultivating under the all optimized conditions the levels of the 2-phenylethanol and biomass production were established. It was 0.37 g/l 2-phenylethanol and biomass yield 2.04 ± 0.22 g/l DWB.

Conclusion

Twenty yeast strains were screened for production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine with sucrose as a carbon source. It was found nine producers of 2-phenylethanol among *K. marxianus* strains. The most productive strain was *K. marxianus* UCM Y-305. It can be concluded that 2-phenylethanol production by *K. marxianus* UCM Y-305 can be improved from 0.0268 g/l to 0.37 g/l by selecting the suitable cultivating conditions.

REFERENCES

1. Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazola L., Martinez-Rodriguez S., Las Heras-Vazquez F.J., Rodriguez-Vico F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation // Int. J. of Food Microbiol. – 2005. – 98. – P. 301–308.



2. Etschmann M.M.W., Shell D., Schrader J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium // *Biotechnol. Letters.* — 2003. — 25. — P. 531–536.
3. Fabre C.E., Duviols V.J., Blanc P.J., Goma G. Identification of volatile flavour compounds obtained in culture of *Kluyveromyces marxianus* // *Biotechnol. Letters.* — 1995. — 17. — P. 1207–1212.
4. Huang C.J.R., Lee S.L., Chou C.C. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components // *J. Biosci. Bioeng.* — 2000. — 90. — P. 142–147.
5. Jiang J. Identification of flavour volatile compounds produced by *Kluyveromyces lactis* // *Biotechnol. Tech.* — 1993. — 7. — P. 863–866.
6. Sumner J.B. (1921) Dinitrosalicilic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine // *J. of Biol. Chemistry* — 1921. — 3. — P. 5–9.
7. Wittmann C., Hans M. and Bluemke W. (2002) Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus* // *Yeasts.* — 2002. — 19. — P. 1351–1363.
8. Medeiros A.B.P., Pandey A., Christen P. et al. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreaktor // *World J. Microbiol. and Biotechnol.* — 2001. — 17. — P. 767–771.
9. Fabre C.E., Blanc P.J., Goma G. Screening of yeasts producing 2-phenylethylalcohol // *Biotechnol. Techniq.* — 1997. — Vol. 11, no. 7. — P. 523–525.
10. Etschmann M.M.W., Bluemke W., Shell D., Schrader J. Biotechnological production of 2-phenylethanol // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2002. — 59. — P. 1-8.
11. Albertazzi E., Cardillo R., Servi S., Zucci G. Biogeneration of 2-phenylethanol and 2-phenylacetate important aroma components // *Biotechnol. Lett.* — 1994. — 16. — P. 491–496.
12. Mameeva O., Nagornaya S., Podgorsky V. Optimization of the 2-phenylethanol and ethanol production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* using statistical analysis // *Folia Microbiol.* — 2009. — in press.

УДК 663.12/.14:547.568.5_

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

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

АНАЛИЗ СИНТЕЗА 2-ФЕНИЛЭТАНОЛА ДРОЖЖАМИ РОДА *KLUYVEROMYCES*

Реферат

Настоящее исследование направлено на определение синтеза 2-фенилэтанола дрожжами рода *Kluyveromyces*. Наиболее продуктивным штаммом является *K. marxianus* УКМ Y-305. Установлено, что подбор оптимальных условий культивирования дал возможность увеличить синтез 2-фенилэтанола дрожжами *K. marxianus* УКМ Y-305 с 0,0268 г/л до 0,37 г/л.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *K. marxianus*, продуцент, 2-фенилэтанол, условия.



УДК 663.12/.14:547.568.5_

О.Г. Мамеєва, А.М. Остапчук, С.С. Нагорна, В.С. Підгорський

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

**АНАЛІЗ СИНТЕЗУ 2-ФЕНІЛЕТАНОЛУ ДРІЖДЖАМИ РОДУ
*KLUYVEROMYCES***

Реферат

Дане дослідження спрямоване на визначення продукування 2-фенілетанолу дріжджами роду *Kluyveromyces*. Найбільш продуктивним штамом є *K. marxianus* УКМ Y-305. Встановлено, що підбір оптимальних умов культивування дав можливість збільшити продукування 2-фенілетанолу дріжджами *K. marxianus* УКМ Y-305 з 0,0268 г/л до 0,37 г/л.

К л ю ч о в і с л о в а: *K. marxianus*, продуцент, 2-фенілетанол, умови.



K. S. Marakasova, B. O. Ostash, V. O. Fedorenko

Ivan Franko National University of Lviv, Grushevsky str., 4,
Lviv, 79005, Ukraine; e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

NEGATIVE REGULATION OF MOENOMYCIN A BIOSYNTHESIS IN *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672

Members of the soil-dwelling prokaryotic genus Streptomyces produce around two-thirds of all known antibiotics. Moenomycin A is a potent antibacterial drug against many Gram-positive pathogens, including vancomycin-resistant pathogens. Studying of moenomycin A biosynthesis regulation is of great importance because of need of new tools for combinatorial biosynthesis. In this work we examined the effects of known pleiotropic regulator DasR on moenomycin biosynthesis under heterologous conditions. DasR controls several pivotal cellular processes, including the transport of N-acetylglucosamine (GlcNAc), ubiquitous metabolite and an important source of carbon and nitrogen in soil ecosystems. Gene dasR was inactivated in S. coelicolor and moenomycin biosynthetic gene cluster was expressed in the mutant and parent strains. Moenomycin production increased twofold in dasR-deficient strain, confirming the involvement of DasR in regulation of phosphoglycolipid production.

Key words: streptomycetes, moenomycin A, regulator DasR, N-acetylglucosamine.

Streptomycetes are complex multicellular Gram-positive soil bacteria, perhaps best known for their ability to produce over two-thirds naturally derived antibiotics. Moenomycin A (MmA) is produced by *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672. Moenomycin A (MmA) is a member of the phosphoglycolipid family of antibiotics, which are the only natural products known to directly target the extracellular peptidoglycan glycosyltransferases involved in bacterial cell wall biosynthesis. The emergence of resistance to existing antibiotics represents a significant threat to public health. New antibiotics with activity against resistant bacterial strains are desperately needed. The structural and biological uniqueness of MmA make it an attractive starting point for the development of new antibacterial drugs.

The entire MmA biosynthetic (*moe*) gene cluster from the producer *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 was cloned and sequenced [1]. The regulation of *moe* cluster gene expression is unclear because it appears to lack dedicated regulatory genes. The aim of this work is to find genes that can regulate MmA biosynthesis. Particularly we focused our attention on gene *dasR*, encoding a protein involved in regulation of transport and metabolism of N-acetylglucosamine (GlcNAc). The latter is a breakdown product of chitin, widely represented polymer in soils. Two molecules of GlcNAc are also present in the MmA, and, therefore, it is logically to suppose that DasR might somehow be implicated in regulation of MmA production. We addressed this question through expression of MmA gene cluster and subsequent analysis of MmA production levels in *dasR*-deficient and parent strains of *S. coelicolor* M145.



Materials and methods

Plasmids and *Streptomyces* strains used in this work are listed in Table. *E. coli* ET12567 (pUB307) was used to perform intergeneric conjugation from *E. coli* to *Streptomyces* strains. *Sarcina lutea* was used as a test-culture for antibiotic activity test.

Table

Plasmids and *Streptomyces* strains

Plasmid/Strain	Genotype/description	Source/reference
moeno38-5	Contains major portion of <i>moe</i> cluster 1, Ap ^r Hyg ^r Km ^r	Ostash B., Lviv University
cosmid SC7E4	Contains a fragment of <i>S. coelicolor</i> genome with insertion of modified Tn5 transposon into <i>dasR</i> coding sequence; Ap ^r Am ^r Km ^r	Dyson P.J., University of Wales Swansea
<i>S. ghanaensis</i> ATCC14672	Wild-type producer of MmA	ATCC
<i>S. coelicolor</i> M145	SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ ; model strain, produces actinorhodin and undecylprodigisin	M. Bibb, John Innes Centre
<i>S. coelicolor</i> M145Δ <i>dasR</i>	<i>dasR</i> mutant, Am ^r	This study
M145Δ <i>dasR</i> moeno38-5 ⁺	<i>S. coelicolor</i> M145Δ <i>dasR</i> carrying moeno38-5	This study
M145 moeno38-5 ⁺	<i>S. coelicolor</i> M145 carrying moeno38-5	This study

Standard genetic techniques for *E. coli* and *Streptomyces* and for DNA manipulations were used as described by Sambrook *et al.* [2] and Kieser *et al.* [3]. *Streptomyces* strains were grown in liquid TSB media for MmA production. *Streptomyces* strains were grown on rich (R2YE) and minimal medium (MM) for estimate the effect of N-acetylglucosamine on the production of the pigmented antibiotics. *E. coli* and *Sarcina* strains were grown in LB supplemented with appropriate antibiotics. Oat-meal medium was used to obtain spores of streptomycetes and to plate intergeneric matings. Where needed, streptomycete strains were incubated in the presence of antibiotics: kanamycin (Km, 50 μg ml⁻¹), apramycin (Am, 50 μg ml⁻¹) or hygromycin (Hyg, 100 μg ml⁻¹). MmA was extracted by stirring the biomass (1 g, wet weight) with 3 ml of methanol for 12 h. The extract was concentrated *in vacuo* and diluted to the final volume of 300 μl. For the antibiotic diffusion assay, paper discs (Ø 5mm, Whatman) were impregnated with a portion of the extract and dried at 37 °C for 1 h. Discs were placed on the plates with 0.7% soft agar containing *S. lutea*. The plates were incubated at 4 °C for 1 h and then at 37 °C for 17 h. The productivity of the strains was referred back to the equal weight of the dry biomass.

Results and discussion

Bioinformatics research has revealed the presence of two genes homologous to GntR-type regulator *dasR* within the genome of *S. ghanaensis* ATCC14672. Probably, DasR is involved in control of the *Streptomyces* sugar phosphotransferase system, responsible for import of several carbon sources, most notably N-acetylglucosamine, the monomer of chitin. In literature, binding of *S. coelicolor* DasR protein to the consensus



sequence (DasR-responsive element (*dre*)) is well documented [4]. We have detected two putative *dre* elements within *S. ghanaensis* ATCC14672 genome. These elements are located within promoters upstream of two genes involved in MmA's carbohydrate portion assembly (*moeE5*: TTGGTCCGGACA, *moeGT5*: TCGGTCTGGCCC).

For knock-out of *dasR* gene in *S. coelicolor* M145 a cosmid SC7E4.1 (tab.) has been used. Phenotype of the generated mutant was confirmed via PCR analysis. We have confirmed the effect of N-acetylglucosamine on the production of the pigmented antibiotics of mutant grown on rich (R2YE) and minimal medium (MM) agar plates with/without N-acetylglucosamine. For heterologous expression of MmA biosynthesis gene cluster, *S. coelicolor* M145 Δ *dasR* (*moeno38-5*) and *S. coelicolor* M145 (*moeno38-5*) strains were constructed. Antibiotic activities of generated mutants were tested with the help of test-culture *Sarcina lutea*. Our data show that in liquid medium *S. coelicolor* Δ *dasR* strain produces two times more moenomycin as compared to initial strain (M145). Thus DasR regulator seems to be involved in regulation of MmA biosynthesis.

Our study showed that *S. coelicolor* DasR could be involved in regulation of MmA biosynthesis. This is also supported by bioinformatic evidence for presence of two *dasR*-like ORFs and two putative *dre* sequences within *moe* cluster of *S. ghanaensis*. Probably DasR binds *dre* sequences in this way repressing MmA biosynthesis. It will be interesting to investigate the role of DasR in MmA producer, *S. ghanaensis* ATCC14672, which contains two genes highly homologous to *S. coelicolor* *dasR*. We suppose that DasR is not a single global negative regulator involved in MmA biosynthesis and more extensive search will turn up other repressors and activators of MmA production. Their rational manipulation will form a basis for improvement of MmA titers in native and heterologous producers.

REFERENCES

1. Ostash B., Saghatelian A., and Walker S. A Streamlined Metabolic Pathway for the Biosynthesis of Moenomycin A // Chemistry & Biology. — 2007. — 14, № 3. — P. 257–267.
2. Sambrook J. and Russel D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. — 3rd ed. — Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 2001. — 2713 p.
3. Kieser T., Bibb M., Buttner M.J., Chater K.F. and Hopwood D.A. Practical *Streptomyces* genetics. — Norwich: The John Innes Foundation, 2000. — 613 p.
4. Rigali S., Nothhaft H., Noens E.E., Schlicht M., Colson S., Møller M., Joris B., Koerten H.K., Hopwood D.A., Titgemeyer F., van Wezel G.P. The sugar phosphotransferase system of *Streptomyces coelicolor* is regulated by the GntR-family regulator DasR and links N-acetylglucosamine metabolism to the control of development // Mol. Microbiol. — 2006. — 61, № 5. — P. 1237–1251.

Е. С. Маракасова, Б. О. Осташ, В. А. Федоренко

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул. Грушевского, 4,
Львов, 79005, Украина; e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

НЕГАТИВНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА МОЕНОМИЦИНА А В ШТАММЕ *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672

Реферат

Проведен биоинформатический анализ генома *S. ghanaensis* ATCC14672. В геноме *S. ghanaensis* обнаружены два гена, гомологичных гену *dasR* в *S. coelicolor*,



продукт якого являється членом семейства регуляторів GntR. DasR-плейотропний регулятор, який негативно регулює біосинтез антибіотиків, метаболізм N-ацетилглюкозаміна і спробообразование. В кластері генів біосинтезу моеноміцину А ідентифіковані верооятні послідовності *dre*, з якими може зв'язуватися білок DasR. Отримано нокаут гена *dasR* в штамі *S. coelicolor* M145. Для штаму дикого типу M145 характерно збільшення синтезу пігментованих антибіотиків актинородина і ундецилпродигіозина на мінімальній середі з додаванням N-ацетилглюкозаміна. Такого ефекта не спостерігалося в штамі з нокаутом гена *dasR* (*S. coelicolor* M145Δ *dasR*). Осуществлена гетерологічна експресія кластера генів біосинтезу моеноміцину А в штаммах *S. coelicolor* M145 Δ *dasR* і *S. coelicolor* M145. Аналіз антибіотичної активності цих штамів показав, що ген *dasR* *S. coelicolor* M145 негативно регулює експресію генів біосинтезу моеноміцину А. Синтез моеноміцинів в штамі з порушеним геном *dasR* був вдвоє вище, ніж в штамі *S. coelicolor*, який містить функціональний ген *dasR*.

К л ю ч е в е с л о в а: стрептомицети, моеноміцин А, регулятор DasR, N-ацетилглюкозамін.

К. С. Маракасова, Б. О. Осташ, В. О. Федоренко

Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4,
Львів, 79005, Україна; e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

НЕГАТИВНА РЕГУЛЯЦІЯ БІОСИНТЕЗУ МОЕНОМІЦИНУ А У ШТАМІ *STREPTOMYCES GHANAENSIS* ATCC14672

Реферат

Проведено біоінформативний аналіз геному *S. ghanaensis* ATCC14672. У геномі *S. ghanaensis* виявлено два гени, гомологічні до гена *dasR* *S. coelicolor*, продукт якого належить до родини регуляторів GntR. DasR-плейотропний регулятор, задіяний у негативній регуляції біосинтезу антибіотиків, метаболізму N-ацетилглюкозаміну та спороутворення. У межах кластера генів біосинтезу моеноміцину А ідентифіковано імовірні послідовності *dre*, з якими може зв'язуватися білок DasR. Отримано нокаут гена *dasR* в штамі *S. coelicolor* M145. Для штаму дикого типу M145 характерне зростання синтезу пігментованих антибіотиків актинородина та ундецилпродигіозину на мінімальній середовищі при додаванні N-ацетилглюкозаміну. Натомість такого зростання не спостерігали у штамі з нокаутом гена *dasR* (*S. coelicolor* M145Δ *dasR*). Здійснено гетерологічну експресію кластера генів біосинтезу моеноміцину А у штаммах *S. coelicolor* M145 та *S. coelicolor* M145Δ *dasR*. Аналіз антибіотичної активності цих штамів виявив, що ген *dasR* *S. coelicolor* M145 негативно регулює експресію генів біосинтезу моеноміцину А. Синтез моеноміцинів у штамі зі зруйнованим геном *dasR* удвічі вищий порівняно зі штамом *S. coelicolor* M145, що містить функціональний ген *dasR*.

К л ю ч о в і с л о в а: стрептомицети, моеноміцин А, регулятор DasR, N-ацетилглюкозамін.



**Jerzy Wielbo¹, Monika Marek-Kozaczuk¹, Andrzej Mazur¹,
Agnieszka Kubik-Komar², Anna Skorupska¹**

¹Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka 19 str., 20-033 Lublin, Poland
tel.: +48 81 537 59 72, e-mail: anna.skorupska@poczta.umcs.lublin.pl

²University of Agriculture, Akademicka 13 str., 20-950 Lublin, Poland

THE DIVERSITY OF *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII* LOCAL POPULATIONS: GENETIC AND PHYSIOLOGICAL TRAITS CONNECTION

Genetic and metabolic variability within local population of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii in context of possible interconnections between metabolic-physiological properties of rhizobia was studied. Considerable genetic diversity was observed in 16-23S rDNA regions and in the plasmid profiles of studied strains. Furthermore, the strains within defined PCR-RFLP group were greatly different. Metabolic profiles of rhizobia studied by Biolog test showed large diversity, even within one genetic group. PCA analysis of metabolic traits revealed differences in utilization of two large groups of the substrates: (a) saccharides, and (b) organic acids, amino acids and modified sugars, named here "non-sugars". Utilization of chemically various saccharides by rhizobia was more commonly observed than "non-sugars". Moreover, utilization of "sugars" and "non-sugars" were positively correlated in the strains belonging to PCR-RFLP Groups 1, 2 and 3. The "sugars" were utilized differently than "non-sugars" by the strains of Group 4. Finally, the significant differences in the growth rate of the strains belonging to particular PCR-RFLP groups in different media were found. We concluded that the local population of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii was not uniform. It was composed of physiologically different strains and high metabolic diversity reflected the level of genetic diversity of population.

Key words: Rhizobium leguminosarum, metabolic and genetic diversity.

The metabolic and adaptive potential of a bacterium is correlated with a degree of its genome complexity. The soil bacterium *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* (*Rlt*) occupies highly challenging soil habitats and induces complex symbiotic interaction with the host plant clover (*Trifolium* spp.) [11]. A common feature of the *Rlt* and other rhizobial genomes is the complexity of genomic organization, with a single chromosome and several large plasmids (megaplasmids). The genes encoding symbiotic functions usually constitute independent replicons, known as symbiotic plasmids (pSym), or symbiotic islands when incorporated into the chromosome [10]. The cryptic plasmids constitute a pool of accessory genetic information [15] and even though they are in general dispensable for bacterial survival. Functional interactions among different replicons are often required for successful completion of both the symbiotic and saprophytic lifestyle of rhizobia [1, 8]. The large, complex and dynamic rhizobial genomes, which encode many potentially useful metabolic traits, play a role in their high metabolic diversity and adaptive potential [9, 14].

© Jerzy Wielbo, Monika Marek-Kozaczuk, Andrzej Mazur, Agnieszka Kubik-Komar, Anna Skorupska, 2009



The knowledge of metabolic traits important for the growth and competition of rhizobia within population is limited. It is known that local populations of rhizobia may differ significantly both on the genetic and physiological levels. Up to now studies concerning genetic and physiological diversity of rhizobial populations focused mainly on the strains colonizing the soil or particular legume plants species [2, 5, 7].

In this work the representative sample of local population of rhizobia that occupy the nodules of clover root systems growing in each other's vicinity in the soil was subjected to comprehensive analyses of their genetic and especially metabolic variability. We have described the possible interconnections between the metabolic-physiological properties of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* and some genetic traits of their genomes.

Materials and methods

50 *Rhizobium leguminosarum* isolates were obtained from the nodules of red clover (*Trifolium pratense* L. cv. Dajana) growing in sandy loam. The nodules were surface-sterilized, crushed and their content was plated on 79CA medium [13]. Strains isolated from the nodules were purified by successive streaking of single colonies and pure cultures were used in further experiments. After analysis of PCR-RFLP and plasmid profiles, strains with the same profiles were discarded. 23 strains different in the PCR-RFLP pattern and plasmid profiles were considered as the representatives of the *Rlt* soil population and subjected to further physiological analyses.

The analyses of the plasmid content of the isolates were performed as it was described by Eckhardt (1978) [3]. The estimation of plasmid size was performed using BIO-PROFIL BioGene Windows Application V11.01 (Vilber-Lourmat, France), using *R. leguminosarum* bv. *viciae* strain 3841 [15] as plasmid standard.

PCR assays of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) were carried out using genomic DNA of *Rlt* isolates as the templates and primers FGPS1490-5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3' and FGPL132-5'-CCGGGTTTCCC CATTCCG-3' [4]. PCR amplicons were digested with *Bsu*RI (*Hae*III) and *Taq*I restriction enzymes (FERMENTAS, Vilnius, Lithuania), and restriction fragments were separated by 3% agarose gel electrophoresis.

The utilization of different carbon and energy sources by *Rlt* isolates was assessed using BIOLOG GN2MicroPlate™ (Gram Negative Identification Test Panel) (BIOLOG, Hayward, USA) containing 95 carbon sources, including sugars, amino acids and organic acids as it had been described earlier [14].

For bacterial growth kinetics assays the isolates were grown overnight at 28 °C in 5 ml TY liquid medium. The cultures were then diluted to OD₅₅₀ of 0.2, and the suspensions were used for inoculation (1:100 v/v) of 79CA, TY and M1 liquid media [12], the latter supplemented with vitamins (thiamine, 1 µg/ml, biotin, 0.5 µg/ml, pantothenate, 1 µg/ml). The cultures were grown in 79CA and TY media for 48 h and in M1 medium for 72 h at 28 °C. Optical density (OD₅₅₀) of cultures was measured at every 24 h. Each experiment was conducted in triplicate.

For cluster analysis and principal component analysis (PCA) the results of BIOLOG test were coded in the binary system. The cluster analysis was used to define similarity of rhizobia metabolic profiles which were calculated by a simple matching coefficient, following which the clustering was performed by the UPGMA method.

The principal component analysis (PCA) with varimax rotation [6] was used to analyze bacterial capability of utilization of particular substrates or groups of substrates. In this manner PCA method allowed us to transform the numerous variables



(utilization of individual substrates), possibly correlated as well into small groups of uncorrelated factors (utilization of groups of substrates) as well as to interpret the defined PCA factors named PC1, PC2 and PC3.

To compare the growth rates of bacteria belonging to different PCR-RFLP groups (groups 1-4) one-way ANOVA was used. All the described analyses were performed with STATISTICA software.

Results and discussion

50 isolates obtained from nodules of clover plants growing in each other's vicinity were characterized by PCR-RFLP analysis of 16S-23S rDNA ITS region and plasmid patterns. The analyses allow selecting of 23 strains different in these genetic traits. Four distinct PCR-RFLP genetic groups (Groups 1–4) were distinguished after RFLP analysis of PCR-amplified 16S-23S rDNA ITS region with *BsuRI* and *TaqI* restriction enzymes (Fig. 1, Tab. 1). The isolates of Group 1 and 2 may be considered as related to some extent due to the same *BsuRI* RFLP profile.

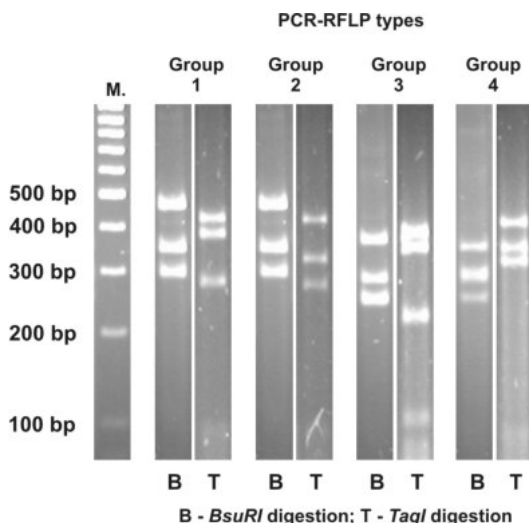


Fig. 1. PCR-RFLP groups identified in *Rlt* strains used in this study
M – 100 bp molecular weight marker (MassRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas).

The plasmid profiles obtained for all isolates showed the great variability, even within one PCR-RFLP group (Fig. 2). Each isolate contained from 2 to 5 plasmids ranging in size approximately from 170 kb to 1 Mb.

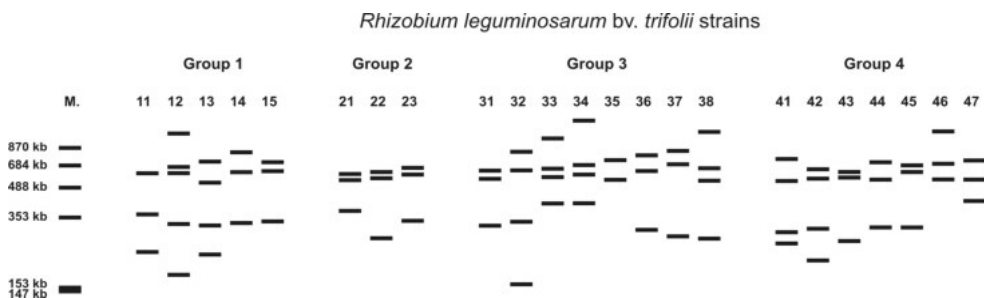


Fig. 2. Plasmid profiles of *Rlt* strains used in this study
M – molecular weight marker (*R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841).



All 23 isolates belonging to four different PCR-RFLP genetic groups were examined with respect to their metabolic profiles using commercial Biolog GN2 MicroPlate™ test. This approach revealed that there were substantial differences between strains in number of utilized substrates, ranging from 37 (*Rlt 38*) to 59 (*Rlt 35*) substrates. On the other hand no differences were found between PCR-RFLP groups, where the number of utilized substrates was respectively 49 ± 4 , 47 ± 6 , 46 ± 8 and 49 ± 5 in Group 1, 2, 3 and 4.

Table 1

PCR-RFLP grouping of *Rlt* strains used in this study

PCR-RFLP group	Strain numbers
Group 1	11, 12, 13, 14, 15
Group 2	21, 22, 23
Group 3	31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38
Group 4	41, 42, 43, 44, 45, 46, 47

Similarly when the Biolog test results were analyzed by the UPGMA method, no relationships were found between PCR-RFLP groups and clustering based on metabolic properties of strains (Fig. 3). Two main branches at 86% similarity level and two independent lineages can be distinguished, but the representatives of four PCR-RFLP groups was found in each of them (Fig. 3).

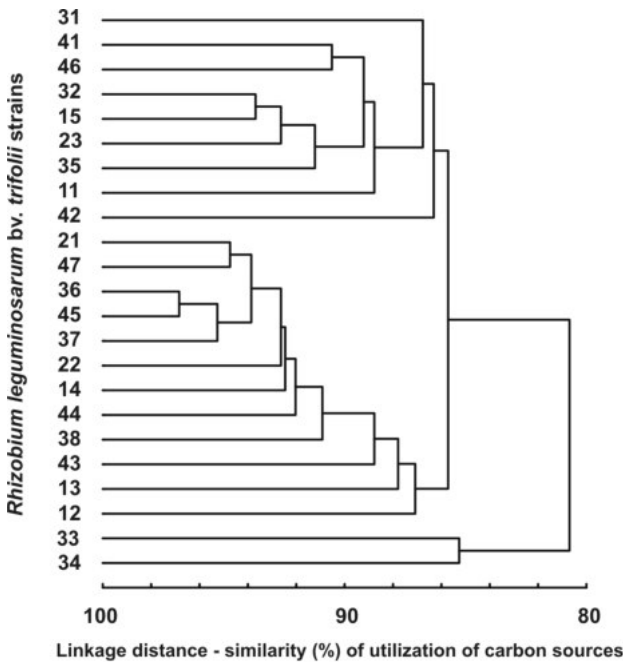


Fig. 3. UPGMA dendrogram of *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strains constructed on the basis of the Biolog test results

Since cluster analysis did not allow identifying the qualitative metabolic differences between the clover nodule isolates, the results of Biolog test were subjected to principal component analysis (PCA). The total 95 carbon and energy sources used in the test were arbitrary divided into nine groups: monosaccharides [S], complex saccharides [cS], modified saccharides [mS], non-modified acids [A], modified acids [mA], sugar acids [sA], non-modified aminoacids [AA], modified aminoacids [mAA] and others (with amines predominating) [O]. The PCA analysis enabled us to group all mentioned carbon and energy sources into three factors explaining most of the total variance: principal component 1 (PC1) composed of A, mS, AA, O and sA; principal component 2 (PC2) composed of S, cS and mAA; and principal component 3 (PC3) including mA (detailed data not shown). Taking into account the chemical characteristics of the substrates, PC1 was interpreted as “utilization of non-sugar components”, and PC2 as “utilization of sugar substrates”. These two large groups of substrates were composed of 90 (35 “sugars” and 55 “non-sugars”) of 95 tested carbon and energy sources. Substantial differences in capability to utilize of substrates belonging to these two groups by the tested rhizobia were found (Tab. 2). While individual strains used “sugars” more readily, the greater variance in substrate utilization by different strains was observed for “non-sugars” substrates. Therefore the differences in the number of utilized substrates by individual *Rlt* strains may be attributed rather to “non-sugars” than to “sugars” substrates (Tab. 2).

Table 2

Classes of metabolic substrates created by the principal component analysis (PCA) applied to *Rlt* strains

Substrates	Group of substrates		
	“sugars” (from PCA classification)	“non-sugars” (from PCA classification)	all tested Biolog’s substrates
Total number of tested substrates	35	55	95
Minimum number of utilized substrates	24	7	37
Maximum number of utilized substrates	31	26	59
Average number of utilized substrates	28.2 ± 1.6	15.7 ± 5.0	47.7 ± 6.0
Variance (for number of utilized substrates)	2.4	25.3	36.5
% of utilized substrates	80.5 ± 4.5	27.7 ± 8.2	49.8 ± 5.8
Variance (for % of utilized substrates)	19.8	67.0	33.8

The relations in the utilization of “sugars” and “non-sugars” by the strains belonging to PCR-RFLP groups were examined (Tab. 3). Relatively high correlation coefficients (ranging from 0.700 to 0.996) between utilization of “sugars”, “non-sugars” and “all substrates” were observed in Group 1 and 2. On the other hand correlation between the use of “sugars” vs. “non-sugars” and “all substrates” in Group 4 was not visible. This observation suggested that the utilization of “non-sugar” substrates reflected the differences of metabolic potential in this group of rhizobial strains (Tab. 3).



Table 3

Correlation coefficients for utilization of “sugar” and “non-sugar” substrates in four PCR-RFLP groups of *Rlt* strains

PCR-RFLP group	Groups of substrates		
		“non-sugars”	all substrates
Group 1	“sugars”	0.700	0.858
	“non-sugars”	-	0.965
Group 2	“sugars”	0.786	0.839
	“non-sugars”	-	0.996
Group 3	“sugars”	0.560	0.739
	“non-sugars”	-	0.972
Group 4	“sugars”	0.357	0.452
	“non-sugars”	-	0.995

The metabolic potential of the individual strains was also estimated by measurements of their growth rates in M1, 79CA and TY liquid media and substantial differences in their growth rates were observed (the details not shown). When ANOVA and post-hoc Tukey test were applied in relation to PCR-RFLP genetic classification (for groups composed of numerous strains), statistically significant difference ($p < 0.05$) in the growth rates of isolates belonging to Group 4 vs. Group 1, 2 and 3 after 24 h of growth, as well between the isolates belonging to Group 4 vs. Group 3 after 48 h of growth was observed on TY medium (Tab. 4). The statistically significant differences were not observed in the case of strains grown on M1 and 79CA media.

In general a great diversity of studied local population with respect to PCR-RFLP profiles, plasmids content, metabolic profiles and growth rate was found. The degree of diversity observed within this population is comparable with that described for populations originating from the distinct soils [5]. It seems that in the context of population diversification studies, plasmid and metabolic profiles should be of special interest. A substantial part of genetic variability results from different plasmid content that constitutes an accessory rhizobial genome influencing bacterial metabolic potential and differentiation of strains even within a given genetic group.

Despite the lack of the straight correlation between PCR-RFLP genetic groups and plasmid content or PCR-RFLP and Biolog test results, some relationships could be found. In the case of the strains belonging to the Group 1 and 2 characterized by similar PCR-RFLP profile similarity in utilization of “sugars” and “non-sugars” were observed, while such correlation between the use of “sugars” vs. “non-sugars” and “all substrates” was not visible in the strains of genetically distinct Group 4. Moreover the differences in the growth rate in TY medium of the strains belonging to Group 4 suggest their variable metabolic potential. Though the genetic classification of the strains based only on the differentiation in 16-23S ITS rDNA is very useful, this type of study underestimates the biodiversity of especially complex populations such as rhizobial ones. The genetic characteristic supplemented by metabolic characterization provides more adequate assessment and demonstrates the correlation occurring between genetic and metabolic profiles of bacterial strains.

Table 4
The growth of *Rlt* strains belonging to four PCR-RFLP groups in TY, 79CA and M1 liquid media

PCR-RFLP group	OD ₅₅₀			
	79CA medium		TY medium	
	24h	48h	24h	48h
Group 1	0.31 ± 0.07a	0.61 ± 0.14a	0.34 ± 0.05a	0.48 ± 0.05ab
Group 2	0.33 ± 0.07a	0.60 ± 0.09a	0.35 ± 0.06a	0.51 ± 0.07ab
Group 3	0.28 ± 0.05a	0.54 ± 0.11a	0.33 ± 0.05a	0.50 ± 0.04a
Group 4	0.26 ± 0.09a	0.56 ± 0.09a	0.28 ± 0.05b	0.46 ± 0.06b
	M1 medium			
	24h	48h	72h	
Group 1	0.23 ± 0.07a	0.45 ± 0.19a	0.52 ± 0.21a	
Group 2	0.29 ± 0.08a	0.56 ± 0.16a	0.67 ± 0.15a	
Group 3	0.25 ± 0.07a	0.51 ± 0.17a	0.70 ± 0.22a	
Group 4	0.27 ± 0.09a	0.57 ± 0.23a	0.69 ± 0.24a	

^{a, b} – the values for one medium at defined time of the growth marked with the same letter did not differ significantly at P<0.05

The strain numbers are on the left. The scale bar represents percent of metabolic diversity.

REFERENCES

1. Brom S., Garcna-de los Santos A., Cervantes L., Palacios R., Romero D. In *Rhizobium etli* symbiotic plasmid transfer, nodulation competitiveness and cellular growth require interaction among different replicons // *Plasmid*. – 2000. – 44. – P. 34–43.
2. Depret G., Laguerre. G. Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea // *New Phytol.* – 2008. – 179. – P. 224–235.
3. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria // *Plasmid*. – 1978. – 1. – P. 584–588.
4. Laguerre G., Mavingui P., Allard M. R., Charnay M. P., Louvrier P., Mazurier S. I., Rigottier-Gois L., Amarger N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – 62. – P. 2029–2036.
5. Laguerre G., Louvrier P., Allard M.R., Amarger N. Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – 69. – P. 2276–2283.
6. Morrison D.F. Multivariate statistical methods. McGraw-Hill 3rd ed., New York, NY, USA, 1990.
7. Mutch L.A., Young J.P. Diversity and specificity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* on wild and cultivated legumes // *Mol. Ecol.* – 2004. – 13. – P. 2435–2444.
8. Oresnik I.J., Pacarynuk L.A., O'Brien S.H.P, Yost C., Hynes M.F. Plasmid-encoded catabolic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*: evidence for a plant-inducible rhamnose locus involved in competition for nodulation // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 1998. – 11. – P. 1175–1185.



9. Oresnik I.J., Liu S.L., Yost C.K., Hynes M. F. Megaplasmid pRme2011a of *Sinorhizobium meliloti* is not required for viability // J. Bacteriol. — 2000. — 182. — P. 3582–3586.
10. Palacios R., Newton W.E. Genomes and genomics of nitrogen-fixing organisms. Rafael Palacios and William E. Newton ed. — Dordrecht: Springer, 2005.
11. Perret X., Staehelin C., Broughton W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2000. — 64. — P. 180–201.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989.
13. Vincent J.M. A manual for the practical study of root nodule bacteria. International biological program handbook no.15. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd., 1970.
14. Wielbo J., Marek-Kozaczuk M., Kubik-Komar A., Skorupska A. Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness // Can. J. Microbiol. — 2007. — 53. — P. 957–967.
15. Young J.P., Crossman L.C., Johnston A.W., Thomson N.R., Ghazoui Z.F., Hull K.H., Wexler M., Curson A.R., Todd J.D., Poole P.S., Mauchline T.H., East A.K., Quail M.A., Churcher C., Arrowsmith C., Cherevach I., Chillingworth T., Clarke K., Cronin A., Davis P., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Rabinowitsch E., Sanders M., Simmonds M., Whitehead S., Parkhill J. The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components // Genome Biol. — 2006. — 7. — P. 34.

Е. Вильбо¹, М. Марек-Козачук¹, А. Мазур¹, А. Кубик-Комар², А. Скорупска¹

¹Университет имени Марии Кюри-Складовской, ул. Академическая, 19, 20-033, г. Люблин, Польша

²Сельскохозяйственный университет, ул. Академическая, 13, 20-950, г. Люблин, Польша

РАЗЛИЧИЯ ЛОКАЛЬНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII*: СВЯЗЬ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМИ ПРИЗНАКАМИ

Реферат

Изучена генетическая и метаболическая вариабильность локальных популяций *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* в контексте возможных связей между метаболо-физиологическими свойствами ризобий. Были обнаружены значительные генетические различия в 16-23S рДНК регионах и в плазмидных профилях исследованных штаммов. Штаммы, разделённые на группы с помощью PCR-RFLP, значительно отличались. Метаболический профиль ризобий, исследованных с помощью Biolog теста, показал существенные различия даже в пределах одной генетической группы. РСА анализ метаболических свойств показал различия в утилизации двух больших групп субстратов (а) сахаров, и (б) органических кислот, аминокислот и модифицированных сахаров, названных в работе «не-сахара». Утилизация химически различных сахаров ризобиями наблюдалась более часто, чем «не-сахаров». Утилизация «сахаров» и «не-сахаров» положительно коррелировала с генетическими различиями штаммов, относящихся к PCR-RFLP группами 1, 2 и 3. «Сахара» утилизировались отлично от «не-сахаров» штаммами группы 4. Обнаружены значительные различия у этих PCR-RFLP групп штаммов в способности расти на разных средах. Сделан вывод о том, что локальные популяции



Rhizobium leguminosarum bv. *trifolii* не являються однородними. Вони складаються з фізіологічно різних штамів, різною метаболічною активністю яких відображається неоднорідність їх генетичної неоднорідності.

Ключові слова: *Rhizobium leguminosarum*, метаболічні та генетичні відмінності.

Е. Вільбо¹, М. Марек-Козачук¹, А. Мазур¹, А. Кубік-Комар², А. Скорупська¹

¹Університет імені Марії Кюрі-Склядовської, вул. Академічна, 19, 20-033, м. Люблін, Польща

²Сільськогосподарський університет, вул. Академічна, 13, 20-950, м. Люблін, Польща

ВІДМІННОСТІ ЛОКАЛЬНИХ ПОПУЛЯЦІЙ *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BV. *TRIFOLII*: ЗВ'ЯЗОК МІЖ ГЕНЕТИЧНИМИ І ФІЗІОЛОГІЧНИМИ ОЗНАКАМИ

Реферат

Досліджена генетична та метаболічна варіабільність *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* у контексті можливих зв'язків між метаболо-фізіологічними ознаками ризобій. Були встановлені значні генетичні відмінності у 16-23S рДНК регіонах та в плазмідних профілях досліджуваних штамів. Штами, розподілені на групи за допомогою PCR-RFLP, значно відрізнялися. Метаболічний профіль ризобій, досліджений з використанням Biolog тесту, показав суттєві відмінності навіть у межах однієї генетичної групи. PCA аналіз метаболічних властивостей виявив відмінності в утилізації двох великих груп субстратів: (а) цукрів і (б) органічних кислот, амінокислот та модифікованих цукрів, які у роботі названі «не-цукри». Утилізація хімічно різних цукрів ризобіями спостерігалася частіше, ніж «не-цукрів». Утилізація «цукрів» і «не-цукрів» позитивно корелювала з генетичними відмінностями штамів, що належали до PCR-RFLP груп 1, 2 і 3. Штами 4-ї групи по різному утилізували «цукри» і «не-цукри». Були виявлені значні відмінності у здатності цих PCR-RFLP груп штамів рости на різних середовищах. Зроблено висновок, що локальні популяції *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* не є однорідними. Вони складаються з фізіологічно відмінних штамів, різною метаболічною активністю яких відображається їх генетична неоднорідність.

Ключові слова: *Rhizobium leguminosarum*, метаболічні та генетичні відмінності.



Dorota Chrobak, Magdalena Kizerwetter-Świda,
Magdalena Rzewuska, Marian Binek

Warsaw University of Life Sciences, Chishewsky str., 8, 02-786 Warsaw, Poland,
tel.: +48 22 593 60 66; e-mail: dorota.chrobak@wp.pl

CHARACTERIZATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME *MEC* TYPES IN METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS* *INTERMEDIUS* STRAINS ISOLATED FROM DOGS

SCCmec types in *mecA*-positive *S. intermedius* strains were characterized by using multiplex PCR method described previously by Oliveira and Lencastre [11]. A total of 100 preliminary identified *S. intermedius* isolates were tested to determine their species identify and *mecA* gene encoding methicillin resistance. The duplex PCR assay was able to identify all the strains carrying *mecA* gene (17%). The study showed that 4% strains identified as *S. intermedius* based upon their phenotypic properties do not yielded a 16S rRNA gene amplification product, indicating staphylococci other than *S. intermedius*. *SCCmec* type IIIC was identified in 15 strains (88%), type IB was found only in one strain. One strain was not typable by this technique.

Key words: *Staphylococcus intermedius*, multiplex PCR, *mecA* gene, MRSI, *SCCmec* types.

Staphylococcus intermedius was first described as a new species in 1976 and was differentiated from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* based on its biochemical and physiological characteristics [3]. This microorganism occurs as commensal bacteria on the skin and mucosal membranes of dogs. This species has also been found in cats, horses, pigeons, foxes, and other animals. In dogs it has been implicated in serious infections, such as: pyoderma, otitis externa, abscess, and infections of eyes, joints, mammary glands, respiratory tract and gastrointestinal tract [2]. In humans *S. intermedius* is recognized as an invasive zoonotic pathogen and has been isolated in 18% of canine-inflicted wounds [5, 8]. On the other hand it has been infrequently identified in other invasive human diseases and only a few studies have reported rare cases of infections such as bacteremia [14], infection of mastoid cavities [5], and brain abscesses [1].

Increased frequency of infections caused by *S. intermedius* exhibiting multi-drug resistance, including methicillin, is being observed among dogs [6, 9]. Methicillin resistance in staphylococci is mediated by the *mecA* gene, encoding the penicillin-binding protein 2a (PBP2a), which has reduced affinity for methicillin, oxacillin and other beta-lactam antibiotics. The *mecA* gene, responsible for this phenomenon



has already been identified in *S. intermedius* strains isolated from dogs [6, 9]. Methicillin resistance is most often associated with a mobile genetic element termed the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*). The molecular basis of methicillin resistance has been well characterized in *S. aureus*, but little is known about the acquisition and the organization of its genetic key, the *mecA* gene, in other staphylococcal species. In *S. aureus* several types and subtypes of Staphylococcal chromosome cassettes (SCC*mec*) have been classified on the basis of the different combinations of the two main parts: the *mec* gene complex, which encodes methicillin resistance (the *mecA* gene and its regulators), and the *ccr* gene complex, which encodes site-specific recombinases responsible for its mobility [7, 10].

In this study we developed a duplex PCR assay, which allows to conduct the simultaneous identification of *Staphylococcus intermedius* strains and the *mecA* gene detection. We also characterize SCC*mec* types in methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* strains isolated from dogs using multiplex PCR strategy.

Materials and methods

A total of 100 strains were isolated in the Diagnostic Laboratory of the Division of Bacteriology and Molecular Biology at Warsaw University of Life Sciences. The strains were cultivated from different clinical specimens taken from dogs. Strains used for control purpose include the: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus intermedius* ATCC 29663 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 14.002 (possessed from The National Reference Centre for Antimicrobial Susceptibility).

The isolates were identified by means of the API Staph system (BioMérieux) and additional characteristics such as type of hemolysis, colony pigment, coagulase, clumping factor and acid production from maltose. Sensitivity to methicillin was assessed using a disc diffusion test according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), with discs containing 1 µg of oxacillin (BioMérieux). Oxacillin-resistant, *mecA*-positive strains were tested for resistance to other antimicrobial agents.

Bacterial cultures were grown overnight at 37 °C in 5 ml of brain-heart infusion broth (BioMérieux). Chromosomal DNA was obtained using DNA Genomic Mini (A&A Biotechnology). For DNA extraction 1.5 ml of bacterial culture was centrifugated at 6 000 g for 5 minutes. Sediment was suspended in 140 µl TE buffer with 2% glucose, containing 5 µl lysozyme (5 mg/ml, SIGMA), 2.5 µl lysostaphin (1 mg/ml, SIGMA) and 2 µl ribonuclease A (10 mg/ml, Fermentas). After incubation for 2 hours at 37 °C further part of the DNA isolation process was conducted according to the manufacturer's instructions.

Two pairs of primers were used for the detection of *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* strains. One was specific for *mecA* gene and one for *S. intermedius*-specific fragment of the 16S rRNA gene. The cycling conditions were as follows: after an initial denaturation step of 94 °C for 3 min, samples completed 30 cycles of amplification (30 s of denaturation at 94 °C, 30 s of annealing at 55 °C and 1.5 min of extension at 72 °C). The final elongation was performed at 72 °C for 4 min. The primer sequences, products size and references are presented in Table 1.



Oligonucleotide primer sequences used in the duplex PCR

Primer	Gene amplified	Sequence	Product size (bp)	References
Inter1	16S rRNA	5'-CCGTATTAGCTAGTTGGTGG-3'	901	[15]
Inter2		5'-GAATGATGGCAACTAAGTTC-3'		
MecA1	mecA	5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'	523	[13]
MecA2		5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'		

The PCR products, 901 bp and 523 bp in size were separated on 1% agarose gels in Tris-Acetate-EDTA buffer, stained with ethidium bromide, visualized with UV light and analyzed using the VersaDoc Model 1000 Imaging System with Quantity One 4-4-0 software (BioRad). Typical electrophoresis pattern of *mecA* and 16S rRNA gene amplification product are presented on Fig. 1.



Fig.1. PCR for the species confirmation and detection of *mecA* gene

Lane 1 – negative control; lane 2 – MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas); lane 3 – *mecA* product for MRSA strain no. 14.002; lane 4 – 16S rRNA gene amplification product for *S. intermedius* ATCC 29663; lane 5 – one of the researched strains (MRSI).

The 17 *mecA*-positive *S. intermedius* strains were used to characterize the SCC*mec* types. SCC*mec* multiplex PCR typing assay was based on Oliveira's method [11]. Totally 9 pairs of the primers for SCC*mec* types and subtypes, as well as for the *mecA* gene were used (tab. 2).

Table 2

Oligonucleotide primer sequences used in the multiplex PCR

Locus	Primer	Oligonucleotide sequence (5'–3')	Product size (bp)	Specificity (SCC _{mec} type)
A	CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	495	I
	CIF2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
B	KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	284	II
	KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
C	MECI P2	ATCAAGACTGCATTCAAGGC	209	II, III
	MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
D	DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	342	I, II, IV
	DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
E	RIF4 F3	GTGATTGTTGAGATATGTGG	243	III
	RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC		
F	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	414	III
	RIF5 R13	GTCACAGTAATCCATCAATGC		
G	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	381	
	pUB110 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC		
H	IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	303	
	pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC		
mecA	MECA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	162	Internal control
	MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

The cycling conditions were as follows: after an initial denaturation step of 94 °C for 4 min, samples completed 30 cycles of amplification (30 s of denaturation at 94 °C, 30 s of annealing at 53 °C and 1 min of extension at 72 °C). The final elongation was performed at 72 °C for 4 min.

The strains used for control purposes include the methicillin/oxacillin resistant *S. aureus* strains carrying: I, IA, IB, II, III, IIIA, IIIB, IIIC, IIID, IIIE, IIIG, IIIJ and IV type of cassette. The standard strains were obtained from National Medicines Institute, Division of Clinical Microbiology and Infection Prevention.

The PCR products were separated on 2% agarose gels in Tris-Acetate-EDTA buffer, stained with ethidium bromide, visualized with UV light and analyzed using a VersaDoc Model 1000 Imaging System with Quantity One 4-4-0 software (BioRad).



Results and discussion

All strains investigated in the present study were predominantly identified as *S. intermedius* based upon their phenotypic properties. In vitro antimicrobial susceptibility tests showed that 17 isolates were resistant to methicillin. Application of duplex PCR yielded following results as shown in Table 3.

Table 3
PCR testing results for the presence of *mecA* and 16S rRNA genes among 100 canine isolates preliminary identified as *S. intermedius*

Methicillin susceptibility phenotypes of tested strains determined by the disc diffusion method	Results of duplex PCR assay			
	<i>mecA</i> + 16S rRNA +	<i>mecA</i> – 16S rRNA +	<i>mecA</i> + 16S rRNA –	<i>mecA</i> – 16S rRNA –
Methicillin - resistant (n=17)	17 (17%)	0	0	0
Methicillin - susceptible (n=83)	0	79 (79%)	0	4 (4%)

The result of duplex PCR assay showed that 4% of the isolates were misidentified as *S. intermedius* upon the identification of the phenotypic test. Totally of 17% of strains recognised as *S. intermedius* carrying *mecA* gene. For 79% of strains we obtained a species-specific product for the 16S rRNA gene of *S. intermedius* but no *mecA* product, as expected for methicillin-sensitive *Staphylococcus intermedius* (MSSI).

SCC*mec* type IIIC was identified in 15 *mecA*-positive strains (88%), type IB was found in one strain (6%). One isolate (6%) was not typable by this technique. The results of multiplex PCR of exemplary 7 investigated *S. intermedius* strains are presented on Fig. 2.

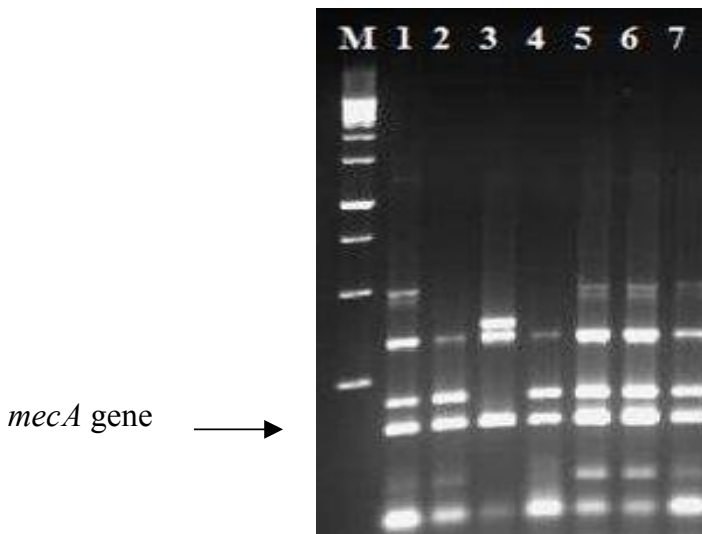


Fig. 2. PCR SCC*mec* profiles from methicillin-resistant *S. intermedius*
M – DNA molecular size marker; 1–7 – exemplary 7 investigated *S. intermedius* strains; SCC*mec* type IB – lanes 3; SCC*mec* type IIIC – lanes 1, 2 and 4 to 7.

The occurrence of *S. intermedius* strains resistant to all antimicrobials commonly used in veterinary medicine is alarming. The results of recent studies have proved that some isolates are resistant to methicillin by expression of *mecA* gene and thus the abbreviation methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* (MRSI) is appropriate in analogy to MRSA. The worldwide increase in the number of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has emphasized the need for the fast and reliable identification and typing methods. In addition to genotyping characterization of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) *mec* type has led to better discrimination of hospital-acquired MRSA (HA-MRSA), carrying one of three types of SCC*mec* (type I, II, or III) and nonmultiresistant community-acquired MRSA (CA-MRSA) carrying type IV or V SCC*mec*. Type IV and V SCC*mec* are small elements that do not carry the antibiotic resistance genes other than *mecA* and has the multiple subtypes [4]. Presence of this small (IV) type of SCC*mec* was observed in *S. schleiferi* subsp. *coagulans* strains isolated from companion animals [12]. Worthwhile to point out that SCC*mec* elements lacking *mecA* have also been reported in *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci. SCCnon-*mec* is located at the same chromosomal site as all SCC*mec* elements, and it contains a virulence factor called capsular polysaccharide 1, which makes the strain more resistant to phagocytosis [10].

In this study we found that *S. intermedius* strains isolated from dogs possessed the type I and III SCC*mec*, and we observed that all these strains were resistant to all beta-lactams and also to other groups of antibiotics (aminoglycosides, thrimethoprim, sulfonamides, tetracyclines, macrolides, and fluorochinolones). Their MIC values were high (data not shown). One isolate was not typable by the method used in this study, and this may indicate that there are a variety of uncharacterized SCC*mec* elements in staphylococcal species other than *S. aureus*.

Little concern has been voiced yet about the possibility of animal to human *mecA* gene transmission.

Canine strains of *S. intermedius* have been found to harbor SCC*mec* elements homologues to those carried by *S. aureus*.

Our findings suggest that the high prevalence of this resistancy vector in dogs may be the reservoirs of antibiotic resistancy genes, and may perhaps be the driving force for the generation of new staphylococcal methicillin-resistant strains. The fact that dogs are in close contact with their owners, the risk of transmission of such bacteria between animals and humans must be considered.

Canine strains of *S. intermedius* have been found to harbor SCC*mec* elements encoding determinants for the expression of the methicillin-resistance phenotype. The SCC*mec* typing strategy we used in this study detected two SCC*mec* elements (SCC*mec* type IB and IIIC). One isolate was not typable by this method.

The diversity of SCC*mec* types found in dogs appears similar to that seen in humans, however uncharacterized SCC*mec* elements in *S. intermedius* may exist.

REFERENCES

1. Atalay B., Ergin F., Cekinmez M., Caner H., Altinors N. Brain abscess caused by *Staphylococcus intermedius* // Acta. Neurochir (Wien). — 2005. — 147. — P. 347–348.
2. Cox H.U. Staphylococcal infections. In: Greence CE (ed) Infectious diseases of the dog and cat. — St. Louis, Saunders Elsevier, 2006. — 316–320 p.



3. Hájek V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1976. — 26. — P. 401–408.
4. Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H., Hiramatsu K. Novel type V Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* driven by a novel Cassette Chromosome Recombinase *ccrC* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2004. — 48. — P. 2637–2651.
5. Kikuchi K., Karasawa T., Itoda Ch.P.I., Hidai H., Yamaura H., Totsuka K., Morikawa T., Takayama M. Molecular confirmation of transmission route of *Staphylococcus intermedius* in mastoid cavity infection from dog saliva // J. Infect. Chemother. — 2004. — 10. — P. 46–48.
6. Kizerwetter-Świda M., Chrobak D., Rzewuska M., Binek M. Antibiotic resistance patterns and occurrence of *mecA* gene in *Staphylococcus intermedius* strains of canine origin // Pol. J. Vet. Sci. — 2009. — 12. — P. 9–13.
7. Kuroda M., Yamashita A., Hirakawa H., Kumano M., Morikawa K., Higashide M., Maruyama A., Inose Y., Matoba K., Toh H., Kuhara S., Hattori M., Ohta T. Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2005. — 102. — P. 13272–13277.
8. Lee J. *Staphylococcus intermedius* isolated from dog-bite wounds // J. Infect. — 1994. — 29. — P. 105–118.
9. Loeffler A., Linek M., Moodley A., Guardabassi L., Sung J.M.L., Winkler M., Weiss R., Lloyd D.H. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from veterinary dermatology referral clinic in Germany // Vet. Dermatol. — 2007. — 18. — P. 412–421.
10. Luong T.T., Ouyang S., Bush K., Lee C.Y. Type 1 capsule genes of *Staphylococcus aureus* are carried in a staphylococcal cassette chromosome genetic element // J. Bacteriol. — 2002. — 184. — P. 3623–3629.
11. Oliveira D.C., Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2002. — 46. — P. 2155–2161.
12. Roberts S., O'Shea K., Morris D., Robb A., Morrison D., Rankin S. A real-time PCR assay to detect the Pantone Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals // Vet. Microbiol. — 2005. — 107. — P. 139–144.
13. Strommenger B., Kettlitz Ch., Werner G., Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Microbiol. — 2003. — 41. — P. 4089–4094.
14. Vandenesch F., Celard M., Arpin D., Bes M., Greenland T., Etienne J. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* // J. Clin. Microbiol. — 1995. — 33. — P. 2508–2510.
15. Wakita Y., Kawano J., Shimizu A., Hájek V., Tomisaka E., Yasuda R., Matsuo E. Development of a PCR test for the identification of *Staphylococcus intermedius* based on the 16S rDNA sequence // J. Vet. Med. Sci. — 2002. — 64. — P. 603–605.

Д. Хробак, М. Кізерветтер-Свіда, М. Ржевуська, М. Бінек

Варшавський університет естественних наук, ул. Чижевського, 8, 02-786, Варшава,
Польща, тел.: +48 22 593 60 66; e-mail: dorota.chrobak@wp.pl

ХАРАКТЕРИСТИКА СТАФИЛОКОККОВОЙ КАССЕТНОЙ ХРОМОСОМЫ *MES* ТИПА У МЕТИЦИЛЛИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ СОБАК

Реферат

SCC*mes* тип у *mesA*-положительных штаммов *S. intermedius* был охарактеризован с использованием метода мультиплексной ПЦР, описанного ранее Oliveira и Lencastre [11]. 100 предварительно идентифицированных изолятов *S. intermedius* были исследованы для подтверждения их видовой принадлежности и для обнаружения *mesA* гена, кодирующего резистентность к метициллину. Дуплексный ПЦР анализ дал возможность идентифицировать все штаммы, несущие *mesA* ген (17%). Исследования показали, что 4% штаммов, идентифицированных как *S. intermedius* на основании их фенотипических свойств, не давали продуктов амплификации гена 16S rРНК, определяющих стафилококки отличные от *S. intermedius*. SCC*mes* типа IIIС была обнаружена у 15 (88%) штаммов, типа IV — только у одного штамма. Лишь один штамм не поддавался типированию с помощью этого подхода.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Staphylococcus intermedius*, мультиплексная ПЦР, *mesA* ген, MRSI, типы SCC*mes*.

Д. Хробак, М. Кізерветтер-Свіда, М. Ржевуська, М. Бінек

Варшавський університет природничих наук, вул. Чижевського, 8, 02-786,
Варшава, Польща, тел.: +48 22 593 60 66; e-mail: dorota.chrobak@wp.pl

ХАРАКТЕРИСТИКА СТАФІЛОКОКОВОЇ КАСЕТНОЇ ХРОМОСОМИ *MES* ТИПУ У МЕТИЦИЛІН-РЕЗИСТЕНТНИХ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS INTERMEDIUS*, ИЗОЛЬОВАНИХ ВІД СОБАК

Реферат

SCC*mes* тип у *mesA*-позитивних штамів *S. intermedius* був охарактеризований з використанням метода мультиплексної ПЛР, що був описаний раніше Oliveira і Lencastre [11]. 100 попередньо ідентифікованих ізолятів *S. intermedius* були досліджені для підтвердження їх видової приналежності та для виявлення *mesA* гена, що кодує резистентність до метициліну. Дуплексний ПЛР аналіз дав можливість ідентифікувати усі штами, що несуть *mesA* ген (17%). Дослідження показали, що 4% штамів, ідентифікованих як *S. intermedius* на підставі їх фенотипових властивостей, не давали продуктів ампліфікації гена 16S rРНК, що виявляють стафілококи відмінні від *S. intermedius*. SCC*mes* типу IIIС була виявлена у 15 (88%) штамів, типу IV — тільки у одного штаму. Лише один штам не піддавався типуванню за допомогою даного підходу.

К л ю ч о в і с л о в а: *Staphylococcus intermedius*, мультиплексна ПЛР, *mesA* ген, MRSI, типи SCC*mes*.



**Bogumiła Szponar, Mariola Paściak, Bartosz Figiel,
Andrzej Gamian**

Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences,
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, Poland
tel.:+48 71 370 9922, e-mail: szponar@iitd.pan.wroc.pl

**CHEMOTAXONOMICAL IDENTIFICATION
OF ACTINOBACTERIAL STRAINS ISOLATED
FROM DAMP-AFFECTED OFFICE BUILDING**

Four actinobacterial sporulating strains have been isolated from two damp-affected office buildings. They have been identified as Streptomyces sp. (three strains) and cell wall type IV actinobacteria (one strain) by the chemotaxonomical approach.

Key words: Actinobacteria, Streptomyces, chemotaxonomy, cell wall, indoor air.

Harmful microbes in indoor environments are a cause of public concern. Bacteria and fungi infest house and office buildings affected by dampness and the environmental conditions and microbial communities undergo continual changes resulting in different microbial populations. Microbial growth on moisture-damaged building materials is commonly associated with adverse health effects in the occupants. Microorganisms, their spores and cell wall components are biologically active agents which may cause and trigger allergy and other respiratory diseases, i.e. chronic airways inflammation [1]. Although the microbial diversity in indoor environment is high, the filamentous and sporulating fungi dominate on indoor microbiota screenings [2, 3]. Recently actinobacteria involved in biological infestation of damp buildings attract increasing interest [4].

Actinobacteria are Gram-positive bacteria, with high G+C content, filamentous microorganisms, majority of which are saprophytic soil and other environmental inhabitants. As common soil organisms they easily colonize water-damaged building materials and may emit toxic-metabolites isolated from the indoor environment of a building where the occupants suffered building-related ill-health symptoms [5].

The aim of present studies was identification of sporulating bacterial strains isolated from wall surface of damp-affected office building in Warsaw (Poland), by means of chemotaxonomical approach.

Materials and methods

Bacterial strains L1, L2, W3, and W4 were isolated from the wall surface of damp-affected office building in Warsaw, Poland.

The isolates were cultivated aerobically on medium "79" in 37 °C for 48 hours. Bacterial biomass was collected by centrifugation in 7000 rpm, after repeated washing



with PBS and MilliQ water. The wet biomass was suspended in MilliQ water (1:1, v:v) and frozen in $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to X-press (AB Biox, Sweden) cell disruption.

The crude cell wall extract was prepared by centrifugation (6000 rpm, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) of disintegrated cells. Supernatant containing crude bacterial cell walls was collected and frozen dried. The cell wall preparations were frozen dried and subjected to hot SDS extraction according to [6]. Proteins and nucleic acids remaining in preparations were removed by using enzymes and dialyzed to deionized water [6].

Sugars were analysed after derivatisation according to [7]; amino acids and fatty acids were derivatised according to [5] and analysed by gas chromatography-mass spectrometry [8].

LL- and *meso* diaminopimelic acid (DAP) isomers were determined by thin-layer chromatography [8].

Bacterial glycolipids were analysed in crude lipid extracts of bacterial biomass by use of thin layer chromatography and visualized by orcinol reagent [8].

An inflammatory potential of the cell wall constituents after purification has been examined by stimulation of cytokines TNF- α and interleukin 1 β (IL-1 β) in vitro in isolated human leukocytes by commercial ELISA tests (BD Biosciences).

Results and discussion

All four studied strains formed dry, lathery colonies producing white spores (Fig. 1). Microscopically, extensively branched Gram-positive pseudomycelium was observed.

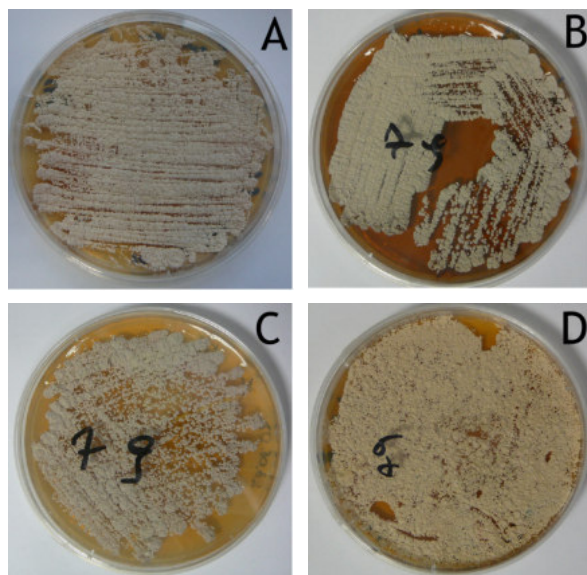


Fig. 1. Sporulating strains L1(a), L2 (b), W3 (c), W4 (d) cultivated on “79” medium

Fatty acids profile of strains L2, W3 and W4 consisted of saturated, branched forms of different chain length *iso*C12, *iso*C16, *aiso*C16, *iso*C17, *iso*C18, and *aiso*C18.

L1 strain is characterized by the least number of fatty acids only *iso*C17:0, *iso*C18:0, and *aiso*C18:0 were present (tab. 1).

Table 1

Fatty acid composition and relative percentage in studied strains

Strain	iso C12:0	iso C16:0	aiso C16:0	iso C17:0	n C17:0	iso C18:0	aiso C18:0
L1	-	-	-	76%	-	9.5%	14.5%
L2	-	10%	25%	25.5%	12.5%	7%	20%
W3	4%	11%	21%	31%	10%	10%	13%
W4	4%	10%	20%	31%	9.5%	10.5%	15%

Alanine, glycine, glutamic acid and diaminopimelic acid (DAP) were detected in the preparations of the cell wall of all investigated strains. LL-Diaminopimelic acid (LL-DAP), marker of *Streptomyces* spp., has been detected in strains W3, W4 and L2. Mezo-DAP was present in L1 strain.

Taxonomically important sugars present in studied strains are presented in Table 2.

Table 2

Sugar composition in cell biomass and in cell wall preparations of *Streptomyces* isolates

Strain	Mannose		Glucose		Galactose		N-acetyl glucosamine	
	total cell	cell wall	total cell	cell wall	total cell	cell wall	total cell	cell wall
L2	+	+	-	-	-	-	-	+
L1	-	+	-	-	+	-	-	+
W3	+	+	-	-	-	-	-	+
W4	-	+	+	+	-	-	-	+

Three strains: L2, W3 and W4 represent I-type of bacterial cell wall, with mannose and N-acetylglucosamine (strain W4 contained mannose and glucose). The L1 strain differed from these strains by the type of growth, and sugar profile which comprised mannose, N-acetylglucosamine and galactose. Fatty acids were represented only by iso C17, and *meso*-DAP was detected. Due to this characteristics strain L1 cannot be classified as belonging to *Streptomyces* genus.

Three of studied strains (L2, W3, W4) revealed similar glycolipid profile with one domination glycolipid of similar retention time to *Streptomyces* sp., while L1 strain did not contain major glycolipid (Fig. 2).

An increasing potency of bacterial cell wall constituents of strain L2 has been shown to stimulate the human blood cells to TNF- α and IL-1 β production and was concentration-dependent.



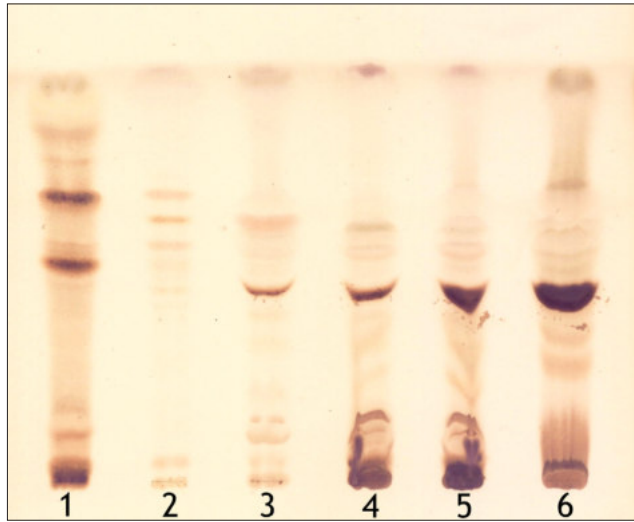


Fig. 2. Glycolipids of studied strains, TLC chromatogram visualized with orcinol reagent

1 – *Nocardioopsis dassonvillei*; 2 – strain L1; 3 – strain L2; 4 – strain W3;
5 – strain W4; 6 – *Streptomyces* sp.

Streptomyces are Gram-positive filamentous bacteria of the class *Actinobacteria* [9]. They are predominantly soil bacteria, but are also present in other habitats [10]. *Streptomyces* have been cultivated from dust samples collected from schools, day-care facilities and private houses [11,12,13]. *Streptomyces* are not demanding in their growth requirements; they metabolise biological polymers, i.e. cellulose, lignin, or chitin as their carbon source, and they do not need organic nitrogen for growth. Excepting a few thermophilic species, the optimal growing temperature is 25–28 °C, as it was observed also for our strains. These features make building materials suitable for their growth and proliferation [14]. *Streptomyces* are also highly potent producers of secondary metabolites of diverse biological activities, such as antibiotic, immunosuppressive, or antitumor [15]. Characteristic volatile metabolite of *Streptomyces* is geosmin, a volatile degraded sesquiterpene, responsible for odor of moist soil [16]. Cytotoxic potential of streptomycetal spores in cocultivation with moulds was reported [17]. Inflammatory and toxic potential of *Streptomyces* spores, not dependent on their viability, has also been confirmed [18].

Three investigated strains: W2, W3 and L2 belong to *Streptomyces* genus, while sporulating L1 strain characterized by cell wall type IV, is a member of *Actinobacteria* class, and further analysis is needed for complete determination of the taxonomical position.

REFERENCES

1. Andersson A.M., Weiss N., Rainey F., Salkinoja-Salonen M.S. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres // *J. Appl. Microbiol.* – 1999. – 86. – P. 622–634.
2. Demain A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1999. – 52. – P. 455–463.



3. Gerber N.N., Lechevalier H.A. Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes // *Appl Microbiol.* — 1965. — 13. — P. 935–938.
4. Hameed A., Awad A. and Farag S.A. An indoor bio-contaminants air quality // *Int. J. Environ. Health Res.* — 1999. — 9. — P. 313–319.
5. Hancock I.C. Analysis of cell wall constituents of gram positive bacteria. In: *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics.* ed. Goodfellow M. and O'Donnell A.G. — Chichester: Wiley & Sons Ltd., 1994. — P. 63–84.
6. Hardin B.D., Kelman B.J., Saxon A. Adverse human health effects associated with molds in the indoor environment // *J. Occup. Environ. Med.* — 2003. — 45. — P. 470–478.
7. Hirvonen M.-R., Ruotsalainen M., Savolainen K., Nevalainen A. Effect of viability of actinomycete spores on their ability to stimulate production of nitric oxide and reactive oxygen species in RAW264.7 macrophages // *Toxicology.* — 1997. — 124. — P. 105–114.
8. Johanning E. Indoor moisture and mold-related health problems // *Eur. Ann Allergy Clin. Immunol.* — 2004. — 36. — P. 182–185.
9. Kim J.L., Elfman L., Mi Y., Wieslander G., Smedje G., Norbäck D. Indoor molds, bacteria, microbial volatile organic compounds and plasticizers in schools--associations with asthma and respiratory symptoms in pupils // *Indoor Air.* — 2007. — 17. — P. 153–163.
10. Murtoniemi T., Nevalainen A., Suutari M., Toivola M., Komulainen H., Hirvonen M.-R. Induction of cytotoxicity and production of inflammatory mediators in RAW264.7 macrophages by spores grown on six different plasterboards // *Inhal. Toxicol.* — 2001. — 13. — P. 233–247.
11. Murtoniemi T., Penttinen P., Nevalainen A., Hirvonen M.-R. Effects of microbial cocultivation on inflammatory and cytotoxic potential of spores // *Inhal. Toxicol.* — 2005. — 17. — P. 681–693.
12. Paściak M., Mordarska H., Szponar B., Gamian A. Chemotaxonomical methods in the diagnostics of clinical strains causing actinobacterial infections // *Post Hig Med. Dośw.* — 2007. — 61. — P. 403–412.
13. Peltola J., Andersson M.A., Haahtela T., Mussalo-Rauhamaa H., Rainey F.A., Kroppenstedt R. M., Samson R. A., Salkinoja-Salonen M.S. Toxic-metabolite-producing bacteria and fungus in an indoor environment // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — 67. — P. 3269–3274.
14. Sawardeker J. S., Slonecker J. H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditolacetals by gas liquid chromatography // *Analyt. Chem.* — 1965. — 37. — P. 1602–1604.
15. Smedje G., Norbäck D. Irritants and allergens at school in relation to furnishing and cleaning // *Indoor Air.* — 2001. — 11. — P. 127–133.
16. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. // *Int. J. Syst. Bacter.* — 1997. — 47. — P. 479–491.
17. Suihko M.L., Priha O., Alakomi H.L., Thompson P., Mølarstig B., Stott R., Richardson M. Detection and molecular characterization of filamentous actinobacteria and thermoactinomycetes present in water-damaged building materials // *Indoor Air.* — 2009. — 19. — P. 268–277.
18. Williams S.T., Goodfellow M., Alderson G. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 399AL. In: Williams, S.T., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* — Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. — Vol. 4. — P. 2452–2492.

Б. Шпонар, М. Пашак, Б. Фигел, А. Гамиан

Институт иммунологии и экспериментальной терапии
Польской академии наук,
ул. Рудольфа Вейгля, 12, 53–114, Вроцлав, Польша
тел. +48 71 3770 9922, e-mail szponar@iitd.pan.wroc.pl

ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ АКТИНОБАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПОРАЖЕННЫХ СЫРОСТЬЮ ОФИСНЫХ ЗДАНИЙ

Реферат

Выделены четыре спорообразующих штамма бактерий из двух офисных зданий поврежденных сыростью. С помощью хемотаксономического подхода они идентифицированы как *Streptomyces sp.* (3 штамма) и актинобактерии с клеточной стенкой IV типа (1 штамм).

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Actinobacteria*, *Streptomyces sp.*, хемотаксономия, клеточная стенка, воздух помещений.

Б. Шпонар, М. Пашак, Б. Фигел, А. Гамиан

Институт імунології та експериментальної терапії академії наук Польщі,
вул. Рудольфа Вейгля, 12, 53 – 114, Вроцлав, Польща
тел. +48 71 370 9922, e-mail: szponar@iitd.pan.wroc.pl

ХЕМОТАКСОНОМІЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ШТАМІВ АКТИНОБАКТЕРІЙ, ІЗОЛЬОВАНИХ З УРАЖЕНИХ ВОЛОГОЮ ОФІСНИХ БУДІВЕЛЬ

Реферат

Виділено чотири штами споротвірних бактерій з двох офісних будівель уражених вологою. За допомогою хемотаксономічного підходу штами ідентифіковані як *Streptomyces sp.* (3 штами) і актинобактерії з клітинною стінкою IV типу (1 штам).

К л ю ч о в і с л о в а: *Actinobacteria*, *Streptomyces*, хемотаксономія, клітинна стінка, повітря приміщень.



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

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

СПОСОБНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* ГИДРОЛИЗОВАТЬ КСИЛАН

*Исследована способность гидролизовать сложноструктурный ксилан у 353 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам. Показано, что эта способность достаточно широко распространена среди 207 штаммов микроорганизмов этого рода, что составило 58,6% от всех исследованных. Среди них доминировали штаммы видов *B. subtilis* (111 штаммов из 228) и *B. megaterium* (11 штаммов из 13). Способность гидролизовать ксилан также обнаружена у штаммов видов *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. species*, *B. oligonitrophilus*. Штаммы видов *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B.adius*, *B. bombycis*, *B. lentus* и *B. pulvifaciens* не гидролизуют ксилан. Установлены не только видовые, но и штаммовые различия.*

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

В природных растительных материалах сложная по структуре целлюлоза обычно связана со многими другими углеводными соединениями: гемицеллюлозой, пектином, лигнином, крахмалом. Гемицеллюлозы, в частности, ксиланы, как и целлюлоза, относятся к основным компонентам клеточной стенки растительных материалов, их содержание в них составляет обычно 20–30%, а в ряде случаев и больше — 34–41% (кукурузная кочерыжка, солома, подсолнечная лузга, семена риса, ржи, сои, гороха, древесина разных пород). По современным представлениям через разные по структуре ксиланы осуществляется связь между целлюлозой и тяжело разлагающимся лигнином в растительных отходах [2].

Способность к образованию ферментов, расщепляющих не только целлюлозу, но и ксиланы, которыми богаты разнообразные сельскохозяйственные растительные отходы, более широко распространена среди грибов и актиномицетов, менее — среди бактерий. Ксиланазы обнаружены у бактерий рода *Bacillus* и обладают большей молекулярной массой, чем из грибов, и нередко более активны [4–7, 9]. Как возможные продуценты гидролитических ферментов эти микроорганизмы изучены значительно меньше, чем грибы, между тем широкое распространение их в природе и способность расщеплять такие труднодоступные соединения как ксиланы свидетельствуют о том, что бациллы обладают богатым набором ферментных систем и многие из них могут быть промышленно значимыми, а значит перспективными в будущем [8, 10]. В связи с изложенным, большой научный интерес и важное практическое значение представляет поиск активных штаммов среди бактерий рода *Bacillus* как продуцентов ксиланаз, которые могут быть использованы в сельском хозяйстве, в фармацевтической и пищевой промышленности.

Целью настоящей работы явился скрининг продуцентов ксиланаз и изучение их активности среди штаммов разных видов бактерий рода *Bacillus*.



Материалы и методы

В работе использованы 353 штамма бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам, из коллекции культур отдела антибиотиков ИМВ НАН Украины.

Бактерии выращивали в течение 2-х суток при 37 °С в чашках Петри на агаризованной среде следующего состава (в г/л): цитрат натрия — 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75; KH_2PO_4 — 9,6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18, которую использовали для первичного отбора ксиланазоактивных штаммов. В качестве источника углерода использовали ксилан овса [фирма Fluka, Германия] в концентрации 1%.

Отбор активных штаммов вели по зонам просветления ксилана, которые проявлялись на 2-е сутки инкубирования вокруг выросших колоний бактерий и отчетливо визуализировались после прокрашивания среды красителем конго рот (0,1%). По диаметру зон судили о способности культур разлагать ксилан. Активность ксиланаз (в ед/мл) определяли титровальным методом по количеству образующихся при ферментативном гидролизе 1%-ного ксилана в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере (рН 5,0) редуцирующих сахаров (ксилозы) [3].

Активность эндоглюканызы и β -глюкозидазы определяли по количеству образующейся при их гидролизе глюкозы по предварительно построенным калибровочным кривым [3]. Содержание глюкозы находили с помощью 3,5-динитросалициловой кислоты [3].

Результаты и их обсуждение

Изучение ксиланазной активности бактерий проводили поэтапно. Первый этап работы заключался в качественном отборе штаммов, способных гидролизовать ксилан. Большинство культур (207 штаммов из исследованных — 58,6% от общего числа штаммов) образовывали зоны гидролиза ксилана разного диаметра: 87 штаммов из них (42%) — зоны диаметром от 10 до 20 мм, 44 штамма (21,3%) — зоны 20–25 мм и 36 штаммов (17,4%) — зоны более 25 мм (табл.1). Наибольшей способностью гидролизовать ксилан среди исследуемых бактерий обладали штаммы самого многочисленного в наших исследованиях вида *B. subtilis*. Из 228 штаммов 161 штамм (70,6%) был способен гидролизовать ксилан. Достаточно активными в использовании этого субстрата были также штаммы видов *B. megaterium* (11 штаммов из 13), *B. pumilus* (6 штаммов из 14), *B. licheniformis* (4 штамма из 25) и *B. cereus* (4 штамма из 24). Виды *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B.adius*, *B. bombycis*, *B. lentus* и *B. pulvifaciens* не способны разлагать ксилан и целлюлозу.

В практике считается важным, чтобы для полного расщепления клеточных оболочек растительного сырья, культуры наряду с ксиланазной обладали высокой целлюлазной активностью. Способных активно гидролизовать как ксилан, так и целлюлозу выявлено 140 штаммов, составивших 39,7% от общего количества исследованных штаммов (табл. 2). Все дальнейшие исследования проводили с этими штаммами. Комплексы ксиланаз и целлюлаз доминировали в основном среди штаммов вида *B. subtilis* (111 из 228, то есть 48,7% от общего количества исследованных штаммов). Широко распространена способность гидролизовать ксилан и целлюлозу среди штаммов вида *B. megaterium* (76,9%). Активные штаммы обнаружены и среди видов *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *Bacillus spp.*, *B. polymyxa*, *B. laterosporus*, *B. oligonitrophilus*, *B. firmus* и *B. macerans*.



Ксиланазная активность бактерий рода *Bacillus*
(диаметр зон гидролиза ксилана)

Xylanase activity of genus *Bacillus* bacteria
(the diameter of xylanase hydrolysis zones)

Вид	Количество штаммов	Количество штаммов по диаметру зон гидролиза ксилана, мм				
		0	0,1–10	10–20	20–25	более 25
<i>B. subtilis</i>	228	67	33	68	36	24
<i>B. licheniformis</i>	25	21	0	3	1	0
<i>B. cereus</i>	24	20	2	1	1	0
<i>B. megaterium</i>	13	2	3	3	3	2
<i>B. pumilus</i>	14	8	0	2	1	3
<i>B. coagulans</i>	3	2	0	1	0	0
<i>B. circulans</i>	4	4	0	0	0	0
<i>B. alvei</i>	3	1	0	0	1	1
<i>B. polymyxa</i>	2	1	0	0	0	1
<i>B. brevis</i>	3	2	0	1	0	0
<i>B. thuringiensis</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B. firmus</i>	2	1	0	0	0	1
<i>B. laterosporus</i>	2	0	0	1	0	1
<i>B. sphaericus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>B.adius</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. bombycis</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. lentus</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. pasteurii</i>	1	0	0	0	0	1
<i>B. macerans</i>	2	1	0	1	0	0
<i>B. pulvifaciens</i>	1	1	0	0	0	0
<i>B. species</i>	15	8	1	5	0	1
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	0	0	1	1	1
<i>B. silvestris</i>	1	0	1	0	0	0
Всего	353	-	-	-	-	-
в т.ч. активных	207	-	40	87	44	36
неактивных	146	146	-	-	-	-

Из сообщений различных авторов известно, что ферменты микробного происхождения, могут быть гетерогенными по составу и состоять из различных типов как целлюлаз, так и гемицеллюлаз, различающихся по способу действия, по содержанию углеводов, аминокислот и т.п. [2, 4, 6]. В наших исследованиях гетерогенность ферментных комплексов подтверждается зонами, различающимися не только по диаметру, но и по окраске (желтые, темные и смешанные).

Таблица 2
Способность к гидролизу Na-КМЦ и ксилана у штаммов рода *Bacillus*Table 2
The ability of the strains of genus *Bacillus* to hydrolyze Na-CMC and xylane

Вид	Число штаммов	Na-КМЦ ¹		Ксилан		Na-КМЦ и ксилан	
		к-во	%	к-во	%	к-во	%
<i>B. subtilis</i>	228	160	70,2	161	70,6	111	48,7
<i>B. licheniformis</i>	25	8	32,8	4	16,0	3	12,0
<i>B. cereus</i>	24	6	25,0	4	16,7	2	8,3
<i>B. megaterium</i>	13	10	76,9	11	84,6	10	76,9
<i>B. pumilus</i>	14	10	71,4	6	42,8	3	21,4
<i>B. coagulans</i>	3	1	33,3	1	33,3	-	-
<i>B. circulans</i>	4	-	-	-	-	-	-
<i>B. alvei</i>	3	1	33,3	2	66,7	-	-
<i>B. polymyxa</i>	2	2	100	1	50,0	2	100
<i>B. brevis</i>	3	-	-	1	33,3	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	2	1	50,0	-	-	-	-
<i>B. firmus</i>	2	2	100	1	50,0	1	50,0
<i>B. laterosporus</i>	2	2	100	2	100	2	100
<i>B. sphaericus</i>	2	-	-	-	-	-	-
<i>B.adius</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. bombycis</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. lentus</i>	1	-	-	-	-	-	-
<i>B. pasteurii</i>	1	-	-	1	100	-	-
<i>B. macerans</i>	2	2	100	1	50,0	1	50,0
<i>B. pulvifaciens</i>	1	1	100	-	-	-	-
<i>B. species</i>	15	-	-	7	46,7	3	20,0
<i>B. oligonitrophilus</i>	3	3	100	3	100	2	66,7
<i>B. silvestris</i>	1	-	-	1	100	-	-
Всего	353	209	59,2	207	58,6	140	39,7

Примечание: ¹ — натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы

Следующим этапом для отбора бактерий было проведение исследований по способности отобранных в ходе первичного скрининга штаммов *B. subtilis* использовать 1%-ную суспензию ксилана в качестве единственного источника углерода при их глубинном выращивании на жидкой питательной среде. На примере наиболее активных при расщеплении ксилана штаммов показано, что накопление образующейся ксиланозы в культуральной жидкости у них связано с ростом бактерий в присутствии ксилана на среде, включающей кукурузный экстракт (рис.). На этой



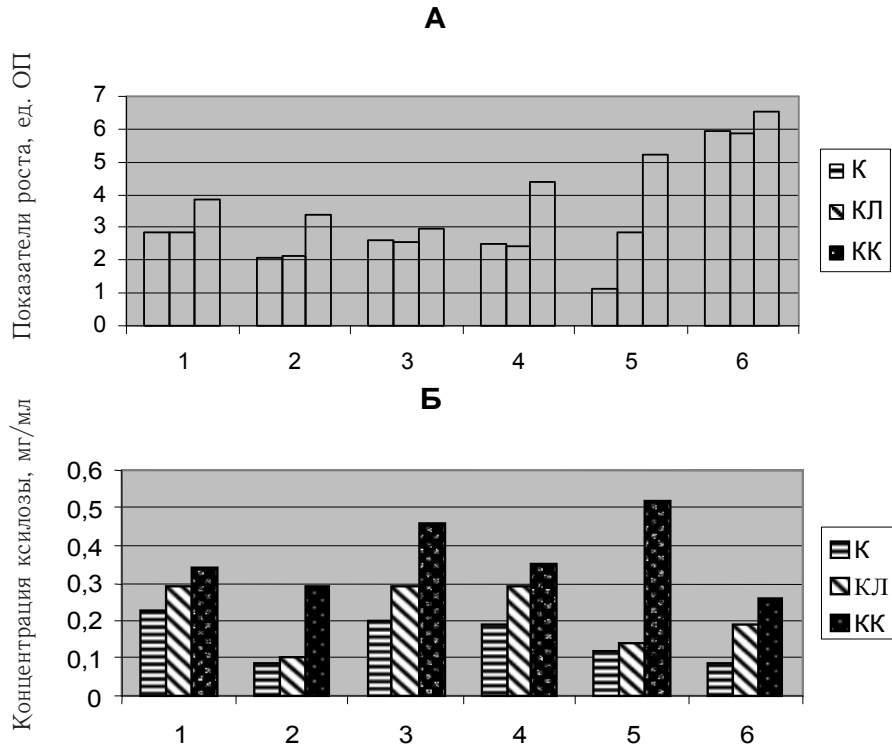


Рис. Показатели роста (А) и ксиланазной (Б) активности на примере штаммов *Bacillus subtilis*
Штаммы *Bacillus subtilis*: 1 – 518, 2 – 55ЛГ, 3 – 96ЛГ, 4 – МС-19, 5 – 43ЛГ, 6 – 54ЛГ. Среды: К – ксилан (контроль); КЛ – ксилан + лактоза; КК – ксилан+кукурузный экстракт.

Fig. Indices of growth (A) and xylanase (B) activity by example strains *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis strains: 1 – 518, 2 – 55ЛГ, 3 – 96ЛГ, 4 – МС-19, 5 – 43ЛГ, 6 – 54ЛГ. Media: X – xylan; XL – xylan+lactose; XC – xylan+corn extract.

среде наблюдались наиболее существенные различия между штаммами *B. subtilis* как в накоплении биомассы клеток, так и в образовании ими сахаров. О положительном влиянии кукурузного экстракта на образование ксиланаз другими микроорганизмами сообщается и некоторыми исследователями [1]. На средах без кукурузного экстракта или лактозы рост бактерий был более слабым и сопровождался значительно меньшим накоплением в среде редуцирующих сахаров. Полученные результаты дают возможность судить о характере ксиланаз, синтезируемых исследуемыми бактериями в питательной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода ксилан и кукурузный экстракт в качестве индуктора синтеза этих ферментов.

Обобщая полученные результаты скрининга из 353 штаммов бактерий рода *Bacillus*, относящихся к 23 видам, как наиболее активные продуценты ксиланазного комплекса ферментов отобраны 5 штаммов *B. subtilis* (штаммы МС-13₂, 1155, 80 ЛГ), *B. licheniformis* (штамм А_{6/3}) и *B. megaterium* (штамм 906). Данные штаммы

бацилл характеризовались также значительной целлюлозолитической активностью (табл. 3). Поэтому они могут рассматриваться как наиболее перспективные продуценты таких промышленно важных ферментов как целлюлазы и ксиланазы для использования в биотехнологических процессах.

Таблица 3

Ферментативная активность (ед/мл) бактерий рода *Bacillus*

Table 3

Fermentative activity (u/ml) of genus *Bacillus* bacteria

Штамм	Ксиланаза	Эндоглюканаза	β -глюкозидаза
<i>B. subtilis</i> МС-13 ₂	35,7 ± 5,6	158,4 ± 7,5	93,5 ± 2,1
<i>B. subtilis</i> 80 ЛГ	30,6 ± 3,7	292,5 ± 5,9	84,5 ± 1,8
<i>B. subtilis</i> 1155	30,6 ± 3,1	152,5 ± 5,5	85,5 ± 2,0
<i>B. megaterium</i> ИНМИВ 90	30,6 ± 2,5	252,5 ± 3,8	87,5 ± 2,5
<i>B. licheniformis</i> А _{6/3}	34,7 ± 1,9	180,2 ± 2,7	87,5 ± 1,1

Наличие комплекса ферментов, принимающих участие в гидролизе сложно разрушаемых растительных субстратов, очень важно, поскольку ксиланазы делают эти субстраты еще более доступными для действия целлюлозолитических и других ферментов. Действуя на клеточную стенку в комплексе, они могут повысить питательную и биологическую ценность кормов в животноводстве с помощью бактерий рода *Bacillus*, сделать эффективнее такие процессы как консервирование и осахаривание. Такие препараты также могут быть эффективными в других отраслях, таких как пивоварение, производство плодово-ягодных соков и других.

ЛИТЕРАТУРА

1. Головина И.Г. Изучение целлюлитических ферментов термотолерантного штамма *Actinomyces diastaticus* 7 // Прикладная биохимия и микробиология. — 1972. — т.8, №5. — С. 546–553.
2. Михайлова Р.В., Лобанюк А.Г. Гемичеселлюлозы и их ферментативное расщепление // Биологически активные вещества микроорганизмов. — Минск: Наука и техника, 1975. — С.3–17.
3. Рухлядева А.П., Полюгалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. — 288 с.
4. Avcioglu Vanu, Eyyupglu Vanu, Bakir Ufuk. Production and characterization of xylanases of a *Bacillus* strain isolated from soil // World J. Microbiol and Biotechnol. [КЭ] — 2005. — 21, №1. — С. 65–68.
5. Han X.F., Zhend L.S., Xil X.M. Study on screening and cultivation conditions of xylanase - producing alkalophilic bacterial // Wuhan Univ. J. Natur. Sci. — 2004. — 9, №1. — P. 125–128.
6. Heck J.X., Hertz P.E., Ayub M.Z. Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid- state cultivation // Braz. J. Microbiol. — 2002. — 33, №3. — P. 213–218.
7. Honda H., Kudo T., Ikura Y., Horikoshi K. Two types of alkalephilic *Bacillus* sp. No C-125 // Can. J. Microbiol. — 1985. — 31. — P. 538–542.
8. Mamadza C., Zvaуya R. Production of cellulases by *Bacillus subtilis* strains cultured on wastewater // Agv. Feod Sci. — 2001. — 23, №1. — P. 15–19.



9. Paul J., Varma A.K. Characterisation of cellulose and hemicellulose degrading *Bacillus* sp. from termite infected soil.// Curr. Sci. — 1993. — 64 (4). — P. 262–266.

10. Subramaniyan S., Prema P. Cellulase - free xylanases from *Bacillus* and other micro-organisms // FEMS Microbiol. Letters. — 2000. — 183. — P. 1–7.

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

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

ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* ГІДРОЛІЗУВАТИ КСИЛАН

Реферат

Досліджена здатність гідролізувати складноструктурний ксилан у 353 штамів бактерій роду *Bacillus*, що відносяться до 23 видів. Показано, що ця здатність досить поширена серед 207 штамів мікроорганізмів цього роду, що становить 58,6% від усіх досліджених. Серед них домінували штами видів *B. subtilis* (111 штамів із 228) і *B. megaterium* (11 штамів із 13). Здатність гідролізувати ксилан також знайдена у штамів видів *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. species*, *B. oligonitrophilus*. Штами видів *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. badius*, *B. bombycis*, *B. lentus* і *B. pulvifaciens* не гідролізували ксилан. Спостерігались не тільки видові, але і штамові відмінності.

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

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

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU, Zabolotnoho str., 154,
Kiev, D 03680, Ukraine, tel.: +38(044) 526 24 09, e-mail: safronova_larisa@ukr.net

ABILITY OF BACTERIA OF GENUS *BACILLUS* TO HYDROLYZE XYLANE

Summary

The ability to hydrolyze xylane has been investigated in 353 strains of bacteria belonging to 23 species of genus *Bacillus*. Xylanase activity was revealed in 207 strains of the genus (58.6% from all investigated cultures). Strains of species *B. subtilis* (111 strains) and *B. megaterium* (11 strains) dominated among them. Strains of species *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. species*, *B. oligonitrophilus* also displayed activity against xylane. Cultures of species *B. circulans*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *B. badius*, *B. bombycis*, *B. lentus* and *B. pulvifaciens* did not appear any activity.

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



**I.M. Stolyarchuk¹, T.P. Shevchenko¹, V.P. Polischuk¹,
A.V. Kripka²**

¹Taras Shevchenko Kyiv National University, Volodymyrska str., 64,
Kyiv, 01033, Ukraine

e-mail: inna_stolyarchuk@mail.ru, tyvonchuk@ukr.net, pvp.@mail.univ.kiev.ua

²Institute of Cell Biology of NASU, Acad. Zabolotny str., 148,
Kyiv, 013143, Ukraine; e-mail: akripka@yahoo.com

VIRUS INFECTION COURSE IN DIFFERENT PLANT SPECIES UNDER INFLUENCE OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA

*The results of the research aimed to study the influence of plants root colonization by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on virus infection development are presented in the paper. Tobacco mosaic virus (TMV) – *Nicotiana tabacum* model was used for the experiment. TMV – *Lycopersicon esculentum* and Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) – *Cucumis sativus* were used as important agricultural plants. Microscopy, molecular and serological methods were used in the experiment. It was shown that arbuscular mycorrhiza inhibits the plant virus infection development in *Nicotiana tabacum* and *Cucumis sativus* plants but not in *Lycopersicon esculentum*.*

*Key words: TMV (Tobacco mosaic virus), CGMMV (Cucumber green mottle mosaic virus), *Glomus intraradices*, arbuscular mycorrhiza.*

Symbiotic interactions between the plants and microorganisms in rhizosphere is one of the major factors of plant health and soil fertility. Arbuscular mycorrhiza (AM) is a very common type of symbiotic interactions for the majority of the plants. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are widely spread and characterized by vast host range. The plants colonized by AMF demonstrate higher growth rate than plants without AM [13, 14]. Moreover AM increases resistance of the plants to stress factors and soilborne pathogens [6]. Activation of plant resistance to pathogens can be explained by anatomical or pathogenic changes in root system or alterations in rhizosphere microbial associations caused by arbuscular fungi [11]. The facts about the role of AM in inhibition of virus infection can be used to improve efficiency of antiviral preventive measures [7, 8]

The aim of this research was to study the influence of root colonization of plants by arbuscular mycorrhizal fungi on development of virus infection, caused by TMV in model plant *Nicotiana tabacum* and in important agricultural plants such as *Lycopersicon esculentum*, and by CGMMV in *Cucumis sativus* plants. *Glomus intraradices* was used in this experiment as one of the most widespread AMF that forms symbiosis with a large number of plant species. Furthermore *Glomus* mycelium can be cultivated at industrial scale and can be used in soil mixtures for the greenhouses.



Materials and methods

The plants used in the experiment are characterized as having systemic reaction in response to phytoviral infection. *Nicotiana tabacum* – TMV was used as a classic model, and *Lycopersicon esculentum* and *Cucumis sativus* were chosen as the plants important for agriculture, particularly for the greenhouses. These systems differed in the inoculation method. For the *Nicotiana tabacum* cv. *trapesond*, TMV viral preparation was poured in soil at concentration of 24.41 µg/ml, the final concentration of virus in soil constituted 500 ng/ml. The plants in *Cucumis sativus* – CGMMV system were infected by soaking seeds in viral preparation (concentration of virus was 200 µg/ml) overnight. The plants in *Lycopersicon esculentum* – TMV system were infected mechanically in two upper level leaves. Concentration of viral preparation was 250 µg/ml [5].

All plants were divided in four groups: the intact plants, the virus-infected plants without AM, non-infected plants with AM, and the plants with both virus and *Glomus intraradices*.

An incubation mixture was used to accumulate the infectious inoculum of AMF in *Tagetes patula* plants. The quantitative analysis of root colonization rate was performed in 80 days [3]. The obtained inoculum was used in the mixture with zeolite. The final proportion of soil and zeolite was 5:1.

Light microscopy of roots was carried out to control the process of AMF colonization. For the quantitative characterization of root mycorrhization the following parameters were used: F – colonization frequency (the percent of roots with fungal structures), M – colonization intensity (percent of colonized cortex in each root), A – percent of arbuscules in colonized roots, a – percent of arbuscules in the whole root system. The minimal value of these parameters in the case of successful colonization is 50% [3].

DNA from plant material was extracted using the phenol-chloroform method. [15]. PCR analysis was carried out to determine AMF in roots [16]. For PCR, primers complementary to internal transcribing spacers of rRNA genes of *Glomus intraradices* were used. The nucleotide sequence of primers: ITS1- TCCGTAGGTGAACCTGCGG; ITS4- TCCTCCGCTTATTGATATGC [16]. The results of PCR were visualized using electrophoresis in 1% agarose gel. Gene Ruler 100 bp DNA ladder (100-3000 bp, MBI Fermentas) was used as markers set.

Indirect ELISA with polyclonal rabbit antibodies was used to detect the viral antigens in plant samples. For ELISA the samples from each plant were collected. The leaves with strongly pronounced macroscopic symptoms, such as mosaic, deformation of leaf blade and necrosis were taken. The samples from the plants not showing the symptoms of virus infection including dried-up leaves were also collected [5].

Results and discussion

The efficiency of colonization was determined by counting the fungal structures in roots of the colonized plants. The number of arbuscules as primary structures playing the role in nutrients exchange shows the rate of transport between the fungus and the plant. Light microscopy analysis of the colonized roots showed the presence of both arbuscules and vesicles in the root cortex of the plants that confirms successful colonization. The results of the quantitative analysis of plant roots colonization rate are shown in Table.



Quantitative analysis of AM colonization

Experimental plant	Virus presence	F%	M%	A%	a%
<i>Nicotiana tabacum</i>	+	73.33	53.30	65.94	35.20
	-	76.67	37.67	96.90	36.50
<i>Lycopersicon esculentum</i>	+	76.67	23.53	97.18	22.87
	-	94.00	32.50	93.74	30.34
<i>Cucumis sativus</i>	+	93.56	35.84	94.23	29.05
	-	95.46	48.09	96.37	33.75

The rates of root colonization, shown in the table, were considerably higher than the minimal rate of 50% confirming successful formation of symbiotic interactions between the plants and AMF.

The PCR analysis of colonized roots was carried out as well to detect the presence of *Glomus intraradices* nucleic acid. The expected fragment approx of 450 bp has been detected (Fig. 1).

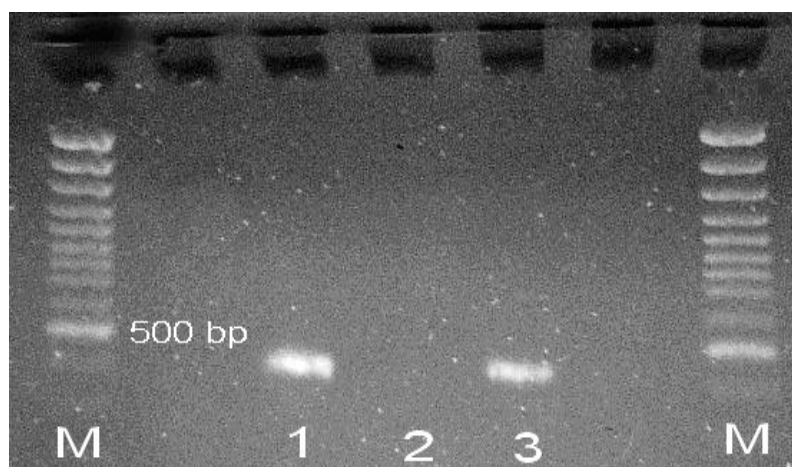


Fig. 1. PCR results for *Nicotiana tabacum* (1) and *Lycopersicon esculentum* (3) plants, 2-negative control, M - markers (Gene Ruler 100bp DNA ladder plus, 100 – 3000bp)

The following pattern was revealed for the *Nicotiana tabacum* cv. *trapesond* – TMV model after visual observations and ELISA. The infected plants without AM had clear symptoms in 80 days, such as mosaic and leaf blade deformation. No symptoms on further stages were observed for the plants colonized with AMF, so virus infection did not develop in such plants in contrast to the plants without AM. Intact plants and the plants colonized by AM but not infected served as the control groups. The content of viral antigens in infected plants without AM permanently increased, as revealed ELISA test. At the early stages of virus infection in infected

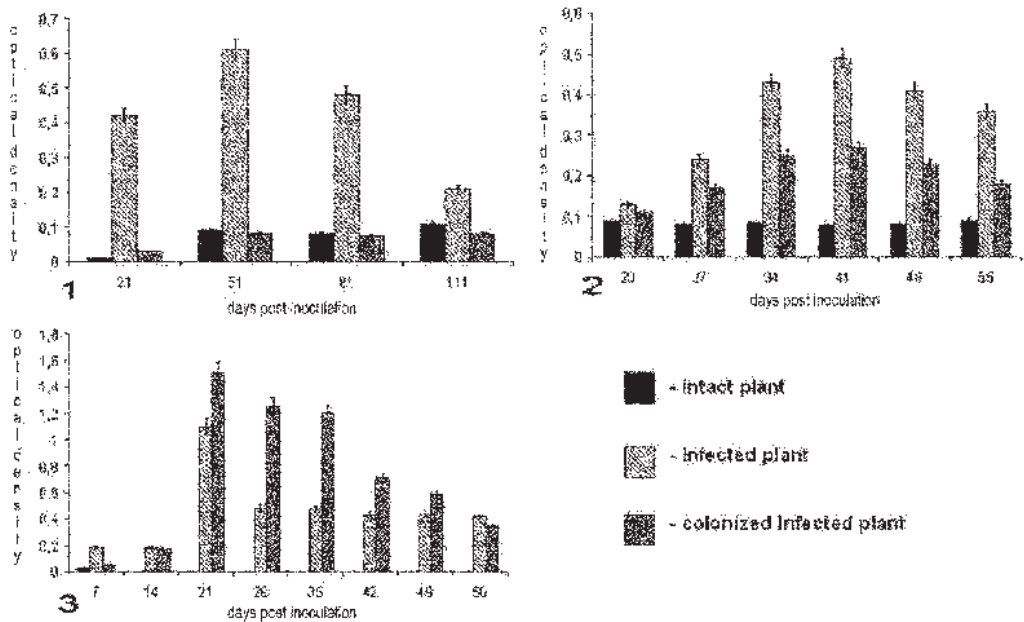


Fig. 2. Dynamics of viral antigen accumulation in *Nicotiana tabacum* cv. *trapesond* TMV (1), *Cucumis sativus* - CGMMV (2) and *Lycopersicon esculentum* - TMV (3) systems

plants with AM the content of viral antigens was four times less as compared with infected plants without AM. The final content of viral antigens in such plants was 2.5 times less (Fig. 2).

The symptoms of virus infection on *Lycopersicon esculentum* plants were observed as green or yellow mosaic. Content of viral antigens in infected plants with and without AM was equal at the early stages of virus infection up to 14 days post inoculation, and then it increased in the plants colonized by AM. At the subsequent stages of virus infection the content of viral antigens in colonized plants subsequently decreased (Fig. 2). This fact can be explained by the way of virus penetration to the plant. It was shown previously that AM can lead to increase of disease severity of foliar pathogens [13].

For *Cucumis sativus* – CGMMV system, visual observations revealed that infected plants had clear symptoms, such as decrease in leaf blade size, growth inhibition, mosaic and leaf blade deformation. The plants colonized by AMF and infected by virus did not manifest pronounced symptoms. ELISA test revealed that infected plants with AM accumulated less amount of viral antigen comparing to infected plants without AM (Fig. 2).

These results can be compared with data about interaction of AMF and non-viral pathogens, such as bacteria and root-infecting fungi. The arbuscular mycorrhiza formation leads to increase of phosphate uptake by the plants, and that nutritional status can be related to the enhanced resistance of the plants to soilborne pathogens such as *Aphanomyces euteiches* [9]. Also it was shown that not only nutritional status can affect the severity of the disease. AM can activate defense-relative genes, such as PR family genes prior to pathogen penetration [1]. The other way of controlling the pathogen proliferation is the competition between arbuscular mycorrhizal and pathogenic fungi to colonize root tissues [4, 10].

As it can be seen, the effect of AM colonization of the plants is different, but it is still difficult to estimate the reasons of such differences. The most obvious reason is the way the virus infects the plant as was already shown for non-viral soilborne pathogens [13]. Obtained data show that for viral pathogens that are introduced through soil the effect is still the same. But in the case when virus is introduced mechanically into the leaf blade the effect of mycorrhization is opposite that may be caused by increased nutrition rates that promote more favorable conditions for virus replication. This fact is very important, because it makes the usage of AM in open field conditions difficult. But in the greenhouses where virus mechanical transmission can be controlled and soil mixture composition can be easily changed, AM can be used to control virus transmission via soil, moreover it increases nutritional rates of the plants and their resistance to non-viral pathogens being of major importance especially for the greenhouses.

It is estimated that AM inhibits plant virus infection development caused by TMV in *Nicotiana tabacum* plants and by CGMMV in *Cucumis sativus* plants if the virus is introduced through root system. It is also shown, that there is no such effect on *TMV – Lycopersicon esculentum* system, where the plants are infected mechanically into the leaf. These facts show that AM may play the role in activating plant responses to soilborne pathogens but promote higher susceptibility to foliar diseases, although the mechanisms of such effects are still unclear and need further research.

REFERENCES

1. Blee, Anderson. Defense-Related Transcript Accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. Colonized by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith // *Plant Physiol.* — 1996. — Vol.110. — P. 675–688.
2. Bonfante-Fasolo P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae: Fungus-plant interactions at the cellular level. // *Symbiosis* — 1987. — Vol. 3. — P. 249–268.
3. Brundrett M., Melville L., Peterson L. Practical methods in mycorrhiza research. — Mycol. Publication, 1994. —161 p.
4. C. Cordier et al. Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus // *MPMI* — 1998. — Vol. 11, No. 1. — P. 1017–1028.
5. Dijkstra, J., Jager, C. P. Practical plant virology: protocols and exercises. Springer-Verlag, 1998. — 459 p.
6. H.W. Dehne. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. // *Phytopathology.* — 1982. — Vol. 72. — P. 1115–1119.
7. Jm Barea et al. Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus.// *Molecular Plant-Microbe Interactions.* — 1998. — Vol. 11. — P. 1017–1028.
8. Kristopher A. Blee and Anne J. Anderson. Defense-Related Transcript Accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. Colonized by the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* // *Plant Physiol.* — 1996. — Vol. 110. — P. 675–678.
9. L. Budker, R. Kjuller, S. Rosendahl Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*.// *Mycorrhiza.* — 1998. — Vol. 8. — P. 169–174.
10. R. Duponnois et al. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holosericea*.// *Soil Biology & Biochemistry.* — 2005. — Vol. 37. — P. 1460–1468.
11. Schutzenhubel A., Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization.// *Journal of experimental botany.* — 2002. — Vol. 53. — P. 1351–1365.
12. Shaul et al. Mycorrhiza-Induced Changes in Disease Severity and PR Protein Expression in Tobacco Leaves.// *Molecular Plant-Microbe Interactions.* —1999. — Vol. 12. — P. 1000–1007.



13. van der Heijden et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity.// Nature. — 1998. — Vol. 396. — P. 69–72.

14. Varma A. Mycorrhiza manual — Springer, 1998. — 412 p.

15. Innis M.A et al. PCR Protocols. A guide to methods and applications. — San Diego - Academic Press, 1990. — 452 p.

І.М. Столярчук¹, Т.П. Шевченко¹, В.П. Поліщук¹, А.В. Кріпка²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна,
e-mail: inna_stolyarchuk@mail.ru, tyvonchuk@ukr.net, pvp.@mail.univ.kiev.ua

²Інститут клітинної біології НАНУ, вул.Заболотного, 148, м. Київ, 013143
Україна; e-mail: akripka@yahoo.com

ПРОТІКАННЯ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У РІЗНИХ ВИДІВ РОСЛИН ПІД ВПЛИВОМ АРБУСКУЛЯРНОЇ МІКОРИЗИ

Реферат

В статті наведено результати досліджень, присвячених вивченню впливу колонізації коренів рослин арбускулярним мікоризним грибом *Glomus intraradices* на протікання фітовірусної інфекції. У експерименті використовували такі модельні системи як ВТМ—*Nicotiana tabacum*, ВТМ—*Lycopersicon esculentum* та ВЗКМО—*Cucumis sativus*. Мікроскопічними, молекулярно-біологічними та серологічними методами дослідження показано, що арбускулярна мікориза інгібує розвиток фітовірусної інфекції в рослинах *Nicotiana tabacum* та *Cucumis sativus*, але не в *Lycopersicon esculentum*.

К л ю ч о в і с л о в а: ВТМ (вірус тютюнової мозаїки), ВЗКМО (вірус зеленої крапчастої мозаїки огірка), *Glomus intraradices*, арбускулярна мікориза.

И.Н. Столярчук¹, Т.П. Шевченко¹, В.П. Полищук¹, А.В. Крипка²

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
ул. Владимирская, 64, г. Киев, Украина,
e-mail: inna_stolyarchuk@mail.ru, tyvonchuk@ukr.net, pvp.@mail.univ.kiev.ua

²Институт клеточной биологии НАНУ, ул.Заболотного 148, г. Киев, Украина,
e-mail: akripka@yahoo.com

ПРОТЕКАНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ

Реферат

В статье приведены результаты исследований, посвященных изучению влияния колонизации корневой системы растений арбускулярным микоризным грибом *Glomus intraradices* на протекание фитовирусной инфекции. В эксперименте использовали такие модельные системы как ВТМ—*Nicotiana tabacum*, ВТМ—*Lycopersicon esculentum* а также ВЗКМО—*Cucumis sativus*. Микроскопическими, молекулярно-биологическими и серологическими методами исследований показано, что арбускулярная микориза ингибирует развитие фитовирусной инфекции в растениях *Nicotiana tabacum* и *Cucumis sativus*, но не в *Lycopersicon esculentum*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: ВТМ (вирус табачной мозаики), ВЗКМО (вирус зеленой крапчатой мозаики огурца), *Glomus intraradices*, арбускулярная микориза.



Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: +38 (032) 239 40 53
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

ПСИХРОФІЛЬНІ ШТАМИ СУЛЬФАТВІДНОВЛЮВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ

*З анаеробної зони водойми, що знаходиться в зоні Яворівського сіркового родовища, виділені психрофільні сульфатвідновлювальні бактерії, які ідентифіковані як *Desulfobacter* sp. Виділені бактерії у середовищі з сульфатами і органічними сполуками інтенсивно відновлюють сульфати до сірководню. Із досліджених органічних сполук як джерело вуглецю бактерії використовують ацетат, лактат, глюкозу, рафінозу, галактозу, арабінозу, сорбіт, дульцит. Виділені психрофільні сульфатвідновлювальні бактерії можуть розглядатися як перспективні для очищення середовищ з високим вмістом сульфатів.*

К л ю ч о в і с л о в а: психрофільні сульфатвідновлювальні бактерії, гідроген сульфід, сульфат.

Сульфатвідновлювальні бактерії здійснюють дисиміляційне відновлення сульфатів і зв'язують потоки вуглецю і сірки в анаеробних біотопах, що містять сульфат. Вони використовують сульфат як кінцевий акцептор електронів і отримують енергію для росту внаслідок окиснення органічних речовин або молекулярного водню [13]. Окрім сульфатів сульфатвідновлювальні бактерії можуть використовувати метали із змінною валентністю (Cr(VI), U(VI), Tc(VI), Pd(II) та ін.) як акцептори електронів, перетворюючи їх до відновлених менш токсичних форм [11, 14, 15]. З другого боку сульфатвідновлювальні бактерії, утворюючи в процесі життєдіяльності гідроген сульфід, сприяють утворенню нерозчинних сульфідів [12].

В умовах помірного клімату перспективним є використання психрофільних і психротолерантних штамів сульфатвідновлювальних бактерій для очищення середовища від високих концентрацій сульфатів та металів. Це дасть можливість в значній мірі нівелювати залежність процесів ремедіації середовища від температури в період осінь-весна. Крім того, вважається, що ферменти психрофільних мікроорганізмів мають більш високу каталітичну активність порівняно з ферментами мезофільних бактерій [9, 10].

Метою роботи було виділити психрофільні штами сульфатвідновлювальних бактерій та дослідити їхні властивості.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були культури сульфатвідновлювальних бактерій, виділені з водойми, що знаходиться на території Яворівського сіркового родовища. Проби води розводили і висівали на чашки Петрі з агаризованим середовищем Постгейта В [13] у розрахунку 100–150 колоній на чашку. Культури вирощували протягом 14



діб при 12 °С в анаеростатах. Для поглинання кисню використовували генератори GENbox anaer (Франція). Для виявлення колоній сульфатвідновлювальних бактерій у середовище додавали залізо у формі FeSO₄. Це сприяло утворенню в клітинах бактерій FeS, що забарвлював колонії у чорний колір. Біомасу клітин після їх вирощування у рідкому середовищі в анаеробних умовах визначали ваговим методом або турбідиметрично, використовуючи КФК-3. Для фотоелектроколориметричного визначення біомаси клітин будували калібрувальну криву залежності екстинції від сухої маси клітин.

Ідентифікацію сульфатвідновлювальних бактерій проводили за морфо-фізіологічними ознаками згідно визначника Берджі [4].

Здатність бактерій утворювати спори визначали загальноприйнятим методом [2]. Суспензію клітин після її прогрівання на водяній бані при 80 °С протягом 10 хв висівали на агаризоване середовище та інкубували в анаеробних умовах. Для виявлення спор в клітинах їх додатково фарбували за методом Пешкова [7], морфологію клітин вивчали за допомогою світлового мікроскопа (x 1600).

Нагромадження ацетат-іону в культурах бактерій в процесі їхнього росту проводили, як описано [1].

Сірководень у культуральній рідині визначали фотометрично з використанням фотоелектроколориметра КФК-3 ($\lambda=665$ нм, кювета з оптичним шляхом 30 мм). Реакційна суміш мала такий склад: цитрат цинку (27,3 мМ) — 10 мл; дистильована вода — 1,98 мл; розчин п-амінодиметиланіліну (5,5 мМ) — 4 мл та 20 мкл досліджуваного розчину. Через 5 хв додавали 1 мл хлориду феруму (0,125 М) та спостерігали утворення метиленої сині. Концентрацію сірководню встановлювали за калібрувальною кривою.

Сульфат у середовищі визначали турбідиметрично після його осадження барій хлоридом. Для стабілізації суспензії використовували гліцерин [6].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою Microsoft Excel 2000 та як описано [3].

Результати та їх обговорення

Щоб з'ясувати, які саме представники психрофільних сульфатвідновлювальних бактерій зустрічаються в даному середовищі з мулу відбирали проби, використовуючи метод Столбунова-Рябова [8]. Проби висівали на селективне середовище Постгейта. Після 14 діб культивування при 12 °С відібрали 32 культури, колонії яких були забарвлені у чорний колір, що свідчило про інтенсивну сульфатредукцію. У подальших експериментах використовували одну культуру, що добре росла на селективному середовищі і колонії якої мали найбільш інтенсивне чорне забарвлення.

Згідно визначника бактерій Берджі сульфатвідновлювальні бактерії поділяють на чотири підгрупи [4]. Щоб з'ясувати, до якої групи належать виділені бактерії, їх висівали у середовище з сульфатами та без них, а також із елементною сіркою з додаванням лактату натрію як джерела вуглецю. Одержані результати показують, що досліджувані бактерії добре росли в контрольному середовищі, що містило сульфати та лактат натрію. Крім того, одержані дані показують, що за відсутності сульфату, сірка не забезпечувала їхнього росту у середовищі з лактатом, що свідчить про відсутність серед виділених бактерій представників родів *Desulfurella* та *Desulfuromonas*.



Для з'ясування здатності виділених бактерій використовувати різні джерела вуглецю, їх висівали на середовище, в якому лактат натрію, як основне джерело вуглецю, заміняли на інші органічні сполуки, зокрема використовували ацетат, сорбіт, дульцит, етанол, пальмітат, сукцинат, глюкозу, рафінозу, лактозу та ряд інших олігоцукридів (табл.).

Таблиця
Нагромадження біомаси та використання сульфату *Desulfobacter sp. 1*

Table
Biomass accumulation and sulphate utilization by *Desulfobacter sp. 1*

Джерело вуглецю	Біомаса, г/л		% використання сульфатів
	SO ₄ ²⁻	S ⁰	
Лактат Na (контроль)	4,51 ± 0,31	-	90,2
Ацетат Na	4,75 ± 0,28	-	96,5*
Глюкоза	3,96 ± 0,18	-	77,7*
Арабіноза	3,84 ± 0,24	-	75,8*
Лактоза	3,69 ± 0,31	-	70,6*
Рафіноза	4,02 ± 0,17	-	81,3*
Сорбіт	3,85 ± 0,23	-	80,5*
Дульцит	3,65 ± 0,13	-	72,6*
Етанол	-	-	-
Пальмітат Na	-	-	-
Сукцинат Na	-	-	-
Прпіонат Na	-	-	-

Примітка. * — встановлено статистичну різницю відносно контрольних даних;
“-” — ріст відсутній.

Отримані результати показують, що досліджувані бактерії добре росли у контрольному середовищі, що містило сульфати та лактат натрію. Протягом 14 діб культивування у цьому середовищі бактерії використали до 90% сульфату. Бактерії, що росли у середовищі з ацетатом активніше використовували сульфати (96%). У середовищі з глюкозою кількість використаного сульфату складала 78%. При вирощуванні бактерій у середовищах, у яких джерелом вуглецю були інші органічні сполуки, кількість використаного сульфату сягала рівня 72–81%. Виділені культури не росли у середовищі з етанолом, пальмітатом та сукцинатом (табл.). Усі виділені культури мали подібні до наведених в таблиці властивості.

Жодна з культур не росла у середовищі з сульфатами і пропіонатом, що включає їх можливу належність до роду *Desulfobulbus*. У середовищі з лактатом натрію і сульфатами усі бактерії, не нагромаджували в середовищі ацетат-іон. Перевірка здатності даних бактерій до спороутворення дала негативні результати, що свідчить про відсутність серед досліджуваних культур представників роду *Desulfotomaculum*.



Отже, дослідження ростових потреб, здатності утворювати спори, характерна паличкоподібна форма, ріст на середовищі з лактатом натрію, ацетатом та іншими джерелами вуглецю і відсутність росту на середовищі з етанолом, пальмітатом та сукцинатом дає підстави віднести виділені культури сульфатвідновлювальних бактерій до роду *Desulfobacter*.

Для визначення оптимальної температури росту штами бактерій пересівали у пробірки з рідким селективним середовищем та вирощували за різних температур. Оптимальною температурою для росту виділених бактерій виявилась 12 °C (рис. 1). Максимум нагромадження біомаси при 12 °C спостерігався на 9 добу культивування і складав 3,6 г/л.

На цей час із середовища практично повністю вичерпувалися сульфати, а у середовищі нагромаджувалося до 5 мМ гідроген сульфід. За температури 4 °C спостерігався незначний ріст (рис. 1) і біомаса клітин була у три рази менша, ніж при 12 °C.

Поряд з цим у середовищі виявлялося більше 50% внесених сульфатів. Підвищення температури культивування до 25 °C не супроводжувалося зростанням біомаси бактерій та підвищенням інтенсивності процесу сульфатредукції. За температури 37 °C бактерії не росли. Таким чином, активний ріст виділених бактерій та утворення ними гідроген сульфід у при 12–25 °C свідчить про те, що вони є психрофільними мікроорганізмами.

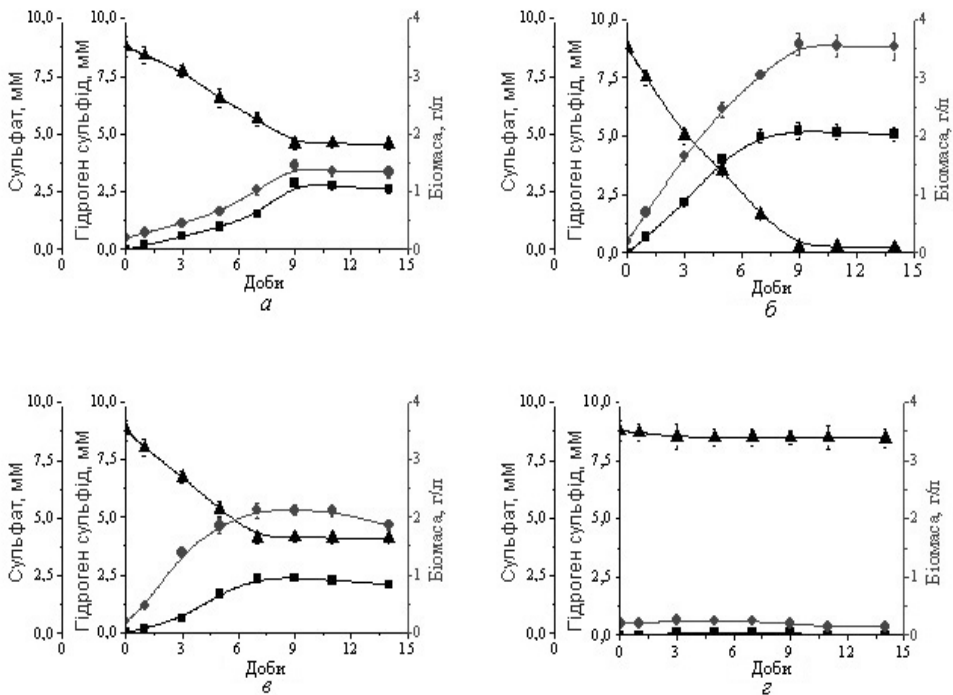


Рис. 1. Використання сульфату (-▲-) та нагромадження біомаси (-●-) і сульфіді (-■-) *Desulfobacter* sp. 1 за різних температур: а – 4 °C, б – 12 °C, в – 25 °C і г – 37 °C

Fig. 1. Sulphate utilization (-▲-) and biomass (-●-) and sulphide (-■-) accumulation by *Desulfobacter* sp. 1 at different temperatures: а – 4 °C, б – 12 °C, в – 25 °C and г – 37 °C

Концентрація сульфатів у середовищі виявилася важливим чинником, що визначає рівень нагромадження біомаси і переходу культури бактерій у стаціонарну фазу росту. Щоб встановити залежність росту виділених бактерій від концентрації сульфату, їх вирощували у середовищі з різними його концентраціями (рис. 2). За концентрації сульфату 4,4 мМ максимальний ріст бактерій спостерігався на п'яту добу культивування (рис. 2, а). У середовищі, що містило 8,8 мМ сульфату максимум нагромадження біомаси спостерігався на сьому добу культивування.

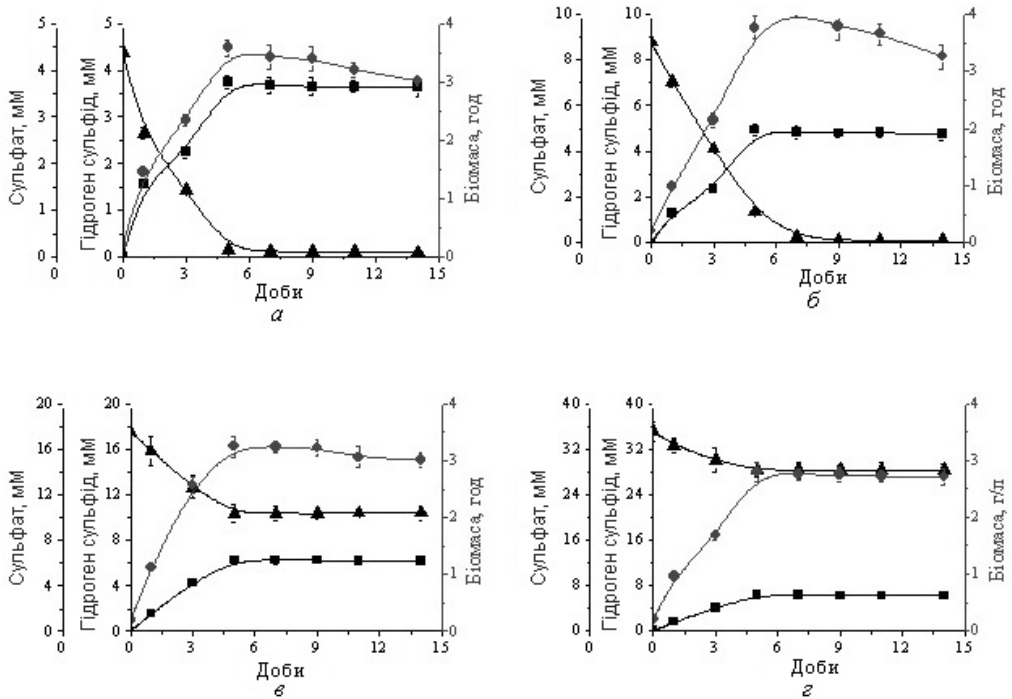


Рис. 2. Використання сульфату (-▲-) та нагромадження біомаси (-●-) і сульфиду (-■-) *Desulfobacter sp. 1* у середовищі за різної концентрації сульфатів: а – 4,4 мМ; б – 8,8 мМ; в – 17,6 мМ; з – 35,2 мМ

Fig. 2. Sulphate utilization (-▲-) and biomass (-●-) and sulphide (-■-) accumulation by *Desulfobacter sp. 1* in the media with different sulphate concentrations: а – 4.4 mM; б – 8.8 mM; в – 17.6 mM; з – 35.2 mM

Аналіз динаміки використання сульфатів бактеріями показав, що на цей час культура практично повністю (> 97%) використовувала сульфат з середовища, що могло бути причиною припинення росту бактерій після сьомої доби культивування (рис. 2, а, б). Подальше збільшення концентрації сульфату (рис. 2, в, з) не сприяло зростанню біомаси. Причиною цього могло бути або дефіцит органічних речовин (донорів електронів) або токсична дія гідроген сульфід.

Раніше авторами було показано, що основним фактором, який лімітує ріст *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за наявності в середовищі донорів і акцепторів електронів є гідроген сульфід [5]. Очевидно, подібна закономірність спостерігається і у представників роду *Desulfobacter*.

Таким чином, виділені нами штами психрофільних сульфатвідновлювальних бактерій за морфо-фізіологічними ознаками слід віднести до роду *Desulfobacter*. Їхній оптимальний ріст за температури 12 °С дає підстави вважати виділені культури перспективними для біотехнологічного використання при очищенні забруднених сульфатами середовищ в умовах помірного клімату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабко А.К., П'ятницький І.В. Кількісний аналіз. — К.: Вища школа, 1974. — 352 с.
2. Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Білінська І.С. Практикум з мікробіології. Частина перша. — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. — 2003. — 80 с.
3. Лакін Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
4. *Определитель* бактерий Берджи / Под. ред. Дж. Хоулта, Р. Крига, П.Снита, Дж. Стейли и С.Уильямса. — М.: Мир, 1997. — 432 с.
5. Перетятко Т.Б., Гнатуш С.О., Гудзь С.П. Утворення сульфідів *Desulfovibrio desulfuricans* Ya-11 за різних умов культивування // Вісник Львів. ун-ту. Серія біол. — 2007. — 43. — С. 180—184.
6. *Почвы*. Метод определения ионов сульфата в водной вытяжке. ГОСТ 26426-85. — М.: Изд-во стандартов, 1985.
7. *Практикум по микробиологии* / Под ред. Н.С. Егорова. — М.: МГУ, 1976. — 355 с.
8. *Родина А.Г.* Методы водной микробиологии. Практ. руководство. М. — Л.: Наука, 1965. — 363 с.
9. Франк Ю.А., Герасимчук А.Л. Психротолерантные сульфатредуцирующие бактерии, перспективные для биотехнологии // XLIII международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». (Новосибирск, 2005): тез. докл. — Новосибирск: Издательство НГУ, 2006. — С. 180—181.
10. Франк Ю.А., Лушников С.В. Биотехнологический потенциал сульфатредуцирующих бактерий // *Экология и промышленность*. — 2006. — 1. — С. 10—13.
11. Goulhen F., Gloter A., Guyot F., Bruschi M. Cr(VI) detoxification by *Desulfovibrio vulgaris* strain Hildenborough: microbe-metal interactions studies // *Applied microbial and cell physiology*. — 2006. — 71. — P. 892—897.
12. Lovely D.R. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction // *J. Ind. Microbiol.* — 1995. — 14. — P. 85—93.
13. Postgate J.R. *The sulfate-reducing bacteria*. 2nd ed. — Cambridge: Cambridge Univ. press, 1984. — 199 p.
14. Poulson S.R., Colberg P.J.S., Drever J.I. Toxicity of heavy metals (Ni, Zn) to *Desulfovibrio desulfuricans* // *Geomicrobiol.* — 1997. — 14. — P. 41—49.
15. Tebo B.M., Obratsova A.Y. Sulfate-reducing bacterium grows with Cr(VI), U(IV), Mn(IV) and Fe(III) as electron acceptors // *FEMS Microbiology Letters*. — 1998. — 162. — P. 193—198.



Т.Б. Перетятко, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: +38 (032) 239 40 53
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

ПСИХРОФИЛЬНЫЕ ШТАММЫ СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Реферат

Из анаэробной зоны водоема, находящегося на территории Яворовского серного месторождения, выделены психрофильные сульфатвосстанавливающие бактерии (температурный оптимум 12 °С), идентифицированные как *Desulfovibrio sp.* На средах с сульфатами и органическими веществами бактерии восстанавливают сульфаты до сероводорода. В качестве источника углерода бактерии используют ацетат, лактат, глюкозу, рафинозу, галактозу, арабинозу, сорбит, дульцит. Выделенные бактерии могут быть использованы в странах с умеренным климатом для очистки вод, загрязненных сульфатами.

К л ю ч е в ы е с л о в а: психрофильные сульфатвосстанавливающие бактерии, сероводород, сульфат.

T.B. Peretyatko, S.P. Gudz

Ivan Franko National University of Lviv,
Hrushevsky str. 4, Lviv, 79005, Ukraine, tel.: +380 32 239 40 53
e-mail: t_peretyatko@franko.lviv.ua

PSYCHROPHILIC STRAINS OF SULPHATE-REDUCING BACTERIA

Summary

Psychrophilic sulphate-reducing bacteria that were isolated from anaerobic zone of Yavoriv storage lake are identified as *Desulfobacter sp.* These bacteria intensively reduce sulphate to hydrogen sulphide in the medium with sulphate and organic compounds. Among the investigated organic compounds bacteria use acetate, lactate, glucose, raffinose, galactose, arabinose, sorbitol and dulzite as carbon sources. Isolated psychrophilic sulphate-reducing bacteria can be considered as perspective for media with high sulphate content purification.

К e y w o r d s: psychrophilic sulphate-reducing bacteria, hydrogen sulphide, sulphate.



3-Я МІЖНАРОДНА УКРАЇНСЬКО-ПОЛЬСЬКА ВЕЙГЛІВСЬКА КОНФЕРЕНЦІЯ „МІКРОБІОЛОГІЯ СЛУЖИТЬ ЛЮДИНІ”

Одеський національний університет імені І.І.Мечникова
14–17 вересня 2009 року

В Одеському національному університеті імені І.І. Мечникова з 14 по 17 вересня 2009 року проходила 3-я Міжнародна українсько-польська Вейглівська конференція „МІКРОБІОЛОГІЯ СЛУЖИТЬ ЛЮДИНІ”. На конференції були представлені доповіді з таких важливих для України питань, як мікробні біотехнології у харчовій промисловості, медицині, сільському господарстві, охороні навколишнього середовища, оздоровленні доквілля, утилізації відходів, створення антимікробних препаратів та ін.

Конференція присвячена пам’яті і досягненням одного з відомих польських вчених, професора Рудольфа Вейгля, першовідкривача вакцинації проти висипного тифу, який був передвісником українсько-польських наукових зв’язків. Головна мета конференції полягала у подальшому розвитку українсько-польського діалогу людей науки, обміні досвідом і зміцненню зв’язків між мікробіологами обох країн.

Організаторами конференції з боку України були Національна академія наук України, Міністерство освіти і науки України; Одеське товариство біологів та біотехнологів; Одеський національний університет імені І.І. Мечникова; Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ; Львівський національний університет імені І. Франка; Інститут біології клітини НАНУ (Львів), з боку Польщі — Комітет з мікробіології Академії наук Польщі; Варшавський сільськогосподарський університет, Комітет з ветеринарних наук, Академія наук Польщі; Польське товариство мікробіологів; Польське товариство експериментальної та клінічної імунології.

У конференції взяли участь понад 150 провідних вчених з України, Польщі, Росії, Бельгії, Білорусії, Грузії, Китаю, Німеччини, США, Швеції.

На урочистому відкритті конференції, яка відбулася у Конференц-залі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, були присутні Посол Республіки Польщі в Україні пан Яцек Ключковський; Генеральний консул Республіки Польщі в Одесі пан Веслав Мазур, Президент Українського товариства мікробіологів, академік член НАНУ, директор Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ, професор Валентин Підгорський, Голова Комітету з мікробіології Академії наук Польщі професор Марек Ніеміалтовський, Віце-президент Українського товариства мікробіологів, Заслужений діяч науки і техніки України, проректор Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, професор Володимир Іваниця, а також спеціальні гості конференції — професор Карл Мара-



морощ (США) і професор Вацлав Шибальський (Польща). На відкритті конференції були зачитані листи — привітання від Кабінету Міністрів України, Міністерства освіти і науки України, Національної Академії Наук України.

Основні наукові напрямки конференції:

1. Погляд у історію
2. Систематика та екологія мікроорганізмів
3. Біохімія та генетика мікроорганізмів
4. Харчова мікробіологія і мікробні біотехнології
5. Антимікробні препарати
6. Вірусологія і імунологія

3-я Міжнародна українсько-польська Вейглівська конференція «Мікробіологія служить людині» проходила у формі засідань, де були представлені усні і стендові доповіді, а також засідань круглого столу — зустрічі членів Комітету з мікробіології Польської Академії Наук та українських представників з приводу наукових стосунків між мікробіологами Польщі та України. Також на засіданні круглого столу науковцями обох країн було розглянуто та обговорено питання щодо проведення 4-ої Міжнародної Вейглівській конференції у м. Вроцлав (Польща) у 2011 році.

Усі тези конференції надруковані у матеріалах конференції. Окремі доповіді, відібрані організаційним комітетом надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія» видавництва Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Організатори та учасники конференції щиро сподіваються, що 3-я Міжнародна українсько-польська Вейглівська конференція створила нові можливості для встановлення наукових зв'язків у сфері мікробіології та біотехнології України і Польщі, та буде сприяти плідним спільним дослідженням науковців обох країн.

Г. Ямборко



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scientific journal «Microbiology and biotechnology» invites you to spotlight

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

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

Languages: Ukrainian, Russian, English.

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

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

Article appearance:

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

The following articles are accepted:

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

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

Contents of manuscript

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



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

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

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

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

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

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

Manuscripts must be grammatically and linguistically correct.

Biological taxonomic names must be given in Latin, italics.

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

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

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

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

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

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

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

Books

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

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

Journals

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



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

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

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

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

Not accepted manuscripts will not be returned.

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

Від редакції. У № 1 журналу за 2009 рік у змісті та рефераті українською мовою (стор. 47) слід читати:

«М.Я. Співак, В.С. Підгорський, Л.М. Лазаренко, Л.М. Шинкаренко, Л.Т. Рачкова, З.М. Олевінська «Вплив лакто- та біфідобактерій на показники імунореактивності організму на експериментальній моделі».

Прізвище професора Н.К. Коваленко надруковано у складі авторів помилково. Просимо вибачення за недогляд.



Наукове видання

«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»

Увага: передрук, усі види копіювання та відтворення матеріалів,
що надруковані у журналі «Мікробіологія і біотехнологія»,
можливі лише за умови посилання на джерело інформації
та з дозволу редакційної колегії.
Усі права захищені згідно законодавства України.

Підп. до друку 15.09.2009. Формат 70x108/16.
Гарн. Таймс. Тираж 100 прим.

Редакційно-видавничий Центр
Одеського національного університету
імені І.І. Мечникова,
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: 8 (048) 723 28 39