

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
Microbiology & Biotechnology

№ 4(8)
2009

MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 4(8)

•
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

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel.: +38(048) 723-28-39, +38(048) 748-11-01
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
№ 4(8)

•
2009

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т.О. Філіпова

ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т.В. Бурлака

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ:

Л.Д. Варбанець, А.І. Вінніков, Ю.Л. Волянський, Б.М. Галкін, П.І. Гвоздяк, Р.І. Гвоздяк, С.П. Гудзь, І.В. Довгаль, Н.М. Жданова, Ю.П. Зайцев, Г.О. Іутинська, Л.В. Капрельянц, О.А. Кіпріанова, Н.К. Коваленко, І.К. Курдиш, Б.П. Мацелюх, Б.Н. Мілкус, Г.Г. Мінічева, В.П. Патица, В.С. Підгорський, В.К. Позур, В.П. Поліщук, А.А. Сибірний, Ю.М. Сиволап, І.Г. Скрипаль, М.Я. Співак, Ф.І. Товкач, В.М. Тоцький, В.О. Федоренко, І.С. Щербатенко

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

*Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Журнал заснований*

Одеським національним університетом імені І.І. Мечникова
Свідоцтво: серія КВ № 11462-335Р від 07.07.2006 р.

**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.: +38(048) 723-28-39, +38(048) 748-11-01
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

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

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

Yu.Yu. Kondratiuk, M.A. Babaryk, O.I. Kornelyuk BACTERIAL EXPRESSION OPTIMIZATION OF MAMMALIAN TYROSYL-tRNA SYNTHETASE ON STRAIN <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL(DE3) <i>pLysE</i> CULTIVATION	6
O.Yu. Zinchenko, T.O. Filipova, B.M. Galkin, S.V. Vodzinsky, Yu.V. Ishkov THE SYNTHETIC PORPHYRINS INFLUENCE ON OPPORTUNISTIC BACTERIA SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS.....	13
L.M. Skivka, O.G. Fedorchuk, O.M. Pyaskovska, N.M. Khranovska, V.V. Pozur THE EFFECT OF <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> WOOD 46 PEPTIDOGLYCAN ON CYTOTOXIC ACTIVITY OF MURINE MONONUCLEAR SPLENOCYTES	20
N.V. Limanska, V.O. Ivanytsia, Zh.Yu. Sergeeva, F.I. Tovkach BACTERIOCINOGENIC ACTIVITY OF <i>RHIZOBIUM VITIS</i> AND <i>PANTOEAE</i> <i>AGGLOMERANS</i> STRAINS ISOLATED FROM GRAPEVINES	26
A.I. Osadcha, L.A. Safronova, O.M. Poltavsky, V.M. Ilyash HYDROLASE ACTIVITY OF ANTARCTIC BACILLI	33
I.B. Rusyn, O.M. Figurka, U.M. Figurka, N.M. Dzhura, O.M. Moroz, V.P. Novikov MICROORGANISMS OF OIL POLLUTED SOILS RECULTIVATED BY <i>CAREX</i> <i>HIRTA</i>	41
O.V. Nikitin, B.M. Galkin, T.O. Philipova, I.I. Seifullina, N.V. Shmatkova THE INFLUENCE OF COORDINATION COMPOUNDS OF GERMANIUM (IV) WITH NITROBENZOIC AND CHLORBENZOIC ACIDS SALICYLALHYDRAZONES ON THE CONTENT OF THE BASIC LYMPHOCYTES POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS IN THE COURSE OF INFLAMMATION IN MICE	48
P.I. Gvozdyak, O.V. Sapura SIMPLE METHOD OF DETECTION AND INTENSIVITY ESTIMATION OF ANAEROBIC PROCESSES ACCOMPANIED BY GAS RELEASE.....	53
A.V. Kharina, T.G. Kot, V.P. Polischuk, I.E. Zaets, N.V. Chervatyuk, A.I. Potopalsky IZATIZONE AS INHIBITOR OF PLANT VIRUS INFECTION	58
E.B. Goldin CYANOBACTERIA AND HERBIVOROUS ORGANISMS: THE PROPERTIES OF INTERSPECIFIC INTERACTIONS.....	64
L.O. Chaykovska, M.I. Baranska INFLUENCE OF AGROSTIMULIN, EMISTIM C, BIOLAN ON GROWTH AND ACTIVITY OF PHOSPHATASE <i>ENTEROBACTER</i> <i>NIMIPRESSURALIS 32-3</i>	70
INSTRUCTIONS TO AUTHORS.....	75

З М І С Т

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

Ю.Ю. Кондратюк, М.А. Бабарик, О.І. Корнелюк ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ТИРОЗИЛ-ТРНК СИНТЕТАЗИ ССАВЦІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ШТАМУ <i>ESCHERICHIA COLI</i> BL21(DE3) <i>pLysE</i>6	
О.Ю. Зінченко, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін, С.В. Водзінський, Ю.В. Ішков ВПЛИВ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ 13	13
Л.М. Сківка, О.Г. Федорчук, О.М. Пясковська, Н.М. Храновська, В.В. Позур ВПЛИВ ПЕПТИДОГЛІКАНА <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> WOOD 46 НА ЦИТО- ТОКСИЧНУ АКТИВНІСТЬ МОНОНУКЛЕАРНИХ СПЛЕНОЦИТІВ МИШЕЙ.....20	20
Н.В. Ліманська, В.О. Іваниця, Ж.Ю. Сергеева, Ф.І. Товкач БАКТЕРІОЦИНОГЕННА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ <i>RHIZOBIUM VITIS</i> I <i>PANTOEAE</i> <i>AGGLOMERANS</i> , ВИДІЛЕНИХ З РОСЛИН ВИНОГРАДУ 26	26
А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, О.М. Полтавський, В.М. Іляш ГІДРОЛАЗНА АКТИВНІСТЬ АНТАРКТИЧНИХ БАЦИЛ..... 33	33
І.Б. Русин, О.М. Фігурка, У.М. Фігурка, Н.М. Джура, О.М. Мороз, В.П. Новіков МІКРОБІОТА НАФТОЗАБРУДНЕНОГО ҐРУНТУ, РЕКУЛЬТИВОВАНОГО РОСЛИНАМИ <i>CAREX HIRTA</i> 41	41
О.В. Нікітін, Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, І.Й. Сейфулліна, Н.В. Шматкова ВПЛИВ КОМПЛЕКСІВ ГЕРМАНІЮ (IV) З САЛІЦИЛАЛЬГІДРАЗОНАМИ ХЛОРБЕНЗОЙНОЇ ТА НІТРОБЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТ НА ВМІСТ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ І СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ У МИШЕЙ ПРИ ЗАПАЛЕННІ... 48	48
П.І. Гвоздяк, О.В.Сапура ПРОСТИЙ МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ ТА ОЦІНКИ ІНТЕНСИВНОСТІ АНАЕРОБНИХ ПРОЦЕСІВ, ЩО СУПРОВОДЖУЮТЬСЯ ВИДІЛЕННЯМ ГАЗІВ..... 53	53
А.В. Харіна, Т.Г. Кот, В.П. Поліщук, І.Є. Заєць, Н.В. Черватюк, А.І. Потопальський ІЗАТІЗОН ЯК ІНГІБІТОР ФІТОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ..... 58	58
Є.Б. Гольдін ЦІАНОБАКТЕРІЇ ТА РОСЛИНОЇДНІ ОРГАНІЗМИ: ОСОБЛИВОСТІ МІЖВИДОВИХ ВІДНОСИН..... 64	64
Л.О. Чайковська, М.І. Баранська ВПЛИВ АГРОСТИМУЛІНУ, ЕМІСТИМУ С, БІОЛАНУ НА РІСТ І ФОСФАТАЗНУ АКТИВНІСТЬ <i>ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS</i> 32-3 70	70
АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»У 2009 РОЦІ..... 75	75
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ..... 82	82

УДК 579.222:577.217

Ю.Ю. Кондратюк^{1, 2}, М.А. Бабарик², О.І. Корнелюк²

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна, e-mail: kondratyuk_yulya@ukr.net

²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Академіка
Заболотного, 150, 03143, м. Київ-143, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ БАКТЕРІАЛЬНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗИ ССАВЦІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ ШТАМУ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)*pLysE*

*Проведено оптимізацію умов бактеріальної експресії рекомбінантної тирозил-тРНК синтетази. Досліджено вплив концентрації індуктора синтезу цільового білка на його кінцевий вихід і встановлено оптимальний час культивування бактеріальної культури до та після додавання індуктора. Запропоновано оптимальну схему культивування штаму *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* для досягнення високого рівня виходу рекомбінантного білка.*

К л ю ч о в і с л о в а: тирозил-тРНК синтетаза, бактеріальна система експресії, оптимізація експресії.

Аміноацил-тРНК синтетази (АРСази) [КФ 6.1.1.] — ключові ферменти білоксинтезувального апарату клітини, які беруть участь в реалізації генетичної інформації та каталізують високоспецифічне аміноацилювання гомологічних транспортних РНК [1, 7]. Крім того, еукаріотні АРСази виконують також ряд неканонічних функцій, у тому числі після протеолітичного розщеплення проявляють цитокинові активності [4]. Наявність цитокинових активностей у АРСаз відкриває перспективи для їх наступного застосування як нових біотерапевтичних препаратів.

Тирозил-тРНК синтетаза ссавців є однією з найбільш вивчених АРСаз ссавців [1, 4]. Цей фермент складається з двох структурних модулів: NH₂-кінцевого каталітичного модуля та цитокінподібного COOH-кінцевого модуля — гомолога цитокіна ЕМАР II (ендотеліального та моноцитаривувального поліпептида II). Некаталітичний С-модуль цитоплазматичної TugRS ссавців має подвійну функцію: бере участь у зв'язуванні тРНК як *цис*-фактор та після протеолітичного відщеплення від каталітичного кора синтетази проявляє цитокинову активність, подібну до ЕМАР II [5, 9]. В повнорозмірній TugRS ссавців модулі з'єднані гнучким неструктурованим міжмодульним лінкером, який містить сигнал для протеолітичного розщеплення — амінокислотну послідовність PEST [1, 4]. До цього часу просторова



структура повнорозмірної TyrRS людини ще не встановлена: кристалографічні структури визначені тільки для окремих каталітичного [11] та ЕМАР II-подібного С-кінцевого модулів [10]. Для проведення структурних досліджень білків методами рентгенівської кристалографії або мультимірної ЯМР-спектроскопії необхідні препаративні кількості білків — десятки мг. Тому для забезпечення цих досліджень необхідним є використання вискоєфективних оптимізованих систем експресії рекомбінантних білків.

З цією метою в даній роботі здійснено підбір оптимальних умов культивування бактеріальної культури та експресії цільового білка — TyrRS ссавців в препаративних кількостях для подальших структурних досліджень.

Матеріали і методи

В роботі використано штам-продуцент рекомбінантних білків, отриманий на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysE*. Штам трансформований за загальноприйнятою методикою [2] відповідним сконструйованим плазмідним вектором pET30a-59K TyrRS, у якого під контролем промотора фага T7 містяться гени, що кодуєть синтез цільового білка — повнорозмірної тирозил-тРНК синтетази (59K TyrRS). Генетичним маркером плазміди pET30a є ген *kan*, що забезпечує стійкість трансформованих клітин до канаміцину.

Штам-продуцент вирощували на середовищі Luria-Bertani (LB), що містить 5 г дріжджового екстракту, 10 г трипону, 10 г NaCl в 1 л з додаванням антибіотика канаміцину до кінцевої його концентрації в розчині 30 мкг/мл. Культуру інкубували при температурі 37 °C та інтенсивній аерації (130 об/хв) до досягнення нею оптичної густини 0,3–1,3 (залежно від часу культивування культури). Оптичну густину (OD_{600}) визначали спектрофотометрично (спектрофотометр BioMate-5, Велика Британія) при довжині хвилі 600 нм.

Для індукції синтезу рекомбінантного білка в культуральне середовище додавали ізопропіл- β -тіогалактопіранозид (ІПТГ) до кінцевих концентрацій 0,5, 0,75, 1,0, 1,25, 1,5 мМ. Визначали час культивування культури до індукції (1, 2, 3 год) та після (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 год) індукції експресії.

Для експресії TyrRS підбирали оптимальне середовище культивування бактеріальної культури: середовище Luria-Bertani, м'ясо-пептонний агар (пептон, суміш амінокислот, Na_2CO_3 , NaCl), мінімальне середовище А (глюкоза, тіамін, біотин, $MgSO_4$, $CaCl_2$, NH_4Cl , NaCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , солі заліза, цинку, міді, кобальту, бору, марганцю як мікроелементи).

Рекомбінантний білок отримували із супернатанту лізованих клітин *E. coli* методом металхелатувальної хроматографії на Ni-NTA-агарозній колонці. Клітини руйнували ультразвуком, освітлювали лізат центрифугуванням. Супернатант наносили на колонку з Ni-NTA-агарозою (Qiagen, США). Цільовий білок елюювали буфером для елюції (50 мМ натрій-фосфатний буфер, 150 мМ NaCl, 200 мМ імідазолу, 5 мМ β -меркаптоетанолу). Фракції, що містили цільовий білок діалізували.

Аналіз бактеріальних білків проводили за допомогою SDS-гель-електрофорезу по Леммлі в денатурувальних умовах (12% розділювальний гель) [6], використовуючи суміш маркерних білків фірми Fermentas (Литва). Гелі фарбували Coomassie blue R-250. Вміст білків визначали денситометрично (денситометр LKB UltroScan XL, Швеція). При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм STATISTICA 7.0. Одержані результати представлені у вигляді середніх значень з урахуванням середніх квадратичних відхилень.



Результати та їх обговорення

Система експресії на основі РНК-полімерази фага Т7 — одна з найефективніших прокаріотних систем, що широко використовуються для отримання цільових продуктів як про-, так і еукаріотного походження. Вона з успіхом використовується для біосинтезу рекомбінантних білків в лабораторних умовах і в умовах великомасштабного виробництва. Найчастіше в ролі продуцента в таких системах виступає штам *E. coli* BL21(DE3)*pLysE*, спеціально для цього сконструйований [2]. В клітинах *E. coli* BL21(DE3) ген РНК-полімерази фага Т7 під контролем *lac UV5* промотора локалізується в бактеріальній хромосомі, куди він інтегрований у складі фага λ . Штам *E. coli* BL21(DE3) використовують як реципієнт для різних плазмідних векторів, в яких цільовий ген вбудований під контроль одного з промоторів, що впізнаються РНК-полімеразою фага Т7. Індукція синтезу фагового фрагмента і, як наслідок, високоефективна транскрипція цільового гену в складі рекомбінантної плазміди спостерігаються після додавання в середовище культивування індуктора — ІПТГ [3, 8].

Важливим моментом на етапі внесення в культуральне середовище індуктора синтезу цільового білка є час його додавання, адже від стадії росту, на якій знаходиться бактеріальна культура, залежить синтез потрібного продукту. Оптимальним є час, коли культура знаходиться в логарифмічній фазі росту.

Нами досліджено рівень експресії білка 59К TyrRS залежно від кількості ІПТГ та часу культивування бактеріальної культури до індукції. Як видно з рисунка 1, при підвищенні концентрації індуктора до 1 мМ спостерігалось чітке зростання рівня експресії білка. При подальшому збільшенні кількості ІПТГ така тенденція втрачалася і навпаки відмічався спад рівня експресії.

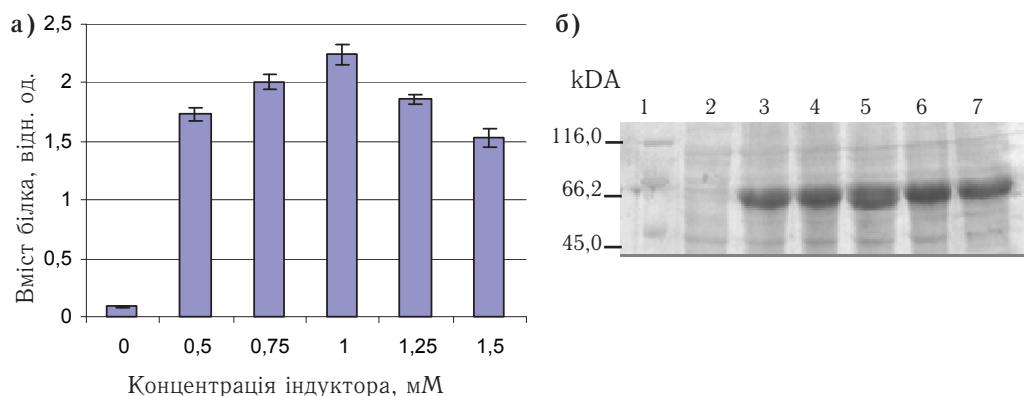


Рис. 1. Рівень експресії білка 59К TyrRS залежно від концентрації ІПТГ:
 а) залежність виходу білка від концентрації індуктора; б) електрофореграма білків, отриманих при додаванні різної кількості ІПТГ. 1 — білкові маркери молекулярної маси ("Fermentas", Литва); 2 — лізат до індукції; 3–7 — лізати після індукції (0,5 мМ, 0,75 мМ, 1 мМ, 1,25 мМ, 1,5 мМ ІПТГ, відповідно).

Fig. 1. The expression level of 59K TyrRS protein depending on the IPTG concentration: a) the dependence of protein output upon concentration of inductor; b) electropherograms of proteins, obtained by adding different amount of IPTG. 1 — protein molecular weight markers ("Fermentas", Lithuania), 2 — without inducer; 3–7 — induced with 0,5 mM, 0,75 mM, 1 mM, 1,25 mM, 1,5 mM IPTG respectively.

Максимальна кількість білка спостерігалася за умови додавання в середовище культивування індуктора на другу годину росту культури ($OG_{600}=0,7-0,9$), що пояснюється імовірним досягненням культурою найбільш сприятливої фази росту (рис. 2):

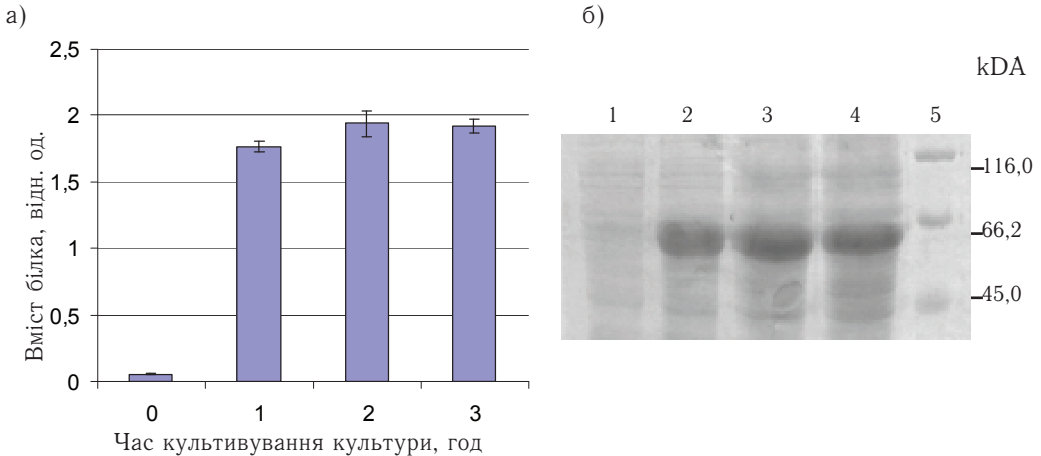


Рис. 2. Рівень експресії білка 59К TyrRS залежно від часу культивування бактеріальної культури до індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих за різного часу культивування.

1 – лізат до індукції; 2–4 – лізати після індукції (1, 2, 3 год культивування до індукції, відповідно); 5 – білкові маркери молекулярної маси (“Fermentas”, Литва).

Fig. 2. The level of expression of 59K TyrRS protein depending on the time of bacterial culture cultivation to induction: a) the dependence of protein output of cultivation time; b) electrophoregrams of proteins, obtained at different time of cultivation. 1 – without inducer; 2–4 – after induction (1, 2, 3 h of cultivation with inducer, respectively); 5 – protein molecular weight markers (“Fermentas”, Lithuania).

При дослідженні рівня експресії білка залежно від часу культивування культури після індукції показано найбільший приріст експресії цільового білка при культивуванні культури протягом 4 год. При подальшому культивуванні спостерігали незначне зростання біосинтезу білка 59К TyrRS та збільшення синтезу бактеріальних білків (рис. 3).

Накопичення в біомасі клітин цільового продукту при культивуванні рекомбінантних штамів-продуцентів залежить не лише від генотипових властивостей популяції рекомбінантних клітин, а також великою мірою обумовлене якістю та кількістю субстратів. Вдало підібране ростове середовище дозволяє досягати високих рівнів виходу цільових білків.

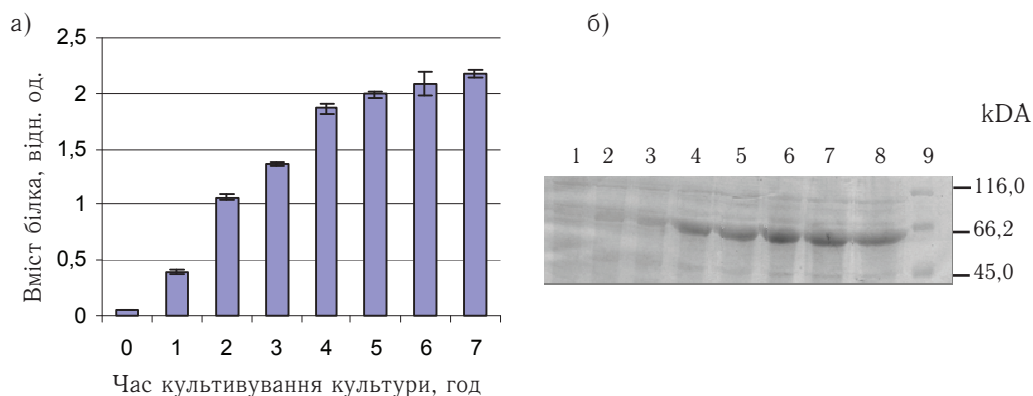


Рис. 3. Рівень експресії білка 59K TyrRS залежно від часу культивування культури після індукції: а) залежність виходу білка від часу культивування; б) електрофореграма білків, отриманих за різного часу культивування. 1 – лізат до індукції; 2–8 – лізати після індукції (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 год культивування після індукції, відповідно); 9 – білкові маркери молекулярної маси (“Fermentas”, Литва).

Fig. 3. The level of expression of 59K TyrRS protein depending on the time of cultivation of bacterial culture after induction:

a) the dependence of protein output of cultivation time; b) electrophoregrams of proteins, obtained at different cultivation time.

1 – without inducer; 2–8 – after induction (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 h of cultivation with inductor, respectively); 9 – protein molecular weight markers (“Fermentas”, Lithuania).

При культивуванні бактеріальної культури на різних поживних середовищах встановили, що найвищий рівень експресії білка 59K TyrRS спостерігався при вирощуванні на мінімальному середовищі А, що пояснюється наявністю в ньому тіаміну, біотину та мікроелементів (рис. 4).

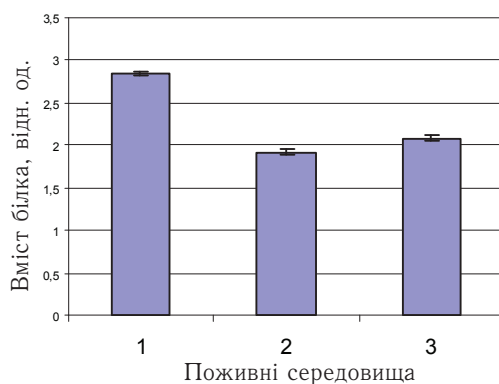


Рис. 4. Рівень експресії білка 59K TyrRS залежно від середовища культивування бактеріальної культури: 1 – мінімальне середовище А; 2 – LB; 3 – МПА.

Fig. 4. The level of expression of 59K TyrRS protein depending on cultivation medium: 1 – minimal medium A, 2 – LB, 3 – beef-extract agar.

Проведено бактеріальну експресію та афінну очистку білка 60kTyrRS. Отримано необхідну для подальших досліджень кількість даного білка високого ступеня чистоти (рис. 5).

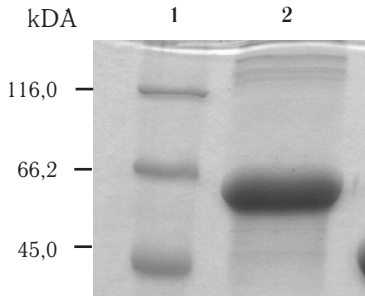


Рис. 5. Електрофоретичний контроль чистоти білків (12% розділювальний гель):

1 – білкові маркери молекулярної маси (“Fermentas”, Литва), 2 – білок 59K TyrRS.

Fig. 5. Electrophoregrams of protein purity control (SDS-12% PAGE):

1 – protein molecular weight markers (“Fermentas”, Lithuania), 2 – protein 59K TyrRS.

Отже, в результаті досліджень здійснено оптимізацію бактеріальної експресії повнорозмірної тирозил-трНК синтетази ссавців. Встановлено, що оптимальна кількість індуктора ІПТГ для експресії TyrRS ссавців становить 1 мМ, а час культивування бактеріальної культури до та після індукції синтезу цільового білка становить дві та чотири години, відповідно. Вихід цільового білка – TyrRS ссавців – при бактеріальній експресії в культурі клітин *E. coli* BL21(DE3)*pLysE* складає 68,52 мг з 1 л культуральної рідини, що відповідає 29% сумарних бактеріальних білків. Отриманий вихід білка є достатнім для проведення наступних структурних досліджень TyrRS ссавців фізичними методами: рентгеноструктурним аналізом та ЯМР-спектроскопією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Корнелюк А.И. Структурно-функциональное исследование тирозил-трНК синтетазы млекопитающих // Биополимеры и клетка. – 1998. – Т. 14, № 4. – С. 349–359.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 479 с.
3. Славченко И.В., Борейко Е.В. Фенотипическое проявление особенностей метаболизма клеток *Escherichia coli* BL 21(DE3) при выращивании на средах, содержащих разные источники углерода // Биополимеры и клетка. – 2002. – Т. 18. – № 3. – С. 232–236.
4. Ivakhno S. S., Kornelyuk A. I. Cytokine-like activities of some aminoacyl-tRNA synthetases and auxiliary p43 cofactor of aminoacylation reaction and their role in oncogenesis // Exper. Oncol. – 2004. – V. 26. – P. 250–255.
5. Kornelyuk A.I., Tas M.P., Dubrovsky A.L., Murray J.C. Cytokine activity of the non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Биополимеры и клетка. – 1999. – V. 15, № 2. – P. 168–172.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – V. 227, № 259. – P. 680–685.
7. Schimmel P. Aminoacyl-tRNA synthetase: general features and recognition of transfer RNAs // Ann. Rev. Biochem. – 1987. – V. 56. – P. 125–158.
8. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes // J. Mol. Biol. – 1986. – V. 189D, № 1. – P. 113–130.
9. Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science. – 1999. – V. 284. – P. 147–151.
10. Yang X.L., Liu J., Skene R.J., McRee D. and Schimmel P. Crystal Structure of an EMAP-II-Like Cytokine Released from a Human tRNA Synthetase // Helvetica Chimica Acta – 2003. – V. 86. – P. 1246–1257.
11. Yang X.L., Skene R.J., McRee D.E., Schimmel P. Crystal structure of a human aminoacyl-tRNA synthetase cytokine // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2002. – V. 99, № 243. – P. 15369–15374.

Ю.Ю. Кондратюк^{1,2}, М.А. Бабарык², А.И. Корнелюк²

¹Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, e-mail: kondratyuk_yulya@ukr.net

²Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Академика
Заболотного, 150, 03143, г. Киев-143, Украина

ОПТИМИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИЛ-тРНК СИНТЕТАЗЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) *pLysE*

Реферат

Проведена оптимизация условий бактериальной экспрессии рекомбинантной тирозил-тРНК синтетазы. Исследовано влияние концентрации индуктора синтеза целевого белка на его конечный выход, а также установлено оптимальное время культивирования бактериальной культуры до и после добавления индуктора. Предложена оптимальная схема культивирования культуры *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE* для достижения высокого уровня выхода рекомбинантного белка.

К л ю ч е в ы е с л о в а: тирозил-тРНК синтаза, бактериальная система экспрессии, оптимизация экспрессии.

Yu.Yu. Kondratiuk^{1,2}, M.A. Babaryk², O.I. Kornelyuk²

¹National Taras Shevchenko University of Kyiv, Volodymyrska str., 64, Kyiv, 01033,
Ukraine, e-mail: kondratyuk_yulya@ukr.net

²Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU, Zabolotny str., 150,
Kyiv-143, 03143, Ukraine

BACTERIAL EXPRESSION OPTIMIZATION OF MAMMALIAN TYROSYL-tRNA SYNTHETASE ON STRAIN *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3) *pLysE* CULTIVATION

Summary

The optimization of the conditions of bacterial expression of recombinant tyrosyl-tRNA synthetase was conducted. The influence of the concentration of synthesis inductor of target protein at its final output and the best time of cultivation of bacterial culture before and after inductor adding was investigated. The optimal conditions for culture *E. coli* BL21 (DE3) *pLysE* cultivation to achieve a high expression level of recombinant protein were proposed.

К e y w o r d s: tyrosyl-tRNA synthetase, bacterial expression system, optimization of expression.



**О.Ю. Зінченко, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін,
С.В. Водзінський, Ю.В. Ішков**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНИХ ПОРФІРИНІВ НА ЧУТЛИВІСТЬ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ДО АНТИБІОТИКІВ

*Досліджено вплив синтетичних порфіринів на чутливість *S. aureus* і *E. coli* до еритроміцину та тетрацикліну. Показано, що сумісне додавання вказаних сполук до поживного середовища призводить до значного зниження мінімальних інгібувальних концентрацій як антибіотиків, так і порфіринів. Характер взаємодії досліджуваних речовин для більшості комбінацій визначено як синергізм.*

К л ю ч о в і с л о в а: антибіотики, синтетичні порфірини, комбіноване застосування, синергізм.

Етіологічна структура інфекційних захворювань людини на сьогоднішній день характеризується залученням до патогенетичного процесу все більшої кількості мікроорганізмів, роль яких у виникненні інфекцій донедавна вважалася незначною. Становище ускладнюється відсутністю засобів специфічної терапії та множинною стійкістю збудників до відомих препаратів. Сучасні принципи боротьби з мікробною резистентністю базуються на декількох можливих підходах, серед яких велика надія покладається на комбіноване застосування препаратів [1, 10].

Протягом двох останніх десятиріч увагу дослідників привертають унікальні властивості синтетичних порфіринів, ефективність яких у лікуванні онкологічних захворювань та локалізованих інфекцій не викликає сумніву [8, 11]. У зарубіжній літературі зустрічаються повідомлення про здатність сполук даного класу змінювати проникність поверхневих структур бактерій для хімічних речовин, в тому числі, антибіотиків [9]. Це слугує підставою для вивчення у даній роботі впливу сумісного застосування антибіотиків та синтетичних порфіринів на ріст умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на культурах *S. aureus* ОНУ 223 та *E. coli* ОНУ 206, отриманих з музею культур кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І.І. Мечникова. Вибір тест-штамів був обумовлений необхідністю оцінити особливості впливу порфіринів на чутливість до антибіотиків грампозитивних та грамнегативних бактерій.

У роботі використовували 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіри-нато тритозилат (сполука I) та його цинковий комплекс (сполука II), синтезовані співробітниками Лабораторії синтезу лікарських засобів ОНУ імені І.І. Мечникова.



Вивчали вплив зазначених сполук на чутливість тест-штамів до еритроміцину та тетрацикліну для порівняння ефекту при застосуванні відповідно гідрофобних та гідрофільних антибактеріальних засобів.

На першому етапі визначали мінімальні інгібувальні концентрації (МІК) антибіотиків та порфіринів. Середовище Гісса з глюкозою розливали у пробірки по 1 мл та стерилізували в автоклаві при 0,5 атм. Готували дворазові розведення антибіотиків та порфіринів і стерильно додавали у пробірки з середовищем. Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Отриману суспензію розводили до концентрації $2 \cdot 10^4$ кл/мл, відбирали по 50 мкл та вносили до кожної пробірки. Таким чином, кінцева кількість клітин у 1 мл середовища дорівнювала $1 \cdot 10^3$. Пробірки з мікроорганізмами витримували у термостаті при 37 °С протягом доби, після чого візуально визначали наявність росту за зміною кольору індикатора Андреде [4].

Для оцінки сумісної дії антибіотиків та порфіринів тест-мікроорганізми вирощували у середовищі Гісса з індикатором Андреде, до якого одночасно додавали антибіотики та порфірини у концентраціях, менших за МІК. Визначення характеру сумісної дії антибіотиків та порфіринів здійснювали шляхом обчислення фракційної інгібувальної концентрації (ФІК) за наступною формулою [6]:

$$\text{ФІК} = \text{МІК A у присутності B} / \text{МІК A} + \text{МІК B у присутності A} / \text{МІК B},$$

де А – антибіотик, В – порфірин.

При $\text{ФІК} \leq 0,5$ взаємодію досліджуваних сполук оцінювали як синергізм, $0,5 < \text{ФІК} < 2,0$ – як адитивний ефект, $\text{ФІК} \geq 2,0$ – антагонізм [6].

Кількість паралелей у кожному експерименті дорівнювала 5. Експеримент повторювали тричі.

Результати та їх обговорення

Результати визначення МІК препаратів наведені у таблиці 1. Отже, МІК еритроміцину та тетрацикліну для стафілокока дорівнювали відповідно 60 мкг/мл та 240 мкг/мл. Для кишкової палички МІК еритроміцину – 120 мкг/мл, тетрацикліну – 240 мкг/мл. МІК порфіринів для *S. aureus* 10 та 9 мкг для сполук I і II, відповідно, для *E. coli* 22 і 16 мкг, відповідно.

Таблиця 1

МІК еритроміцину та тетрацикліну для *S. aureus* ОНУ 223 та *E. coli* ОНУ 206

Table 1

MICs of erythromycin and tetracycline for *S. aureus* ONU 223 and *E. coli* ONU 206

Препарат	МІК досліджуваних сполук, мкг/мл	
	<i>S. aureus</i> ОНУ 223	<i>E. coli</i> ОНУ 206
Еритроміцин	60	120
Тетрациклін	240	240
Сполука I	10	22
Сполука II	9	16

При одночасному додаванні до поживного середовища антибіотиків та порфіринів спостерігали значне зниження МІК як тих, так і інших.



Так, МІК еритроміцину для *S. aureus* ОНУ 223 знижувалася до 3,75 мкг/мл, тобто, у 16 разів, МІК тетрацикліну — у 8 разів (рис. 1, а), при цьому МІК порфіринів, в свою чергу, зменшувалася у 1,5–15 разів (рис. 2).

МІК еритроміцину для *E. coli* ОНУ 206 за присутності синтетичних порфіринів також зменшувалася у 16 разів (рис. 1, б).

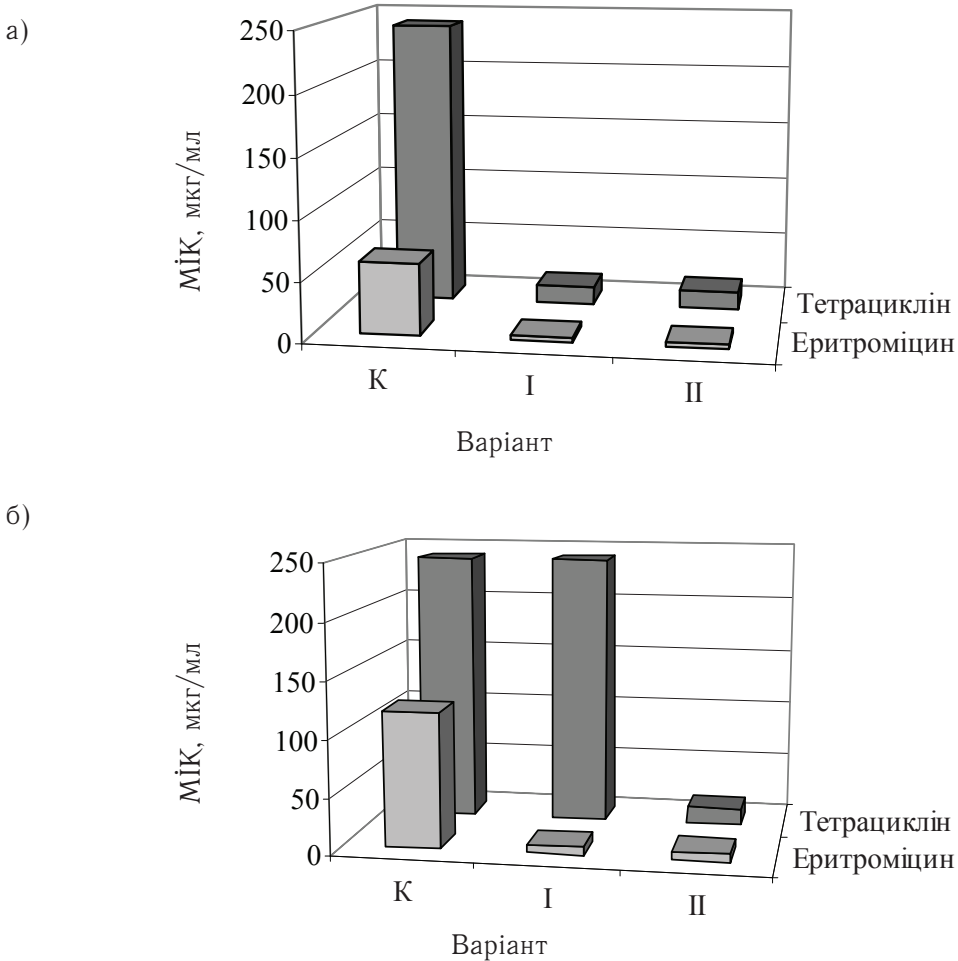


Рис. 1. МІК антибіотиків щодо *S. aureus* (а) та *E. coli* (б) в присутності синтетичних порфіринів

Fig. 1. MICs of antibiotics for *S. aureus* ONU 223 and *E. coli* ONU 206 in the presence of synthetic porphyrins

Зменшення МІК тетрацикліну у 16 разів відбувалося лише при додаванні цинкового комплексу 5,10,15-три(Н-метил-4-піридил)-20-(н-ноніл)порфіринату тритозилату (сполука ІІ). Присутність у середовищі вільної основи порфірину (сполука І) не викликала жодного ефекту. МІК самих порфіринів у комбінації як з еритроміцином, так і з тетрацикліном, значно зменшувалися (рис. 2).

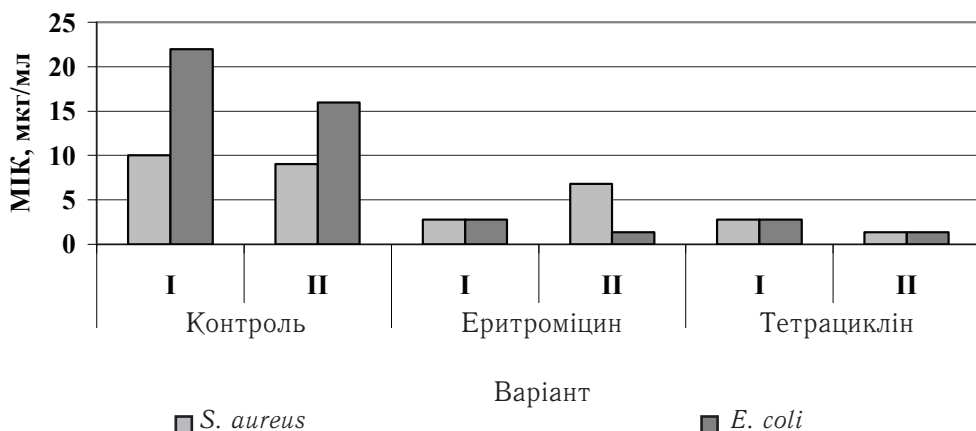


Рис. 2. МІК порфіринів щодо *S. aureus* ОНУ 223 та *E. coli* ОНУ 206 в присутності антибіотиків

Fig. 2. MICs of porphyrins for *S. aureus* ONU 223 and *E. coli* ONU 206 in the presence of antibiotics

Обчислення МІК, результати якого наведені в таблиці 2, дозволило оцінити характер взаємодії досліджуваних порфіринів та антибіотиків. Для більшості комбінацій він був визначений як синергізм. Для комбінацій еритроміцин+сполука II у випадку *S. aureus* ОНУ 223 та тетрациклін+сполука I у випадку *E. coli* ОНУ 206 характер взаємодії зазначених сполук був визначений як адитивний ефект.

Таблиця 2
Фракційні інгібувальні концентрації комбінацій антибіотиків та порфіринів, мкг/мл

Table 2
Fractional inhibitory concentrations of antibiotics and porphyrins, μg/ml

Комбінація		Штам	
		<i>S. aureus</i> ОНУ 223	<i>E. coli</i> ОНУ 206
Еритроміцин	сполука I	0,34	0,19
Еритроміцин	сполука II	0,82	0,15
Тетрациклін	сполука I	0,41	1,13
Тетрациклін	сполука II	0,28	0,15

За даними літератури, порфірини здатні знижувати МІК гідрофобних антибактеріальних агентів. Так, Minnok зі співавт. [9] показали, що при одноразовому додаванні до середовища еритроміцину та піридинфталоціаніну МІК для *E. coli* зменшувалася учетверо. На чутливість до тетрацикліну ця сполука майже не впливала — МІК знижувалася лише у 1,7 разу. Причиною такого явища дослідники вважають здатність піридинфталоціаніну заміщувати іони Mg^{2+} , які зв'язують сусідні молекули ЛПС зовнішньої мембрани, та порушувати її проникність. За таких умов полегшується надходження до клітини гідрофобних молекул. На транспорт



гідрофільних речовин це порушення не впливає, оскільки вони потрапляють до бактеріальних клітин за допомогою порфіринів [7].

У наших досліджах порфірини виявили значний вплив на чутливість кишкової палички як до еритроміцину, так і тетрацикліну, оскільки МІК цих антибіотиків знизилася у 16 разів. Цікаво, що МІК тетрацикліну зменшувалася лише за присутності цинкового комплексу дослідженого порфірину, тоді як антимікробна активність досліджених порфіринів була приблизно однаковою [2]. Вірогідно, у випадку еритроміцину підвищення чутливості клітин *E. coli* ОНУ 206 відбувалося за рахунок механізму, описаного дослідниками [9].

Що ж стосується тетрацикліну, тут можливі декілька шляхів. Відомі механізми резистентності грамнегативних бактерій до дії тетрацикліну включають активне виведення та захист рибосоми, оскільки мішенню дії антибіотика є 30S субодинаця рибосом. Перший механізм є найбільш поширеним. Детермінанти резистентності локалізовані на плазмідах, що забезпечує їх швидке поширення як усередині виду, так і поза його межами. Серед грамнегативних видів поширені гени TetA—TetE та їх продукти [3]. Вірогідно, сполука II здатна зв'язуватися з плазмідною ДНК або з продуктами відповідних генів, інактивуючи їх.

Іншим механізмом резистентності грамнегативних бактерій до тетрацикліну вважають синтез ряду захисних протеїнів, які дозволяють бактерії синтезувати білок, незважаючи на приєднання тетрацикліну до рибосоми. Механізм такого захисту невідомий, проте описано 5 генів, що кодують захисні білки [5]. Можливо, цинковий комплекс дослідженого порфірину здатний блокувати синтез подібних білків або впливати на їх захисні функції. У будь-якому разі участь центрального атому Zn в даному процесі неясна, але очевидно, що наявність іону металу є вирішальною.

Що ж стосується впливу порфіринів на чутливість *S. aureus* до антибіотиків, у літературі нема вказівок на подібні дослідження. У наших досліджах внесення синтетичних порфіринів зменшувало МІК еритроміцину у 16 разів. Оскільки стафілокок належить до грамположитивних мікроорганізмів і не має зовнішньої мембрани, в даному випадку виключається можливість полегшеного надходження даного антибіотика усередину клітини та подолання резистентності. Мішенню дії еритроміцину є 50S субодинаця рибосоми. Відомо, що стійкість стафілококів до макролідів, яким є еритроміцин, може виникати унаслідок метилування 23S субодинаці рРНК. Існує близько 20 генів *erm*, що кодують фермент метилазу. Вони асоційовані з транспозонами та можуть локалізуватися як на плазмідах, так і на хромосомах. Синтез стафілококових метилаз індукується, зокрема, 14-членними макролідами, до яких належить еритроміцин [3]. Враховуючи зниження МІК у присутності досліджуваних порфіринів, можна припустити, що ці сполуки здатні зв'язуватися з генами, які кодують метилазу та перешкоджати її синтезу. Цілком ймовірно, що порфірини діють і на більш пізній стадії та інактивують безпосередньо фермент.

Відомий також механізм резистентності стафілококів до еритроміцину за рахунок ферментативної інактивації антибіотика, проте його значення вважають набагато меншим порівняно з попереднім [3]. Однак не виключено, що досліджені сполуки здатні інактивувати відповідні ферменти.

Наявність у порфіринів здатності підвищувати чутливість тест-штамів до антибіотиків відкриває широкі можливості для створення вискоєфективних комбінованих антибактеріальних препаратів.



ЛІТЕРАТУРА

1. Гаврисюк В.К. Пенициллины, их место в отечественных и международных соглашениях по лечению пневмонии и инфекционных обострений ХОЗЛ // Украинский пульмонологический журнал. — 2007. — № 1. — С. 52–55.
2. Зінченко О.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Іваниця В.О., Жиліна З.І., Водзінський С.В., Водзінська Н.С. Антимікробні властивості асиметрично мезо-заміщених порфіринів // Вісник ОНУ. Біологія. — 2006. — Т. 10, № 7. — С. 110–116.
3. Сидоренко С.В. Механизмы резистентности микроорганизмов // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: Наука, 2002. — 142 с.
4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175–177.
5. Basic and clinical pharmacology / Ed. by B.G. Katzung. — San Francisco: Appleton and Lange, 1995. — V. 2. — P. 225–320.
6. Hallander H.O., Dornbush K., Gezelius L. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity; interaction index and killing curve method // Antimicrob. Agents Chemother. — 1982. — V. 22, № 5. — P. 743–752.
7. Hancock R.E.W. The bacterial outer membrane as a drug barrier // Trends Microbiol. — 1997. — V. 5, № 1. — P. 37–42.
8. Malik Z., Ladan H., Ehrenberg B., Nitzan Y. Bacterial and viral photodynamic inactivation // Photodynamic therapy — Medical applications / Ed. B. W. Henderson, T. J. Dougherty. — Buffalo: Marcel Dekker Inc., 1992. — P. 97–113.
9. Minnok A., Vernon D.I., Schofield J. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli* // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — V. 5, № 5. — P. 522–527.
10. Miskinis K., Kaminskaite A. Treatment outcomes of multidrug resistant tuberculosis // The European respiratory Journal. Abstracts ERS Annual Congress. Geneva, Switzerland. — 1998. — P. 368.
11. Moan J., Rogan S.E., Evensen J.F. Cell photosensitization by porphyrins // Photobiophys. Photobiophys. Suppl. — 1987. — P. 385–395.

О.Ю. Зинченко, Т.О. Филиппова, Б.Н. Галкин, С.В. Водзинский, Ю.В. Ишков

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

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОРФИРИНОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Реферат

Исследовано влияние синтетических порфиринов на чувствительность *S. aureus* и *E. coli* к эритромицину и тетрациклину. Показано, что совместное добавление данных соединений к питательной среде приводит к значительному снижению минимальных ингибирующих концентраций как антибиотиков, так и порфиринов. Характер взаимодействия исследованных веществ для большинства комбинаций определен как синергизм.

К л ю ч е в ы е с л о в а: антибиотики, синтетические порфирины, комбинированное применение, синергизм.



O.Yu. Zinchenko, T.O. Filipova, B.M. Galkin, S.V. Vodzinsky, Yu.V. Ishkov

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

THE SYNTHETIC PORPHYRINS INFLUENCE ON OPPORTUNISTIC BACTERIA SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS

Summary

The influence of synthetic porphyrins on *S. aureus* and *E. coli* sensitivity to erythromycin and tetracycline has been studied. It has been shown the significant decrease of MICs of the mentioned compounds under their combined addition to the nutrient medium. The interaction type of studied chemicals has been determined as synergism for the most combinations.

K e y w o r d s: antibiotics, synthetic porphyrins, combined application, synergism.



**L.M. Skivka¹, O.G. Fedorchuk², O.M. Pyaskovska²,
N.M. Khranovska³, V.V. Pozur¹**

¹ T.G. Shevchenko Kyiv National University, Glushkov ave., 2, Kyiv, 03022, Ukraine, e-mail: realmed@i.com.ua;

² R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NASU, Vasylykivska str., 45, Kyiv, 03022, Ukraine;

³ National Cancer Institute Ministry of Public Health of Ukraine, Lomonosov str., 33/44, Kyiv, 03022, Ukraine

THE EFFECT OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 PEPTIDOGLYCAN ON CYTOTOXIC ACTIVITY OF MURINE MONONUCLEAR SPLENOCYTES

The effect of S. aureus Wood 46 peptidoglycan (PG) on cytotoxic activity of mononuclear splenocytes in mice has been investigated. It was shown that the target-cells death indices upon addition of PG at the concentration of 500 µg/ml after 4h incubation were 1.5 times higher than corresponding indices in the control, but at lower concentrations PG did not influence cytotoxic activity of murine mononuclear splenocytes. 16 h incubation effector and target cells with PG resulted in a dose dependent increase of splenic mononuclear cells cytotoxicity by 1.5, 1.8, 2.0 and 2.5 times for 10, 25, 100 and 500 µg/ml of murein correspondingly.

Key words: peptidoglycan, cytotoxic activity, Lewis lung carcinoma.

Peptidoglycan (PG) is the major unique and essential component of the cell wall of virtually all of Gram-positive and Gram-negative bacteria [2]. PG and its mucopeptide derivatives are considered as potential virulence factors [7]. PGs from different bacteria have distinguishing features but all of them are not present in eukaryotes and therefore they are excellent targets for innate immune system [1, 3, 6].

Two families of receptors — the members of proinflammatory interleukin-1 receptor family — Toll-like receptors (TLR) (in particular, TLR-2) and cytosolic proteins containing a nucleotide-binding oligomerization domain (NOD1 and NOD2) — play the key role in PG detection [3, 6]. Following ligand recognition TLR and NODs initiate intracellular signal transduction that results in the expression of genes involved in inflammation [9, 15]. PG detecting germ-line encoded receptors are expressed in the variety of cells and tissues including mucosal epithelial cells, monocytes, macrophages, T- and B-lymphocytes [11, 18]. Recently TLRs were found in NK cells [10]. These receptors allow NK cells to recognise directly bacterial structures besides their indirect activation with accessory cells through cytokine production. NK cells are one of the key players in tumor immunity, being ultimately responsible for destruction of malignant cells [8]. NK cytotoxic ability can be enhanced in vitro and in vivo by



cytokines, such as interleukin (IL)-2, IL-12, IL-15 and interferon alpha/beta (IFN-alpha/beta) [17]. Recently it was shown that some bacterial immunomodulators, such as CpG-containing DNA, can directly activate NK cell response to tumor cells [13]. The aim of our work was to investigate the effect of *S. aureus* Wood 46 peptidoglycan on cytotoxic activity of mononuclear splenocytes in mice.

Materials and Methods

PG was isolated from the cell walls of *S. aureus* Wood 46 as described previously [12]. For the experiments the PG was dispersed by sonication (25 Hz, 60 s) on ice.

Splenic mononuclear cells (SMC) were isolated by centrifugation splenocytes in ficoll-verograffin gradient ($\rho=1,077$).

Lewis lung carcinoma (LLC), rat lymphosarcoma (LSR) and Yac-1 cells were obtained from the National Bank of Cell Lines and Tumor Strains (IEPOR, Kyiv, Ukraine). The single cell suspension was prepared as described previously [14] by mechanical disaggregation of tumor tissues. LLC cells were expanded in vitro in RPMI 1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% FBS and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin and were incubated at 37 °C in incubator with humidified atmosphere containing 5% CO_2 .

NK-cell cytotoxic activity was determined by flow cytometry method. The target cell (2×10^5 cells/ml) and effector cells (murine mononuclear cells) (4×10^6 cells/ml) were mixed in U-bottom wells of a 96-well microtiter plate at the E : T cell ratio of 20 : 1 in triplicate and incubated in 5% CO_2 atmosphere for 4 or 16 h. The target cells were incubated alone to estimate the rate of spontaneous death. Later incubation cells were collected into cytometric tubes and stained with propidium iodide (Sigma, USA) (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After that the cells were analyzed using a FACSCalibur (Becton Dickinson) and CellQuest program. The cytotoxicity indices were calculated according to the formula: $k = \% \text{ dead cells in experimental probes} - \% \text{ dead cells in spontaneous probes}$ [16].

Statistical analysis was performed using Student's t-test. *P* values < 0.05 were considered significant.

Results and discussion

To research the effect of PG on mice NK cells cytotoxic activity against syngeneic tumor cells we have used Lewis lung carcinoma cells as the targets. Previously we have performed comparative investigation of cytotoxic activity of murine mononuclear splenocytes with LLC and traditional for murine system target cells (Yac-1 and LSR). The target-cells lysis indices in the probes with these three types of target cells were quite comparable (Table).

Table

Cytotoxic activity of mononuclear splenocytes of mice

Target cells	Yac-1	LSR	LLC
Cytotoxicity indexes	16,9 \pm 0.4	15.0 \pm 0.4	15.5 \pm 0.6

These results allowed us to considere LLC as adequate target cells for murine NK cells cytotoxic activity testing and to use them in further experiments.



Incubation of E: T mixture with PG at the concentration of 10, 25 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 4 h has no effect on cytotoxic activity of murine mononuclear splenocytes (Fig. 1). However upon addition of PG at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 4 h, the target cells lysis indices were 1.5 times higher than corresponding indices in control. Our experiments are performed on total suspension of SMC containing a certain portion of dendritic cells (DC). It is well documented that DC can activate NK cells [5]. But in murine system only early-stimulated mature DC can activate NK cells. Besides DC require period > 4 h to acquire NK cell stimulatory capacity after exposure to different stimuli (in our case – with PG) and to perform the activation procedure [4]. Therefore we suppose that after 4 h incubation with PG augmentation of the target cells death mediated by direct activation of NK cells lytic potential.

16 h incubation of effector and target cells with PG resulted in a dose dependent increase of splenic mononuclear cells cytotoxicity by 1.5, 1.8, 2.0 and 2.5 times for 10, 25, 100 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of murein respectively (Fig. 1).

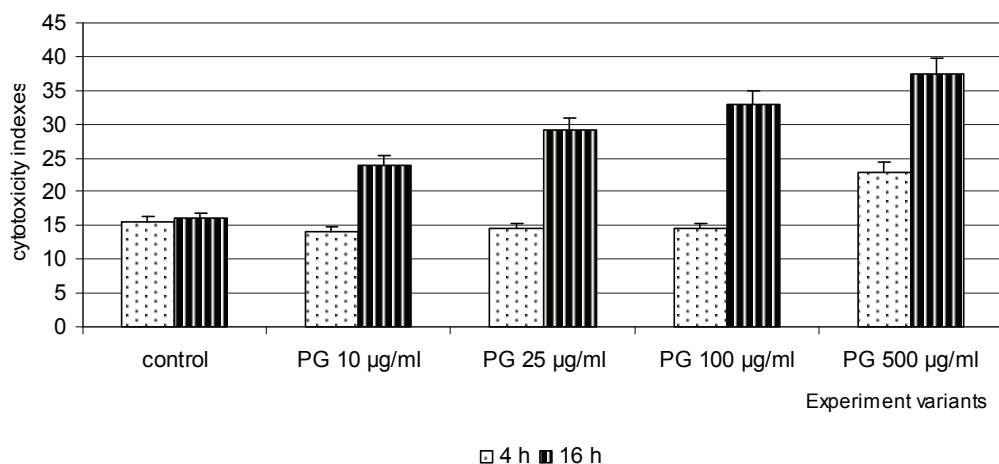


Fig. 1. Effect of PG from *S. aureus* Wood 46 on cytotoxic activity of SMC of mice after 4 h and 16 h incubation

Probably after a long term incubation with PG augmentation of cytotoxic activity of murine SMC is the result of additional activation of NK cells by DC presented in suspension and matured after contact with murein. Since elevation of SMC cytotoxic activity in 4 h tests occurred only upon addition of PG at the maximal concentration, it is suggested that the higher concentration of murein is required for stimulation of lytic activity of NK cells than that for maturation and activation of DC.

It is necessary to point that addition of PG in the probes with target cells without effector cells resulted in dose dependent augmentation of LLC cells death irrespective of incubation period and had no influence on LSR cells (Fig.2). Incubation of LLC with PG for 4 h was leading to the increase of cell death without distinct dose dependence. Maximal cell death stimulation was observed upon addition of PG at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. More prolonged incubation of LLC with PG also resulted in slight augmentation of cell death (significant only upon addition of PG at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). PG has no effect on viability of LSR cells. It is known that TLRs can induce apoptosis in eucariotic cells. Our results suggest that PG has selective apoptotic effect on tumor cells.



As stated above TLR-2, NOD1 and NOD2 are involved in PG recognition. Though a number of authors has proved the presence of TLRs in broad spectrum of tumor cells, data concerning TLRs expression in LSR are absent. Probably it is precisely this fact that explains different reaction of LLC and LSR on PG.

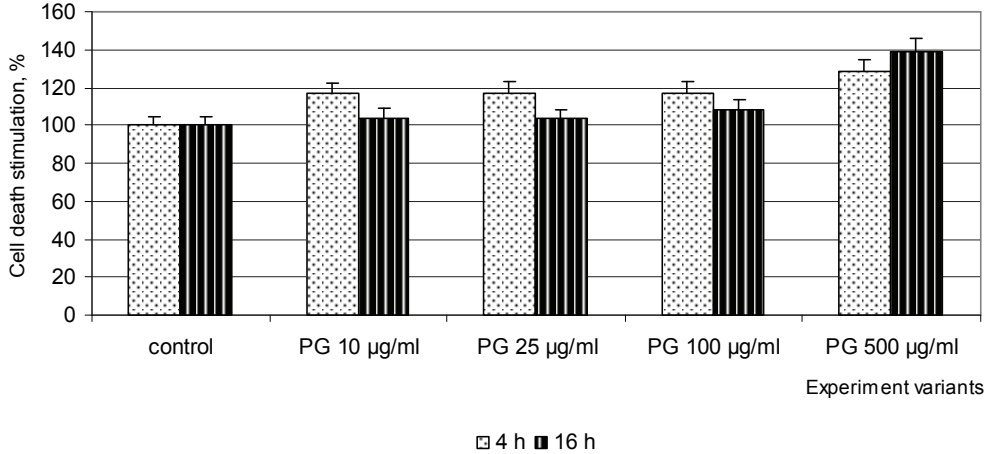


Fig. 2. Effect of PG from *S. aureus* Wood 46 on LLC-cells viability after 4 h and 16 h exposure

Thus we suppose that by the reason of different TLRs expression PG can have selective apoptotic effect on tumor cells. In that case PG may elevate target-cells lysis in E: T mixture by direct toxic action on the target cells and by activation of lytic potential of effector cells.

REFERENCES

1. Beutler B., Hoebe K., Du X., Ulevitch R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers // *J. Leukoc. Biol.* – 2003. – 74, N 4. – P. 479–85.
2. Boneca I.G. The role of peptidoglycan in pathogenesis // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2005. – 8, N 1. – P. 46–53.
3. Dziarski R., Gupta D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) // *Genome Biol.* – 2006. – 7, N 8. – P. 232.
4. Ferlazzo G., Maggi Pack M., Thomas D., Paludan C., Schmid D., Strowig T., Bougras G., Muller W.A., Moretta L., Minz C.. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs // *PNAS.* – 2004. – 101, N 47. – P. 16606–16611.
5. Ferlazzo G., Morandi B., D'Agostino A., Melioli G., Moretta A., Moretta L. The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells // *Eur. J. Immunol.* – 2003. – 33. – P. 306–313.
6. Girardin S.E., Philpott D.J. Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity // *Eur. J. Immunol.* – 2004. – 34, N 7. – P. 1777–82.
7. Guan R., Mariuzza R.A. Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system // *Trends Microbiol.* – 2007. – 15, N 3. – P. 127–34.
8. Julie Y. Djeu, Kun Jiang and Sheng Wei. Signals Triggering Cytotoxicity // *Clin. Cancer. Res.* – 2002. – 8. – P. 636–640.

9. Moreillon P., Majcherczyk P.A. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria // Scand. J. Infect. Dis. — 2003. — 35, N 9. — P. 632–41.
10. O'Connor G.M., Hart O.M., Gardiner C.M. Putting the natural killer cell in its place // Immunology. — 2006. — 117, N 1. — P. 1–10.
11. Pasare C., Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity // Adv. Exp. Med. Biol. — 2005. — 560.— P. 11–8.
12. Pozur V.K., Cheusova Z.V., Borysov V.A., Marushko Iu.V., Hrytsenko L.M., Marushko T.V., Son'kin V.M. The development of a coagglutination reaction using staphylococcal peptidoglycan for the diagnosis of staphylococcal infection // Lik Sprava. — 1999. — N 3. — P. 79–82.
13. Roda J.M., Parihar R., Carson W.E. 3rd. CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells // J Immunol. — 2005. — 175, N 3. — P. 1619–27.
14. Solyanik G.I., Pyaskovskaya O.N., Garmanchouk L.V. Cisplatin-resistant Lewis lung carcinoma cells possess increased level of VEGF secretion // Exp Oncol. — 2003. — 4. — P. 260–265.
15. Strober W., Murray P.J., Kitani A., Watanabe T. Signaling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2 // Nat. Rev. Immunol. — 2006. — 6, N 1. — P. 9–20.
16. Use of Flow cytometry for evaluation of functional activity of human immune system. Manual for laboratory use. — Moscow: 2001. — P. 19–24.
17. Wu J., Lanier L.L. Natural killer cells and cancer // Adv. Cancer Res. — 2003. — 90. — P. 127–56.
18. Xu D., Komai-Koma M., Liew F.Y. Expression and function of Toll-like receptor on T cells // Cell Immunol. — 2005. — 233, N 2. — P. 5–9.

Л.М. Сківка¹, А.Г. Федорчук², О.Н. Пясковская², Н.Н. Храновская³, В.В. Позур¹

¹ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
просп. Глушкова, 2, Киев, 03022, Украина, e-mail: realmed@i.com.ua;

² Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е. Кавецкого НАНУ ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина;

³ Национальный Институт Рака МЗ Украины
ул. Ломоносова, 33/44, Киев, 03022, Украина

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАНА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШЕЙ

Реферат

В настоящей работе исследовано влияние пептидогликана (ПГ) *S. aureus* Wood 46 на цитотоксическую активность мононуклеарных спленоцитов мышей. Показано, что добавление ПГ в концентрации 500 мкг/мл при 4-часовой инкубации в 1,5 раза усиливает гибель клеток-мишеней, тогда как ПГ в более низких концентрациях достоверно не влияет на цитотоксическую активность мононуклеарных спленоцитов мышей. 16-часовая инкубация с ПГ результируется дозозависимым усилением цитотоксичности мононуклеарных клеток в 1,5; 1,8; 2,0 и 2,5 раза при добавлении ПГ в концентрациях 10, 25, 100 и 500 мкг/мл соответственно.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пептидогликан, цитотоксическая активность, карцинома легкого Льюис.



Л.М. Сківка¹, О.Г. Федорчук², О.М. Пясковська², Н.М. Храновська³, В.В. Позур¹

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
просп. Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна
e-mail: realmed@i.com.ua;

² Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології
імені Р.Є. Кавецького НАНУ, вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна;

³ Національний Інститут Раку МОЗ України
вул. Ломоносова, 33/44, Київ, 03022, Україна

ВПЛИВ ПЕПТИДОГЛІКАНА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 НА ЦИТОТОКСИЧНУ АКТИВНІСТЬ МОНОНУКЛЕАРНИХ СПЛЕНОЦИТІВ МИШЕЙ

Реферат

В роботі досліджено вплив пептидоглікана (ПГ) *S. aureus* Wood 46 на цитотоксичну активність мононуклеарних спленоцитів мишей. Показано, що додавання ПГ в концентрації 500 мкг/мл при 4-годинній інкубації в 1,5 рази посилює загибель клітин-мішеней, тоді як ПГ в нижчих концентраціях достовірно не впливає на цитотоксичну активність мононуклеарних спленоцитів мишей. 16-годинна інкубація з ПГ результується додозалежним посиленням цитотоксичності мононуклеарних клітин у 1,5; 1,8; 2,0 і 2,5 рази при додаванні ПГ в концентраціях 10, 25, 100 і 500 мкг/мл відповідно.

К л ю ч о в і с л о в а: пептидоглікан, цитотоксична активність, карцинома легені Льюїс.



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

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: limmy@mail.ru

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

БАКТЕРИОЦИНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *RHIZOBIUM VITIS* И *PANTOEA AGGLOMERANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА

Выделенные штаммы Rhizobium vitis и Pantoeae agglomerans проявили бактериоциногенную активность по отношению к близкородственным штаммам. Показано, что исследованные культуры различались по чувствительности к бактериоцинам. По сравнению с митомициновой индукцией, в случае спонтанного выхода бактериоцинов выявлялось значительно меньшее количество зон лизиса на газонах тест-культур, однако ряд штаммов все же демонстрировал хорошо выраженную бактериоциногенную активность.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Rhizobium vitis, Pantoeae agglomerans, бактериоцины.*

Бактериальный рак винограда — опаснейшее заболевание для молодых питомников. При его развитии уже на третий год возможна гибель 70% молодых растений [1]. Возбудителями бактериального рака являются *Rhizobium vitis* (ранее известная как *Agrobacterium vitis*) и *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) — граммотрицательные бактерии, населяющие ксилему растений.

Эффективные меры борьбы с данными фитопатогенами до настоящего времени не разработаны. Перспективным направлением является использование штаммов-антагонистов [2]. Так, известно, что штамм *R. rhizogenes* K84 продуцирует бактериоцин агроцин, подавляющий активность многих штаммов *Rhizobium* [7]. Из штамма *R. radiobacter* E26 был выделен новый низкомолекулярный бактериоцин Ar26. Этот бактериоцин, являясь аналогом нуклеозидов, кроме киллерной активности, способен также подавлять функции обратной транскриптазы и α - и β -глюкозидаз [6, 10]. Вещества с подобными активностями являются ценными потенциальными агентами биологического контроля бактериального рака.

Целью данной работы было изучение бактериоциногенной активности патогенных штаммов *R. vitis*, выделенных из растений винограда юга Украины.

Материалы и методы исследования

В работе использованы 10 штаммов *R. vitis*, выделенных на одном из виноградников Одесской области, и штамм *R. radiobacter* C58, несущий туморогенную плазмиду pTi-C58 нопаинового типа. Идентификацию штаммов проводили методом полимеразной цепной реакции [4].



Для исследования потенциала антагонистических взаимоотношений других представителей микробиоты растения нами было проведено изучение влияния бактериоцинов эпифитной бактерии *Pantoeae agglomerans* на рост штаммов *R. vitis*. Штаммы *P. agglomerans* были выделены из растений того же виноградника Одесской области, из которого выделяли исследуемые штаммы ризобий.

Для культивирования бактерий использовали среду LB с увеличенным содержанием компонентов (г/л): пептон — 15, дрожжевой экстракт — 10, NaCl — 5.

Индукцию бактериоцинов проводили при помощи митомицина С (1 мкг/мл), который вносили в середине логарифмической фазы роста культур, после чего бактерии культивировали 24 часа при 28 °С.

Кроме того, все штаммы проверяли на спонтанный выход бактериоцинов в стационарной фазе роста при культивировании в среде LB. Клетки осаждали центрифугированием для получения надосадочной жидкости.

Лизаты бактериальных клеток, полученные после добавления в культуры митомицина С, и надосадочную жидкость обрабатывали хлороформом (0,5–1%) и азидом натрия (0,02%), очищали центрифугированием и хранили в 0,02% растворе азиды натрия при +4 °С.

Для оценки потенциала антагонистических взаимоотношений проводили перекрестную проверку бактериоциночувствительности каждого из 10 исследуемых штаммов *R. vitis* к полученным препаратам бактериоцинов. Зоны лизиса свежезасеянных газонных культур, образуемые в месте нанесения 5 мкл лизата или надосадочной жидкости, учитывали после 18 часов инкубации чашек с LB агаром при 28 °С. Все исследования проводили в двух повторностях. В качестве положительного контроля применяли *R. radiobacter* C58.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты изучения бактериоциногенной активности штаммов *R. vitis*, а также штамма *R. radiobacter* C58 показали, что возбудители бактериального рака значительно различались по чувствительности к бактериоцинам родственных бактерий, индуцированных митомицином С (табл. 1).

По этому показателю 11 штаммов можно условно разделить на несколько групп. Пять штаммов (*R. vitis* 1, *R. vitis* 7, *R. vitis* 11, *R. vitis* 13, *R. vitis* 15) проявили чувствительность к бактериоцинам всех исследованных культур. При этом большинство из них (кроме *R. vitis* 6 и *R. vitis* 8, а также контрольного штамма *R. radiobacter* C58) лизируются собственными бактериоцинами. Эти результаты позволяют предположить, что данные киллеры являются факторами автолизиса *R. vitis*.

Штаммы *R. vitis* 8 и *R. vitis* 6 оказались устойчивыми к лизису бактериоцинами. Уровень их чувствительности не достигал такового контрольного неродственного штамма *R. radiobacter* C58 и составил 9 и 27%, соответственно. К бактериоцинам более чем половины исследованных культур были чувствительны 70% штаммов.

В свою очередь, если рассматривать штаммы ризобий в качестве продуцентов, то они также очень разнообразны по спектру киллерной активности их бактериоцинов (табл. 1). Так, например, *R. vitis* 14 продуцировал бактериоцины, которые вызвали лизис клеток 9 штаммов (81%), тогда как киллеры из штаммов *R. vitis* 1 и *R. vitis* 7 характеризуются наименьшей активностью. Такие результаты в первую



Таблица 1
Чувствительность культур *R. vitis* к бактериоцинам близкородственных штаммов, индуцированных митомицином С

Table 1
Sensitivity of *R. vitis* cultures to mitomycin-induced bacteriocines of the close-related strains

Штамм-продукент	Тест-штамми											Лизируемые штаммы, %
	<i>R.vitis</i> 1	<i>R.vitis</i> 7	<i>R.vitis</i> 11	<i>R.vitis</i> 15	<i>R.vitis</i> 13	<i>R.vitis</i> 5	<i>R.vitis</i> 14	<i>R.vitis</i> 9	<i>R.radiobacter</i> C58	<i>R.vitis</i> 6	<i>R.vitis</i> 8	
<i>R. vitis</i> 13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90
<i>R. vitis</i> 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	81
<i>R. vitis</i> 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	72
<i>R. vitis</i> 8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	72
<i>R. vitis</i> 11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	72
<i>R. vitis</i> 15	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	72
<i>R. vitis</i> 5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	63
<i>R. vitis</i> 9	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	63
<i>R. radiobacter</i> C58	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	63
<i>R. vitis</i> 1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	54
<i>R. vitis</i> 7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	54
Лизирующие штаммы, %	100	100	100	100	100	81	63	45	36	27	9	

Примечание: «+» — наличие лизиса, «-» — отсутствие лизиса.



Таблица 2
Чувствительность культур *R. vitis* к бактериоцинам близкородственных штаммов, выделенных в результате спонтанной индукции

Table 2
Sensitivity of *R. vitis* cultures to bacteriocines of close-related strains obtained as a result of spontaneous induction

Штамм-продуцент	Тест-штамм													Лизируемые штаммы, %	
	<i>R.vitis</i> 9	<i>R.vitis</i> 11	<i>R.vitis</i> 13	<i>R.vitis</i> 14	<i>R.vitis</i> 5	<i>R.vitis</i> 6	<i>R.vitis</i> 8	<i>R.vitis</i> 7	<i>R.vitis</i> 1	<i>R.vitis</i> 15	<i>R.radiobacter</i> C58	Лизируемые штаммы, %			
<i>R. vitis</i> 15	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	45
<i>R. vitis</i> 5	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	36
<i>R. vitis</i> 6	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. vitis</i> 8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. vitis</i> 14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. radiobacter</i> C58	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. vitis</i> 9	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	18
<i>R. vitis</i> 1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>R. vitis</i> 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>R. vitis</i> 11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>R. vitis</i> 13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Лизирующие штаммы, %	81	54	27	27	18	18	18	9	0	0	0	0	0	0	

Примечание: «+» — наличие лизиса, «-» — отсутствие лизиса.

очередь указывают на относительную неспецифичность данных бактериоцинов, хотя нельзя исключить расширение активности за счет их множественности.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что чувствительность к бактериоцинам у изученных культур *R. vitis* и *R. radiobacter* является штаммовым признаком. Высокая активность бактериоцинов и значительная чувствительность к ним свидетельствуют о жесткой конкуренции между штаммами *R. vitis* в биоценозе на уровне бактериоциногенности.

Для подтверждения этого предположения провели изучение бактериоциногенной активности веществ, выделившихся в результате спонтанной индукции клеток при их продолжительном росте. По сравнению с митомициновой индукцией, в этом случае было выявлено значительно меньшее количество зон лизиса на газонах тест-культур, однако ряд штаммов все же демонстрирует хорошо выраженную бактериоциногенную активность (табл. 2).

Установлено, что *R. vitis* 15 синтезирует вещества, убивающие клетки 5 исследованных штаммов, *R. vitis* 5 — 4 штаммов, а *R. vitis* C58, *R. vitis* 14, *R. vitis* 8 и *R. vitis* 6 — 3 штаммов.

Штаммы с широким спектром бактериоциногенной активности представляют большой практический интерес для дальнейшего выделения антагонистических веществ и использования их в биологической защите растений. По нашему мнению, бактериоцины, получаемые в результате спонтанной индукции, являются более предпочтительными для указанных целей из-за недорогой методики обработки культур, требующей меньших временных затрат.

Дальнейшее изучение межродового антагонизма с участием бактериоцинов позволило выявить некоторые особенности экологии возбудителей бактериального рака винограда. Часто *R. vitis* выделяются совместно с *P. agglomerans*, широко распространенными граммотрицательными представителями микробиоты растений, вследствие чего выделение чистой культуры возбудителей бактериального рака требует особой тщательности.

Пять штаммов этой эпифитной бактерии были выделены нами на винограднике в ассоциациях с культурами *R. vitis*. С данными штаммами были проведены исследования бактериоциногенности *P. agglomerans* по той же схеме, что и *R. vitis*. Результаты показали, что бактериоцины этой бактерии достаточно эффективно лизировали клетки целого ряда штаммов данного вида, а также многие штаммы канцерогенных ризобий (от 31 до 19%).

Кроме того, исследовали чувствительность культур *R. vitis* и выделенных из растений винограда культур *P. agglomerans* к отдельным фракциям веществ с бактериоциногенной активностью музейных штаммов *P. agglomerans*. Очищенные фракции вызывали лизис большего числа тестируемых культур (от 25 до 62,5%), чем неочищенные лизаты.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Кушкиной А.И. за оказание консультативной и технической помощи при выполнении работы.

Работа была выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки Украины № НУ/448-2009 от 06.07.2009.



ЛИТЕРАТУРА

1. Негруль А. М. Виноградарство. — М.: Плодопромиздат, 1952. — 400 с.
2. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53–80.
3. Goodner B.W., Markelz B.P., Flanagan C. et al. Combined genetic and physical map of the complex genome of *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. — 1999. — Vol. 181, № 17. — P. 5160–5166.
4. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — V. 61, № 8. — P. 2879–2884.
5. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. — 1981. — Vol. 145, № 3. — P. 1365–1373.
6. Liang Z.H., Wang H.M., Wang J.H. Preliminary study on effectiveness and the stability of E26 on controlling crown gall disease // J. China Agricult. Univ. — 2001. — Vol. 6. — P. 91–95.
7. Moore L.W., Warren G. *Agrobacterium radiobacter* strain R84 and biological control of crown gall // Annu. Rev. Phytopathol. — 1979. — Vol. 17. — P. 163–179.
8. Pionnat S., Keller H., Richer D. et al. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // Appl. Environm. Microbiol. — 1999. — Vol. 65, № 9. — P. 4197–4206.
9. Tovkach F.I. Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins // Microbiologiya. — 1998. — Vol. 67, № 6. — P. 636–642.
10. Wang H.M., Wang H.X., Ng T.B., Li J.Y. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens* // Plant Pathol. — 2003. — Vol. 52. — P. 134–139.

Н.В. Ліманська¹, В.О. Іваниця¹, Ж.Ю. Сергеева¹, Ф.І. Товчач²

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

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

БАКТЕРІОЦИНОГЕННА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *RHIZOBIUM VITIS* І *PANTOEAЕ AGGLOMERANS*, ВИДІЛЕНИХ З РОСЛИН ВИНОГРАДУ

Реферат

Виділені штами *Rhizobium vitis* і *Pantoeae agglomerans* проявили бактеріоциногенну активність по відношенню до близькоспоріднених штамів. Показано, що досліджені культури розрізнялися за чутливістю до бактеріоцинів. У порівнянні з мітоміциновою індукцією, у випадку спонтанного виходу бактеріоцинів виявлялася значно менша кількість зон лізису на газонах тест-культур, однак низка штамів все ж виявляла добре виражену бактеріоциногенну активність.

К л ю ч о в і с л о в а: *Rhizobium vitis*, *Pantoeae agglomerans*, бактеріоцини.



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

¹Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limmy@mail.ru

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, Academic Zabolotny str.,
154, Kyiv, Д03680, Ukraine

BACTERIOCIINOGENIC ACTIVITY OF *RHIZOBIUM VITIS* AND *PANTOEA*E AGGLOMERANS STRAINS ISOLATED FROM GRAPEVINES

Summary

Isolated *Rhizobium vitis* and *Pantoeae agglomerans* strains showed bacteriocinogenic activity against closely related strains. Investigated cultures had different susceptibility to bacteriocines. Comparing to mitomycin induction, spontaneous induction resulted in less quantity of lysis spots on test-culture lawns, but some strains still showed marked bacteriocinogenic activity.

K e y w o r d s: *Rhizobium vitis*, *Pantoeae agglomerans*, bacteriocines.



ГИДРОЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТАРКТИЧЕСКИХ БАЦИЛЛ

*Из почв Антарктиды выделены штаммы бактерий, которые после идентификации были отнесены к роду *Bacillus*. Изучена возможность выделенных бацилл расщеплять различные природные субстраты. Показано, что антарктические штаммы бацилл способны продуцировать комплексы гидролитических ферментов – целлюлаз, ксиланаз, пектиназ и липаз.*

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

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* часто обнаруживают в регионах Антарктики, мало изученной и наиболее суровой области земного шара [11, 13]. Представители рода *Bacillus* [1, 3] относятся к наиболее активным продуцентам гидролитических ферментов.

Такие ферменты, как целлюлазы, ксиланазы и другие, участвующие в разложении растительной клеточной стенки, занимают центральное место в круговороте органического углерода и демонстрируют поразительное разнообразие форм, создаваемых различными микроорганизмами.

Сегодня по-прежнему актуален поиск штаммов микроорганизмов, продуцирующих и в суровых условиях различные гидролитические ферменты, благодаря которым становится доступным сложное органическое вещество, состоящее из целлюлозы, пектинов, гемицеллюлоз, белков и жиров. Не исключено, что такая специфическая среда обитания микроорганизмов как Антарктика могла способствовать появлению штаммов бактерий с особыми свойствами [3].

Целью настоящей работы было выявление способности штаммов бацилл, выделенных и идентифицированных из антарктических проб, расщеплять целлюлозосодержащие субстраты, ксилан, пектин, а также оливковое масло и твины для отбора среди них новых продуцентов гидролитических ферментов.

Материалы и методы

Микроорганизмы выделяли из образцов почвы и мха, которые были отобраны на острове Галиндез (Антарктида) в ходе Украинской экспедиции 2002 года.

Идентификацию полученных изолятов проводили по культурально-морфологическим и физиолого-биологическим свойствам [15].

Выделение ДНК проводили согласно методу [7]. ПЦР осуществляли с использованием термального циклера Hybaid PCR Express и праймеров 16S Forward

(AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) и 16S Reverse (TACGGYTACCTTGTTACGACTT). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 1,5% агарозе Genaxis. Сиквенс осуществляли на сиквенаторе CEQ™ 2000XL (Beckman Coulter). Анализ полученных данных и сравнение с последовательностями Gen Bank проводили с помощью компьютерной программы BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Для исследования ферментативной активности штаммов бактериальные культуры выращивали в колбах в условиях аэрации на качалке (200 об/мин) при 37 °С в течение двух суток на жидкой синтетической среде (г/л): натрия цитрат — 1,29, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,75, KH_2PO_4 — 9,6, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,18 с добавлением соответствующих специфических субстратов — Na-КМЦ (натрий карбоксиметилцеллюлозы), целлобиозы, пектина, оливкового масла и твинов 20, 40, 60 и 80. Ферментативную активность определяли в бесклеточной культуральной жидкости после центрифугирования при 6000 об/мин в течение 20 мин. Об активности продуцируемых бактериями ферментов судили по образованию зон просветления соответствующего субстрата на агаризованных средах. Количественное определение эндоглюканазной активности проводили по количеству образовавшихся редуцирующих сахаров после гидролиза 1%-ной Na-КМЦ, определяемых по реакции с динитросалициловой кислотой [10]. Целлобиазную (β -глюкозидазную) активность аналогично при действии на 0,2% раствор целлобиозы [8].

Активность ксиланазы определяли по количеству образовавшихся сахаров (ксилозы) при гидролизе 1% ксилана овса титрованием [10]. Полигалактуроназу (ПГ) и пектинэстеразу (ПЭ) — титрометрическим методом по количеству альдегидных и метоксильных групп, образующихся при расщеплении 0,5% пектина соответственно и рассчитывали по формулам, приведенным в методиках [5]. Ферментативную активность бактерий выражали в ед/мл культуральной жидкости.

Оценку липазной активности бактерий проводили по модифицированному методу Ота и Ямады и выражали в микромолях олеиновой кислоты, освобождающейся в результате гидролиза субстрата (40% эмульсии оливкового масла в 2% водном растворе поливинилового спирта) [14].

Опыты проводили не менее, чем в 3-х повторностях. Результаты статистически обрабатывали, используя компьютерную программу Microsoft Excel 97.

Результаты и их обсуждение

Из антарктических проб выделено и идентифицировано методами фенотипического анализа и генотипического тестирования 13 штаммов бактерий рода *Bacillus* (табл. 1). В результате изучения изолятов было выявлено два штамма *B. licheniformis* и 9 штаммов *B. subtilis*.

Между данными сиквенса генов 16S rRNA и результатами изучения физиолого-биохимических характеристик шести штаммов бацилл показана корреляция. Штаммы A_7 и A_9 были идентифицированы по фенотипическим признакам как *B. silvestris*, однако эти данные противоречат показателям сиквенса гена 16S rRNA. Исследования относительно определения таксономического статуса штаммов A_7 и A_9 в дальнейшем будут продолжены.

В последующих исследованиях была изучена способность выделенных штаммов к синтезу гидролитических ферментов.



Результаты сиквенса фрагментов гена 16S rRNA изолированных штаммов спорообразующих бактерий

Results of 16S rRNA gene sequence of sporeforming bacteria isolated from Antarctic samples

Штамм	Название вида в Gen Bank	Подобие с генами 16S rRNA референтных штаммов, %	Количество нуклеотидов идентичного фрагмента гена 16S rRNA
A ₉	Low G+C Gram-positive bacterium M32	98	675
	<i>Bacillaceae bacterium</i> LA38BB	98	669
	<i>Kurthia gibsonii</i> NCIMB 9758	97	626
	<i>Kurthia sibirica</i> DSM 4747T	96	652
A ₇	<i>Bacillaceae bacterium</i> LA38BB	98	595
	Low G+C Gram-positive bacterium M32	98	594
	<i>Kurthia sibirica</i> ATCC 49154	94	542
A ₄	<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-077	98	642
	<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-073	98	642
A ₈	<i>Bacillus subtilis</i> strain STB29	98	503
	<i>Bacillus subtilis</i> strain KL-077	98	503
A _{23/2}	<i>Bacillus subtilis</i> strain BHP6-1	99	575
	<i>Bacillus subtilis</i> strain HAZ14	99	575
A _{6/2}	<i>Bacillus licheniformis</i> strain KL-185	99	558
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain PR-1	99	558
A _{6/3}	<i>Bacillus licheniformis</i> strain KL-185	97	500
	<i>Bacillus licheniformis</i> strain KL-176	97	500
A _{5/3}	<i>Bacillus subtilis</i> strain WP1-21	97	501
	<i>Bacillus subtilis</i> strain BZ15	97	501

Установлено, что изучаемые антарктические бациллы способны синтезировать ряд экстрацеллюлярных ферментов, в частности ферменты целлюлазного и ксилазного комплексов, а также липолитические и пектолитические ферменты (табл. 2).

Способностью образовывать КМЦ-азу (эндоглюканазу) обладали все исследуемые культуры антарктических бацилл. Штаммы *B. subtilis* A₂, A₄ и A_{23/1} образовывали желтые зоны диаметром 3–11 мм на грязно-красном фоне. У штаммов *B. subtilis* A₅, A₈ и A₁₃ и штаммов других видов вокруг выросших колоний через 5–6 часов после проявления желтых зон в центре появлялась также и синяя окраска диаметром 12–13 мм. Исходя из этого, можно предположить, что эти культуры синтезируют разные типы целлюлаз. Такая способность описана и для

других продуцентов целлюлаз [2, 4, 8]. Некоторые авторы проявление желтых зон при расщеплении целлюлозы связывают с образованием глюкозы, синих зон — с образованием целлобиозы, пентоз или целлоолигосахаридов, а также с условиями их культивирования [8, 14].

Наибольшей целлюлозолитической активностью отличались штаммы *B. subtilis* A_{5/2} (18680 ед/мл), A_{5/1} (10428 ед/мл), *B. licheniformis* A_{6/2} — (11660 ед/мл) и *Bacillus spp.* A₁₀ (10480 ед/мл). Штаммы *B. subtilis* и *Bacillus spp.* (A₁₃, A₂, A₄, A₅, A₈, A_{5/3}) синтезировали целлюлазы активностью в пределах 5820—6012 ед/мл, штаммы бактерий *B. licheniformis* A_{6/2}, *B. silvestris*, *B. subtilis* A_{23/2} и A_{23/1} продуцировали этот фермент в количестве 3753 ед/мл. Целлобиазная активность исследуемых культур находилась на одном уровне — 83—92 ед/мл.

В природных растительных материалах трудно разлагающаяся целлюлоза, как самый распространенный углеводный полимер высших растений и водорослей, связана обычно со многими другими полисахаридными соединениями: гемицеллюлозой, пектином, лигнином. К ферментам, разлагающим эти полимеры, относятся и ксиланазы, как ферменты, необходимые для полной биоконверсии растительного сырья, в частности его ксиланов, которые содержатся в стенках растительных клеток разных видов растений, таких, как древовидные папоротники, хвойные, хлебные злаки.

Полученные нами данные показали, что исследуемые антарктические бациллы обладают способностью расщеплять и ксилан. Ксиланазную активность учитывали по зонам просветления данного субстрата, различающимися как по диаметру (от 15 до 22 мм), так и по окраске (желтые, темные, смешанные), что, вероятно, также связано со способностью изучаемых бактерий к синтезу различных типов ксиланаз (эндо- и экзоксиланаз или обеих вместе). Однако, даже наиболее активные среди выявленных нами культур *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. silvestris* нельзя было отнести к высокоактивным по этому ферменту штаммам (21,8—34,7 ед/мл).

При исследовании антарктических бацилл нами установлено отсутствие у них пектинэстеразы (ПЭ) и наличие только полигалактуроназы (ПГ). Активные по расщеплению пектина культуры бацилл под влиянием пектиназ образовывали разные по внешнему виду зоны гидролиза: прозрачные зоны с бледно-синим ореолом, которые через несколько часов теряли четкость контуров, и четкие зоны с бело-молочным ореолом, сохраняющиеся долгое время. Отличались зоны также по диаметру и проявлялись в разные сроки, что, возможно, является отражением степени активности обнаруживаемых у штаммов различных типов пектиназ. По способности гидролизовать пектин исследуемые штаммы антарктических бацилл располагались в таком порядке (в ед/мл): *B. subtilis* (9 шт.) — 9,65±3,2; *B. licheniformis* (2 шт.) — 8,9±0,2; *B. spp.* (2 шт.) — 8,1±0,5; *B. silvestris* (1 шт.) — 8,6±0,5 (табл. 2).

Полученные нами результаты показали также, что для разных видов антарктических бацилл характерно еще одно важное свойство — способность к гидролизу сложноэфирной связи в молекулах таких субстратов, как оливковое масло и различные синтетические твины. Использование таких различных субстратов позволило выявить существенные видовые и даже штаммовые различия этих микроорганизмов. Так, наиболее активными при гидролизе оливкового масла были штаммы *B. silvestris* A₇ (56,5 ед/мл), *B. subtilis* A₂, A₄, A_{23/1}, A_{5/3}, A_{23/2} (от 45,5 до 52 ед/мл), *Bacillus spp.* A₁₀, A₁₃ (от 32,5 до 40 ед/мл) и штаммы *B. licheniformis* 6/2, 6/3 (26—35,5



Таблица 2

Table 2

Ферментативная активность антарктических бацилл (в ед./мл)

The enzymatic activity of Antarctic bacilli (un/ ml)

Вид	Штамм	Целлюлазный комплекс		Ксиланаза	Пектинолитический комплекс		Оливковое масло	Твин			
		КМЦ-аза	β-глюкозидаза		ПЭ	ПА		20	40	60	80
<i>B. subtilis</i>	A ₂	5820,0	86,0	29,6	0	6,6	52,0	83,5	116,5	94,5	82,0
<i>B. subtilis</i>	A ₄	5850	86,0	21,8	0	8,0	52,0	80,5	112,5	82,5	84,5
<i>B. subtilis</i>	A ₅	5364	83,0	22,8	0	7,2	1,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A ₈	5364	87,5	21,8	0	10,9	9,0	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{5/1}	10428	90,5	21,8	0	11,3	11,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{5/2}	18680	81,0	26,6	0	11,1	2,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{5/3}	6012	92,0	21,3	0	11,3	45,5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{23/2}	3753	90,5	21,3	0	7,6	46,0	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	A _{23/1}	3753	86,0	28,6	0	12,9	47,5	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	A _{6/2}	3753	84,5	27,6	0	8,7	26,0	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i>	A _{6/3}	11660	87,5	34,7	0	9,1	35,5	-	-	-	-
<i>B. siloestrus</i>	A ₇	3753	86,0	20,3	0	8,6	56,5	101,5	87,5	86,5	88,5
<i>Bacillus spp.</i>	A ₁₀	10480	86,0	10,6	0	8,6	32,5	-	-	-	-
<i>Bacillus spp.</i>	A ₁₃	5526	86,0	12,6	0	7,6	40,0	-	-	-	-

Примечание: “ — ” — не определяли

ед/мл). Низкую активность проявили штаммы *B. subtilis* A₅, A_{5/1}, A₈, A_{5/2} (от 1,5 до 11,5 ед/мл). При использовании твина в качестве субстрата бактерии выявили более высокую степень липазной активности, которая на 57–124% превышала активность гидролиза ими оливкового масла. Такую неоднозначность действия твинов и оливкового масла на липазную активность микроорганизмов некоторые исследователи объясняют различной проницаемостью клеточных мембран под их влиянием и связанным с этим повышенным выходом ферментов в культуральную жидкость, а отсутствие стимулирующего действия оливкового масла, видимо, накоплением в среде в результате его гидролиза олеиновой кислоты, которая ингибирует биосинтез липаз [2, 6, 9].

Наряду с этим твины, будучи введенными в питательную среду, являются лучшим субстратом, чем масла. Эмульгаторами понижают поверхностное натяжение на границе жир-вода, и тогда жир лучше смешивается с водой, образуя эмульсию, более доступную для действия липаз [9, 14]. Такая специфичность проявления активности бактерий нередко определяет их значение при определении природного местообитания в биогеоценозах, ведь одним из путей проникновения микроорганизмов через покровы растений может быть именно ферментативный гидролиз липидов [11].

При анализе этого материала заслуживает внимания именно то, что исследуемые бациллы обладают способностью гидролизовать не только жидкие, но и твердые твины, которые как составные разнообразных жироподобных веществ — восков у растений с восковым налетом, выполняют важную биологическую функцию при регулировании их водного режима и предохранения от неблагоприятных влияний окружающей среды (высыхания, понижения смачивания, поражения микроорганизмами, а также во время покоя или адаптации) [12]. На наш взгляд это немаловажно для Антарктики с ее суровыми условиями.

Таким образом, полученные данные показали, что все выделенные штаммы исследованных антарктических бацилл обладают способностью расщеплять целлюлозу, целлобиозу, ксилан, пектин, оливковое масло и твины и являются активными продуцентами гидролаз, что является свидетельством огромной ферментативной вооруженности этих бактерий и отражает универсальность их жизненной системы, способной использовать самые разные природные субстраты. Показано, что наиболее активно ими расщеплялись целлюлоза и целлобиоза, менее активно ксиланосодержащие субстраты. Установлено также наличие у них полигалактуроназы и отсутствие пектинэстеразы. Выделенным штаммам антарктических бацилл свойственна способность гидролизовать такие субстраты как оливковое масло и синтетические твины.

Полученные данные показывают перспективы потенциального использования исследованных штаммов бактерий в биотехнологии в качестве неисчерпаемого источника полезных продуктов, в том числе целлюлаз, ксиланаз, пектиназ, липаз и других гидролитических ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баросс Д., Морита Р. Жизнь микроорганизмов при низких температурах: экологические аспекты // Жизнь микробов в экстремальных условиях. Под ред. Д. Кашнера. М.: Мир., 1981. — С. 19–82.



2. Безбородов А.М., Астапович Н.И. Секреция ферментов у микроорганизмов. М. : Наука, 1984. — 72 с.
3. Беленева И.А., Масленникова Э.Ф. Гидролитическая активность морских бактерий — ассоциантов мидии *Mytilus trossulus* // Микроб. журн. — 2005.— 67, № 1. — С. 3—7.
4. Билай В.И., Пидопличко Н.М., Тарадий Г.В. Целлюлолитические свойства плесневых грибов и принципы отбора активных продуцентов целлюлаз // Ферментативное расщепление целлюлазы. М.: Наука, 1967.— С. 37—45.
5. Лифшиц Д.Б. Методы определения пектолитической активности препаратов плесневых грибов // Унифицированные методы определения активности ферментных препаратов производственного назначения. — К.: Укр НИИТИ, 1967.— 42 с.
6. Лобырева Г.Б. Липолитическая активность дрожжей *Candida utilis* 295t // Изв. АН СССР, Серия биол. 1974. — № 6. — С. 885—890.
7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
8. Рабинович М.Л., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Классификация целлюлаз их распространенность, множественные формы и механизмы действия целлюлаз // В сб. «Итоги науки и техники» ВИНТИ. Биотехнология, 1988.— Т. 11. — С. 1—224.
9. Рубан Е.Л. Микробные липиды и липазы.— М.: Наука, 1977.— 218 с.
10. Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1981.— 288 с.
11. Сова В.В., Широкова Н.И., Кусайкина М.И. β -1-3-глюкозидаза из оплодотворенных яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. Сравнение с β -1-3-глюкозидазами морских иноземных моллюсков // Биохимия. 2003. — Т. 68, № 5, — С. 650—655.
12. Bonkowski M., Yrifiiths B.S., Ritz K. Food preference of earthworms for soil fungi // Pedobiologia.— 2000. — 44. — P. 666—676.
13. Fajardo-Cavazos P., Nicholson Wayne Bacillus endospores isolated from granite : Close molecular relationships to globally distributed *Bacillus spp.* from endolithic and extreme environments // Appl. and Environ. Microbiol. — 2006. — 72, № 4. — P. 2856—2863.
14. Ota V., Yamada Y. Lipase from *Candida parapolitytica*. Part 1. Anionic surfactants as the essential activator in the systems emulsified by polyvinyl alcohol // Agric. Biol. Chem. — 1966.— V. 30, № 4. — P. 351—358.
15. Reva O.N., Sorokulova I.B., Smirnov V.V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype // Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. — 2001. — № 51. — P. 1361—1371.

A.I. Osadchaya, L.A. Safronova, A.N. Poltavsky, V.M. Ilyash

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

HYDROLASE ACTIVITY OF ANTARCTIC BACILLI

Summary

Strains of bacteria were isolated from Antarctica soil after identification they were attributed to genus *Bacillus*. The opportunity of participation of isolated bacilli in the degradation of various natural substrates has been studied.

It is supposed that such natural extreme habitat as Antarctic Region is not casual for the investigated bacteria and displays universality of their vital system. It is shown that Antarctic strains of bacteria are capable to produce hydrolytic enzymes complexes — cellulases, xylanases, pectinases and lipases and are the perspective cultures for using in biotechnology.

K e y w o r d s: Antarctica, bacteria of genus *Bacillus*, hydrolytic enzymes.

А.І. Осадча, Л.А. Сафронова, О.М. Полтавський, 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

ГІДРОЛАЗНА АКТИВНІСТЬ АНТАРКТИЧНИХ БАЦИЛ

Реферат

Із ґрунтів Антарктиди виділені штами бактерій, які після ідентифікації були віднесені до роду *Bacillus*. Вивчена можливість виділених бацилл розщиплювати різноманітні природні субстрати.

Припускається, що таке природне екстремальне місцезнаходження як Антарктика є не випадковим для досліджених бактерій і відображає універсальність їх життєвої системи. Показано, що антарктичні штами бактерій здатні продукувати комплекси гідролітичних ферментів — целюлаз, ксиланаз, пектиназ і ліпаз та є перспективними для застосування у біотехнології.

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



**І.Б. Русин¹, О.М. Фігурка¹, У.М. Фігурка¹,
Н.М. Джура², О.М. Мороз², В.П. Новіков¹**

¹Національний університет „Львівська політехніка”, вул. С. Бандери, 12, м. Львів,
79013, Україна, e-mail: rib@gala.net

²Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. М. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

МІКРОБІОТА НАФТОЗАБРУДНЕНОГО ҐРУНТУ, РЕКУЛЬТИВОВАНОГО РОСЛИНАМИ *CAREX HIRTA*

*Проаналізовано динаміку чисельності ґрунтових мікроорганізмів основних фізіологічних груп (целюлозоруйнівні, азотфіксувальні, нітрифікувальні, денітрифікатори, амоніфікатори, дріжджі) нафтозабрудненого ґрунту, рівень мікробної деструкції вуглеводнів та особливості впливу на ці процеси рекультивациі осокою шершавою *Carex hirta* та вторинного заростання рослинами. В перші місяці після нафтового забруднення виявлено зниження чисельності мікроорганізмів багатьох фізіологічних груп та водночас активізацію розвитку вуглеводнеутилізувальної мікробіоти. Відмічено позитивний вплив *C. hirta* на ріст мікроорганізмів більшості фізіологічних груп та рівень мікробної деструкції вуглеводнів нафти в перші місяці після забруднення. Через 1,5 роки кількість мікроорганізмів усіх фізіологічних груп практично повністю відновилась, а вміст вуглеводнів у ґрунті був залишковим.*

*К л ю ч о в і с л о в а: нафтозабруднений ґрунт, мікроорганізми, *Carex hirta*.*

Комбінована рекультивациа нафтозабруднених ґрунтів за участю мікроорганізмів та рослин є перспективним методом їх очищення [1]. Цікавим в цьому плані є використання осоки шершавої *Carex hirta*. Дана рослина нафтостійка, її довгі кореневища покращують повітряно-водний режим ґрунту, а виділення кореневищ збагачують ґрунт мінеральними та органічними речовинами [2, 3, 4]. Ці фактори сприяють інтенсифікації розвитку в нафтозабруднених ґрунтах мікроорганізмів деструкторів та активному вторинному заростанню ґрунтів рослинами.

Метою роботи був моніторинг за процесом відновлення ґрунтів від нафтового забруднення при рекультивациі осокою шершавою та без рекультивацийних заходів, коли ґрунтові мікроорганізми були основним фактором самовідновлення ґрунтів для оцінки ефективності фітомікроборемедіациі. Для цього було проведено аналіз динаміки чисельності ґрунтової мікробіоти основних фізіологічних груп, визначення рівня мікробної деструкції вуглеводнів нафти та особливості впливу на ці процеси рекультивациі осокою шершавою *C. hirta*.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження проводили протягом 18 місяців з глинистими ґрунтами, які переважають біля нафтових свердловин Прикарпатського регіону та



постійно зазнають нафтової контамінації. Для моделювання процесу забруднення використано неочищену нафту із Бориславської свердловини в кількості 5, 50 і 75 г/кг сухого ґрунту. Половину дослідних ґрунтів рекультивували осокою шершавою *C. hirta*, яку для цього спеціально висаджували в нафтозабруднений ґрунт через місяць після забруднення. Інша частина дослідних зразків була позбавлена рослинного покриву. Через рік після внесення нафтового забруднення в усіх зразках ґрунту спостерігалось вторинне заростання рослинами. Найбільш інтенсивно рослини розвивались в ґрунті, рекультивованому осокою шершавою.

Для виділення з ґрунту вільноживучих азотфіксаторів, целюлозо-деструкторів, нітрифікаторів, денітрифікаторів, амоніфікаторів, дріжджів використовували селективні середовища Ешбі, Гетченсона, крохмало-аміачний агар, середовище Чапека, Гільтая, Баалсруда, м'ясо-пептонний агар, сусло-агар [5]. Виявлення анаеробних мікроорганізмів проводили за допомогою системи Анаерораск [6]. Виділення та дослідження росту вуглеводнеутілізувальних мікроорганізмів проводили на середовищах, де джерелом вуглецю була неочищена нафта. Як емульгатор використовували SPAN 80 (сорбітанмоноолеат). Збір середньої проби ґрунту, підготовку зразка, виготовлення ґрунтової суспензії, висів на відповідні середовища проводили як описано [7]. Кількість клітин мікроорганізмів (КУО — колонієутворювальних одиниць) в 1 г сухого ґрунту визначали, враховуючи розведення суспензії і відносну вологість ґрунту. Обрахунок кількості клітин целюлозо-утилізувальних мікроорганізмів проводили, враховуючи ступінь обростання часточок ґрунту на селективному середовищі [7]. Вміст вуглеводнів у ґрунті визначали за модифікованою методикою [8] шляхом екстракційного концентрування нафтопродуктів з ґрунту тетрахлоридом вуглецю з наступним ІЧ-спектроскопічним визначенням за калібрувальним графіком.

Результати та їх обговорення

В перші місяці після нафтового забруднення в ґрунтах без рекультиваційних заходів виявлено пригнічувальний вплив нафти на чисельність більшості досліджуваних фізіологічних груп аеробних мікроорганізмів: вільноживучих азотфіксаторів, деструкторів целюлози, нітрифікаторів, амоніфікаторів, дріжджів. Так, наприклад, в забрудненому нафтою ґрунті (75 г нафти/кг сухого ґрунту) без рекультиваційних заходів ріст нітрифікаторів практично був відсутній, кількість целюлозоруйнівних мікроорганізмів знизилась у 6,31 рази, азотфіксаторів мікроорганізмів у 5,46 рази, аеробних дріжджів в 6,91 рази порівняно з їх чисельністю у контрольному зразку ґрунту без забруднення (рис. 1–3). Дана тенденція до зменшення кількості мікроорганізмів спостерігалась в ґрунтах із нафтою у всіх досліджуваних концентраціях.

В той же час відбувався активний розвиток анаеробних мікроорганізмів, які, ймовірно, брали участь у деструкції вуглеводнів нафти. Даний ефект можна пояснити тим, що нафтове забруднення зумовлює збільшення кількості анаеробних зон ґрунту та забезпечує створення оптимальних умов даній групі мікроорганізмів. Зважаючи на сучасні дані про процеси анаеробного катаболізму вуглеводнів [9] цікаво було прослідкувати за динамікою чисельності анаеробних мікроорганізмів в нафтозабруднених ґрунтах, а особливо, дріжджів, серед яких багато видів належать до активних аеробних деструкторів вуглеводнів нафти [10]. В нафтозабруднених зразках ґрунту виявлено зростання кількості анаеробних дріжджів та денітрифікаторів. Так, через 3 місяці після внесення в ґрунт нафти кількість анаеробних дріжджів зросла у 1,07–5,99 разів порівняно із ґрунтом без забруднення (рис. 4).



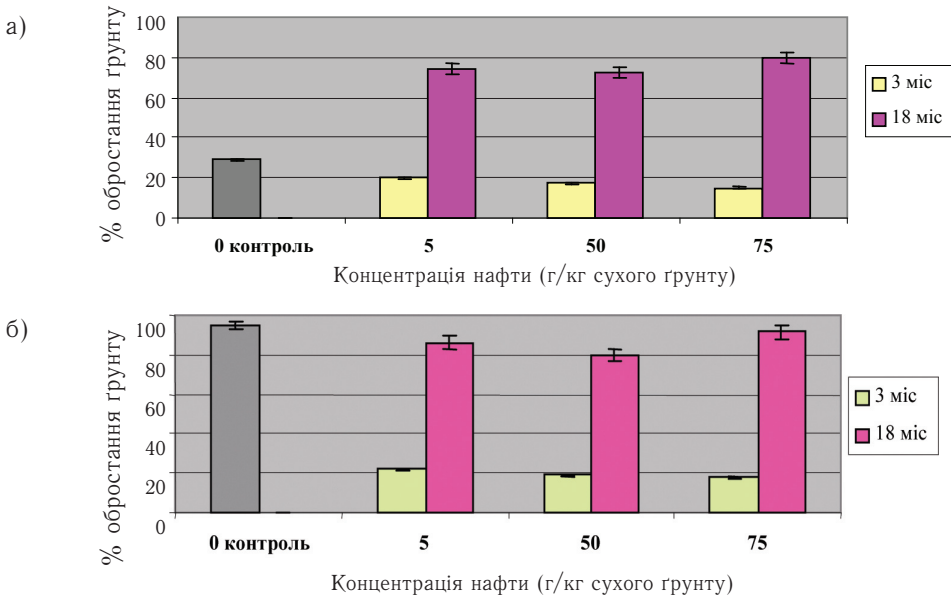


Рис. 1 Динаміка чисельності целюлозоруйнівних мікроорганізмів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації; б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 1 Dynamics of cellulose-degraded microorganisms quantity of oil contaminated soil: a) without recultivation; b) recultivated by *C. hirta*

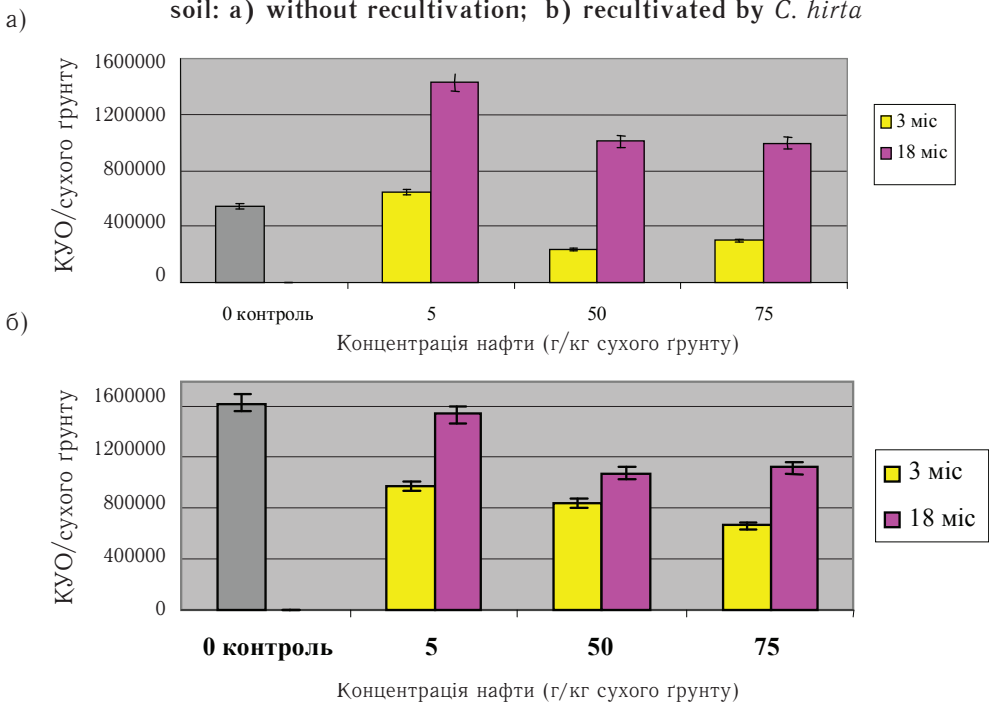


Рис. 2 Динаміка чисельності азотфіксуючих мікроорганізмів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 2 Dynamics of nitrogen-fixing microorganisms quantity of oil contaminated soil: a) without recultivation; b) recultivated by *C. hirta*

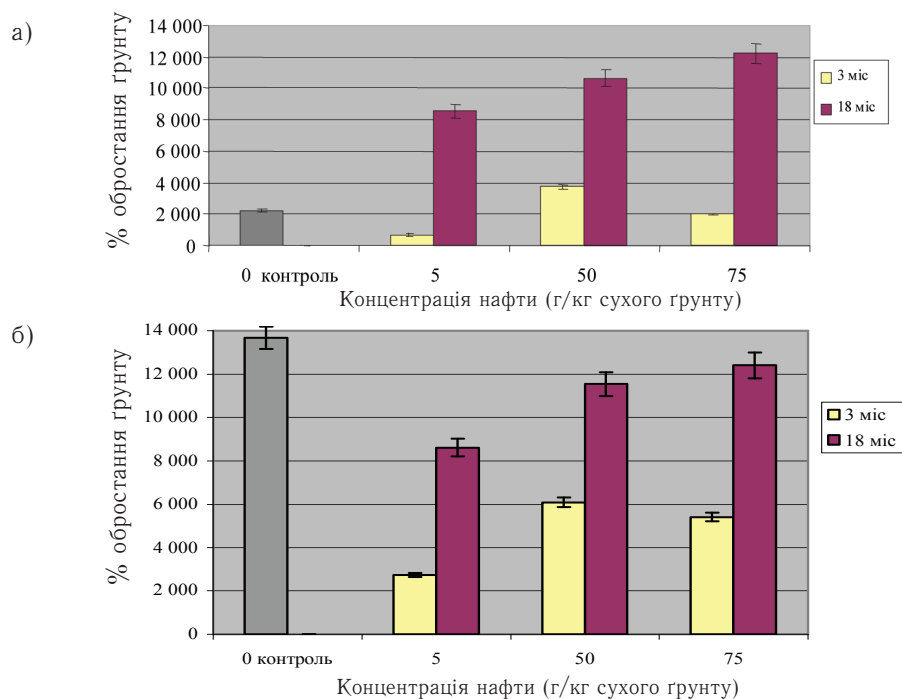


Рис. 3 Динаміка чисельності аеробних дріжджів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації; б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 3 Dynamics of aerobic yeast quantity of oil contaminated soil: а) without recultivation; б) recultivated by *C. hirta*

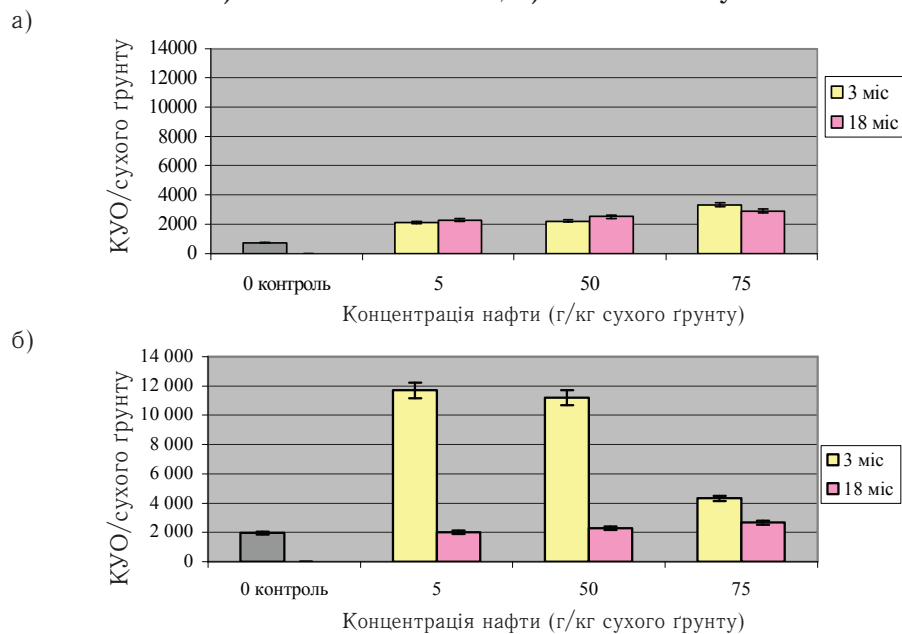


Рис. 4 Динаміка чисельності анаеробних дріжджів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації; б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 4 Dynamics of anaerobic yeast quantity of oil contaminated soil: а) without recultivation; б) recultivated by *C. hirta*

Осока шершава, поглинаючи нафту, знижувала її токсичний ефект та створювала оптимальні умови для розвитку мікроорганізмів, тому в рекультивованому ґрунті чисельність мікроорганізмів більшості проаналізованих фізіологічних груп була вищою, ніж у ґрунті без рослин (рис. 1–4). Так, наприклад, у ґрунтах із нафтою (50 г/кг сухого ґрунту) з висадженою осокою шершавою кількість азотфіксаторів була в 3,6 рази вищою, нітрифікаторів в 2,3 рази, дріжджів в 1,6 рази, целюлозоруйнівних мікроорганізмів в 1,1 рази, ніж популяція мікроорганізмів цих фізіологічних груп у ґрунтах з аналогічним забрудненням нафтою, але без рекультиваційних заходів. Виявлено здатність мікроорганізмів, виділених з нафтозабрудненого ґрунту, утилізувати вуглеводні нафти.

C. hirta позитивно впливала і на рівень мікробної деструкції вуглеводнів нафти. Цей ефект особливо виявлявся у перші місяці після забруднення. В ґрунтах, засаджених осокою шершавою рівень мікробної деструкції вуглеводнів був вищим на 6,1%, ніж в ґрунтах без рекультиваційних заходів. За 3 місяці вміст вуглеводнів знизився на 75,3% і 81,4% (табл.) у зразках ґрунту відповідно без рослин та з осокою шершавою.

Таблиця

Біодеградація нафти в ґрунті протягом 12 місяців при рекультивації осокою шершавою *C. hirta* та без рекультиваційних заходів

Table

Biodegradation of oil in soil for 12 months being recultivated by *Carex hirta* and without any recultivative methods

Рекультиваційні заходи	Вихідний вміст нафти у ґрунті, г/кг	Очищення ґрунту від нафти, %	
		3 міс	12 міс
не проводили	50,0	75,3±2,28*	93,2±1,24*
проводили	50,0	81,4±1,65*	97,6±1,98*

Примітка: * — різниця між контрольним і дослідними варіантами достовірна при $P < 0,05$

Через 18 міс після нафтового забруднення кількість мікроорганізмів усіх фізіологічних груп практично повністю відновилася, а анаеробних мікроорганізмів знизилася і була близькою до рівня їх чисельності у контрольних зразках ґрунту без забруднення (рис. 1–4). За цей період вміст нафтопродуктів в усіх ґрунтових пробах знизився до залишкового (табл.).

Таким чином, виявлено позитивний вплив *C. hirta* на чисельність мікроорганізмів ґрунтової мікробіоти досліджуваних фізіологічних груп та рівень мікробної деструкції вуглеводнів нафти. Отримані результати вказують на перспективність застосування рекультивації *C. hirta* для фітомікроборемедіації нафтозабруднених ґрунтів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биотехнологические основы восстановления плодородия почвы на базе микробно-растительного взаимодействия // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии», Воронеж, 18–19 мая 2004 г. — Москва, «Златограф». — 2004. — С. 7.
2. Джура Н.М., Романюк О.І., Гонсьор Я., Цвілинюк О.М., Терек О.І. Використання рослин для рекультивациі ґрунтів, забруднених нафтою та нафтопродуктами // Екологія та ноосферологія. — 2006. — Т. 17, № 1–2. — С. 55–60.
3. Джура Н., Цвілинюк О., Терек О. Вплив нафтового забруднення ґрунту на морфофізіологічні особливості рослин // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. — 2005. — Вип. 40. — С. 51–58.
4. Цайтлер М.Й. Відновлення рослинного покриву і зміни структури ценопопуляцій трав'яних рослин на нафтозабруднених територіях Бориславського нафтового родовища: Автореферат дис. канд. біол. наук. — Д., 2001. — 16 с.
5. Гудзь С., Гнатуш С., Білінська І. Практикум з мікробіології. Ч. 1. Навчальний посібник. — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. — 80 с.
6. Delaney M.L., Onderdonk A.B. Evaluation of the Anaeropack system for growth of clinically significant anaerobes // J. Clin. Microbiol. — 1997. — vol. 35, № 3. — P. 558–562.
7. Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. 3-е изд. — М.: Агропромиздат, 1987. — 239 с.
8. Дмитриев М.Т., Казнина Н.И., Пинигина И.А. Санитарно-химический анализ веществ в окружающей среде. — М.: Химия, 1989. — 210 с.
9. Heider J, Fuchs G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds // Eur. J. Biochem. — 1997. — № 243. — P. 577–596.
10. Neujahr H.Y. Yeast in biodegradation and biodeterioration processes // In: Verachtert H., De Mot R. (eds) Yeast biotechnology and biocatalysis. Marcel Dekker, New York, 1990. — P. 321–348.

I.B. Rusyn¹, O.M. Figurka¹, U.M. Figurka¹,
N.M. Dzhura², O.M. Moroz², V.P. Novikov¹

¹National University „Lviv Polytechnic”, Bandera str., 12, Lviv, 79013, Ukraine,
e-mail: rib@gala.net

²Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevsky str., 4, Lviv, 79005, Ukraine

MICROORGANISMS OF OIL POLLUTED SOILS RECULTIVATED BY *CAREX HIRTA*

Summary

It has been conducted monitoring for the natural self-recovery of oil polluted loamy grounds by soil microorganisms as a basic factor and observing for recovering process in the soils recultivated by *Carex hirta*.

Quantity of microorganisms most of the investigated physiological groups was reduced in the first months after oil pollution, the intensific development of hydrocarbon-utilizing microorganisms in ground was observed at the same time. The positive effect of *C. hirta* on the processes of microorganisms growth most of physiological groups and microbial destruction of hydrocarbon was revealed in the first months



after oil pollution. Quantity of microorganisms of all physiological groups practically completely recovering and hydrocarbon contents in soil was remained in 18 months after oil pollution.

An oil-resistant and long-rooted plant *C. hirta* favours the intensific development of oil-destructive microorganisms in polluted soil and accordingly positively influences on the level of microbial destruction of oil hydrocarbons. Using of *C. hirta* and microorganisms in complex of bioremediation measures is a perspective method for soil purification from oil contamination.

К е у w o r d s: oil polluted soil, microorganisms, *Carex hirta*.

**И.Б. Русын¹, О.М. Фигурка¹, У.М. Фигурка¹,
Н.М. Джура², О.М. Мороз², В.П. Новиков¹**

¹Национальный университет „Львовская политехника”, ул. С. Бандеры, 12,
г. Львов, 79013, Украина, e-mail: rib@gala.net

²Львовский национальный университет имени Ивана Франка, ул. М. Грушевского,
4, г. Львов, 79005, Украина

МИКРОБИОТА НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННОЙ ПОЧВЫ, РЕКУЛЬТИВИРОВАННОЙ РАСТЕНИЯМИ *CAREX HIRTA*

Реферат

Проведен мониторинг природного процесса самовосстановления нефтезагрязнённых глинистых грунтов при участии почвенных микроорганизмов как основного фактора, а также наблюдение за ходом этого процесса в грунтах со специально высаженной осокой шершавой *Carex hirta*.

В первые месяцы после нефтяного загрязнения выявлено снижение численности микроорганизмов большинства исследуемых физиологических групп и одновременно активизацию развития углеводородутилизующей микробиоты. Отмечено позитивное влияние *C. hirta* на рост микроорганизмов большинства физиологических групп и уровень микробной деструкции углеводородов нефти в первые месяцы после загрязнения. Через 1,5 года численность микроорганизмов всех физиологических групп практически полностью восстановилась, а содержание углеводородов в почве было остаточным.

Нефтестойкая, долгокореневищная *C. hirta* способствует интенсификации развития микроорганизмов-деструкторов на нефтезагрязнённых грунтах и соответственно деструкции углеводородов нефти. Использование *C. hirta* в комплексе микробофиторемедиационных мероприятий является перспективным методом очищения окружающей среды от нефтяных загрязнений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: нефтезагрязнённая почва, микроорганизмы, *Carex hirta*.



**О.В. Нікітін¹, Б.М. Галкін², Т.О. Філіпова²,
І.Й. Сейфулліна², Н.В. Шматкова²**

¹Одеський державний медичний університет, пров. Валіховський, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 728 50 48, e-mail: nikitin_alex@mail.ru

²Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: bgalkin@ukr.net

ВПЛИВ КОМПЛЕКСІВ ГЕРМАНІЮ (IV) З САЛІЦИЛАЛЬГІДРАЗОНАМИ ХЛОРБЕНЗОЙНОЇ ТА НІТРОБЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТ НА ВМІСТ ОСНОВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ І СУБПОПУЛЯЦІЙ ЛІМФОЦИТІВ У МИШЕЙ ПРИ ЗАПАЛЕННІ

Показано, що при запаленні, викликаному зимозаном, імунорегуляторний коефіцієнт (CD4/CD8) зростає в 1,8 рази, що свідчить про активацію імунної системи. На тлі запалення також на 70% підвищується кількість НК-клітин. Досліджувані координаційні сполуки германію знижують число натуральних кілерів, вміст Т-хелперів і підвищують кількість Т-супресорів, що призводить до зменшення співвідношення CD4/CD8.

К л ю ч о в і с л о в а: германій (IV), координаційні сполуки, лімфоцити, запалення.

Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) належать до числа найчастіше призначуваних “симптоматичних” препаратів, що зумовлено унікальним поєднанням в них протизапальних, анальгетичних, жарознижувальних і антитромботичних властивостей, якого не мають інші лікарські засоби [1, 3, 6].

Сучасні підходи до створення нових НПЗП базуються на пошуку сполук, що мають меншу токсичність та не поступаються активністю існуючим препаратам даної групи [1]. На сьогоднішній день, перспективним є також створення НПЗП з імуномодулювальною дією [4].

У попередніх роботах нами були відібрані, шляхом скринінгових досліджень, комплексні сполуки германію (IV) з найбільш високою протизапальною активністю ([Ge(3-Cl-L)₂, [Ge(4-NO₂-L)₂]) [7, 9]. Германій був обраний як метал-комплексоутворювач у зв'язку з тим, що його сполуки відрізняються високою фармакологічною активністю і відносно низькою токсичністю [5].

Авторами доведено [8], що протизапальна активність комплексів [Ge(3-Cl-L)₂] та [Ge(4-NO₂-L)₂] обумовлена впливом на цитокиновий профіль: встановлено гальмування продукції в організмі прозапальних цитокинів ФНП-α і ІФН-γ та стимуляцію синтезу протизапального цитокіна — ІЛ-10. Слід зазначити, що цитокіни переважно синтезуються різними імунокомпетентними клітинами [10].



Метою дослідження було вивчення впливу комплексів германію (IV) з саліцилальгідрозонами хлорбензойної та гідроксибензойної кислот на вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів в умовах експериментального запалення.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на білих безпородних мишах масою 17–22 г (у кожній групі по 8 тварин) на моделі запалення — шестиденного повітряного мішка [11]. Для відтворення запалення тварин анестезували, після чого під шкіру на спині вводили 5 мл повітря. Через 3 доби для підтримки мішка вводили ще 3 мл повітря. На 6 добу у мішок вводили 1 мл 1% розчину зимозану у фізіологічному розчині. У ролі НПЗП були використані: $[\text{Ge}(3\text{-Cl-L})_2]$ та $[\text{Ge}(4\text{-NO}_2\text{L})_2]$, які були синтезовані на кафедрі загальної хімії і полімерів ОНУ імені І.І. Мечникова. Досліджувані комплекси вводили у дозі 50 мг/кг одноразово у вигляді водної суспензії, стабілізованої твіном-80, внутрішньошлунково або безпосередньо в мішок через 1 годину після ін'єкції зимозану.

В ході дослідження визначали фенотипові характеристики лімфоцитів:

1. CD3 — загальна кількість Т-лімфоцитів;
2. CD4 — Т-хелпери (індуктори);
3. CD8 — цитотоксичні Т-лімфоцити (супресори);
4. CD19 — загальна кількість В-лімфоцитів;
5. CD16 — натуральні кілери (NK-клітини).

Крім того, розраховували імунорегуляторний індекс — співвідношення CD4/CD8.

Визначення числа основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів у лімфатичних вузлах здійснювали за допомоги люмінесцентної мікроскопії. Клітини мітили FITC-кон'югованими моноклональними антитілами фірми «eBioscience», США, до мишачих CD19, CD3, CD4, CD8 та рап NK рецепторів.

Отримані результати опрацьовували методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Ст'юдента, застосовуючи програму Excel-2000 [2].

Результати дослідження та їх обговорення

Отримані дані (табл.) свідчать про те, що при запаленні порівняно з інтактним контролем приблизно на 20% знижується відносна кількість Т-лімфоцитів (CD3), що може бути пов'язано з активною міграцією цих клітин у вогнище запалення. Одночасно у лімфовузлах зростає відносний вміст В-лімфоцитів (CD19). Результатом таких змін у складі основних популяцій лімфоцитів є значне зниження співвідношення Т-клітини/В-клітини з 4,38 до 2,91. На тлі запалення також суттєво підвищується кількість NK-клітин — на 70%, що корелює з високим рівнем γ -інтерферону, який був встановлений нами раніше [8].

Значних змін зазнає також склад субпопуляцій Т-лімфоцитів: на 34% зростає вміст Т-хелперів і на 27% зменшується вміст Т-супресорів. Внаслідок цього значно, майже удвічі, підвищується величина імунорегуляторного індексу. Це свідчить про активацію імунної системи і її участь у реалізації запальної відповіді.

Досліджувані комплексні сполуки германію не тільки чинять протизапальну дію, але і сприяють нормалізації деяких імунологічних показників. Зокрема, спостерігається збільшення відносного вмісту Т-лімфоцитів супресорів, що, в свою чергу, зменшує значення імунорегуляторного індексу.



Таблиця

Вплив комплексних сполук германію на вміст основних популяцій та субпопуляцій лімфоцитів (%) на тлі запалення ($M \pm m$; $n=8$)

Table

Germanium coordination compounds influence on the content of the basic lymphocytes populations and subpopulations in the course of inflammation ($M \pm m$; $n=8$)

Варіант	CD19	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	CD16
Контроль	17,2±1,5	75,4±7,2	48,0±5,1	25,8±2,4	1,86±0,17	8,6±0,9
Неліковані тварини	21,2±2,0	61,7±5,7*	64,5±6,1*	18,9±1,8*	3,41±0,32*	14,5±1,1*
[Ge(4-NO ₂ -L) ₂] per os	20,5±1,9	65,2±6,4	62,5±5,8	26,2±2,7	2,36±0,27	10,6±1,2*
[Ge(4-NO ₂ -L) ₂] у мішок	20,7±2,2	63,8±6,1	64,1±6,0*	20,1±1,7	3,19±0,28*	12,7±1,3*
[Ge(3-Cl-L) ₂] per os	20,0±1,9	62,2±6,3	66,7±6,3*	24,9±2,1	2,68±0,24	11,0±1,2*
[Ge(3-Cl-L) ₂] у мішок	22,5±2,0	63,7±6,5	62,3±5,9	19,4±1,9	3,21±0,26*	13,2±1,3*

Примітка: * — різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Таким чином, поряд із зменшенням вмісту в організмі тварин прозапальних цитокінів (фактору некрозу пухлин α і інтерферону γ) ці сполуки знижують рівень активації імунних реакцій. Слід зазначити, що з боку кількісних показників CD3, CD19, CD16 і CD4 лімфоцитів виражених змін не відбувається. Але можна припустити зниження деяких функціональних властивостей цих клітин, зокрема, НК-клітин, які є головними продуцентами імунного інтерферону. В цілому отримані раніше [7–9] і наведені у даній роботі результати свідчать про те, що комплексні сполуки германію не тільки сприятливо впливають на перебіг гострого запалення, але і запобігають його переходу в імунну фазу. Також слід зазначити, що імуномодулювальна дія комплексних сполук германію більш виражена при їх внутрішньошлунковому введенні.

Таким чином, показано, що на тлі запалення, викликаного зімозаном, у лімфовузлах мишей знижується вміст CD3 і дещо підвищується кількість CD19 лімфоцитів. За рахунок зростання кількості Т-клітин хелперів і зменшення Т-клітин супресорів суттєво підвищується значення імунорегуляторного індексу.

У результаті роботи доведено, що досліджувані комплекси [Ge(3-Cl-L)₂] та [Ge(4-NO₂-L)₂] виявляють імуномодулювальну дію, яка виявляється у нормалізації вмісту досліджуваних імуноцитів. Досліджувані сполуки в більшому ступені впливають на імунологічні показники при внутрішньошлунковому введенні, ніж при введенні безпосередньо у вогнище запалення.



ЛІТЕРАТУРА

1. Акбаров А.Б., Харитонов Ю.Я., Исламов М.Н. Бионеорганические аспекты особенностей взаимосвязи типа состав-строение-специфическая активность биоконплексов // Журн. неорг. химии. — 1993. — Т. 38, № 2. — С. 312–327.
2. Горлач С.Н., Чубенко А.В., Бабиц П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel — К.: Морион, 2000. — 320 с.
3. Дзяк Г.В., Степанов Ю.М., Грищенко В.І., Куцніренко І.В. Сучасний погляд на гастропатії, викликані нестероїдними протизапальними препаратами // Сучасна гастроентерологія. — 2003. — № 1. — С. 4–10.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації / За редакцією О.В. Стефанова. — К.: Авіцена, 2001. — 527 с.
5. Лукевиц Э.Я., Гар Т.К., Игнатович Л.М., Миронов В.Ф. Биологическая активность германия — Рига: Зинатне, 1990. — 191 с.
6. Насонов Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов: терапевтические перспективы // РМЖ. — 2002. — Т. 10, № 4. — С. 206–212.
7. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Філіпова Т.О., Шматкова Н.В. Протизапальна активність комплексів германію (IV) з саліцилальгідрозонами нітробензойної кислоти // Одеський медичний журнал. — 2003. — № 2. — С. 21–23.
8. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Філіпова Т.О., Шматкова Н. В. Вплив на цитокіновий профіль комплексів германію (IV) з саліцилальгідрозонами хлорбензойної та нітробензойної кислоти на моделі експериментального запалення // Одеський медичний журнал. — 2008. — № 3. — С. 3–5.
9. Нікітін О.В., Галкін Б.М., Сейфулліна І.Й., Шматкова Н.В. Вплив комплексів германію (IV) з саліцилальгідрозонами хлорбензойної та нітробензойної кислот на лейкоцитарну формулу крові при гострому запаленні // III Національний з'їзд фармакологів України, 17–20 жовтня 2006 р., Одеса: тези доп. — Одеса: ОДМУ, 2006. — С. 125–126.
10. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Системное воспаление как иммунопатобиологический феномен // Цитокины и воспаление. — 2002. — Т. 1, № 2. — С. 17–26.
11. Vicente A.M., Guillen M.I., Alcaraz M.J. Participation of Heme Oxygenase-1 in a model of acute inflammation // Exp. Biol. Med. — 2003. — V. 228. — P. 514–516.

**А.В. Никитин¹, Б.Н. Галкин², Т.О. Филиппова², И.И. Сейфуллина²,
Н.В. Шматкова²**

¹Одесский государственный медицинский университет, пер. Валиховский, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 728 50 48, e-mail: nikitin_alex@mail.ru

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

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ ГЕРМАНИЯ (IV) С САЛИЦИЛАЛЬГИДРАЗОНАМИ ХЛОРБЕНЗОЙНОЙ И НИТРОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТ НА СОДЕРЖАНИЕ ОСНОВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У МЫШЕЙ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Реферат

Показано, что при воспалении, вызванном зимозаном, иммунорегуляторный коэффициент (соотношение CD4/CD8) возрастает в 1,8 раза, что свидетельствует об активации иммунной системы. На фоне воспаления на 70% увеличивается ко-



личество NK-клеток. Изученные координационные соединения германия снижают число натуральных киллеров, содержание Т-хелперов и повышают количество Т-супрессоров, что приводит к уменьшению соотношения CD4/CD8.

К л ю ч е в ы е с л о в а: германий (IV), координационные соединения, лимфоциты, воспаление.

O.V. Nikitin¹, B.M. Galkin², T.O. Philipova², I.I. Seifullina², N.V. Shmatkova²

¹Odesa National I.I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: bgalkin@ukr.net

²Odesa State Medical University, Valikhovsky lane, 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 728 50 48, e-mail: nikitin_alex@mail.ru

THE INFLUENCE OF COORDINATION COMPOUNDS OF GERMANIUM (IV) WITH NITROBENZOIC AND CHLORBENZOIC ACIDS SALICYLALHYDRAZONES ON THE CONTENT OF THE BASIC LYMPHOCYTES POPULATIONS AND SUBPOPULATIONS IN THE COURSE OF INFLAMMATION IN MICE

Summary

It was shown that in zymozan induced inflammation CD4/CD8 ratio increased for 1.8 times, that showed immune system activation. Also on the background of inflammation NK-cells content increased for 70%. Studied coordination compounds of germanium decrease the level of NK-cells and T-helpers but increase the level of T-suppressors that result in decreasing of CD4/CD8 ratio.

К e y w o r d s: germanium (IV), coordination compounds, lymphocytes, inflammation.



ПРОСТИЙ МЕТОД ВИЯВЛЕННЯ ТА ОЦІНКИ ІНТЕНСИВНОСТІ АНАЕРОБНИХ ПРОЦЕСІВ, ЩО СУПРОВОДЖУЮТЬСЯ ВИДІЛЕННЯМ ГАЗІВ

*Запропоновано метод виявлення та оцінки інтенсивності анаеробних процесів, що супроводжуються утворенням газів (CO_2 , CH_4 , H_2 , N_2 тощо). Для цього в попередньо частково проградувану PET-пляшку поміщають рідину з усіма необхідними інгредієнтами поживного середовища і поживний матеріал загальним об'ємом 4/5 ємності пляшки, стисканням бокових поверхонь пляшки видаляють з неї повітря та щільно закривають пробкою. Таку пляшку поміщають у термостат і спостерігають за накопиченням у ній газів, які за потребою аналізують. Кількість дослідів, їх повторюваність, а також число контрольних проб практично необмежені. За допомогою такого методу вперше в Україні виявлено ANAMMOX-процес (*Anaerobic Ammonium Oxidation*) у спорудах біологічного очищення стічних вод, а також продемонстровано можливість анаеробного очищення промислових стічних вод пивзаводу з підвищеною концентрацією (до 2500 мг/л) хлор-іону анаеробним гранульованим активованим мулом.*

К л ю ч о в і с л о в а: анаеробні процеси, газоутворення, очищення води, ANAMMOX.

В біологічному очищенні стічних вод останнім часом набувають усе більшого застосування анаеробні методи. Це пов'язано з тим, що вони мають певні незаперечні переваги у порівнянні з аеробними технологіями:

- вимагають значно менших витрат електроенергії (не потрібна аерація);
- утворюється у декілька разів менше надлишкової біомаси, утилізація якої спричиняє певні труднощі;
- синтезуються енергетично цінні гази (CH_4 , H_2 , H_2S);
- продуктивність перевищує таку аеробних у десятки разів(!) і сягає подеколи понад 100 кг ХСК/м³ добу, а ефективність процесу за зниженням ХСК (хімічне споживання кисню) доходить до 80%;
- повітряний басейн не забруднюється біологічними аерозолями;
- саме за анаеробних умов можлива деструкція нітро- та хлорорганічних сполук і деяких інших ксенобіотиків;
- анаеробно здійснюються процеси звільнення води від нітрату, нітриту, амонію, хлоратів, сульфатів, арсенатів тощо;
- анаеробні процеси використовуються для очищення стічних вод від іонів важких металів, радіонуклідів.

Як відомо, після анаеробної обробки води обов'язково необхідне аеробне її доочищення, проте воно потребує незрівнянно менших затрат, ніж виключно аеробне очищення вихідних стічних вод.

Слід відмітити, що дослідження анаеробних процесів очищення води стикається зі значними труднощами, пов'язаними з необхідністю створення анаеробних умов, з застосуванням доволі складних і дорогих пристроїв та обладнання. Особливо це стосується випадків, коли йдеться про безкисневі процеси, які забезпечуються хемолітоавтотрофними анаеробними мікроорганізмами, що повільно ростуть, наприклад, *Candidatus Brocadia anammoxidans*, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis* та іншими так званими ANAMMOX-бактеріями, або при вивченні впливу стимулюючих чи інгібуючих речовин на протікання анаеробних процесів очищення води.

Метою даної роботи було розробити прості засоби виявлення анаеробних процесів, у тому числі ANAMMOX, при очищенні стічних вод, а також оцінки інтенсивності виділення газів в анаеробних умовах обробки стічної води, у яку надходять ті чи інші стимулятори або інгібітори біологічного процесу.

Матеріали і методи

Досліди проводили з використанням, як найпростіших біореакторів, РЕТ (поліетилентерефталатних)-пляшок місткістю від 0,5 до 6 л, які на 4/5 об'єму заповнювали відповідним поживним середовищем і посівним матеріалом, повністю витискували з пляшок повітря, щільно закривали пробками, розміщали в термостаті та через певні проміжки часу визначали об'єм газу, що виділився в результаті біологічного процесу і накопичився в пляшках-біореакторах.

Для виявлення ANAMMOX-процесу готували поживні середовища такого складу (в мг на 1 л водопровідної води): K_2PO_4 – 200; K_2HPO_4 – 200; NaHCO_3 – 1000; NH_4Cl – 150; NaNO_2 – 250. Контролями служили середовища 1) без NH_4Cl та NaNO_2 ; 2) без NH_4Cl ; 3) без NaNO_2 .

Як посівний матеріал брали активований мул Бортницької станції аерації (м. Київ), біологічних очисних споруд міста Чернігова, Київського картонного комбінату (м. Обухів Київської області), с.м.т. Новий Світ і Маріупольського коксохімічного комбінату (Донецька область). Використовували також гідробіонтів активованого мулу, іммобілізованих на волокнистому носіїв типу ВІА, для чого носії попередньо поміщали на 15 діб у водно-муловий потік на виході з аеротенків. Маса посівного матеріалу складала 15% від загальної маси рідини у біореакторі. Температура інкубації – 30 °С.

Для визначення впливу концентрації хлор-іону на перебіг анаеробного очищення стічних вод пивоварного заводу в пляшки-біореактори всипали розраховану масу NaCl з тим, аби концентрація Cl^- в об'ємі стічної води складала (в мг/л): 350, 500, 750, 1000, 1500, 2000 та 2500. У ці біореактори доливали, розчиняючи сіль, суміш стічних вод і гранульованого анаеробного активованого мулу (у співвідношенні 10:1, відповідно), витісняли (натисканням на боки пляшки) повітря, щільно закривали пробкою і ставили в термостат (42 °С). Контролем служили біореактори зі стічною водою та посівним матеріалом, але без додавання NaCl .

Аналіз біогазів проводили на газовому хроматографі 6890 N фірми Agilent. Детектор – катарометр. Температура детектору 200 °С. Газ-носій – аргон. Аналіз легких газів проводили на колонці MOLSIV довжиною 15 м, вуглеводнів – на колонці PLOTQ довжиною 15 м.



Результати та їх обговорення

Нещодавнє виявлення ANAMMOX-бартерій в складі біоценозів очисних споруд ряду міст Голландії та інших країн [5] та інтенсивне вивчення ANAMMOX-процесів [2–4] і вдалі спроби практичного їх застосування [6] спонукали нас до пошуку такого роду процесів на станціях аерації в Україні.

Класичні методи дослідження безкисневих процесів в лабораторних установках для вивчення спиртового бродіння [1] стримували постановку численних розширених експериментів, і тому ми вдалися до максимально спрощеного варіанту [7], який дозволив провести масштабні дослідження вільноплаваючих та іммобілізованих на волокнистих носіях ВІА активованих мулів станцій біологічного очищення міських стічних вод (міст Києва, Чернігова), промислових стічних вод коксохімічного виробництва (м. Маріуполя), картонного, біохімічного комбінатів (м. Обухов, Київська область), складних стічних вод, що очищаються за біотехнологією одночасної нітри-денітрифікації (ОНД) (с.м.т. Новий Світ, Донецької області).

Результати експериментів підтвердили наявність ANAMMOX-процесу в усіх біологічних спорудах, особливо при застосуванні як посівного матеріалу мулів, іммобілізованих на волокнистому носіїві. В очисних спорудах міст Чернігова і Обухова ANAMMOX-процеси не надто яскраво виражені. Дещо інтенсивніше відбувається анаеробне окислення амонію нітритом активованими мулами біологічних очисних споруд с.м.т. Новий Світ і коксохімічного заводу Маріуполя. Найкращі результати показав іммобілізований активований мул Бортницької станції аерації.

Методом газової хроматографії показано, що до зібраного біогазу входять (в %): N_2 – 93,62; CH_4 – 3,58; CO_2 – 1,49; C_2H_4 – 0,07; H_2 – 1,24. Високі концентрації азоту (від 58 до 95%) в біогазі зафіксовано і в пробах з активованим мулом інших станцій очищення стічних вод, що однозначно свідчить про присутність в їх аеротенках ANAMMOX-бактерій, адже при додаванні до поживного середовища з посівним матеріалом (вільноплаваючим чи іммобілізованим активованим мулом) тільки амонійного, або тільки нітратного азоту утворення газів не спостерігається. Не відбувається і чисто хімічний процес між амонієм та нітритом з виділенням молекулярного азоту в мінеральному середовищі без інокуляції активованим мулом.

Перед запуском в експлуатацію споруд з біологічного очищення промислових стічних вод одного з пивзаводів в Україні виникло побоювання, чи зможе гранульований анаеробний мул з іншого харчового виробництва, де в стічних водах стабільно низька концентрація хлор-іону (до 250 мг/л), успішно працювати в стоках пивзаводу, де концентрація хлор-іону коливається в межах 350–800 мг/л. Для того, щоби зняти будь-які застереження з цього приводу, було проведено дослідження (з використанням ПЕТ-пляшок-біореакторів) інтенсивності анаеробного процесу обробки реальних стоків пивзаводу з концентрацією хлор-іону до 2500 мг/л. Виявилось, що швидкість накопичення біогазу в усіх експериментальних пробах фактично однакова і не відрізняється від такої контрольних проб.

Таким чином, отримані результати дають змогу стверджувати можливість простим методом, використовуючи ПЕТ-пляшки як своєрідні біореактори, досліджувати анаеробні біохімічні реакції, що супроводжуються виділенням газів. Цей метод дозволяє одночасно ставити масові, розгалужені експерименти з різноманітними контролями, вивчати вплив будь-яких технологічних параметрів і хімічних речовин – інгібіторів чи стимуляторів – на анаеробні процеси, зокрема, очищення стічних вод. За допомогою запропонованого методу вперше в Україні доведено наявність



АНАММОХ-бактерій в діючих спорудах біохімічного очищення побутових і деяких промислових стічних вод. На прикладі промстоків пивзаводу доведено можливість анаеробної обробки цих вод при суттєвому (понад 7-кратному) перевищенні в них вмісту хлор-іону.

Автори висловлюють щирю подяку к.х.н. В.П. Демчиній (Інститут газу НАН України) за проведення аналізу біогазів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Векірчик К.М. Практикум з мікробіології. — К. Либідь, 2003. — 97 с.
2. Гладченко М.А., Калюжный С.В. Новые процессы биокаталитической очистки сточных вод от азотных загрязнений // Катализ в промышленности — 2006. — № 1. — С. 36—41.
3. Михайловська М. В., Гвоздяк П. І. Порівняльний аналіз методів біологічного очищення стічних вод від сполук азоту // Наукові вісті НТУУ «КП». — 2007. — № 2. — С. 109—117.
4. Jetten M.S.M., Cirpust I., Kartal B., van Niftrikt L., van de Pas-Schoonen K.T., Sliekerst O., Haaijer S., van der Star W., Schmid M., van de Vossenberg J., Schmidt I., Harhangi H., van Loosdrecht M., Gijls Kuenen., Op den Camp H, Strous M. 1994—2004: 10 years of research on the anaerobic oxidation of ammonium // 10th Nitrogen Cycle Meeting 2004. Biochemical Society. Transactions — 2005. — V. 33, part 1 — P. 119—123.
5. Kuenen J. G. Anammox bacteria: from discovery to application// Nature Reviews / Microbiology. — 2008. — V. 6. — P. 320—326.
6. Van der Star W. R.L., Abma R.W., Blommers D., Mulder J.W., Tokutomi T., Strous M., Picioreanu C., van Loosdrecht M.C.M. Startup of reactors for anoxic ammonium oxidation: Experiences from the first full-scale anammox-reactor in Rotterdam // Water Res. — 2007. — V. 41, № 18 — P. 4149—4163.
7. Гвоздяк П.І., Сапура О.В., Глоба Л.І. заявка № а 2008 12869 на патент України, від 04/11/2008р. Спосіб визначення інтенсивності біохімічного процесу. МПК(2008) G 01, N 7/14.

УДК 628.16.098.4

П.И. Гвоздяк, Е.В. Сапура

Институт коллоидной химии и химии воды имени А.В. Думанского НАН Украины,
бульв. Вернадского, 42, Киев, 03142, Украина,
тел.: +38 (044) 424 35 79, e-mail: gvozdyak@ukr.net

ПРОСТОЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ И ОЦЕНКИ ИНТЕНСИВНОСТИ АНАЭРОБНЫХ ПРОЦЕССОВ, КОТОРЫЕ СОПРОВОЖДАЮТСЯ ВЫДЕЛЕНИЕМ ГАЗОВ

Реферат

Предложен метод выявления и оценки интенсивности анаэробных процессов, которые сопровождаются образованием газов (CO_2 , CH_4 , H_2 , N_2 и т.п.). Для этого в предварительно частично проградуированную PET-бутылку помещают жидкость со всеми необходимыми ингредиентами питательной среды и посевной материал общим объемом 4/5 емкости бутылки, сжиманием боковых поверхностей бутылки удаляют из нее воздух и плотно закрывают пробкой. Такую бутылку помещают в



термостат и наблюдают за накоплением в ней газов, которые по необходимости анализируют. С помощью такого метода впервые в Украине выявлен ANAMMOX-процесс (Anaerobic Ammonium Oxidation) в сооружениях биологической очистки сточных вод, а также продемонстрирована возможность анаэробной очистки промышленных сточных вод пивзавода с повышенной концентрацией (до 2500 мг/л) хлор-иона анаэробным гранулированным активированным илом.

К л ю ч е в ы е с л о в а: анаэробные процессы, газообразование, очистка воды, ANAMMOX.

P.I. Gvozdyak, O.V. Sapura

A.V. Dumansky Institute of Colloid and Water Chemistry of NASU,
Vernadsky ave., 42, 03142, Kyiv, Ukraine,
tel.: +38 (044) 424 35 79, e-mail: gvozdyak@ukr.net

SIMPLE METHOD OF DETECTION AND INTENSIVITY ESTIMATION OF ANAEROBIC PROCESSES ACCOMPANIED BY GAS RELEASE

Summary

The method of detection and intensity estimation of anaerobic processes accompanied by formation of gases (CO₂, CH₄, H₂, N₂ etc.) is proposed. This method is realized in such a way: the PET-bottle is filled by 4/5 of its volume with the nutrients solution or wastewater, anaerobic bacteria, activated sludge or other anaerobic biocenoses. Thereafter by simply squeezing of a PET-bottle the air is removed from it and the bottle is tightly corked. The bottle is then placed into a thermostat and the levels of gas generated and accumulated in this anaerobic bioreactor are periodically measured. Whenever necessary gas composition and concentration change of substances in the water (medium) are analyzed. Thanks to the method for the first time in Ukraine there has been identified the presence of ANAMMOX (Anaerobic Ammonium Oxidation) bacteria in activated sludge of biological treatment facilities. By this method the possibility of anaerobic treatment of beer-brewing wastewater with increased concentration of chloride-ion (up 2500 mg/l) was proved.

К e y w o r d s: anaerobic processes, biogas, water purification, ANAMMOX.



**А.В. Харіна¹, Т.Г. Кот¹, В.П. Поліщук¹, І.Є. Заєць², Н.В. Черватюк²,
А.І. Потопальський²**

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01033, Україна, тел.: +38 (044) 521 35 02,
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

²Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, вул. Академіка Заболотного,
150, м. Київ, 03143, Україна, тел.: +38 (044) 526 11 69,
e-mail: zkora@ukr.net

ІЗАТІЗОН ЯК ІНГІБІТОР ФІТОВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

*Представлено результати дослідження активності ізатізону проти вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на двох модельних системах. Обробка ізатізоном насіння та рослин *Nicotiana tabacum* до інокуляції вірусом покращує ріст рослин і захищає їх від вірусної інфекції, що проявляється у зниженні ступеню прояву симптомів і зменшенні кількості вірусу в рослині. Показано, що ізатізон у розведенні 1:500 пригнічує розвиток ВТМ у культурі тканин тютюну і знижує кількість вірусу в калусній тканині на 21,7%.*

К л ю ч о в і с л о в а: ізатізон, ВТМ, захист рослин.

Віруси рослин здатні швидкими темпами розповсюджуватися в агроценозах, завдаючи значних збитків сільському господарству України та інших країн світу. В середньому втрати врожаю від вірусних інфекцій становлять 30% і навіть 100%. З огляду на вказане доцільними є застосування існуючих методів та розробка нових засобів боротьби з фітовірусними інфекціями.

Одним із методів контролю фітовірусних інфекцій, на який слід звернути увагу, є хіміотерапія. В літературі наведено дані стосовно антифітовірусної активності сполук різних класів, а саме аналогів нуклеозидів, екстрактів рослин, неорганічних сполук синтетичного походження [5, 7, 9], проте на практиці застосовуються лише деякі з них, такі як рибавірин та похідні бензотіадиазолу [8, 11]. Пошук активних сполук для їх наступного застосування в агросфері триває. Метою даної роботи було визначення антифітовірусної активності ізатізону. Вибір препарату обумовлений низкою причин, головна з яких — широкий спектр біологічної активності препарату.

Матеріали і методи

В роботі використовували ВТМ (вірус тютюнової мозаїки, штам U1), попередньо накопичений та очищений за загальноприйнятою методикою [4].

Для проведення дослідів застосовували рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* cv. *Trapeson*).

Досліджували антифітовірусну активність ізатізону, отриманого в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. Ізатізон — це 2% розчин



n-тіосемикарбазону (метисазону) в універсальному розчиннику, до складу якого входять димексид і поліетиленгліколь-400 у співвідношенні 1:3.

Антивірусна активність ізатізону була досліджена в умовах *in vivo* на модельній системі ВТМ — *Nicotiana tabacum*. Для цього проводили передпосівну обробку насіння тютюну препаратом, розведеним дистильованою водою у співвідношенні 1:80. Рослини на стадії трьох листків оприскували ізатізоном у розведенні 1:200. Через 10 днів проводили третю обробку рослин препаратом шляхом оприскування. Через 1 добу після останньої обробки здійснювали інфікування рослин ВТМ, шляхом механічної інокуляції з використанням карборунду. Концентрація вірусу становила 400 мкг/мл. Контрольні рослини обробляли дистильованою водою. Для статистичної достовірності в кожному варіанті використовували по 5 рослин. Вплив речовин на розвиток вірусної інфекції в даній системі оцінювали за часом прояву і ступенем вираженості симптомів хвороби та за допомогою імуноферментного аналізу.

Для дослідження впливу ізатізону на перебіг вірусної інфекції у калусній тканині рослин тютюну як джерело експлантів було використано асептичні, інфіковані ВТМ рослини *Nicotiana tabacum*. Для індукції калусної тканини *in vitro* рослинний матеріал переносили на поживне середовище MS-1 [3], яке містило у своєму складі ізатізон у кінцевих розведеннях 1:100, 1:200 та 1:500. Контрольний калус отримували на середовищах без сполуки. Зразки ізольованого калусу тестували на присутність вірусу за допомогою імуноферментного аналізу. Регенеровані пагони переносили на безгормональне поживне середовище MS. Надалі проводили візуальну діагностику розвитку симптомів вірусної інфекції.

Для визначення концентрації вірусу в досліджуваних зразках проводили непрямий ІФА з використанням сироваток власного виготовлення.

Результати та їх обговорення

З літературних даних відомо, що препарат ізатізон проявляє широкий спектр біохімічної, фізіологічної, протипатогенної дії [1, 6, 11]. Препарат затверджений у ветеринарії України та Росії для попередження та лікування інфекційних захворювань птахів і тварин. Показана активність ізатізону проти вірусів людини та тварин [2], а отже перспективність даного препарату очевидна.

Дослідження впливу ізатізону на рослини показали, що фенотипові ознаки рослин, оброблених ізатізоном, значно більше виражені, ніж у рослин необроблених препаратом. Це проявляється у збільшенні довжини колосу та стебла, листової пластинки та загальної біомаси рослини. Ймовірно, паралельно з очевидним фізіолого-біохімічним впливом на рослини даний препарат може мати антивірусні властивості.

Антифітовірусну активність ізатізону було вирішено досліджувати на двох модельних системах ВТМ-*Nicotiana tabacum* та ВТМ — культура тканин *Nicotiana tabacum*.

В результаті проведених експериментів показано, що ізатізон пригнічує розвиток вірусної інфекції, викликаной ВТМ на тютюні. Слід відмітити, що симптоми вірусної інфекції формувалися як у контрольних рослин, так і у рослин, оброблених ізатізоном. У контрольних рослин спостерігали затримку росту (рис. 1), мозаїку та значну деформацію листових пластинок. В той же час, у оброблених препаратом рослин симптоми були менше вираженими і з часом маскувались.





Рис. 1. Вплив ізатізону на ріст рослин, інфікованих ВТМ:

1 — контрольні рослини, інокульовані ВТМ; 2 — рослини, оброблені ізатізонам і інокульовані ВТМ

Fig. 1. Influence of izatizone on the growth of tobacco plants inoculated with TMV:

1 — control plants inoculated with TMV; 2 — plants treated with the izatizone and inoculated with TMV

За результатами ІФА обробка рослин ізатізонам призводила до зниження кількості вірусного антигену в рослинній тканині на 67%, у порівнянні з контролем. Таким чином, ізатизон певною мірою захищає рослини, значно знижуючи негативний вплив вірусу. Ймовірно у рослин, оброблених препаратом, відбувається активація захисних механізмів, які протидіють розмноженню та розповсюдженню вірусу у рослині.

Одним з методів боротьби з вірусними інфекціями рослин є отримання безвірусного посадкового матеріалу в процесі мікроклонального розмноження рослин. Однак, у багатьох випадках регенерація рослин з калусу чи апікальної меристеми не гарантує їх повного звільнення від вірусу. Саме тому сьогодні ведуться інтенсивні пошуки антивірусних сполук, при додаванні яких у середовище для регенерації рослин можна було б підвищувати відсоток виходу безвірусних рослин. Зважаючи на результати, які свідчать про здатність ізатізону пригнічувати розвиток вірусної інфекції викликаной ВТМ на тютюні *in vivo*, ми поставили собі за мету дослідити активність цього препарату *in vitro*.

Оскільки рослинна тканина, яка культивується *in vitro* є більш чутливою до хімічних чинників порівняно з нативною рослиною, то для досліджень у культурі тканин використовувалися більші розведення ізатізона, такі як: 1:100, 1:200, 1:500.

В результаті проведених експериментів показано, що ізатизону в правильно підбраній концентрації притаманна антифетовірусна активність у даній модельній системі. Так, при розведенні препарату 1:100 спостерігається негативний вплив на рослинну тканину, при цьому регенерація пагонів значно пригнічується.

При розведенні ізатізона 1:500 відмічено антивірусну активність препарату. Останній знижував кількість вірусу в калусній тканині на 21,7% (рис. 2). При збільшенні концентрації препарату (1:200) рівень антивірусної активності значно знижується. При цьому значно зростає фітотоксичний вплив на культуру.

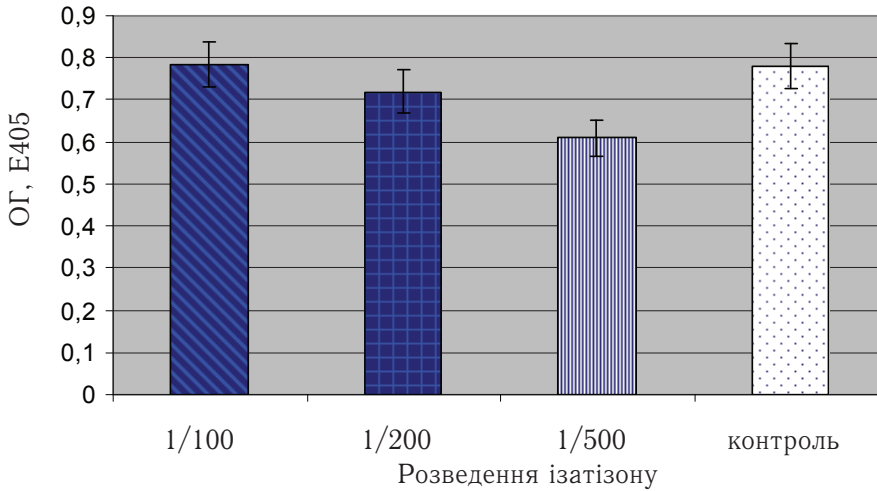


Рис. 2. Зниження кількості вірусного антигену в рослинах під впливом ізатізону (за результатами ІФА)

Fig. 2. Decrease of viral antigen quantity under izatizone influence (the results of ELISA)

Таким чином, кінцеве розведення ізатізону в поживному середовищі 1:500 є оптимальним розведенням за даних умов проведення експерименту. Така концентрація не спричиняла негативного впливу на ріст і розвиток калусної культури і водночас пригнічувала розвиток вірусу.

Співставивши результати дослідження антифітотвірної активності та біологічної активності ізатізону можна розглядати можливість застосування цього препарату в агросфері. Очевидні явні переваги цього препарату: низький рівень токсичності препарату і здатність стимулювати ріст та розвиток рослин. Крім того, в нашій роботі показано, що ізатізон має значно більший спектр біологічних властивостей і здатний пригнічувати розмноження вірусів рослин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заїка Л.А., Болсунова О.І., Потопальський А.І., Рибалко С.Л., Дядюн С.Т. Вивчення антивірусної дії препарату ізатізон на моделі герпес вірусу простого І (ВПГ І) // Імунологія та алергологія. — 2002. — № 3. — С. 67–68.
2. Зейдо Ф., Луцик Б. Д., Лозюк Л. В., Лозюк Р. М. Супозиторії з ізатізоном на основі поліетиленгліколю з противірусною активністю (клініко-фармацевтичні аспекти) // Acta Medica (Львівський медичний часопис). — 2005. — Т. XI, № 1. — С. 67–69.
3. Мусієнко М.М., Панюта О.О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — С. 13–22.
4. Практикум по общей вирусологии/ под ред. Атабекова И.Г. — М.: Издательство Московского Университета. — 1981. — 192 с.
5. Реунов А.В., Лапшина Л.А., Нагорская В.П., Елкова Л.А. Подавление 1,3; 1,6-β-D-глюканом инфекций, вызванных X-вирусом картофеля, в листьях томатной и дурманной // Физиология растений. — 2000. — Т. 47, № 2. — С. 240–243.
6. Сич Г.О., Сокирко Т.О., Буцацький Л.П., Матвієнко Н.М., Попова Е.М. Вивчення стану ліпопероксидації, антиоксидантного захисту та білкового обміну у цьогорічок коропових

риб під впливом різних концентрацій імуномодуючого препарату „Ізатізон”// Науковий вісник ЛНАВМ імені С.З. Гжицького. — 2007. — Т. 9, № 2. — С. 37.

7. *Bonnes M.S., Ready M. P., Irvin J.D. and Mabry T. J.* Pokeweed antiviral protein inactivates ribosomes; implications for the antiviral mechanisms// *The Plant Journal*. — 1994. — Vol. 5. — P. 173–183.

8. *Friendrich L., Lawton K. A., Ruess W., et al.* A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco// *Plant J*. — 1996. — Vol. 10. — P. 61–70.

9. *Lavanya N., Saravanakumar D., Rajendran L., Ramiah M., Raguchander T., Samiyappan R.* Management of sunflower necrosis virus through anti-viral substances// *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. — 2009. — Vol. 42, № 3. — P. 265–276.

10. *Potopalskiy A.I., Lozyuk L.V.* Antiviral and antitumor preparation IZATIZON — Lviv, “Scientific conception”. — 1995. — P. 90.

11. *Quecin V., Lopes M., Pacheco F., Ongarelli M.* Ribavirin, a guanosine analogue mammalian antiviral agent, impairs tomato spotted wilt virus multiplication in tobacco cell cultures// *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. — 2008. — Vol. 41, № 1. — P. 1–13.

**A.V. Kharina¹, T.G. Kot ¹, V.P. Polischuk¹, I.E. Zaets², N.V. Chervatyuk²,
A.I. Potopalsky²**

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv
Volodymyrska str., 64, Kyiv, 01033, Ukraine, tel.: +38 (044) 521 35 02
e-mail: virus@biocc.univ.kiev.ua

²Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU
Zabolotny str., 150, Kyiv, 03143, Ukraine, tel.: +38 (044) 526 11 69
e-mail: zkora@ukr.net

IZATIZONE AS INHIBITOR OF PLANT VIRUS INFECTION

Summary

Izatizone was investigated for biocontrol efficiency against tobacco mosaic virus (TMV) in two model systems. The izatizone treatment of seeds and *Nicotiana tabacum* plants prior to inoculation with the virus enhanced plant growth and protected them against TMV that displayed in decrease of symptoms severity and reduction of virus quantity in plants. It was shown that investigated compound was capable of reducing the development of TMV in tissue culture and caused 21.7% reduction of virus quantity in callus.

К e y w o r d s: izatizone, TMV, plant protection.



А.В. Харина¹, Т.Г. Кот¹, В.П. Полищук¹, И.Е. Заец², Н.В. Черватюк²,
А.И. Потопальский²

¹Киевский университет имени Тараса Шевченка,
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, тел.: +38 (044) 521 35 02

²Институт молекулярной биологии и генетики НАНУ,
ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03143, тел.: +38 (044) 526 11 69
e-mail: zkora@ukr.net

ИЗАТИЗОН КАК ИНГИБИТОР ФИТОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Реферат

Представлено результаты исследований активности изатизона против вируса табачной мозаики в двух модельных системах. Обработка изатизоном семян и растений *Nicotiana tabacum* до инокуляции вирусом улучшала рост растений и защищала их от вирусной инфекции, что проявлялось в снижении степени проявления симптомов и снижении количества вируса в растениях. Показано, что изатизон ингибирует развитие ВТМ в культуре ткани табака и снижает количество вируса в калусной ткани на 21,7%.

К л ю ч е в ы е с л о в а: изатизон, ВТМ, защита растений.



Гольдин Е.Б.

Южный филиал Национального университета биоресурсов и природопользования Украины, Крымский агротехнологический университет, п/о Аграрное, г. Симферополь, АР Крым, Украина, 95492, тел.: +38 (0652) 221 389; e-mail: Evgeny_goldin@mail.ru

ЦИАНОБАКТЕРИИ И РАСТИТЕЛЬНОВАДНЫЕ ОРГАНИЗМЫ: ОСОБЕННОСТИ МЕЖВИДОВЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ

Характер действия проб природных популяций цианобактерий, собранных в бассейне Днепра в период “цветения” воды, на растительноводные организмы был изучен в модельных экспериментах. В качестве тест-объектов использованы колорадский жук и американская белая бабочка в различных возрастных фазах. Показано, что цианобактерии проявляют детеррентное и ингибирующее действие в большей степени, чем токсичное.

К л ю ч е в ы е с л о в а: цианобактерии, растительноводные организмы, межвидовые отношения, химическая экология.

Биологически активные вещества цианобактерий, играющие важную роль в межвидовых отношениях в водной среде, привлекают внимание широкого круга специалистов и вызывают неоднозначную оценку их экологической природы. За последние 30 лет описано много примеров долгосрочных и многосторонних симбиотических, антагонистических и паразитических связей, существующих между цианобактериями и растительноводными членистоногими (“grazers”) в естественных экосистемах и зависящих от комплексных биохимических взаимодействий. Результаты исследований показывают, что вторичные метаболиты цианобактерий выполняют защитную функцию и значительно отличаются от известных биотоксинов, поражающих теплокровных животных и гидробионтов во время “цветений” воды [5]. Эти вещества влияют на жизненные функции конкурентов и/или растительноводных организмов, вызывая стресс, репеллентный и детеррентный эффекты (но не элиминацию!) [5], и служат важным инструментом в построении межвидовых взаимоотношений в водных экосистемах. Защитные реакции цианобактерий очень близки к проявлениям ингибирующей активности микроводорослей и макрофитов по отношению к растительноводным консументам [10] или наземных растений, которые продуцируют аллелохимические вещества для защиты от других растений или микробных патогенов [3, 4, 6]. С практической точки зрения биоцидные метаболиты цианобактерий могут быть источником препаратов для сельского хозяйства и медицины, предназначенных для биологического контроля численности вредных организмов, что представляет собой одну из наиболее перспективных тенденций в прикладном аспекте использования вторичных метаболитов [4–6, 8, 11]. Ранее проведенные нами эксперименты подтвердили теоретические предположения, выявив



антибактериальные [1], антигельминтные [2], детергентные, метатоксические и энтомоцидные свойства цианобактерий [6–9].

В представленной статье на примере некоторых данных, отражающих ингибирование жизненных функций наземных членистоногих (растительноядных насекомых с различными типами питания), впервые предпринята попытка оценки биоцидной активности цианобактерий в природе, что поможет сделать шаг в направлении понимания процессов, происходящих в водных экосистемах.

Материалы и методы

Пробы природного материала цианобактерий были отобраны в бассейне Днепра в период традиционного летне-осеннего “цветения” воды в сотрудничестве с Институтом гидробиологии НАН Украины. В таксономической структуре проб доминировал *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenk. (70,0–100,0%); также присутствовали *Microcystis* spp., *Anabaena variabilis* Kütz., *Aphanizomenon flos-aquae* Ralfs ex Born et Flah., *Phormidium mucicola* Hub.-Pest. et Naum. и *Phormidium* spp. Биомассу цианобактерий подвергали тепловой (37 °С), лиофильной, вальцевой или ацетоновой сушкам, а затем измельчали при помощи лабораторных мельниц для получения экспериментальных порошковидных препаративных проб. Водными суспензиями (0,5 и 1,0%) вариантов полученного порошка при помощи лабораторного распылителя опрыскивали листья, предназначенные для питания насекомых. В качестве тест-объектов использовали различные возрастные фазы американской белой бабочки *Hlyphantia cunea* Drury (полифаг) и яйца, личинки разных возрастов и имаго колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* Say (олигофаг), собранные в природных популяциях; для питания им предлагали листья наиболее типичного растения-хозяина (картофеля для колорадского жука и клена ясенелистного для американской белой бабочки). Насекомых содержали в стеклянных сосудах емкостью 1,0 л, по 10 особей в каждом, вариант опыта включал 5–10 повторностей. В модельных экспериментах определяли биоцидную активность цианобактерий, наблюдая за питанием (процент потребленной листовой поверхности/на одну особь), пищевым поведением, ростом, метаморфозом и выживаемостью в течение 10–20 суток.

Результаты и их обсуждение

Первичные препараты цианобактерий обладали общим ингибирующим эффектом и угнетали ряд жизненных функций насекомых (питание, метаморфоз, рост, размножение и выживаемость), особенно в случаях потребления корма на стадии младших личиночных возрастов. В то же время эффект последствия проявлялся в нарушениях процессов окукливания, формирования имаго и личиночном, куколочном и имагинальном тератогенезе. Вероятность выживания тест-объектов в результате совокупного действия ингибирующих факторов значительно снижалась. Сопоставление и анализ показателей угнетения процессов питания, роста, метаморфоза и сроков наступления гибели в вариантах с различными препаративными формами показали, что процент доминирования *M. aeruginosa* в популяции оказывает влияние на проявление биоцидной активности. Подавление трофической функции личинок подтверждается визуальными наблюдениями и данными измерения листовой поверхности. Ниже приведены примеры детергентной активности некоторых проб ассоциаций цианобактерий: (1) *M. aeruginosa* – 70,0%, *A. flos-aquae* – 30,0%;



(2) *M. aeruginosa* – 98,0%, *A. flos-aquae* – 2,0%; (3) *M. aeruginosa* – 90,0%, *A. flos-aquae* – 10,0% (табл. 1).

Таблица 1

Детеррентная активность биомассы цианобактерий

Table 1

Deterrent activity of cyanobacterial biomass

№.№ проб	Способ обработки биомассы	Потребление обработанных листьев на протяжении 10 дней, % от контроля					
		Колорадский жук			Американская белая бабочка		
		2 возраст	3 возраст	4 возраст	2 возраст	3 возраст	4 возраст
1	Вальцевая сушка	42,8±4,0	40,8±5,5	—	11,1±0,2	—	19,6±3,5
2	Лиофильная сушка	18,7±3,2	55,0±7,5	—	1,5±0,2	2,0±0,5	42,0±7,7
	Тепловая сушка	18,0±4,6	49,8±7,0	74,4±3,2	0	12,0±2,6	32,2±10,6
	Водный фильтрат сырой биомассы (1:1)	7,1±2,2	35,7±6,1	79,1±1,9	12,0±1,0	29,5±9,7	32,5±8,3
3	Тепловая сушка	5,8±0,6	33,9±4,8	68,3±3,2	12,2±0,4	11,5±1,9	27,8±3,2
Контроль		100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Примечание: листья обработаны 0,5% суспензией порошка; в каждом варианте 150 личинок.

Ингибирование питания и отставание личинок в росте приводит к нарушениям метаморфоза. В различных вариантах опыта у колорадского жука имаго формируются в 2,0–4,4 раз реже, чем в контроле, причем процессы окукливания и выхода имаго сопровождаются значительными морфологическими отклонениями от нормы в виде тератогенеза (нежизнеспособные куколки со сморщенной кутикулой у американской белой бабочки и имаго с редуцированными надкрыльями у колорадского жука). В конечном итоге смертность регистрируется на всех фазах развития членистоногих, приводя к относительно высокому суммарному эффекту [6, 8]. Экспериментальные данные показывают, что гибель в личиночной фазе наступает не только под влиянием токсической/энтомоцидной активности, но и по причине угнетения трофической функции и ростовых процессов. Кроме того, можно проследить прямую зависимость ингибирующего и летального эффектов от концентрации водных суспензий первичных препаратов (табл. 2) и специфическое действие цианобактерий на различные виды насекомых.

Таблица 2



Смертність личинок колорадського жука другого візиту в варіанті з природної проби ціанобактерій № 2, висушеної тепловим способом

Table 2

Mortality of the second instar larvae of Colorado potato beetle caused by cyanobacterial sample N 2 (thermal drying)

Концентрація, %	Показатели смертності по строкам учета, %		
	5 сутки	10 сутки	15 сутки
0,5	33,7±6,8	45,3±6,8	64,0±8,2
1,0	100,0	0	0
Контроль	0	5,3±2,7	5,3±2,7

Примечание: в каждом варианте использовали 75 личинок.

По всей вероятности, избирательность действия зависит от спектра питания и пищевых привычек тест-объектов, их анатомических, биологических и экологических особенностей. Сравнительное гистологическое обследование насекомых выявило патологические изменения, связанные с влиянием цианобактерий и свидетельствующие о различной чувствительности тест-объектов, которая проявляется на видовом уровне [7].

Анализ данных, полученных нами и другими специалистами, позволяет предположить, что цианобактерии продуцируют ряд соединений различной химической природы с широким спектром биологической активности, который включает не менее 800 названий. Среди них можно выделить следующие группы соединений, имеющие специфическое экологическое значение в химической структуре межвидовых взаимоотношений. (1) Токсины, вызывающие гибель широкого круга гидробионтов (от цианобактерий и микроводорослей до млекопитающих) или причиняющие им косвенный/потенциальный вред (накопление в органах и тканях). Их продуцирование специализированными клетками определенных видов и штаммов (один и тот же вид может образовывать токсичные и нетоксичные популяции) связано, как правило, с появлением в экосистеме видов-антагонистов или конкурентов. (2) Токсины/совокупность токсинов, которые отпугивают растительноядные виды, осуществляя функции репеллентов и детеррентов, или ограничивают их размножение, но не вызывая летального исхода [5]. (3) Вторичные метаболиты, направленные против автотрофных конкурентов (цианобактерий, микроводорослей и т.д.), но неэффективные по отношению к растительноядным членистоногим и не принадлежащие к числу токсинов. Их существование позволило ряду авторов (Т. Smayda, А. Cembella U. Tillmann, J. Kubanek, E. Gross, B. Shaw и др.) обосновать теорию водной аллелопатии (по аналогии со сходными явлениями в наземных экосистемах). При этом нужно отметить, что полную параллель между взаимоотношениями в наземных и водных местообитаниях провести трудно из-за существенных различий в эволюционных, биохимических и экологических аспектах формирования этих процессов, причинах и особенностях проявления вторичного метаболизма, высокого уровня разнообразия метаболитов гидробионтов и их биологической активности по сравнению с наземными продуцентами и т.д. (4) Вторичные метаболиты, предназначенные для защиты от растительноядных организмов и их



личинок. К проявлению их активности относится ингибирование питания, плодовитости, подвижности и снижение уровня выживаемости водных членистоногих [11, 12]. Такие же эффекты мы наблюдали в опытах на модельных тест-объектах, что позволяет сделать заключение о защитном характере действия нетоксичных метаболитов цианобактерий (в частности, этими свойствами обладают липидные и терпеновые соединения [4, 9]).

Таким образом, по своему спектру и механизму действия биоцидная активность цианобактерий близка к действию защитных секретов низших и высших растений на растительноядные организмы. Несмотря на смертность растительноядных организмов в ряде вариантов, влияние первичных препаратов на основе цианобактерий содержит детеррентных и ингибирующих признаков больше, чем токсичных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдин Е.Б. Антибактериальная активность альгологически чистых культур цианобактерий и микроводорослей // Микробиол. журн. — 2003. — 65, № 4. — С. 68–76.
2. Гольдин Е.Б., Менджул М.И. Фаголизаты цианобактерий: их биоцидность и использование // Микробиол. журн. — 1996. — 58, № 5. — С. 51–58.
3. Гольдин Е.Б., Гольдина В.Г. Эфирные масла сосны обыкновенной и защита растений от вредных насекомых // С.-х. науки: Науч. тр. Крым. гос. аграрного ун-та. — Вып. 75. — Симферополь, 2002. — С. 50–53.
4. Гольдин Е.Б., Гольдина В.Г. Терпены природного происхождения и проблемы защиты растений // С.-х. науки: Науч. тр. Крым. гос. аграрного ун-та. — Вып. 76. — Симферополь, 2004. — С. 174–178.
5. Berry J.P., Gantar M., Perez M.H., Berry G., Noriega F.G. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides // Mar. Drugs. — 2008. — 6, 2. — P. 117–146.
6. Goldin E.B. Algological factor in pest control and its horizons. — Proc. 2nd Internat. Conf. Mediterranean Coastal Environment MEDCOAST 95 (Ed E. Ozhan), Tarragona, Spain, 1995. — P. 241–252.
7. Goldin E.B. Harmful cyanobacteria-invertebrates relations: histopathological picture in fall webworm. — Harmful Algae 2002: Xth HAB Internat. Conf. (Eds K.A. Steidinger et al.). — Florida Marine Research Institute, Florida Fish and Wildlife Commission, Florida Institute of Oceanography, IOC of UNESCO, 2004. — P. 476–478.
8. Goldin E.B., Sirenko L.A. The blue-green algae as the producers of the natural pesticides // Альгология. — 1998. — № 1. — С. 93–104.
9. Goldin E.B., Goldina V.G. Insecticidal activity of harmful cyanobacteria: the role of terpene substances. — Harmful Algal Blooms 2000 (Eds G. Hallegraeff et al.). — IOC of UNESCO, Paris. — P. 403–406.
10. Hay M., Duffy J.E., Pfister C.A., Fenical W. Chemical defense against different marine herbivores: are amphipods insect equivalents? // Ecology. — 1987. — 68. — P. 1567–1580.
11. Macias F., Galindo J., Garcia-Diaz M., Galindo J. Allelopathic agents from aquatic ecosystems: potential biopesticides models // Phytochem. Rev. — 2008. — 7. — P. 155–178.
12. Paul V.J., Arthur K.E., Ritson-Williams R., Ross C., Sharp K. Chemical defenses: from compounds to communities // Biol. Bull. — 2007. — 213. — P. 226–251.



Є.Б. Гольдін

Південний філіал Національного університету біоресурсів і природокоористування України, Кримський агротехнологічний університет, м. Сімферополь, Аграрне, АР Крим, 95492, Україна
тел.: +38 (0652) 221 389; e-mail: Evgeny_goldin@mail.ru

ЦІАНОБАКТЕРІЇ ТА РОСЛИНОЇДНІ ОРГАНІЗМИ: ОСОБЛИВОСТІ МІЖВИДОВИХ ВІДНОСИН

Реферат

Характер дії проб природних популяцій ціанобактерій, що були зібрані в басейні Дніпра під час “цвітіння” води, на рослиноїдні організми було досліджено в модельних експериментах (колорадський жук і американський білий метелик у різних фазах розвитку були використані як тест-об’єкти). Результати експериментів підтвердили, що ціанобактерії виявляють детеррентну та інгібувальну дію більше за токсичну.

К л ю ч о в і с л о в а: ціанобактерії, рослиноїдні організми, міжвидові відносини, хімічна екологія.

E.B. Goldin

Southern Branch of National University of Biological Resources and Environmental Management-Crimean Agricultural and Technological University, Simferopol, Agrarne, AR Crimea, 95492, Ukraine
тел.: +38 (0652) 221 389; e-mail: Evgeny_goldin@mail.ru

CYANOBACTERIA AND HERBIVOROUS ORGANISMS: THE PROPERTIES OF INTERSPECIFIC INTERACTIONS

Summary

Cyanobacterial natural samples were collected in the Dnieper basin during traditional summer-autumn “water bloom” and the pattern of their biological activity to the herbivorous organisms was revealed in the model tests (experimental exposures of fall webworm and Colorado potato beetle were used at several life-history stages). It can be determined deterrent and inhibitory effect of cyanobacteria is displayed more likely than toxic one.

К e y w o r d s: cyanobacteria, herbivorous organisms, interspecific interactions, chemical ecology.



Чайковская Л.А., Баранская М.И.

Южная исследовательская станция Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, пгт. Гвардейское, ул. К. Маркса, 107, АР Крым, 97513, Украина, тел.: +38 (0652) 32 34 76

ВЛИЯНИЕ АГРОСТИМУЛИНА, БИОЛАНА И ЭМИСТИМА С НА РОСТ И ФОСФАТАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3

*Исследовано влияние регуляторов роста растений (агrostимулин, эмистим С, биолан) на бактерию *Enterobacter nimipressuralis* 32-3: рост, продуктивность биомассы, активность продуцирования щелочной фосфатазы. Показано, что наибольший прирост биомассы бактерий получен при добавлении в питательные среды биолана и эмистима С (до 26% и 30%, соответственно). Отмечено положительное действие обоих стимуляторов роста на основные показатели роста и активность щелочной фосфатазы, продуцируемой *E. nimipressuralis* 32-3.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: регуляторы роста растений, *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, биомасса, фосфатаза.

Создание и разработка биопрепаратов для сельского хозяйства, в частности позволяющих оптимизировать питание растений, является одной из задач современной биотехнологии [1]. Исследования в этом направлении проводятся учеными ИМВ НАН Украины, ИСХМ УААН, а также Южного филиала ИСХМ, в которых созданы эффективные препараты на основе азотфиксирующих и фосфатмобилизующих бактерий.

Как известно, при производстве биопрепаратов важно увеличить выход биомассы и активизировать ферментативную активность микроорганизмов, что достигается посредством оптимизации условий их культивирования и состава питательной среды. Одним из факторов, позволяющих решить эту задачу, является использование биологически активных веществ. Так, выявлено положительное влияние природных регуляторов роста на культуру фосфатмобилизующей бактерии *Bacillus megaterim* 5: отмечено возрастание активности фосфатазы и накопления биомассы [2], а также устойчивость к стрессовым факторам [3].

Цель работы заключалась в исследовании влияния регуляторов роста растений (агrostимулин, эмистим С, биолан) на рост биомассы и продуцирование щелочной фосфатазы штаммом *E. nimipressuralis* 32-3, который является основой биопрепарата фосфоэнтерин [4].



Материалы и методы

Объектом исследований был штамм *E. nimipressuralis* 32-3, способный к мобилизации труднорастворимых органических и неорганических соединений фосфора, выделенный нами из чернозема южного [5].

В опытах использованы регуляторы роста растений нового поколения: агро-стимулин (комплекс регуляторов роста природного происхождения и синтетических аналогов фитогормонов), эмистим С (продукт биотехнологического выращивания грибов-эпифитов из корневой системы лекарственных растений), биолан (усовершенствованный аналог эмистима С), любезно предоставленные директором МНТЦ «Агробиотех» С.П. Пономаренко [6]. Изучалось влияние данных фиторегуляторов на рост и фосфатазную активность штамма *E. nimipressuralis* 32-3. В опытах использована концентрация исследуемых регуляторов роста в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-10} г/л.

E. nimipressuralis 32-3 культивировали на двух видах питательных сред: глюкозо-аспарагиновой (глюкоза — 10 г, аспарагин — 1 г, K_2SO_4 — 0,2 г, $MgSO_4$ — 0,2 г, вода — до 1л) и технологической (используемой для приготовления опытных партий биопрепарата фосфоэнтерин) в течение 24 часов при 30 °С в периодических условиях на качалке (230 об/мин). Количественные характеристики роста культуры (удельная скорость роста, число поколений) и рост клеток определены по методикам [7–9]. Активность щелочной фосфатазы определена на биохимическом анализаторе “Собас Mira Plus” (Швейцария) оптимизированным стандартным методом с использованием п-нитрофенил-фосфата по рекомендациям Ассоциации клинической биохимии; единицей измерения ферментативной активности в системе СИ является Е/л [10].

Удельную скорость роста (μ) вычисляли по формуле:

$$\mu = 2,3 \frac{(\lg x_2 - \lg x_1)}{t_2 - t_1} \quad [8],$$

где:

x_1 и x_2 — количество клеток в промежуток времени t_1 и t_2
2,3 — коэффициент перевода в десятичный логарифм

Число поколений вычисляли по формуле:

$$K = \frac{q}{t} \quad [7],$$

где:

t — промежуток времени;
 q — продолжительность каждой генерации

Результаты и их обсуждение

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что при культивировании *E. nimipressuralis* 32-3 на глюкозо-аспарагиновой среде наибольший прирост биомассы — 21% и 17% получено при добавлении биолана ($1 \cdot 10^{-10}$ г/л) и эмистима С ($1 \cdot 10^{-10}$ г/л), соответственно (рис.1). Эта же тенденция отмечена и при использовании технологической среды: биолан ($1 \cdot 10^{-9}$ г/л) способствовал увеличению био-

массы на 26%, эместим С — на 31% ($1 \cdot 10^{-10}$ г/л). Добавка агростимулина в питательные среды незначительно повлияла на прирост биомассы *E. nimipressuralis* 32-3: 11% ($1 \cdot 10^{-10}$ г/л) на технологической и 7% ($1 \cdot 10^{-10}$ г/л) — на глюкозо-аспарагиновой средах.

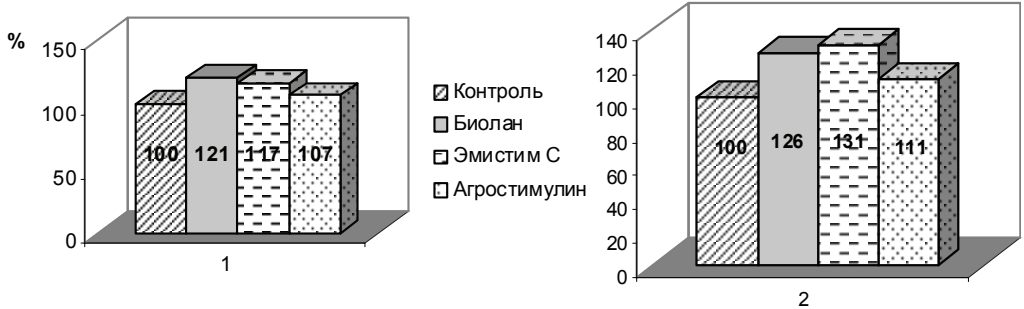


Рис.1. Влияние биолана, эместима С и агростимулина на рост биомассы *E. nimipressuralis* 32-3: 1 — глюкозо-аспарагиновая среда; 2 — технологическая среда

Fig.1. The influence of biolan, emistim C and agrostimulin of growth on productivity of biomass *E. nimipressuralis* 32-3: 1 — glucose-asparagin medium; 2 — technological medium

Показано различное влияние исследованных регуляторов роста на активность щелочной фосфатазы, продуцируемой *E. nimipressuralis* 32-3: при добавке в питательную среду агростимулина она была на уровне контроля (рис. 2). Внесение биолана и эместима С (в концентрации $1 \cdot 10^{-10}$ г/л) способствовало возрастанию активности щелочной фосфатазы до 4–5 Е/л, в тоже время в контроле она составляла 1 Е/л.

Для вычисления удельной скорости роста и числа генераций проведены учеты численности клеток в 10-часовой и 12-часовой культуре бактерий, что соответствовало экспоненциальной фазе роста.

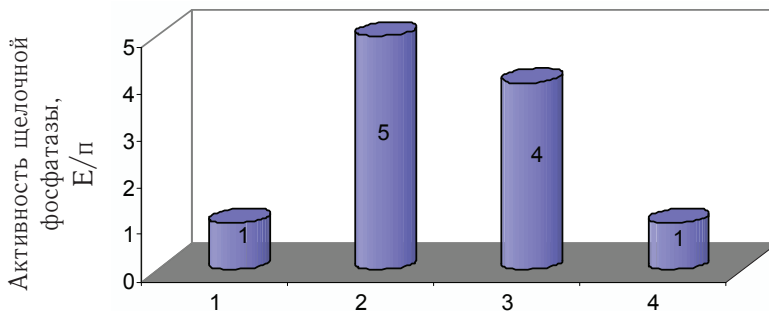


Рис. 2. Влияние регуляторов роста на активность щелочной фосфатазы, продуцируемой бактерией *E. nimipressuralis* 32-3:

1 — контроль, 2 — эместим С, 3 — биолан, 4 — агростимулин

Fig. 2. The influence of the growth regulators on the activity of alkaline phosphatase produced by bacteria *E. nimipressuralis* 32-3:

1 — control; 2 — emistim C; 3 — biolan; 4 — agrostimulin

Исследования показали, что в контроле (без стимуляторов) удельная скорость роста достигала 0,13 делений/час, а число генераций — 0,42. При добавлении в питательную среду биолана ($1 \cdot 10^{-10}$ г/л) удельная скорость роста возрастала в среднем до 0,19 делений/час, а число генераций — до 0,62, что соответствовало повышению этих показателей в 1,5 раза. Влияние эместима С на обсуждаемые показатели было незначительно. Так, наибольшие значения получены при добавлении эместима С ($1 \cdot 10^{-8}$ и $1 \cdot 10^{-8}$ г/л): удельная скорость роста и число генераций возрастали в 1,2 раза по сравнению с контролем и составляли 0,15 делений/час и 0,49 соответственно.

Таким образом, установлено положительное действие изученных регуляторов роста растений на продуктивность биомассы *E. nimipressuralis* 32-3, а также выявлено положительное влияние биолана и эместима С на возрастание удельной скорости, числа генераций и активность щелочной фосфатазы, продуцируемой *E. nimipressuralis* 32-3. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения этих регуляторов роста растений при производстве бактериального удобрения фосфоэнтерин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Підгорський В.С. Мікробні біотехнології: наукові перспективи та умови реалізації // Мікробіологічний журнал. — 2006. — 68, № 2. — С. 3–11.
2. Іутинський О.В., Пономаренко С.П. Вплив нових регуляторів росту рослин на *Bacillus megaterium* 5 — основу фосфобактерину // Наукові записки Тернопільського державного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. — 2003. — С. 41–45.
3. Іутинський О.В., Піндрус А.А. Резистентність фосфатмобілізівної бактерії *Bacillus megaterium* 5 до стресових факторів. Зб.: Фосфор і калій у землеробстві. Проблеми мікробіологічної мобілізації. — Чернігів — Харків. — 2004. — С. 48–55.
4. Декл. патент № 12537, Україна. Удобрювальний біопрепарат „фосфоентерин” на основі штаму фосфатмобілізуючих бактерій *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 / Чайковська Л.О., Мельничук Т.М., Татарин Л.М., Пархоменко Т.Ю., Грітчина Л.Ю., Каменева І.О. Заявл. 01.08.2005. Опубл. 15.02.2006. Бюл. № 2. — 5 с.
5. Декл. патент № 3203, Україна. Штам фосфатмобілізуючих бактерій / Л.О. Чайковська, Т.М. Мельничук. Заявл. 07.06.2004, Опубл. 15.10.2004, Бюл. № 10. — 4 с.
6. 6. *Технологии* применения регуляторов роста растений в земледелии. Методическое пособие. Под ред. Л.А. Анишина, С.П. Пономаренка, В.О. Жилкина, З.М. Грицаенко. — 2006. — Киев. — С. 4–7.
7. *Мікробіологія*. Підручник / За ред. М.Г. Сергійчук, В.К. Позур, А.Т. Вінніков та ін. — Видавничо-поліграфічний центр “Київський університет.” — 2005. — С. 148–154.
8. *Промышленная микробиология* / Под ред. проф. Н.С. Егорова. — М.: Высшая школа. — 1979. — С. 127–128.
9. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (малый практикум). — М.: Изд. МГУ. — 1971. — С. 143–144.
10. Rosalki S.B., Foo A.Y., Burlina A. et al. Multicenter evaluation of iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma // J. Clin. Chem. — 1993. — 39. — P. 648–652.



Л.О. Чайковська, М.І. Баранська

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН, смт. Гвардійське, вул. К. Маркса, 107, АР Крим, 97513, Україна, тел.: +38 (0652) 32 34 76

ВПЛИВ АГРОСТИМУЛІНУ, ЕМІСТИМУ С, БІОЛАНУ НА РІСТ І ФОСФАТАЗНУ АКТИВНІСТЬ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3

Реферат

Досліджено вплив регуляторів росту рослин (агrostимулін, емістим С, біолан) на *Enterobacter nimipressuralis* 32-3: ріст, продуктивність біомаси, активність продукування лужної фосфатази. Виявлено, що найбільший приріст біомаси бактерій спостерігався при додаванні в поживні середовища біолану та емістиму С (до 26% і 30%, відповідно). Відмічено також позитивну дію обох стимуляторів на основні показники росту та активність лужної фосфатази, яку продукує *E. nimipressuralis* 32-3.

Ключові слова: регулятори росту рослин, бактерія *E. nimipressuralis* 32-3, біомаса, фосфатаза.

L.O. Chaykovska, M.I. Baranska

Southern Branch of Institute of Agricultural Microbiology of NASU,
urban vil. Gvardejskie, K. Marx str., 107, AR Crimea, 97513, Ukraine
tel.: +38 (0652) 32 34 76

INFLUENCE OF AGROSTIMULIN, EMISTIM C, BIOLAN ON GROWTH AND ACTIVITY OF PHOSPHATASE *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3

Summary

The influence of plants growth regulators (agrostimulin, emistim C, biolan) on bacterium *E. nimipressuralis* 32-3 (growth, biomass productivity, alkaline phosphatase activity) has been investigated. It has been revealed that addition of biolan and emistim C increases bacterium biomass (26% and 30% relatively). The positive influence of both growth regulators on basic growth exponent and activity indices of alkaline phosphatase has been recorded.

Key words: growth regulators of plants, bacterium *E. nimipressuralis* 32-3, biomass, phosphatase.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ»
У 2009 РОЦІ**

Автори		№ вип.	№ стор.
<i>Авдєєва Л.В.</i>	див. <i>Осадча А.І.</i>	3	63
<i>Андронаті С.О.</i>	див. <i>Давиденко Т.І.</i>	2	8
<i>Антонюк Т.С.</i>	див. <i>Гордієнко А.С.</i>	1	64
<i>Аравіцька О.В.</i>	див. <i>Грубський Я.П.</i>	2	28
<i>Бабарик М.А.</i>	див. <i>Кондратюк Ю.Ю.</i>	4	6
<i>Багаєва О.С.</i>	див. <i>Басюл О.В.</i>	2	53
<i>Баранська М.І.</i>	див. <i>Чайковська Л.О.</i>	4	70
<i>Басюл О.В., Ямборко Г.В., Багаєва О.С., Іваниця В.О.</i>	Ферментація гливи звичайної бактеріями роду <i>Lactobacillus</i>	2	53
<i>Білоіваненко С.О.</i>	див. <i>Лісютін Г.В.</i>	1	88
<i>Бінек М.</i>	див. <i>Хробак Д.</i>	3	49
<i>Бухтіяров А.Є.</i>	див. <i>Лісютін Г.В.</i>	1	88
<i>Бухтіяров А.Є.</i>	див. <i>Іваниця В.О.</i>	2	36
<i>Васильєва Н.Ю.</i>	див. <i>Іваниця В.О.</i>	2	36
<i>Вільбо Е., Марек-Козачук М., Мазур А., Кубік-Комар А., Скорупська А.</i>	Відмінності локальних популяцій <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> : зв'язок між генетичними і фізіологічними ознаками	3	40
<i>Вінніков А.І.</i>	див. <i>Дрегваль О.А.</i>	1	82
<i>Водзінська Н.С.</i>	див. <i>Крулько І.В.</i>	2	47
<i>Водзінський С.В.</i>	див. <i>Зінченко О.Ю.</i>	4	13
<i>Вострова Л.М.</i>	див. <i>Русакова М.Ю.</i>	2	69
<i>Галкін Б.М.</i>	див. <i>Русакова М.Ю.</i>	2	69
<i>Галкін Б.М.</i>	див. <i>Зінченко О.Ю.</i>	4	13
<i>Галкін Б.М.</i>	див. <i>Нікітін О.В.</i>	4	48
<i>Гамян А.</i>	див. <i>Пащак М.</i>	3	22
<i>Гамян А.</i>	див. <i>Шпонар Б.</i>	3	57
<i>Гвоздяк П.І.</i>	див. <i>Кузьмінський Є.В.</i>	1	6
<i>Гвоздяк П.І.</i>	див. <i>Рильський О.Ф.</i>	2	43
<i>Гвоздяк П.І., Сапура О.В.</i>	Простий метод виявлення та оцінки інтенсивності анаеробних процесів, що супроводжуються виділенням газів	4	53



Автори		№ вип.	№ стор.
Гнатуш С.О.	див. Кушкевич І.В.	1	70
Голуб Н.Б.	див. Кузьмінський Є.В.	1	6
Гольдін Є.Б.	Ціанобактерії та рослинні організми: особливості міжвидових відносин	4	64
Гончар М.В.	див. Федорович Д.В.	3	15
Гордієнко А.С., Антонюк Т.С., Курдиш І.К.	Вплив глинистих мінералів на адгезію бактерій — компонентів гранульованих препаратів для рослинництва	1	64
Гренадьорова М.В.	див. Русакова М.Ю.	2	69
Громико О.М.	див. Грубський Я.П.	2	28
Грубський Я.П., Аравіцька О.В., Мироновський М.Л., Громико О.М., Остап Б.О., Федоренко В.О.	Вплив п-метил-п'-нітро-п-нітрозогуанідину та п-метил-п-нітрозометилсечовини на антибіотичну активність продуцента сіоміцину <i>Streptomyces sioyaensis</i> Lv81	2	28
Гудзенко Т.В.	див. Лісютін Г.В.	1	88
Гудзенко Т.В.	див. Іваниця В.О.	2	36
Гудзь С.П.	див. Кушкевич І.В.	1	70
Гудзь С.П.	див. Перетятко Т.Б.	3	76
Гуляєва І.І., Снігур Г.О., Поліщук В.П., Мілкус Б.Н.	Вірусні захворювання зернових в Одеській області	1	77
Давиденко Т.І., Романовська І.І., Андронаті С.О.	Імобілізація біологічно активних речо- вин	2	8
Джура Н.М.	див. Русин І.Б.	4	41
Дрегваль О.А., Черевач Н.В., Вінніков А.І.	Сумісна дія штамів ентомопатогенних бактерій та грибів	1	82
Думова В.А., Патица Н.В., Круглов Ю.В., Патица В.П.	Вивчення біорізноманіття комплексу прокаріотних мікроорганізмів підзолистих грунтів	2	60
Заєць І.Є.	див. Харіна А.В.	4	58
Заїка С.А.	див. Крулько І.В.	2	47
Зайцев Ю.П., Копитіна Н.І.	Гриби у морському середовищі	3	6
Зінченко О.Ю., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Водзінський С.В., Ішков Ю.В.	Вплив синтетичних порфіринів на чутливість умовно-патогенних бактерій до антибіотиків	4	13
Зінченко О.Ю., Шматкова Н.В., Філіпова Т.О., Сейфулліна І.Й., Подуст В.С.	Антибактеріальна активність нікотиноїл- гідрозона саліцилового альдегіду та його комплексів	1	49
Іваниця В.О.	див. Лісютін Г.В.	1	88



Автори		№ вип.	№ стор.
<i>Іваниця В.О.</i>	див. <i>Басюл О.В.</i>	2	53
<i>Іваниця В.О.</i>	див. <i>Ліманська Н.В.</i>	4	26
<i>Іваниця В.О., Васильєва Н.Ю., Лісютін Г.В., Бухтіяров А.Є., Гудзенко Т.В.</i>	Токсична і мутагенна активність забруднення акваторії острова Зміїний	2	36
<i>Іляш В.М.</i>	див. <i>Осадча А.І.</i>	3	63
<i>Іляш В.М.</i>	див. <i>Осадча А.І.</i>	4	33
<i>Ішков Ю.В.</i>	див. <i>Зінченко О.Ю.</i>	4	13
<i>Каспров Е.</i>	див. <i>Пащак М.</i>	3	22
<i>Кашицік П.</i>	див. <i>Федорович Д.В.</i>	3	15
<i>Кізерветтер-Свіда М.</i>	див. <i>Хробак Д.</i>	3	49
<i>Коваленко Н.К.</i>	див. <i>Співак М.Я.</i>	1	39
<i>Колочек Г.</i>	див. <i>Федорович Д.В.</i>	3	15
<i>Кондратюк Ю.Ю., Бабарик М.А., Корнелюк О.І.</i>	Оптимізація бактеріальної експресії тирозил-тРНК синтетази ссавців при культивуванні штаму <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) <i>pLysE</i>	4	6
<i>Копитіна Н.І.</i>	див. <i>Зайцев Ю.П.</i>	3	6
<i>Корнелюк О.І.</i>	див. <i>Кондратюк Ю.Ю.</i>	4	6
<i>Кот Т.Г.</i>	див. <i>Харіна А.В.</i>	4	58
<i>Кріпка А.В.</i>	див. <i>Столярчук І.М.</i>	3	70
<i>Круглов Ю.В.</i>	див. <i>Думова В.А.</i>	2	60
<i>Крулько І.В., Заїка С.А., Харіна А.В., Водзінська Н.С., Поліщук В.П.</i>	Порфірини як інгібітори вірусної інфекції в культурі рослинних тканин	2	47
<i>Кубік-Комар А.</i>	див. <i>Вільбо Е.</i>	3	40
<i>Кузнєцов В.О.</i>	Професор Яків Юлійович Бардах (1857–1929)	2	75
<i>Кузьмінський Є.В., Гвоздяк П.І., Голуб Н.Б.</i>	Біопаливні елементи — проблеми і перспективи розвитку. II. Мікробні біопаливні елементи	1	6
<i>Кулачковський О.Р.</i>	див. <i>Кушкевич І.В.</i>	1	70
<i>Курдиш І.К.</i>	див. <i>Гордієнко А.С.</i>	1	64
<i>Курдиш І.К.</i>	Вплив біогенних і абіогенних факторів на ефективність інтродукції мікроорганізмів у агроєкосистемі	1	23
<i>Кушкевич І.В., Гнатуш С.О., Гудзь С.П., Кулачковський О.Р.</i>	Вплив кадмій сульфату на ріст, швидкість поглинання кисню та ультраструктуру <i>Chromatium sp.</i>	1	70



Автори		№ вип.	№ стор.
Кшемінська Г.П.	див. Федорович Д.В.	3	15
Лазаренко Л.М.	див. Співак М.Я.	1	39
Ліманська Н.В., Іваниця В.О., Сергєєва Ж.Ю., Товкач Ф.І.	Бактеріоциногенна активність штамів <i>Rhizobium vitis</i> і <i>Pantoeae agglomerans</i> , виділених з рослин винограду	4	26
Лісютін Г.В.	див. Іваниця В.О.	2	36
Лісютін Г.В., Бухтіяров А.Є., Білоіваненко С.О., Пономарьова Л.П., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О.	Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова Зміїний	1	88
Мазур А.	див. Вільбо Е.	3	40
Мамєєва О.Г., Остапчук А.М., Нагорна С.С., Підгорський В.С.	Аналіз синтезу 2-фенілетанолу дріжджами роду <i>Kluveromyces</i>	3	29
Маракасова К.С., Осташ Б.О., Федоренко В.О.	Негативна регуляція біосинтезу моено- міцину А у штамі <i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672	3	36
Марек-Козачук М.	див. Вільбо Е.	3	40
Мироновський М.Л.	див. Грубський Я.П.	2	28
Мілкус Б.Н.	див. Гуляєва І.І.	1	77
Мороз О.М.	див. Русин І.Б.	4	41
Нагорна С.С.	див. Мамєєва О.Г.	3	29
Нечай Г.І.	див. Федорович Д.В.	3	15
Нікітін О.В., Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Сейфулліна І.Й., Шматкова Н.В.	Вплив комплексів германію (IV) з салі- цилальгідразонами хлорбензойної та нітробензойної кислот на вміст основних популяцій і субпопуляцій лімфоцитів у мишей при запаленні	4	48
Новіков В.П.	див. Русин І.Б.	4	41
Олевінська З.М.	див. Співак М.Я.	1	39
Осадча А.І., Сафронова Л.А., Авдєєва Л.В., Іляш В.М.	Здатність бактерій роду <i>Vacillus</i> гідро- лізувати ксилан	3	63
Осадча А.І., Сафронова Л.А., Полтавський О.М., Іляш В.М.	Гідролазна активність антарктичних ба- цил	4	33
Остапчук А.М.	див. Мамєєва О.Г.	3	29
Осташ Б.О.	див. Грубський Я.П.	2	28
Осташ Б.О.	див. Маракасова К.С.	3	36
Патика В.П.	див. Патика Т.І.	1	56



Автори		№ вип.	№ стор.
Патика В.П.	див. Думова В.А.	2	60
Патика Н.В.	див. Думова В.А.	2	60
Патика Т.І., Патика В.П.	Токсигенні властивості ентомопатогенів <i>Bacillus thuringiensis</i>	1	56
Пащак М.	див. Шпонар Б.	3	57
Пащак М., Каспров Е., Хуанг Й., Гамян А.	Полярні ліпіди <i>Ruania albidiflava</i> — нового представника підпорядку <i>Micrococcineae</i>	3	22
Перетятко Т.Б., Гудзь С.П.	Психрофільні штами сульфатвідновлю- вальних бактерій	3	76
Підгорський В.С.	див. Мамєєва О.Г.	3	29
Підгорський В.С.	див. Співак М.Я.	1	39
Подуст В.С.	див. Зінченко О.Ю.	1	49
Позур В.В.	див. Сківка Л.М.	4	20
Поліщук В.П.	див. Гуляєва І.І.	1	77
Поліщук В.П.	див. Крулько І.В.	2	47
Поліщук В.П.	див. Столярчук І.М.	3	70
Поліщук В.П.	див. Харіна А.В.	4	58
Полтавський О.М.	див. Осадча А.І.	4	33
Пономарьова Л.П.	див. Лісютін Г.В.	1	88
Потопальський А.І.	див. Харіна А.В.	4	58
Прокопів Т.М.	див. Федорович Д.В.	3	15
Пясковська О.М.	див. Сківка Л.М.	4	20
Рачкова Л.Т.	див. Співак М.Я.	1	39
Ржевуська М.	див. Хробак Д.	3	49
Рильський О.Ф., Гвоздяк П.І.	Пригнічення пігментсинтезувальної здат- ності бактерій іонами важких металів	2	43
Романовська І.І.	див. Давиденко Т.І.	2	8
Русакова М.Ю., Галкін Б.М., Філіпова Т.О., Вострова Л.М., Гренадьо- рова М.В.	Фунгіцидна активність гідразидів фен- оксіоцтової кислоти щодо збудників прикореневої гнілі	2	69
Русин І.Б., Фігурка О.М., Фігурка У.М., Джура Н.М., Мороз О.М., Новіков В.П.	Мікробіота нафтозабрудненого ґрунту, рекультивованого рослинами <i>Carex hirta</i>	4	41
Сапура О.В.	див. Гвоздяк П.І.	4	53
Сафронова Л.А.	див. Осадча А.І.	3	63
Сафронова Л.А.	див. Осадча А.І.	4	33



Автори		№ вип.	№ стор.
Сейфулліна І.Й.	див. Зінченко О.Ю.	1	49
Сейфулліна І.Й.	див. Нікітін О.В.	4	48
Сергєєва Ж.Ю.	див. Ліманська Н.В.	4	26
Сергєєва Ж.Ю., Товкач Ф.І.	Порівняльний рестрикційний аналіз ДНК мегаплазмід і бактеріофагів <i>Erwinia carotovora</i>	2	23
Сергєєва Ж.Ю., Товкач Ф.І.	Рестрикційне картування позахромосомно- го елемента рСА25 <i>Erwinia carotovora</i>	2	66
Сибірний А.А.	див. Федорович Д.В.	3	15
Сківка Л.М., Федорчук О.Г., Пяковська О.М., Храновська Н.М., Позур В.В.	Вплив пептидоглікана <i>Staphylococcus aureus</i> Wood 46 на цитотоксичну активність мононуклеарних спленоцитів мишей	4	20
Скорупська А.	див. Вільбо Е.	3	40
Снігур Г.О.	див. Гуляєва І.І.	1	77
Співак М.Я., Підгорський В.С., Лазаренко Л.М., Шинкаренко Л.М., Коваленко Н.К., Рачкова Л.Т., Олевінська З.М.	Вплив лакто- та біфідобактерій на по- казники імунореактивності організму на експериментальній моделі	1	39
Столярчук І.М., Шевченко Т.П., Поліщук В.П., Крпінка А.В.	Протікання вірусної інфекції у різних видів рослин під впливом арбускулярної мікоризи	3	70
Товкач Ф.І.	див. Ліманська Н.В.	4	26
Товкач Ф.І.	див. Сергєєва Ж. Ю.	2	23
Товкач Ф.І.	див. Сергєєва Ж. Ю.	2	66
Федоренко В.О.	див. Грубський Я.П.	2	28
Федоренко В.О.	див. Маракасова К.С.	3	36
Федорович Д.В., Гончар М.В., Кшемінська Г.П., Прокопів Т.М., Нечай Г.І., Кашицькі П., Колочек Г., Сибірний А.А.	Механізми детоксикації хромату у дріжджів	3	15
Федорчук О.Г.	див. Сківка Л.М.	4	20
Фігел Б.	див. Шпонар Б.	3	57
Фігурка О.М.	див. Русин І.Б.	4	41
Фігурка У.М.	див. Русин І.Б.	4	41
Філіпова Т.О.	див. Зінченко О.Ю.	1	49



Автори		№ вип.	№ стор.
Філіпова Т.О.	див. Русакова М.Ю.	2	69
Філіпова Т.О.	див. Зінченко О.Ю.	4	13
Філіпова Т.О.	див. Нікітін О.В.	4	48
Харіна А.В.	див. Крулько І.В.	2	47
Харіна А.В., Кот Т.Г., Поліщук В.П., Заєць І.Є., Черватюк Н.В., Потопальський А.І.	Ізатізон як інгібітор фітовірусних інфекцій	4	58
Храновська Н.М.	див. Сківка Л.М.	4	20
Хробак Д., Кізерветтер-Свіда М., Ржевуська М., Бінек М.	Характеристика стафілокової касетної хромосоми <i>mes</i> типу у метицилін-резистентних штамів <i>Staphylococcus intermedius</i> , ізольованих від собак	3	49
Хуанг Й.	див. Пащак М.	3	22
Чайковська Л.О., Баранська М.І.	Вплив агростимуліну, емістиму С, біолану на ріст і фосфатазну активність <i>Enterobacter nimipressuralis</i> 32-3	4	70
Черватюк Н.В.	див. Харіна А.В.	4	58
Черевач Н.В.	див. Дрегваль О.А.	1	82
Шевченко Т.П.	див. Столярчук І.М.	3	70
Шинкаренко Л.М.	див. Снівак М.Я.	1	39
Шматкова Н.В.	див. Зінченко О.Ю.	1	49
Шматкова Н.В.	див. Нікітін О.В.	4	48
Шпонар Б., Пащак М., Фігел Б., Гам'ян А.	Хемотаксономічна ідентифікація штамів актинобактерій, ізольованих з уражених вологою офісних будівель	3	57
Ямборко Г.В.	див. Басюл О.В.	2	53

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.



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 15.11.2009. 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.: +38 (048) 723 28 39