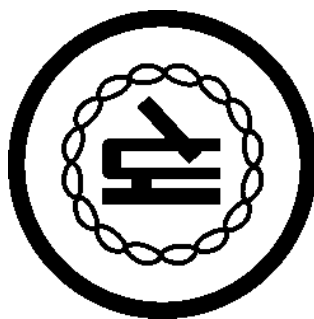


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

№ 1(2)
2008



MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

SCIENTIST JOURNAL

№ 1(2)



2008

EDITOR-IN-CHIEF

V.O. Ivanytsya

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T.O. Filipova

EXECUTIVE SECRETARY

T.V. Burlaka

EDITORIAL BOARD MEMBERS

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

Scientific editor V.O. Ivanytsya

The journal is established by

Odesa National Mechnykov University.

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

PUBLISHER

Odesa National Mechnykov University

It is approved for printing by

Academic Council of Odesa National University after I.I. Mechnykov

22.05.2008, Minutes № 8

Publishing editor *N.G. Yurgelaitis*

Editors: I.M. Omelchenko, L.B. Kotlyarova, T.Yu. Stepanova

Address:

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

Tel. 7317151, 7466391

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

www.mbt.onu.edu.ua

© Odesa National Mechnykov University, 2008

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ

№ 1(2)

•
2008

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, Ю.П. Зайцев, Г.О. Іутинська, Л.В. Капрельянц, 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

Науковий редактор випуску В.О. Іваниця

Журнал заснований

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

ВИДАВЕЦЬ

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

**Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова
22.05.2008 р., протокол № 8**

Завідувач редакцією *Н.Г. Юргелайтіс*

Редактори: І.М. Омельченко, Л.Б. Котлярова, Т.Ю. Степанова

Адреса редакції:

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна
Тел. 7317151, 7466391
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

www.mbt.onu.edu.ua

CONTENS

OBSERVATION AND THEORETICAL ARTICLES

- O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko**
BIFIDOBACTERIA AND THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES 8

EXPERIMENTAL WORKS

- L.F. Didenko, L.D. Varbanets, T.Yu. Sabirova, O.V. Serdenko,**
O.S. Brovarska, N.Ya. Spivak
MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF RHABDOVIRUSES INFECTING ANIMALS
AND PLANTS 18

- V.O. Ivanytsya, T.O. Filipova, B.M. Galkin, T.V. Gudzenko, M.Yu. Rusakova,**
T. Yu. Stepanova, T.I. Ivanytsya, N. Chanishvili, T. Barbutashvili
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS BACTERIOPHAGE EFFECT ON MACROPHAGES
FUNCTIONAL ACTIVITY 23

- O.G. Mameeva, S.S. Nagornaya, A.M. Ostapchuk, V.S. Podgorsky**
EXTRACELLULAR POLYSACCHARYDES OF YEASTS' *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS*
(SAITO) SKINNER 29

- O.A. Kovtun**
NEW TAXONS OF BENTHIC DIATOM ALGAE OF THE TILIGUL ESTUARY (THE
NORTH-WESTERN PART OF THE BLACK SEA COAST) 36

- V.V. Klochko, A.N. Ostapchuk, L.N. Butsenko, O.M. Onischenko,**
E.A. Kiprianova
FAT-ACIDIC COMPOSITION OF BACTERIA OF THE GENUS *PSYCHROBACTER*
ISOLATED FROM THE BLACK SEA WATER 44

- M.B. Gorishniy, C.P. Gudz, S.O. Hnatush**
THE GROWTH OF *CHLOROBIUM LIMICOLA* YA-2002 UNDER VARIOUS CULTIVA-
TION CONDITIONS 50

- S.G. Karakis, L.M. Karpov, E.G. Dragoeva, T.I. Lavrenjuk, V.A. Sagaric,**
V.S. Marchenko
BIOCHEMICAL BIOMASS CONTEST OF THE STRAIN OF *ARTHROSPIRA*
(*SPIRULINA*) *PLATENSIS* 58

- L.I. Sapunova**
XYLOSE ISOMERASE SYNTHESIS IN ACTINOBACTERIA *ARTHROBACTER*
UREAFACIENS BIM B-6 64

- I.I. Romanovska, O.V. Oseychuk, Yu.A. Shesterenko, O.V. Sevastyanov**
ENZYMATIC METHODS OF PHENOLIC POLLUTANTS ELIMINATION 72

- Iu.O. Pavlova, S.P. Gudz**
HYDROGEN SULFIDE UTILIZATION AND ACCUMULATION OF SULFUR IN
THIOCYSTIS SP. CELLS 79

ЗМІСТ

ОГЛЯДОВІ ТА ТЕОРЕТИЧНІ СТАТТІ

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко БІФІДОБАКТЕРІЇ І ЇХ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ.....	8
---	---

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

L.F. Didenko, L.D. Varbanets, T.Yu. Sabirova, O.V. Serdenko, O.S. Brovarska, N.Ya. Spivak MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF RHABDOVIRUSES INFECTING ANIMALS AND PLANTS	18
В.О. Іваниця, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін, Т.В. Гудзенко, М.Ю. Русакова, Т.Ю. Степанова, Т.В. Іваниця, Н. Чанішвілі, Т. Барбуташвілі ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ БАКТЕРІОФАГА <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МАКРОФАГІВ	23
О.Г. Мамеева, С.С. Нагорная, А.М. Остапчук, В.С. Подгорский ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ДРОЖЖЕЙ <i>CRYPTOCOCCUS ALBIDUS</i> (SAITO) SKINNER	29
О.А. Ковтун НОВЫЕ ТАКСОНЫ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ БЕНТОСА ТИЛИГУЛЬСКОГО ЛИМАНА (СЕВЕРО-ЗАПАДНОЕ ПРИЧЕРНОМОРЬЕ).....	36
В.В. Клочко, А.Н. Остапчук, Л.Н. Буценко, О.М. Онищенко, Е.А. Киприанова ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ РОДА <i>PSYCHROBACTER</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ ЧЕРНОГО МОРЯ.....	44
М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш РІСТ <i>CHLOROBIVM LIMICOLA</i> YA-2002 ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ.....	50
С.Г. Каракис, Л.М. Карпов, Е.Г. Драгоева, Т.И. Лавренюк, В.А. Сагариц, В.С. Марченко БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОМАССЫ ШТАММОВ <i>ARTHROSPIRA</i> (<i>SPIRULINA</i>) <i>PLATENSIS</i>	58
L.I. Sapunova XYLOSE ISOMERASE SYNTHESIS IN ACTINOBACTERIA <i>ARTHROBACTER UREAFACIENS</i> BIM B-6.....	64
І.І. Романовська, О.В. Осійчук, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов ФЕРМЕНТАТИВНІ МЕТОДИ ЕЛІМІНАЦІЇ ФЕНОЛЬНИХ ПОЛЮТАНТІВ	72
Ю.О. Павлова, С.П. Гудзь ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА НАГРОМАДЖЕННЯ ЕЛЕМЕНТНОЇ СІРКИ В КЛІТИНАХ <i>THIOCYSTIS</i> SP. YA 2006	79

M.B. Galkin, Z.I. Zhilina, Yu.V. Ishkov, M.O. Petrova, V.O. Ivanytsya
INFLUENCE OF MESO-TETRA (4-N-METHYLPYRIDIL) PORPHYRIN COMPLEX
WITH BISMUTH ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 BIOFILM
GROWTH AND FORMATION86

GLIMPSE OF HISTORY

**V.O.Ivanytsya, T.V. Burlaka, N.G. Yurgelaitis, T.V. Gudzenko,
G.A. Kozhanova, L.V. Kotlyarova**
IN MEMORY OF THE PROFESSOR V.P. TULCHYNSKA.....93

REVIEW

T.I. Leshchuk
RESUME TO THE TEACHING TEXT-BOOK: V.O. IVANYTSIYA, V.S.
PIDGORSKY, N.G. YURGELAITIS, T.V. BURLAKA, B.P. MATSELYUH,
I.G. SKRYPAL "DICTIONARY OF MICROBIOLOGICAL TERMS"..100

М.Б. Галкін, З.І. Жиліна, Ю.В. Ішков, М.О. Петрова, В.О. Іваниця
ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПІРИДИЛ) ПОРФІРИНУ З
ВІСМУТОМ НА РІСТ ТА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERU-*
GINOSA ATCC 2785386

СТОРІНКИ ІСТОРІЇ

**В.О. Іваниця, Т.В. Бурлака, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Гудзенко, Г.А. Кожанова,
Л.Б. Котлярова**
ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА В.П. ТУЛЬЧИНСЬКОЇ 93

РЕЦЕНЗІЇ

Т.Й. Лещук
РЕЦЕНЗІЯ НА НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК В.О. ІВАНИЦІ, В.С. ПІДГОРСЬКО-
ГО, Н.Г. ЮРГЕЛАЙТІС, Т.В. БУРЛАКИ, Б.П. МАЦЕЛЮХА, І.Г. СКРИПАЛЯ
“СЛОВНИК ТЕРМІНІВ У МІКРОБІОЛОГІЇ”100

УДК 576.8.095.38

О.А. Полтавська, Н.К. Коваленко

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України
вул. Заболотного, 154, Київ, Д 03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 23 29, e-mail: poltavaska@ukr.net

БІФІДОБАКТЕРІЇ І ЇХ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

В огляді наведені дані літератури та дані власних досліджень стосовно біології біфідобактерій. Викладено відомості щодо розвитку та сучасного стану таксономії біфідобактерій та фенотипових ознак цієї групи мікроорганізмів. Проведено аналіз робіт, присвячених вивченню антагоністичних та адгезивних властивостей біфідобактерій. Висвітлено питання використання біфідобактерій у складі пробіотичних препаратів.

К л ю ч о в і с л о в а: біфідобактерії, біологічні властивості, пробіотики, синбіотики.

Біфідобактерії являють собою групу бактерій, що відіграють важливу роль у життєдіяльності людини. Ця група мікроорганізмів є складовою частиною нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини і тварин. Завдяки високій і різноманітній біологічній активності біфідобактерій інтерес до цих бактерій постійно зростає.

Таксономічне положення біфідобактерій. Вперше біфідобактерії були виділені і описані Н. Tissier ще в 1900 році, який назвав виділений штам *Bacillus bifidus communis* [1]. Однак протягом досить тривалого періоду протилежність думок різних авторів [2, 3] стосовно систематики біфідобактерій стримувала встановлення таксономії цих мікроорганізмів і залишала практично не розробленою їх видову діагностику.

Значний прогрес у галузі систематики біфідобактерій почав спостерігатися у другій половині ХХ ст., після встановлення домінуючої ролі цих мікроорганізмів у складі мікрофлори ШКТ дітей, а також їх позитивного впливу на організм людини. Так, G. Reuter [4] відніс біфідобактерії до самостійного роду *Bifidobacterium* Orla-Jensen. Були виділені і описані нові види цього роду: з кишечника людини – *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactentis*, *B. liberorum*, *B. longum*, *B. parvulorum*, від бджіл – *B. asteroides*, *B. coryneforme*, *B. indicum*, з рубця великої рогатої худоби – *B. globosum* і *B. ruminale* [5].

З розвитком молекулярно-генетичних методів і з застосуванням їх у систематиці мікроорганізмів удосконалювалась і таксономія біфідобактерій [6], що дозволило



розробити їх класифікацію. Була розширена фенотипова характеристика, проведені дослідження геному біфідобактерій, визначено нуклеотидний склад ДНК і застосовано метод гібридизації ДНК-ДНК, що дозволило удосконалити класифікацію і виявити нові види бактерій роду *Bifidobacterium* – *B. dentium*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*. У 1986 р. у 9-му виданні „Керівництва по визначенню бактерій” Бергі рід *Bifidobacterium* був включений в 15-ту частину “Irregular nonspornging gram-positive rods” («Грампозитивні неспороутворюючі палички неправильної форми») без об’єднання в будь-яку родину і містив вже 24 види з типовим видом *Bifidobacterium bifidum* [5].

За останні часи після опублікування 9-го „Керівництва по визначенню бактерій” Бергі на основі аналізу даних про послідовність рДНК були запропоновані види: *B. gallicum*, *B. scardovii*, *B. inopinatum*, *B. denticolens*, [7, 8], *B. thermacidophilum* [9, 10], *B. psychraophilum* [11] та ін. Крім того, Р. J. Simpson зі співавт. на основі даних послідовності гену 16s рРНК запропонували створити новий рід *Aeriscardovia* (типовий вид – *A. aeriphila*), а китайські вчені V. Jian та X. Dong описали 2 нових роди біфідобактерій: *Scardovia* (*S. inopinata*) та *Parascardovia* (*P. denticolens*) [11, 12].

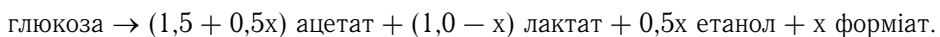
Застосування сучасних методів дослідження на молекулярному рівні дозволило підійти з позиції філогенії до розуміння місця біфідобактерій серед інших бактерій. E. Stackebrandt зі співавт. [13], підсумовуючи отримані раніше дані аналізу будови 16S гену рибосомної РНК, запропонували нову класифікаційну структуру біфідобактерій, де вони відносяться до класу *Actinobacteria*, порядку *Bifidobacteriales*, і утворюють родину *Bifidobacteriaceae*, типовий рід – *Bifidobacterium*.

Таким чином, на даний час описано 31 вид біфідобактерій, які в останні роки були доповнені трьома новими родами.

Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості біфідобактерій.

Біфідобактерії – це варіабельні за морфологією палички. Питання їх плеоморфізму привертало увагу багатьох дослідників. Так, А. С. Наувард зі співавт. відмічали посилення розгалуження і утворення набряклих, інволюційних, кулеподібних форм біфідобактерій в несприятливих умовах поживного середовища, а саме: занадто висока або низька кислотність середовища, температура вирощування, присутність кисню [14]. V. Sundman і K. Bjorksten в результаті проведених досліджень зробили висновок, що хоча біфідобактерії мають тенденцію до плеоморфізму при рості *in vitro*, але вони у більшості паличкоподібні у природному для них середовищі. Автори припускають, що біфідобактерії мають більш складний шлях синтезу клітинної стінки, ніж інші мікроорганізми [15].

Біфідобактерії – хемоорганогетеротрофи. V. Scardovi, W. de Vries зі співавт. [5, 16] було показано, що ця група бактерій зброджує вуглеводи за фруктозо-6-фосфатним шунтом. Баланс ферментації можна виразити наступним рівнянням:



Слід зазначити, що відкриття у біфідобактерій такого особливого типу метаболізму було однією з вагомих причин для відокремлення їх від роду *Lactobacillus*.

Масляну і пропіонову кислоти біфідобактерії не утворюють. Каталазонегативні, а в деяких випадках позитивні під час росту в атмосфері повітря з додаванням CO₂. Не утворюють H₂S, не відновлюють нітрати в нітрیتی, не мають уреазної активності, не розріджують желатин. Оптимальна температура для росту більшості видів біфідобактерій 37 – 41 °С.



Потреби біфідобактерій у поживних речовинах великі і різноманітні. J.B. Hassinen зі співавт. показали, що ці мікроорганізми потребують біотину, рибофлавіну, пантотенової кислоти, пуринових і піримідинових основ, пептидів, цистеїну, аміноцукрів [17]. В той же час деякі біфідобактерії самі здатні синтезувати ряд вітамінів: пантотенову кислоту, рибофлавін, тіамін, фолієву кислоту, кобаламін [18].

Протягом всього періоду вивчення біології біфідобактерій, що супроводжувався відкриттям нових видів і дослідженням їх властивостей, між дослідниками цих мікроорганізмів велися суперечки у питанні відношення їх до кисню. Літературні відомості про здатність біфідобактерій рости в присутності кисню є суперечливими і дотепер. Так, Norris зі співавт. відмічали різницю в потребі атмосферного CO₂ при вирощуванні біфідобактерій на твердому або в рідкому середовищах [19]. Mayer зі співавт. [20] показали, що біфідобактерії є анаеробними мікроорганізмами, а також виявили існування різних причин анаеробіозу для різних штамів біфідобактерій.

Згідно літературних джерел, місцем існування біфідобактерій є, в основному, організм людини і тварин. За даними 9-го видання „Керівництва по визначенню бактерій” Бергі [5], майже третина видів роду *Bifidobacterium* є мешканцями ШКТ людини, причому найчастіше зустрічаються *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis* та *B. breve*. У вагінальному вмісті V. Scardovi, L.D. Trovatelli виявляли *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve* [5].

Біфідобактерії були виявлені і у ШКТ свиней, великої рогатої худоби, собак, мавп, кролів, мишей, курчат [5]. Поодинокі дані вказують, що ці мікроорганізми зустрічаються в травному тракті бджіл (*B. asteroides*, *B. corineforme* та *B. indicum*) [5, 21]. В останні роки з'явилися відомості про існування біфідобактерій у травному тракті дельфінів [21, 22].

Біологічна активність біфідобактерій. Оздоровча дія нормальної мікрофлори, і зокрема біфідобактерій, на макроорганізм відома досить давно. І.І. Мечников і Н. Tissier ще в 1905 році відмічали позитивну динаміку у стані здоров'я пацієнтів при застосуванні живих культур молочнокислих бактерій і використовували їх при лікуванні хворих з кишковими дисфункціями [18]. Активне вивчення механізмів такого позитивного впливу розпочалося лише у другій половині ХХ століття.

Для обґрунтування важливості біфідобактерій для життєдіяльності людини, проводилися дослідження з вивчення впливу цих бактерій на умовно патогенні мікроорганізми. Одним з перших було повідомлення [20], в якому показано інгібуючий ефект *Lactobacillus bifidus var. pennsylvanicus* на ріст *E. coli*. В досліді з мишами-гнотобіонтами було виявлено, що біфідобактерії здатні пригнічувати розмноження *Salmonella typhimurium* [18]. При вивченні кишкових інфекцій у новонароджених відмічалася значно менша кількість випадків цих захворювань у немовлят, що харчувалися виключно грудним молоком, причому у фекаліях цих дітей домінуючими мікроорганізмами були біфідобактерії [20].

В літературі досить повно відображені дослідження антагоністичної дії біфідобактерій на збудників багатьох гострих та хронічних розладів — *Escherichia coli* зі слабо вираженими ферментативними властивостями; *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, дріжджеподібні гриби роду *Candida*, *Clostridium*, *Bacillus*, та ін. [23, 24, 25, 26]. Здатність біфідобактерій пригнічувати ріст небажаної мікрофлори довгий час пояснювалася лише дією оцтової та молочної кислот — кінцевих продуктів метаболізму цих мікроорганізмів [16]. В подальшому в науковій літературі з'явилися повідомлення про інші механізми антагоністичної дії біфідобактерій



з метою захисту макроорганізму від патогенних бактерій. Зокрема, F. Abe, M.-F. Bernet, R. Fuller, G. Gibson в експериментах з культурами клітин показали, що біфідобактерії здатні ефективно конкурувати з патогенними мікроорганізмами за сайти адгезії на епітеліальних клітинах макроорганізму, тим самим забезпечувати, так звану, колонізаційну резистентність [27, 28, 29, 30]. В дослідженні G. Reid зі співавт. *in vitro* було показано, що біфідобактерії здатні прикріплюватися і до клітин самих патогенів [31]. Автори роблять припущення, що в умовах кишечника біфідобактерії, прикріплюючись до патогенних мікроорганізмів, запобігають адгезії останніх до ентероцитів, що сприяє швидкій їх елімінації.

Існують літературні відомості про антагоністичну активність нормофлори кишечника, яка обумовлена не лише дією органічних кислот, а і здатністю синтезувати специфічні антимікробні речовини. Ряду дослідників вдалося виявити у деяких представників молочнокислих бактерій явище специфічного антимікробного антагонізму і показати, що вони синтезують антибіотики [32]. Стосовно біфідобактерій існують лише поодинокі відомості про здатність продукувати специфічні антимікробні речовини. В наших дослідженнях було показано, що антагоністичні властивості біфідобактерій також обумовлені продукуванням специфічних антимікробних речовин [33]. Z. Yildirim зі співавт [34] описали бактеріоцин, який отримав назву біфідоцин В, зі штаму *B. bifidum* NCFB 1454. Цей бактеріоцин пригнічував ріст бактерій родів *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus*. R. Toure зі співавт. [35] отримали стійкі до нагрівання білкові сполуки, що продукували 4 штами біфідобактерій, виділені від дітей. Дані сполуки пригнічували ріст *Listeria monocytogenes*. Питання існування специфічних антимікробних речовин біфідобактерій потребує подальших досліджень.

Здатність біфідобактерій прикріплюватися до епітеліоцитів відіграє велику роль в їх колонізації ШКТ, запобігаючи швидкій їх елімінації перистальтикою кишечника. Цей фактор забезпечує біфідобактеріям конкурентноспроможність у даній екосистемі. Завдяки позитивному впливу біфідобактерій на життєдіяльність макроорганізму, в останні роки з'явилися роботи, присвячені пошуку високоадгезивних штамів цих бактерій [28, 29, 30, 36]. Відомо, що клітинна адгезія — це багатостадійний процес, який включає в себе контакт клітини з поверхнею епітелію, і він залежить від складу і структури клітинної стінки, а також поверхні, з якою вона взаємодіє [37]. Поодинокі дослідження механізмів адгезії біфідобактерій до клітин макроорганізму дозволили виявити деякі фактори, що приймають участь у процесі адгезії. Так, P.F. Peretz зі співавт. [38] показали, що гідрофобність і дзета-потенціал поверхні клітини впливають на процеси аутоагрегації і гемаглютинації у штамів біфідобактерій, ізолюваних від людини. Крім того, автори відмічали підвищення адгезивної активності при зниженні рН від 7,0 до 2,0. В. Del Re зі співавт. [39] виявили кореляцію між аутоагрегацією клітин *B. suis*, гідрофобністю їх клітинних поверхонь та адгезією до ентероцитів свині. Аналогічні дані з 13-ма штамми *B. longum*, виділеними від людини, підтвердили попередні результати, і було висловлено думку, що процес аутоагрегації є необхідною складовою адгезивного процесу у кишечнику макроорганізму [39].

Ф. Не зі співавт. [40] досліджували здатність біфідобактерій, ізолюваних з різних природних джерел, адгезуватись до іммобілізованих глікопротеїнів слизової оболонки кишечника. Було з'ясовано, що всі досліджувані штами адгезувались до глікопротеїнів обох типів, причому адгезивна активність штамів, ізолюваних від людини, була більш специфічною до глікопротеїнів кишечника людини. У штамів,



ізолюваних з інших природних джерел, такої специфічності не спостерігалось. Цей факт свідчить про те, що слід ретельніше підходити до вибору моделі епітеліоцитів під час добору високоадгезивних штамів для створення пробіотиків для людини.

Таким чином, літературні дані свідчать, що адгезивна активність біфідобактерій залежить як від самого штаму, так і від метаболізму епітеліоцитів макроорганізму. На здатність біфідобактерій прикріплюватися впливають умови середовища, властивості клітинної поверхні та ін.

На увагу заслуговують нові дані G.R. Gibson відносно метаболізму біфідобактерій. Останні розкладають в кишечнику речовини, які не можуть засвоюватись організмом хазяїна, на більш прості, включаючи нерозчинний крохмаль, складні вуглеводи, олігоцукриди, протеїни і муцин [30]. В результаті цього метаболізму як кінцеві продукти утворюються в основному коротколанцюгові жирні кислоти, такі як лактат, ацетат, які необхідні для щоденних енергетичних потреб макроорганізму. В товстій кишці людини біфідобактерії синтезують вітаміни — тіамін, рибофлавін та вітамін К, які потім поглинаються організмом хазяїна [41]. За даними С.А. Шевельової, біфідобактерії синтезують і транспортують між клітинами до 120,3 мг вітамінів групи В [42]. S. Bengmark зі співавт. показали, що біфідобактерії також можуть синтезувати деякі екзогенні амінокислоти: аргінін, глютамін та ін. [43]. Крім того, авторами було доведено, що адаптація травного тракту до біфідних культур покращує вміст азоту при підвищенні вмісту вітаміну В₆.

Пробіотичні продукти. В останні роки, завдяки біологічній активності біфідобактерій, їх роль для здоров'я і життєдіяльності макроорганізму є загально визнаною і постійно привертає увагу дослідників. Особливу роль з наукової точки зору відіграють штами, що мають підвищену фізіологічну активність, антиоксидантні властивості, здатність активно пригнічувати ріст небажаних мікроорганізмів, високу адгезивну активність. Такі штами мікроорганізмів отримали назву пробіотичних. Термін “пробіотик” походить від грецького слова і означає “для життя”. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначає пробіотики як “живі мікроорганізми, які проявляють свої позитивні властивості на макроорганізм” [44].

Пробіотичні мікроорганізми є нормальними мешканцями кишечника здорової людини. Частіше це біфідобактерії, лактобактерії, деякі дріжджі та ін. [45]. В відомих пробіотичних препаратах вони використовуються як складові монокультур, так і як окремі штами біфідобактерій в асоціації з іншими видами мікроорганізмів. До їх складу найчастіше входять *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. breve* [46].

В останні роки в науковій літературі і в офіційних документах, що мають відношення до проблем збереження балансу нормальної мікрофлори, приділяється велика увага пробіотичним мікроорганізмам. Вони широко застосовуються у лікуванні і профілактиці багатьох дисфункцій фізіологічних систем людини.

Перш за все, вони використовуються у лікуванні кишкових інфекцій у немовлят. За даними G. Reid зі співавт. [31], такі збудники інфекцій, як *Clostridium*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* та ін. збільшують ризик некротичного ентероколіту. Одними з перших почали ефективно застосовувати пробіотики, зокрема «Біфідумбактерин», для лікування кишкових захворювань немовлят Г.І. Гончарова зі співавт. [47]. В дослідженнях різних авторів показано, що колонізація кишечника немовлят біфідобактеріями при кишкових інфекціях, знижує ризик виникнення у них некротичного ентероколіту, а біфідобактерії пригнічують ріст патогенних мікроорганізмів не лише шляхом колонізаційної резистентності. Вони також знижують ендотоксемію й індукують запальний каскад [48, 49].



Біфідопрепарати є ефективними при лікуванні і профілактиці гастроентеритів після антибактеріальної терапії. Застосування пробіотиків в комбінації зі звичайною антибіотикотерапією знижує ризик виникнення дисбактеріозів різної етіології. Але в цьому випадку штам-пробіотик має бути нечутливим до використаного антибіотика [31].

Здатність біфідобактерій знижувати рівень α -глюкуронідази і канцерогенних речовин є причиною зменшення ризику виникнення раку при застосуванні цих мікроорганізмів [50]. L. Pei-Rep зі співавт. виявили, що в реакції антимутагенезу у штамів *B. lactis* Bb-12 і *B. longum* CCRC 14634 приймає участь в основному клітинна стінка біфідобактерій, зв'язуючи мутагенний фактор [51]. V.I. Chalova зі співавт. показали, що такий антимутагенний ефект залежить від фази росту цих мікроорганізмів, а також самого мутагену [52].

Біфідобактерії здатні знижувати рівень сироваткового холестерину. D.I.A. Pereira, G.R. Gibson спостерігали *in vitro* зниження вмісту холестерину в культуральній рідині штаму *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 [30, 53]. Механізмом такого зниження холестерину автори вважають зв'язування останнього клітинною стінкою бактерій.

Останнім часом біфідобактерії почали ефективно застосовувати у профілактиці і лікуванні урогенітальних інфекцій. Так, В.Ф. Долгушина [54] показала ефективність прийому біфідумбактерину у лікуванні вагінозів бактеріальної етіології у вагітних жінок.

Згідно вимогам ВОЗ, пробіотиками називаються лише ті препарати, що відповідають критеріям відбору штамів: вони повинні бути чітко ідентифікованими, не патогенними, не токсичними, міститися в достатній кількості (не менше 10^6 КУО/мл), зберігати життєздатність при проходженні через весь ШКТ та при зберіганні [45], повинні проявляти високу антагоністичну активність проти патогенних мікроорганізмів та мати здатність адгезуватись на клітинах епітелію макроорганізму.

На теперішній час все більше привертає увагу розробка синбіотичних препаратів, які являють собою суміш пробіотиків та пребіотиків [46]. Останні являють собою біологічно активні добавки. Пребіотики активізують метаболічні процеси у макроорганізмі, і завдяки вибірковій стимуляції росту пробіотичних культур сприяють прояву антагонізму по відношенню до патогенної і умовно патогенної мікрофлори, і таким чином захищають організм від проникнення збудників інфекції. Численні дослідження свідчать про те, що синбіотики чинять корисний вплив на здоров'я людини і вибірково стимулюють ріст і функціональну активність пробіотиків, як тих, що надходять з продуктами, так і власних, що населяють організм хазяїна. Синбіотичні препарати сприяють проявленню імуногенних властивостей корисних мікроорганізмів за рахунок збільшення продукування ними бактеріальних метаболітів з імуномодельючими властивостями (пептидоглікани, ліпополіцукриди, тейхоеві кислоти), а також, стимулювання нормальної мікрофлори, яка посилює клітинний імунітет [55].

Таким чином, аналіз літературних даних показує, що біфідобактерії представляють самостійну групу мікроорганізмів, об'єднану в рід *Bifidobacterium*. Таксономічне положення представників цього роду визначається на основі морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних властивостей, а також з використанням молекулярно-генетичних методів. Біфідобактерії відіграють важливу роль в організмі людини і тварин завдяки широкому спектру біологічної активності. Оздоровчий вплив їх на макроорганізм переконливо встановлений.



ЛІТЕРАТУРА

1. Tissier H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique) // Paris Theses. — 1900. — #1. — P. 1-253.
2. Guarner F., Malagelada J.-R. Gut flora in health and disease // Lancet. — 2003. — Vol.361, #9356. — P. 512-519.
3. Cummings J.H., Mac Farlane G.T. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism // Clinical nutrition. — 1997. — Vol.16, #1. — P. 3-11.
4. Reuter G. Designation of type strains for *Bifidobacterium* species // Int. Journ. Syst. Bacteriol. — 1971. — Vol.21, #4. — P. 273-275.
5. Scardovi V. Genus *Bifidobacterium*. Orla-Jensen // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt. — Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. — P. 1418-1434.
6. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф. Геносистематика бактерий. — М.: Наука, 1976. — 151 с.
7. Crociani F., Biavati B., Alessandrini A. et al. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 1996. — Vol.46, #2. — P. 564-571.
8. Hoyles L., Inganas E., Falsen E. et al. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — Vol.52, #1. — P. 995-999.
9. Dong X., Xin Y., Jian W. et al. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from anaerobic digester // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2000. — Vol.50, #1. — P. 119-125.
10. Zhu L., Li W., Dong X. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HS60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* sbsp. *porcinum* sbsp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2003. — Vol.53, #6. — P. 1619-1623.
11. Simpson P.J., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. *Bifidobacterium psychrophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2004. — Vol.54, #2. — P. 401-406.
12. Jian W., Dong X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov. and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — Vol.56, #4. — P. 809-812.
13. Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1997. — Vol.47, #10. — P. 4479-4491.
14. Hayward A.C., Hale C.M.F., Bisset K.A. The morphology and relationships of *Lactobacillus bifidus* // J. Gen. Microbiol. — 1955. — Vol.13, #2. — P. 292-294.
15. Sundman V., Bjorksten K. The globular involution forms of the bifid bacteria // J. Gen. Microbiol. — 1958. — Vol.19, #1. — P. 491-496.
16. Vries W., Stouthamer A.H. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria // J. Bacteriol. — 1967. — Vol.93, #5. — P. 574-576.
17. Hassinen J.B., Durbin G.T., Tomarelli R.M., Bernhart F.W. The minimal nutrition requirements of *Lactobacillus bifidus* // J. Bacteriol. — 1951. — Vol.13, #2. — P. 292-294.
18. Biavatti B., Vescovo M., Torriani S., Botazzi V. Bifidobacteria: ecology, physiology and applications // Ann. Microb. — 2000. — Vol.50, #1. — P. 117-131.
19. Norris R.F., Flanders T., Tomarelli R.M., Gyorgy P. Occurrence of mucoid variant of *Lactobacillus bifidus* (Tissier). A comparison of branched and unbranched strains // J. Bacteriol. — 1950. — Vol.60, #9. — P. 681-696.
20. Poupard J.A., Husain I., Norris R.F. Biology of the Bifidobacteria // Bacteriol. Rew. — 1973. — #6. — P. 136-165.
21. Полтавська О.А. Біологічні властивості біфідобактерій, ізольованих з різних природних джерел: Автореф. дис... канд. біол. наук: 03.00.07 / Ін-т мікробіол. вірусол. — Київ, 2006. — 21 с.
22. Коваленко Н.К., Полтавська О.А. Адгезивні властивості біфідобактерій // Вісник Одеського націонал. університету. — 2005. — Т.10, №7. — С. 117-124.
23. Ганина В.И., Лысенко А.М., Гуреева Ю.В. и др. Изучение антагонистической активности и идентификация бифидобактерий и молочнокислых палочек, рекомендуемых для получения продуктов лечебно-профилактического назначения и пробиотиков // Биотехнология. — 1999. — №2. — С. 15-21.



24. Коршунов В.М., Уртаева З.А., Смянов В.В. и др. Изучение антагонистической активности бифидобактерий *in vitro* и *in vivo* с использованием гнотобиологической технологии // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. — 1999. — №5. — С. 72-77.
25. Мурашева А.О., Новокшенов А.А., Учайкин В.Ф. Эффективность применения бифидоцефа для лечения острых кишечных инфекций и коррекции дисбиоза у детей // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. — 1994. — №6. — С. 53-56.
26. Ibrahim S.A., Bezkorovainy A. Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria // J. Food Protection. — 1993. — Vol.56, #1. — P. 713-715.
27. Abe F., Mamose H., Igarashi M., et al. The effect of administration of Bifidobacteria on the intestinal flora and growth of newborn piglets // J. Gen. Appl. Microbiol. — 1996. — Vol.42, #1. — P. 257-262.
28. Bernet M.-F., Brassart D., Neeser J.-R., Servin A.L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interaction // Appl. Environ. Microbiol. — 1993. — Vol.59, #6. — P. 4121-4128.
29. Fuller R. Probiotics in man and animals // J. Appl. Bacteriol. — 1989. — Vol.66, #1. — P. 365-378.
30. Gibson G.R., Rastall R.A. Gastrointestinal infection and the protective role of probiotics and prebiotics // Food Science and Technology Bulletin. — 2003. — #1. — P. 35-52.
31. Reid G., Jass J., Sebulsy M.T., McCormic J.K. Potential uses probiotics in clinical practice // Cur. Microbiol. Rew. — 2003. — Vol.16, #4. — P. 658-672.
32. Bernet-Camard M.-F., Lievin V., Hemery E., Brassart D. et al. The probiotic human *Lactobacillus acidophilus* strain La1 secretes antibacterial substances active *in vitro* and *in vivo* // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — Vol.63, #5. — P. 2747-2753.
33. Полтавська О.А., Коваленко Н.К. Антагоністичні властивості біфідобактерій, ізолюваних з різних природних джерел // Мікроб. журнал.-2004. — №6. — С. 70-79.
34. Yildirim Z., Jonson M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454 // J. Food Protection. — 1998. — Vol.61, #1. — P. 47-51.
35. Toure R., Kheadr E., Lacroix C. et al. Producton of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes* // J. Appl. Microbiol. — 2003. — Vol.95, #2. — P. 1058-1069.
36. Crittenden R., Laitila A., Forsell P. et al. Adhesion of Bifidobacteria to granular starch and its implication in probiotics technology // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol.67, #8. — P. 3469-3475.
37. Op de Camp H.J.M., Oosterhof A., Veerkamp J.H. Interaction of bifidobacterial lipoteichoic acid with human intestinal epithelial cells // Infect. Immun. — 1984. — Vol.47, #3. — P. 332-334.
38. Peretz P.F., Minnaard J., Disalvo E.A., Antoni G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin // Appl. Environ. Microbiol. — 1998. — Vol.64, #1. — P. 21-26.
39. Re del B., Busetto A., Vignola G. et al. Autoaggregation and adhesion abilities in a *Bifidobacterium suis* strain // Letters in Applied Microbiology. — 1998. — Vol.27, #1. — P. 307-310.
40. He F., Ouwehand A.C., Hashimoto H. et al. Adhesion of *Bifidobacterium* spp. to human intestinal mucus // Microb. Immunol. — 2001. — Vol.45, #3. — P. 259-262.
41. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. — М.: Наука, 1975. — 384 с.
42. Шевелева С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопр. питания. — 1999. — №2. — С. 32-40.
43. Bengmark S. Colonic food: pre- and probiotics // Am. J. of Gastroenterol. — 2000. — Vol.95, #1(suppl). — P. S5-S7.
44. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria / Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. — Amerian Cyrdoba Park Hotel, 2001. — P. 1-34.
45. Guidelines for the evaluation of probiotics in food // Report of Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. — London, 2002. — P. 3-56.
46. Коваленко Н.К., Полтавська О.А. Вплив пребіотиків на ріст біфідобактерій і лактобактерій // Науковий вісник Чернівецького університету. — 2004. — №194. — С. 37-41.
47. Гончарова Г.И., Козлова Е.П., Лянная А.М., Зацепин Ю.К. Новый советский препарат, сухой бифидобактерин и его эффективность при кишечных заболеваниях у детей // Педиатр. акуш. гинек. — 1974. — №4. — С. 22-23.

48. Caplan M.S., Jilling T. Neonatal necrotizing enterocolitis: possible role of probiotic supplementation // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* — 2000. — Vol.30, #2(Supl.). — P. S18-S22.
49. Martino D.J., Currie H., Taylor A., Conway P., Prescott S.L. Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. // *Clin Exp Allergy* — 2008. — Vol. 38, #1. P.69-78.
50. Arimochi H., Kinouchi T., Kataoka K. et al. Effect of intestinal microflora on formation of azoximethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon // *Biochem Biophys. Res. Commun.* — 1997. — Vol. 238, #2. — P. 753-757.
51. Pei-Ren L., Roch-Chui Y., Cheng-Chung C., Ya-Hui T. Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo[a]pyrene // *J. Biosc. Bioeng.* — 2002. — Vol.94, #2. — P. 148-153.
52. Chalova V.I., Lingbeck J.M., Kwon Y.M., Ricke S.C. Extracellular antimutagenic activities of selected probiotic Bifidobacterium and Lactobacillus spp. as a function of growth phase. // *J. Environ. Sci. Health B.* — 2008. — Vol. 43, #2. P.193-198.
53. Pereira D.I.A., Gibson G.R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human gut // *Appl. Envir. Microbiol.* — 2002. — Vol.68, #9. — P.4689-4693.
54. Долгушина В.Ф. Изучение иммунокорректирующих свойств бактериальных препаратов (лактобактерина, бифидумбактерина) и бемитила у беременных с урогенитальной инфекцией // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол.* — 1991. — №4. — С. 56-58.
55. Casiraghi M.C., Canzi E., Zanchi R., Donati E., Villa L. Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem. // *J. Appl. Microbiol.* — 2007.- Vol.103, #2. — P.499-506.

О.А. Полтавская, Н.К. Коваленко

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, Д 03680, Украина, тел.: 8 (044) 526 23 29, e-mail: poltavska@ukr.net

БИФИДОБАКТЕРИИ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Реферат

В обзоре представлены данные литературы и собственных исследований, касающиеся изучения биологии бифидобактерий. Изложены сведения о развитии и современном состоянии таксономии бифидобактерий и о фенотипических признаках этой группы микроорганизмов. Проведен анализ работ, посвященных изучению антагонистических, адгезивных свойств бифидобактерий. Освещен вопрос использования бифидобактерий в составе пробиотических препаратов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бифидобактерии, биологические свойства, пробиотики, синбиотики.



O.A. Poltavska, N.K. Kovalenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, 154 Zabolotnogo Str., Kyiv, D 03680, Ukraine, тел.: 8 (044) 526 23 29, e-mail: poltavska@ukr.net

BIFIDOBACTERIA AND THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

Summary

Literature data, concerning the study of bifidobacterial biology are represented in the review. The information about development and modern condition of bifidobacterial taxonomy and about phenotypic characters of this group of microorganisms is expounded. The analysis of the studies described the investigation of antagonistic, adhesive properties of bifidobacteria is conducted. The question of the use of bifidobacteria in composition of probiotic preparations is taken up.

Key words: bifidobacteria, biological properties, probiotics, synbiotics.



**L.F. Didenko, L.D. Varbanets, T.Yu. Sabirova, O.V. Serdenko,
O.S. Brovarska, N.Ya. Spivak**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Zabolotny
str.154, Kiev, 03187, Ukraine, tel.: 8 (044) 526 94 25,
e-mail: spivak@serv.imv.kiev.ua

MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF RHABDOVIRUSES INFECTING ANIMALS AND PLANTS

Comparative studies of plant and animal rhabdoviruses are of great importance because of their similar structural organization, morphological characters and functional properties of their components. Rhabdoviruses differ from plus-genome viruses, because in addition to their minus-RNA chain and multifunctional proteins, they contain also fatty acids and carbohydrates.

K e y w o r d s: carbohydrates, rhabdoviruses, vesicular stomatitis virus, curly potato dwarf virus, spot sweetflag virus.

Carbohydrate component of viral glycoproteins plays the leading role in the virus genome expression. Rhabdoviruses contain 3 % of carbohydrates. They are presented by N-glycan chains on the surface G-protein as well as by glycolipids (1, 2). G-protein function due to its association with specific monosaccharides determines to certain degree its properties; the most important G-protein property is peplomer formation on the virion surface, the peplomers being, in their turn responsible for virus binding to its host cell receptors (3). Besides, the carbohydrate roles in virus life cycle includes the glycoprotein transport to the cell surface and its intracellular migration (4), as well as carbohydrate participation in the formation and establishment of glycoproteins conformation necessary to assure their immunological properties; carbohydrates defend glycoprotein polypeptide chains against their non-specific cleavage by cell proteinases (5). Many laboratories investigate the different properties and the role of glycoproteins contained by vertebrates (6, 7) and plants (8).

The importance of such investigations is without any doubt because of increasing interest in biological evolution and properties of Rhabdoviridae family members infecting plants and animals. Taking into account these considerations, we have carried out the comparative study concerning detection and identification of carbohydrates contained by phytorhabdoviruses – curly potato dwarf virus (CPDV) and spot sweetflag virus (SSV), as well as by an animal rhabdovirus – causative agent of vesicular stomatitis (vesicular stomatitis virus, VSV).

©L.F. Didenko, L.D. Varbanets, T.Yu. Sabirova, O.V. Serdenko, O.S. Brovarska, N.Ya. Spivak, 2008



Materials and methods

Isolation of viruses. Phytorhabdoviruses — curly potato dwarf virus (CPDV) and spot sweetflag virus (SSV) — were isolated from infected *Nicotiana rustica* tissues using PEG-6000 and differential centrifugation (7).

VSV was cultivated in the cells of embryonal piglet testicles; a purified virus preparation was obtained according to Dalton and Rose (8).

Carbohydrate identification. To identify neutral monosaccharides, the virus preparations were hydrolyzed by 2 N HCl during 5 h at 100 °C and then analyzed as polyol-acetates in a chromatomass-spectrometric Agilent 6890N/5973 inert system. A column PB225mS used had the parameters 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; the carrier gas, helium, was flowed through the column (1 ml/µm). The temperatures were 250 °C, 280 °C, and 22 °C for evaporator, interface, and thermostat, respectively, the process having been carried out in isothermal conditions.

The test was conducted by the division of the stream 1:100. The identification of monosaccharides was made by comparing of retention time for different polyol-acetates of samples tested and standard ones using the computer data base Chemstation. The quantitative ratios of individual monosaccharides were determined as percents from the amount of the peak areas of all monosaccharides.

To evaluate the aminosugar content, 1 mg of preparation was hydrolyzed by 6 N HCl (20 h, 100 °C). A hydrolyzate obtained was centrifuged and vacuum-evaporated. Aminosugars were determined by using of the amino acid analyzer KLA-5 (“Hitachi”, Japan) using a column (0.9x15cm) containing “Ostion 0803” cation-exchanger in the sodium-citrate buffer, pH 5.28, at 55 °C. The quantitative glucosamine and galactosamine determination was carried out following the sample hydrolysis by 2 N CF₃CO₂H (1.5h, 120 °C) using Agilent 6890N/5973 inert system.

Results and discussion

The qualitative and quantitative monosaccharide contents in glycoproteins of viruses grown in animal cells, VSV, and plant ones — CPDV and SSV have been investigated.

The envelope structures of all three rhabdoviruses CPDV, SSV, and VSV were shown to contain monosaccharides, their contents being varied depending on the virus studied (Table 1).

Identifying monosaccharides contained by the CPDV we found out glucose (35.2 %) and mannose (23.8 %) to be dominant CPDV monosaccharides. In addition, this virus contains also galactose, arabinose, fucose, and rhamnose.

The carbohydrate component of the SSV was shown to include something different monosaccharide content. Its monosaccharides were glucose (25,3 %), galactose (18,3 %), arabinose (16 %), rhamnose (3,1 %), mannose (2,32 %), and fucose (3,98 %).

Sometimes we found out also ribose in several hydrolyzate preparations, its detection being due to the ribose presence in rhabdoviral RNA molecules.

Rhabdoviruses possess a very wide host range, their surface glycoproteins include carbohydrates of different cell origin leading to marked differences in monosaccharide contents of these pathogenic agents. That is why it is interesting to compare carbohydrate compounds included into CPDV and SSV particles, these agents being

reproduced in the same host, *Nicotiana rustica*. CPDV and SSV were shown to contain identical monosaccharides, their quantitative ratios being, however, markedly different.

The results obtained show the highest glucose content (35,2 %) is found for the CPDV. Contrary to the CDPV, the SSV contains lower quantity of this compound – 25,3 %.

The quantities of arabinose found in the CPDV and SSV are 10,4 % and 16 %, respectively. Phytorhabdoviruses contain also rhamnose, its quantities being 3,1 % and 9,7 % for the SSV and CPDV, respectively. Mannose is a dominating CPDV monosaccharide (23,8 %), its content in the SSV is significantly lower (2,32 %).

Besides, fucose was also identified in these viruses, its quantities being 8,6 % and 3,98 % for the CPDV and SSV, respectively.

Galactose levels in these agents are 12,3 % (in CPDV virions) and 18,3 % (in SSV particles). The presence of identical carbohydrates in phytorhabdoviruses infecting the same host demonstrates the viral carbohydrate structures to be predetermined by the host cell enzymatic systems (11). However, there is a point of view the virus is able to transform in some way the host cell glycosyltransferases (12). It is quite possible the cell glycosyltransferases modified by the viral infection may induce some changes concerning monosaccharide quantitative ratios in the cells and, consequently, in the virus particles.

Comparing monosaccharide contents of the VSV (an animal virus) and phytorhabdoviruses, CPDV and SSV, it was detected, the VSV contained much higher quantities of the mannose – 58,5 %; it is almost twice as much as for the CPDV (23,8 %) and about by 20 times more than in the SSV (2,32 %). The glucose contents are almost similar for the VSV (21 %) and for the SSV (25,3 %); VSV, however, contain less glucose quantity than the CPDV (35,2 %). The SSV contains also higher quantities of galactose 18,3 % and arabinose 16 % comparing to the CDPV, the last includes 12,3 and 10,4 % of these compounds, respectively. The fucose content of the VSV (3,7 %) is the same to the SSV (3,98 %), being, however, lower than in the CDPV (8,6 %). It is noteworthy there is no rhamnose in the VSV envelope, the SSV containing 3,1 % and the CDPV – 9,7 % of this monosaccharide.

Table 1

Comparative analyses of viral monosaccharides (%)

Monosaccharides	CPDV	SSV	VSV
Glucose	35,2	25,3	21,0
Mannose	23,8	2,32	58,5
Galactose	12,3	18,3	3,8
Arabinose	10,4	16,0	2,7
Fucose	8,6	3,98	3,7
Rhamnose	9,7	3,1	

All the viruses studied here include also, in addition to neutral monosaccharides, two aminosugars – glucosamine and galactosamine. The last compound content was markedly higher comparing to the first one: it was by 8,75 times for the CPDV, by 7,2 times for the SSV, and by 1,6 times more for the VSV.



REFERENCES

1. Murphy F.A., Fanquet C.M., Bishop D.V.L., Ghabrial S.H., Jarvis A.W., Mantelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. (eds) — Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses // Virology. Division International Union of Microbiological Societies: Springer Verlag, Wien New York. — Arch. Virol. — 1995. — Suppl. 10. — 275-288.
2. Jackson A. O., Dietzgen R.G., Geodin J.M., Bragg J.N., Deng M. Biology of plant rhabdoviruses. // Ann. Rev. Phytopathol.— 2005.— V.43, p. 623-660.
3. Da Poian A.T., Carneiro F.A., Stauber F. Viral membrane fusion: is glycoprotein G of Rhabdoviruses a representative of a new class of viral fusion proteins? // Brazilian Journal of Medical and Biological Research.— 2005.— V. 38, p. 813-823.
4. Machamer C.F., Gnar J.-L., Rose J.K. Role of glycosylation in protein transport to the cell surface. — Virus Res., 1985, 3, Suppl. №1.
5. Derevitskaya V.A. Glycoproteins of RNA-containing enveloped viruses. Bioorganic Chemistry. Rus. — 1983. — V.9, №5, 581–616.
6. Coll J.M. The glycoprotein G of rhabdoviruses. // Arch. Virology.— 1995.— V. 140, p. 827-851.
7. Walker P.J., Kongsuwan K. Deduced structural model for animal rhabdovirus glycoproteins. // J.Gen.Virol. — 1999.— V. 80, p. 1211-1220.
8. Goldberg K.-B., Modrell B., Hillman B.I. Heaten L.A., Choi T.-J., Jakson A.O. Structure of the glycoprotein gene of sonchus yellow net virus, a plant rhabdoviruses. // Virology.— 1991.— V. 185, p. 32-38.
9. L.F. Didenko, N.I. Parhomenko, L.O. Maksimenko, N.S. Dyachenco, N.M. Zaritsky, F.E. Kozar. Influence of klinostation on the virus of curly potato dwarf virus (CPDV) and his structural components in vitro and in vivo. // Space science and technology— 1999.—5, p. 1-5.
10. Dalton K.P., Rose J.K. Vesicular stomatitis virus glycoprotein containing the entire green fluorescent protein on its cytoplasmic domain is incorporated efficiently into virus particles. // Virology.— 2001.—V. 279, №2, 414-421.
11. Zaides V.M., Berezin V.E., Zhdanov V.M. Glycoproteins of enveloped animal viruses as transmembrane proteins. Problems of Virology, 1986, vol. 31.— №2,—p. 133-148.
12. Klenk H.D. The molecular basis of microbiology. Patogenecity // Eds by H. Smith, J. Skeher, M. Turner. — Welnheim, 1980, 55-66.

**Л.Ф. Діденко, Л.Д. Варбанець, Т.Ю. Сабірова, О.В. Серденко,
О.С. Броварська, М.Я. Співак**

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

МОНОЦУКРИДНИЙ СКЛАД РАБДОВІРУСІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ З ТВАРИН ТА РОСЛИН

Реферат

Вивчений моноцукричний склад глікопротеїнів зоорабдовіруса везикулярного стоматиту (ВВС) і фітопатогенних рабдовірусів — віруса кучерявої карликовості картоплі (ВККК) і віруса плямистості аїру (ВПА). При порівнянні моноцукридного складу всіх трьох представників рабдовірусів виявлені загальні моноцукриди — глюкоза, маноза, галактоза, арабіноза, фукоза. Домінуючими з них в складі ВККК і ВВС присутні глюкоза і маноза (35,2 %,



21,6 % і 23,8 %, 49,6 % відповідно), для ВПА глюкоза і галактоза (24 % і 16,4 % відповідно). ВККК і ВПА на відміну від ВВС містять рамнозу (3 % і 9,7 % відповідно).

У всіх цих вірусах поряд з моноцукрами виявлені також і аміноцукри глюкозамін і галактозамін.

К л ю ч о в і с л о в а: вуглеводи, рабдовируси, везикулярний вірус стоматиту, вірус кучерявої карликовості картоплі, вірус крапчатості айру.

Л.Ф. Диденко, Л.Д. Варбанец, Т.Ю. Сабирова, О.В. Серденко, О.С. Броварская, Н.Я. Спивак

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

МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ РАБДОВИРУСОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Реферат

Исследован моносахаридный состав гликопротеинов зоорабдовируса везикулярного стоматита (ВВС) и фитопатогенных рабдовирусов вируса курчавой карликовости картофеля (ВККК) и вируса крапчатости айра (ВКА). При сравнении моносахаридного состава всех трех представителей рабдовирусов выявлены общие моносахариды — глюкоза, манноза, галактоза, арабиноза, фукоза. Доминирующими среди них в составе ВККК и ВВС присутствует глюкоза и манноза (35,2 %, 21,6 % и 23,8 %, 49,6 % соответственно), для ВКА глюкоза и галактоза (24 % и 16,4 % соответственно). ВККК и ВКА в отличие от ВВС содержат рамнозу (3 % и 9,7 % соответственно).

Во всех этих вирусах, наряду с моносахарами, выявлены также и аминоксара — глюкозамин и галактозамин.

К л ю ч е в ы е с л о в а: углеводы, рабдовирусы, везикулярный вирус стоматита, вирус курчавой карликовости картофеля, вирус крапчатости айра.



**В.О. Іваниця¹, Т.О. Філіпова¹, Б.М. Галкін¹, Т.В. Гудзенко¹,
М.Ю. Русакова¹, Т.Ю. Степанова¹, Т.В. Іваниця¹,
Н. Чанішвілі², Т. Барбуташвілі²**

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua, tphilipova@ukr.net

² Інститут бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліава,
Тбілісі, Грузія

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ БАКТЕРІОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МАКРОФАГІВ

Встановлено, що препарат бактеріофага Clostridium perfringens in vivo і in vitro пригнічує фагоцитарну здатність макрофагів черевної порожнини і селезінки та утворення ними активних форм кисню. Кількісні прояви цих ефектів залежать від тривалості прийому препарату та його концентрації у середовищі інкубації. Ці зміни функціонального стану супроводжуються посиленням синтезу фактора некрозу пухлин α як в організмі, так і у культурі макрофагів in vitro. Препарат не чинить прямого токсичного впливу на макрофаги.

К л ю ч о в і с л о в а: бактеріофаг Clostridium perfringens, функціональна активність макрофагів, фактор некрозу пухлин α .

Поновлення в останні роки інтересу до бактеріофагів як до антимікробних агентів, які можуть використовуватися для лікування і профілактики інфекційних захворювань людини та тварин, поставило ряд питань про характер їх впливу на організм в цілому [3, 8]. Особливу увагу привертає проблема взаємодії імунної системи з фагами, оскільки ці питання майже не досліджені.

Сьогодні відомі два факти: бактеріофаги, введені тваринам внутрішньочеревинно, індукують синтез специфічних антитіл [7], а пероральне застосування фагів викликає їх тривалу (до 14 діб) персистенцію у печінці та селезінці [11,12]. Ці факти свідчать про активну взаємодію клітин імунної системи з бактеріофагами.

Раніше нами було встановлено, що комерційний препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* за перорального введення мишам посилює у них запальну реакцію на карагенан та зимозан [1].

Враховуючи важливу роль у формуванні запалення макрофагів та цитокінів, що синтезуються цими клітинами, метою даного дослідження було вивчення впливу препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* in vivo та in vitro на функціональну активність макрофагів та продукцію ними фактора некрозу пухлин α .

Матеріали і методи

Препарат бактеріофага *Clostridium perfringens*, створений в Інституті бактеріофагії, мікробіології і вірусології АН Грузії, містив 10^7 бляшкоутворювальних одиниць (БУО) в 1 мл.

У роботі були використані миші самці лінії BALB/с масою 18-20 г.

В експериментах *in vivo* препарат бактеріофага вводили мишам перорально одно- або трьохразово у дозі 0,5 мл, а в дослідах *in vitro* препарат додавали до моношару макрофагів у кінцевих концентраціях 10^5 та 10^6 БУО/мл.

Сироватку і макрофаги з черевної порожнини та селезінки отримували за загально прийнятими методами [2]. Культивування макрофагів *in vitro* здійснювали у 96-лункових планшетах у середовищі RPMI 1640, яке містило 10 % телячої сироватки, 2 мМ глутаміну та антибіотики. У кожен лунку вносили 0,2 мл суспензії макрофагів з концентрацією клітин 10^6 в 1 мл. Через 60 хв, після прикріплення макрофагів до дна лунок, замінювали культуральне середовище і додавали відповідні кількості препарату бактеріофага. Подальшу інкубацію здійснювали протягом 24 год у термостаті при температурі 37 °С.

Фагоцитарну активність та здатність макрофагів відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ-тест) оцінювали за [5,10].

Вміст фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) визначали імуоферментним методом з використанням тест-наборів Anti-mouse Ready-Set-Go! Cytokine ELISA Kit фірми «eBioscience», США. При виконанні аналізів керувалися інструкцією фірми виробника. Рівень ФНП- α визначали у сироватці, селезінці та культуральній рідині. Облік результатів проводили на планшетному фотометрі «Уніплан», Росія, при довжині хвилі 450 нм.

Цитотоксичний вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* вивчали за активністю дегідрогеназ макрофагів з використанням 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій броміду (МТТ-тест) фірми SIGMA, США [4,9].

Усі експерименти повторювали п'ятикратно. Математичне опрацювання отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У роботі досліджено препарат бактеріофага, що був розроблений для мінімізації ризику шлунково-кишкових інфекцій людини та тварин, які збуджуються штамми *Clostridium perfringens* з нещодавно набутою резистентністю до антибіотиків. Крім фагів, препарат містить лізат клітин клостридій та культуральне середовище (м'ясо-пептонний бульйон).

Отримані нами раніше результати свідчать, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens*, введений мишам у задню лапу під апоневроз, не викликає формування місцевої запальної реакції. У той же час пероральне застосування цього препарату потенціє локальну запальну реакцію на відомі флогогени: карагенан і зимозан, а у 70 % дослідних тварин одночасно реєструвалися ознаки системного запалення. Було висунуто припущення, що компоненти препарату (самі бактеріофаги та/або лізат клітин клостридій, перш за все, їх токсини) індукують утворення в організмі прозапальних цитокінів, зокрема ФНП- α . Експериментальному підтвердженню цього припущення присвячена дана робота.

У дослідженнях *in vivo* препарат вводили перорально, одно- і трьохразово, у дозі 0,5 мл на мишу і через добу після останнього введення оцінювали фагоцитарну здатність і активність у НСТ-тесті макрофагів, вилучених з черевної порожнини та селезінки, а також рівень ФНП- α у сироватці та селезінці.



Отримані результати (табл.) показали, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* викликає вірогідне зниження як фагоцитарної активності макрофагів, так і продукції ними реакційно активних форм кисню. При цьому на фоні трьохразового застосування препарату відмічені більш суттєві зміни функціональних властивостей фагоцитів. Подібні дані були отримані і у клінічних дослідженнях [14]. Результати цих спостережень свідчать про наявність у пацієнтів пригніченої здатності нейтрофілів до фагоцитозу бактерій після фаготерапії, причому гальмування фагоцитозу рееструвалося також через три місяці після припинення лікування.

Таблиця

Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональну активність макрофагів in vivo ($M \pm m, n = 5$)

	Варіант	Фагоцитарна активність, клітин дріжджів/ 10^6 макрофагів, $\times 10^6$	Активність у НСТ-тесті, мкг диформазау/ 10^6 макрофагів
Макрофаги селезінки	Контроль	$1,78 \pm 0,09$	$5,36 \pm 0,34$
	1-разове введення	$1,68 \pm 0,11$	$4,22 \pm 0,16^*$
	3-разове введення	$0,79 \pm 0,04^*$	$3,67 \pm 0,15^*$
Макрофаги черевної порожнини	Контроль	$4,83 \pm 0,21$	$13,94 \pm 1,06$
	1-разове введення	$3,65 \pm 0,12^*$	$11,25 \pm 0,83^*$
	3-разове введення	$1,49 \pm 0,09^*$	$3,83 \pm 0,18^*$

* – різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Визначення рівня ФНП- α у сироватці та селезінці (рис. 1) виявило його підвищення на 10-15 % після однократного і на 40-50 % після трьохкратного введення препарату.

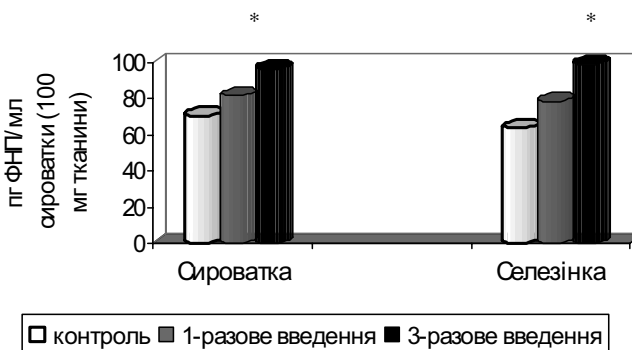


Рис. 1. Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на вміст фактору некрозу пухлин у сироватці та селезінці мишей

*-різниця вірогідна у порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 1. Bacteriophage Preparatus *Clostridium perfringens* effect upon factor contents of tumour necrosis at the serum and spleen of mouse



Враховуючи, що основна кількість фактора некрозу пухлин α в організмі синтезується макрофагами, у досліджах *in vitro* вивчали безпосередній вплив препарату бактеріофага на функціональні властивості макрофагів і продукцію ними прозапального цитокіну. До макрофагів, прикріплених до дна 96-лункових планшетів або чашок Петрі діаметром 35 мм, додавали середовище RPMI 1640, яке містило в 1 мл 10^5 - 10^6 фагових часток. Через 24 години інкубації у термостаті при 37 °С у надосадовій рідині лунок визначали вміст ФНП- α , а у шарах макрофагів на чашках Петрі оцінювали здатність до поглинання клітин дріжджів та відновлення нітросинього тетразолію.

Наведені на рис. 2 дані свідчать про те, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* в умовах *in vitro* впливає на макрофаги так само, як і *in vivo*. Гальмування функціональної активності фагоцитів та збільшення синтезу фактора некрозу пухлин α виявилися залежними від концентрації фагових часток. При концентрації фага 10^6 БУО/мл поглинальна здатність та активність у НСТ-тесті знижувалися порівняно з контролем майже на 50 %, а рівень синтезу цитокіна підвищився вдвічі.

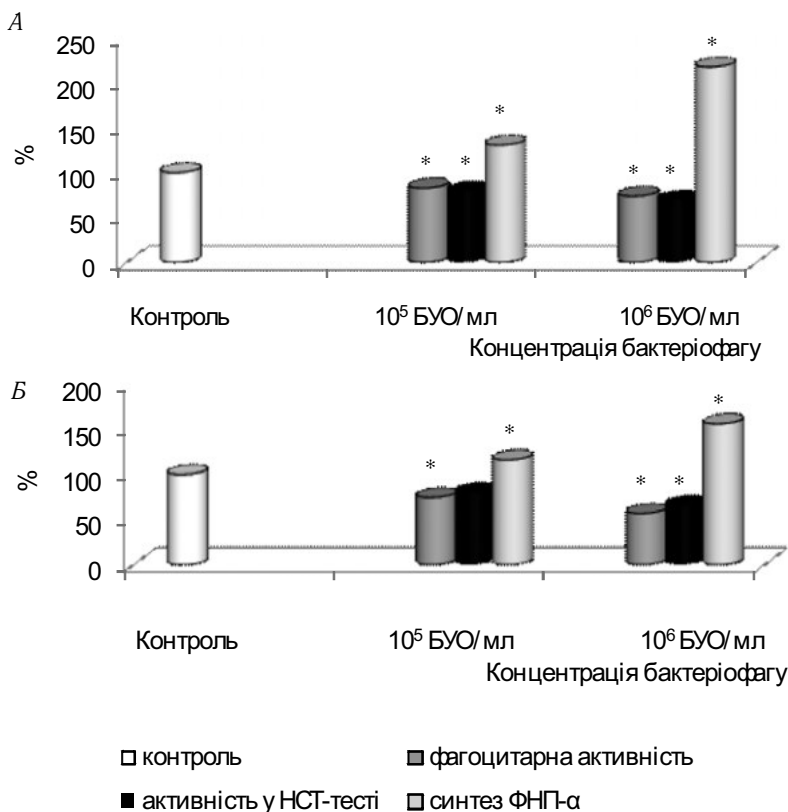


Рис. 2. Вплив різних концентрацій бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональний стан макрофагів черевної порожнини (А) та селезінки (Б) *in vitro* * — різниця вірогідна порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. Bacteriophage *Clostridium perfringens* different concentration effect upon functional macrophages activity of peritoneal (A) and spleen (B) *in vitro*



За даними МТТ-тесту встановлено, що досліджуваний препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* не впливає на життєздатність макрофагів в культурі: рівень активності дегідрогеназ у клітинах, що інкубувалися у присутності бактеріофага впродовж доби, не відрізнявся від контрольних значень і складав 97 % від величин, зареєстрованих у макрофагах одразу після вилучення з організму тварин.

Таким чином, проведене дослідження підтвердило, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* стимулює синтез в організмі дослідних тварин одного з прозапальних цитокінів — фактора некрозу пухлин α . Крім того, показано безпосередній вплив препарату на функціональний стан макрофагів. Слід зазначити, що вплив фаготерапії на цитокіновий профіль хворих встановлений рядом авторів [6,13]. Оскільки досліджений препарат містить крім фагів лізат кластридій, не можна стверджувати, що встановлені ефекти обумовлені саме фагами. Для остаточного вирішення цього питання необхідно отримати фагові частки, очищені від фрагментів бактеріальних клітин, і провести вивчення їх впливу на функціональну активність макрофагів та продукцію ними ФНП- α .

ЛІТЕРАТУРА

1. *Иваница В. А., Филиппова Т. О., Галкин Б. Н., Гудзенко Т. В., Русакова М. Ю., Степанова Т. Ю., Иваница Т. В., Чанишвили Н., Барбуташивили Т.* Провоспалительные и цитотоксические свойства бактериофага *Clostridium perfringens* // Тези доповідей міжнародної конференції «Мікробні біотехнології», Одеса, 2006. — С. 126.
2. *Barrow, P. A., Soothill J. S.* Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential // *Trends Microbiol.* — 1997. — V. 5. — P. 268-271.
3. *Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K.* Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill // *J. Immunol. Methods.* — 1989. — V. 119. — P. 203-210.
4. *Kaminski N.E., Roberts J.F., Guthrie F.E.* A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage activity // *Immunol. Lett.* — 1985. — V. 10. — P. 329-331.
5. *Kozminska J., Weber-Dabrowska B., Mulczyk M.* The study on biology of bacteriophages and their usage in the treatment of bacterial diseases and on the influence of different bacteriophages on cytokine production by leukocytes in human peripheral blood // *Otolaryngologia Polska.* — 1997. — V. 51, Suppl. 25. — P. 195-198.
6. *Kucharewicz-Krukowska A., Slopek S.* Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy // *Archivum Immunologii et Therapiae Experimentalis.* — 1987. — V. 35. — P. 553-561.
7. *Merril, C. R., Scholl D., Adhya S. L.* The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2003. — V. 2. — P. 489-497.
8. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* — 1983. — V. 65. — P. 55-63.
9. *Raichvarg D., Marchand E., Sarfati G., Agneray J.* Technique colorimetrique d'evaluation de l'activite phagocytaire des macrophages peritoneaux de souris // *Ann. Immunol.* — 1980. — V. 131. — P. 71-78.
10. *Reynaud A., Cloastre L., Bernard J.* Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy // *Vet. Microbiol.* — 1992. — V. 30. — P. 203-212.
11. *Smith H.W., Huggins M.B.* Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics // *J. Gen. Microbiol.* — 1982. — V. 128. — P. 307-318.
12. *Weber-Dabrowska B., Dabrowski M., Slopek S.* Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy // *Archivum Immunologii et Therapiae Experimentalis.* — 1987. — V. 35. — P. 563-568.
13. *Weber-Dabrowska B., Zimecki M., Mulczyk M., Gorski A.* Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2002. — V. 34. — P. 135-138.

Робота виконана за підтримки гранту INTAS Ref. Nr. 03-51-5563.



**В.А. Иваниця¹, Т.О.Филиппова¹, Б.Н. Галкин¹, Т.В. Гудзенко¹,
М.Ю. Русакова¹, Т.Ю. Степанова¹, Т.В. Иваниця¹, Н. Чанишвили²,
Т. Барбуташвили²**

¹ Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: tphilippova@ukr.net

² Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии имени Г. Элиава,
Тбилиси, Грузия

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКРОФАГОВ

Реферат

Показано, что препарат бактериофага *Clostridium perfringens* *in vivo* и *in vitro* подавляет фагоцитарную способность макрофагов брюшной полости и селезенки и образование ими активных форм кислорода. Выраженность этих эффектов зависит от длительности приема препарата и его концентрации в среде инкубации. Эти изменения сопровождаются усилением синтеза фактора некроза опухолей α как в организме, так и в культуре макрофагов *in vitro*. Препарат не оказывает прямого токсического влияния на макрофаги.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериофаг *Clostridium perfringens*, функциональная активность макрофагов, фактор некроза опухолей α .

**V.O. Ivanytsya¹, T.O. Filipova¹, B.M. Galkin¹, T.V. Gudzenko¹,
M.Yu. Rusakova¹, T. Yu. Stepanova¹, T.I. Ivanytsya¹,
N. Chanishvili², T. Barbutashvili²**

¹ Odesa Mechnykov National University, Dvoriyanska, 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: tphilippova@ukr.net

² Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia

***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BACTERIOPHAGE EFFECT ON MACROPHAGES FUNCTIONAL ACTIVITY**

Summary

We have shown that *Clostridium perfringens* bacteriophage both *in vivo* and *in vitro* suppresses the phagocytic activity of peritoneal cavity and spleen macrophages as well as restoration of nitro blue tetrazolium. The effect depends on duration of treatment and preparation concentration in incubation media. All changes in cell activity are entailed with the increase of tumor necrosis factor α synthesis in organism as well as in macrophage culture *in vitro*. The preparation does not have any direct toxic effect on macrophages.

К e y w o r d s: *Clostridium perfringens* bacteriophage, functional activity of macrophages, tumor necrosis factor α .



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

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Заболотного 154, Киев, ДСП, Д03680, Украина,
тел.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ДРОЖЖЕЙ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* (SAITO) SKINNER

*Изучен моносахаридный состав внеклеточных полисахаридных препаратов дрожжей *C. albidus* УКМ У-1028, 1063 и 1066, доминирующим углеводом которых была манноза (до 67 %). Отобран штамм *C. albidus* УКМ У-1066, в составе внеклеточных полисахаридов которого преобладали манноза (58 %), глюкоза (21 %) и ксилоза (16 %). Полученный препарат может быть использован в качестве сорбента микотоксинов.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а: *Cryptococcus albidus*, внеклеточные полисахариды, моносахаридный состав.*

Дрожжи выгодно отличаются от бактериальных культур способностью образовывать ценные и малотоксичные полисахариды. Наиболее известными и изученными продуцентами внеклеточных полисахаридов являются дрожжи родов *Cryptococcus* Vuillemin и *Rhodotorula* Harrison прежде всего потому, что важным таксономическим признаком, отличающим между собой дрожжи данных родов, является моносахаридный состав именно их внеклеточных полисахаридов [4, 11, 14]. При этом получение и изучение различных полисахаридных препаратов проводилось с целью их использования в фармацевтической и пищевой промышленности [2, 5].

В настоящее время также актуален вопрос использования внеклеточных полисахаридов в животноводстве и кормопроизводстве в качестве компонента препаратов, применяемых для профилактики микотоксикозов [8]. В состав таких препаратов и кормовых добавок входят олигосахариды маннозы и β -D-глюканы. Разрабатываются специальные продукты для птицеводства на основе этих компонентов, содержащие, в основном, глюкоманнаны, выделяемые из стенок дрожжевых клеток [16, 17]. Глюкоманнаны, полученные таким образом, имеют высокую стоимость, в отличие от препаратов внеклеточных полисахаридов дрожжей, которые также в своём составе содержат как олигосахариды маннозы, так и β -D-глюканы. В связи с этим представляет интерес поиск активных штаммов криптококков — продуцентов внеклеточных маннанов и глюканов.

Целью настоящей работы было изучение моносахаридного состава внеклеточных полисахаридов дрожжей *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner.

Материалы и методы

Объектом исследований были 9 штаммов *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner (1947) из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ), выделенные из пресных водоёмов, рек, ила и филлосферы кукурузы.

© О.Г. Мамеева, С.С. Нагорная, А.М. Остапчук, В.С. Подгорский, 2008



В работе использовали следующие среды:

среда Ридер, содержащая (г/л дистиллированной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,0, K_2HPO_4 — 0,1, KH_2PO_4 — 1,0, MgSO_4 — 0,7, NaCl — 0,5, глюкоза — 1 %, дрожжевой экстракт — 0,1 %, pH 4,2;

среда Харада, содержащая (г/л водопроводной воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,5, KH_2PO_4 — 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, NaCl — 0,5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1, глюкоза — 5 %, комплекс витаминов группы В, pH 4,2;

среда Голубева, содержащая (г/л дистиллированной воды): Na_2HPO_4 — 7,2, KH_2PO_4 — 3,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, NaCl — 0,5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,0015, глюкоза — 5 %, пептон — 0,2 %, дрожжевой автолизат — 10 мл, pH 4,2 [3, 7].

Посевной материал выращивали в течение 48 час на сусло-агаре. В работе использовали культуры дрожжей, предварительно выращенные на вышеуказанных средах в колбах Эрленмейера объёмом 750 мл, содержащих 150 мл питательной среды при 28 °С на качалках (240 об./мин) в течение 5 суток. Оценивали прирост биомассы (измеряли фотоэлектроколориметрически в пересчёте на абсолютно сухой вес) и капсулообразование (метод негативного контрастирования тушью по Дюгиду) у исследуемых культур дрожжей [10].

Для изучения углеводных компонентов клетки использовали различные подходы. Биомассу клеток растирали с ацетоном в соотношении 1:1, через 24 часа фильтровали и центрифугировали фильтрат при 5000 g 20 мин. Для получения препаратов внеклеточных полисахаридов в центрифугат культуральной жидкости добавляли два объёма 96 %-ного этанола, осадок полисахарида отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин. В другом варианте клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием 5000 g в течение 30 мин. К супернатанту, подкисленному концентрированной уксусной кислотой до pH 3,0, добавляли два объёма этанола 96 % или один объём ацетона, осадок полисахарида отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин., трижды промывали его ацетоном. Отсутствие клеток в супернатантах контролировали микроскопированием [2 — 5].

Идентификацию нейтральных моносахаридов проводили после гидролиза препаратов в 2 N HCl на протяжении 4-5 час при температуре 100 °С. Пробы для анализа препаратов готовили по методу Albersheim с соавторами [12]. Гидролизат упаривали досуха, трижды промывали дистиллированной водой на роторном испарителе при температуре 45-50 °С. Пробу ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды, добавляли боргидрид Na, оставляли в тёмном месте на 12 часов, после чего pH доводили до нейтрального значения при помощи смолы КУ-2 в H^+ форме. Освобождённый от смолы фильтрат упаривали досуха, затем трижды промывали метанолом на роторном испарителе при комнатной температуре. К пробе добавляли 0,5 мл пиридина (перегнанного) и 0,5 мл уксусного ангидрида, гидролизировали 15 мин. при 100 °С. Пробы высушивали, ресуспендировали в 2-3 мл хлороформа и центрифугировали при 2500 g, 20 мин. После чего супернатант, содержащий смесь нейтральных моносахаридов в виде ацетатов полиолов, разделяли на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм, газ носитель — гелий, поток через колонку 1 мл/мин. Температура испарения — 250 °С, интерфейса — 280 °С, термостата — 220 °С (изотермический режим). Пробу вводили с делением потока 1:100. Иден-



тификацию моносахаридов проводили при помощи сравнения времени удержания ацетатов полиолов стандартных и исследуемых образцов, и также с использованием компьютерной базы данных ChemStation. Количественное соотношение отдельных моносахаридов определяли в процентах от суммы площадей пиков.

Определение количества углеводов проводили по Dubois et al. [13]. 1 мг препарата полисахарида растворяли в 1 мл дистиллированной воды. К 0,1 мл исследуемого раствора добавляли 0,4 мл H_2O , 0,5 мл 5 %-ного фенола и 2,5 мл H_2SO_4 (конц.). Выдерживали смесь при комнатной температуре в течение 30 мин. Содержание углеводов определяли по стандартной калибровочной кривой зависимости оптической плотности D-глюкозы от концентрации при длине волны 490 нм в кювете толщиной 1 см, на спектрофотометре СФ-26. Контроль готовили параллельно с исследуемыми образцами по вышеуказанной методике, где раствор препарата полисахарида заменён соответствующим количеством дистиллированной воды [1, 13].

Результаты и их обсуждение

Дрожжи рода *Cryptococcus* известны как продуценты внеклеточных полисахаридов. В таком аспекте изучен качественный моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов *C. skinneri*, *C. humicolus*, *C. dimennae*, *C. neoformans*, *C. terreus*, *C. luteolus* и капсульного материала *C. laurentii* [2 – 5, 11]. Внеклеточные полисахариды *C. albidus* являются малоизученными полимерами и им посвящены единичные сообщения [15]. Установлены антивирусные свойства капсульных веществ некоторых штаммов *C. albidus*, выделенных нами из филлосферы растений [9]. Эти вещества способны защищать растения табака и дурмана от заражения вирусом табачной мозаики.

В связи с малой изученностью *C. albidus* в качестве продуцента внеклеточных полисахаридов, мы исследовали особенности капсулообразования у коллекционных штаммов. При культивировании на сусло-агаре *C. albidus*, дрожжи образовывали явно выраженную капсулу, что является характерным признаком именно базидиомицетных дрожжей рода *Cryptococcus* [11, 14]. Среди девяти исследованных штаммов *C. albidus* с использованием метода негативного контрастирования тушью по Дюгиду визуально были отобраны три штамма *C. albidus* УКМ У-1028, 1063 и 1066 (рис. 1).

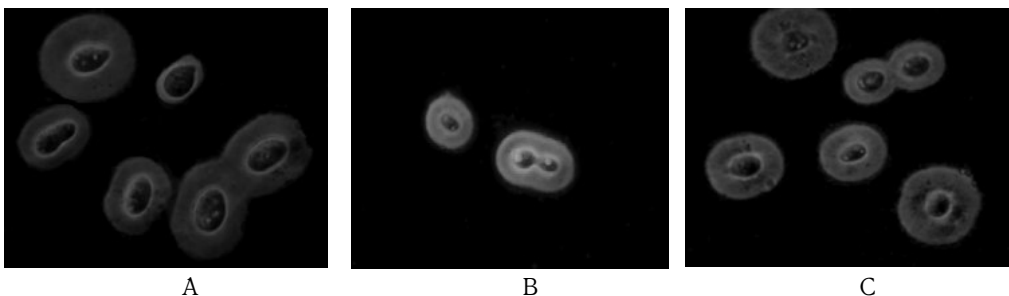


Рис. 1. Клетки дрожжей *C. albidus* УКМ У-1028 (А), УКМ У-1063 (В) и УКМ У-1066 (С) на сусло-агаре после 120 ч культивирования (увеличение $\times 200$).

Fig. 1. Yeasts cells *C. albidus* UKM U-1028 (A), UKM U-1063 (B) and UKM U-1066 (C) on beer-wort agar after 120 h cultivation (increase $\times 200$).

Нами установлено, что среди используемых сред Ридер, Харада и Голубева наилучшей для накопления биомассы дрожжей является среда Голубева (табл. 1). На этой же среде определяли выход внеклеточного полисахарида для штаммов *C. albidus* УКМ У-1028, УКМ У-1063 и УКМ У-1066, который достигал $2,54 \pm 0,18$ г/л, $2,82 \pm 0,26$ г/л и $2,89 \pm 0,21$ г/л. Исходные значения рН среды для культивирования криптококков были достаточно низкими (4,2), с дальнейшим снижением рН до 3,5 при их культивировании.

Таблица 1

Накопление биомассы *Cryptococcus albidus* при культивировании на различных питательных средах

Штамм УКМ У-	Биомасса, г/л АСВ		
	среда Ридер	среда Харада	среда Голубева
1003	$3,42 \pm 0,20$	$0,74 \pm 0,15$	$3,55 \pm 0,10$
1028	$2,02 \pm 0,10$	$0,96 \pm 0,12$	$3,64 \pm 0,20$
1033	$2,30 \pm 0,13$	$0,62 \pm 0,25$	$2,36 \pm 0,16$
1055	$2,30 \pm 0,10$	$0,98 \pm 0,10$	$2,28 \pm 0,15$
1063	$3,42 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,20$	$4,04 \pm 0,12$
1066	$2,24 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,10$	$4,02 \pm 0,12$
1068	$2,36 \pm 0,14$	$0,69 \pm 0,10$	$2,70 \pm 0,11$
1065	$3,48 \pm 0,20$	$0,81 \pm 0,10$	$2,64 \pm 0,20$
1069	$4,00 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,16$	$2,70 \pm 0,10$

По данным литературы, внеклеточные полисахариды дрожжей рода *Cryptococcus* содержат маннозу, ксилозу, глюкуроновую кислоту, иногда глюкозу [2 – 5, 11, 14, 15]. Такой моносахаридный состав внеклеточных полисахаридов установлен для *C. skinneri*, *C. humicolus*, *C. dimennae* [2 – 5]. Для нефракционированных внеклеточных полисахаридов *C. albidus* var. *albidus* характерно наличие глюкозы, галактозы, маннозы, ксилозы и глюкуроновой кислоты [15].

Изучение моносахаридного состава препаратов полисахаридов *C. albidus* УКМ У-1028, УКМ У-1063 и УКМ У-1066, полученных с помощью трёх различных подходов показало, что основным преобладающим компонентом препаратов была манноза — до 67 % (табл. 2). В состав внеклеточных препаратов также входили глюкоза (20,0 – 22,0 %), ксилоза (13,0 – 20,0 %), галактоза (1,0 – 3,0 %), следовые количества рибозы и арабинозы (0 – 2,0 %). Неидентифицированный моносахарид составлял 2,0 – 6,35 % от общей суммы площадей пиков. При этом общее количество углеводов в полисахаридных препаратах составляло для штаммов *C. albidus* УКМ У-1066 и УКМ У-1028 — 36 % и 34 % соответственно, а для штамма *C. albidus* УКМ У-1063 — 9 %.

Таким образом, для последующего изучения нами отобран штамм дрожжей *C. albidus* УКМ У-1066. Манноза (58 %), глюкоза (21 %) и ксилоза (16 %) являются преобладающими моносахаридами внеклеточного полисахарида данного штамма.



**Моносахаридный состав полисахаридных препаратов *Cryptococcus albidus*
(% к общей сумме площадей пиков)**

Препарат	Штамм, УКМ У-	Риб	Араб	Кси	Ман	Гал	Глю	Х
1	1066	-	-	15,69	58,06	-	21,36	4,89
	1028	0,54	0,71	13,83	50,69	3,16	29,09	1,98
	1063	1,02	1,87	55,44	20,21	2,52	13,90	5,04
2	1066	1,30	3,19	14,54	59,15	-	21,76	0,06
	1028	-	-	13,13	48,83	30,67	2,24	5,13
	1063	-	-	13,07	58,91	20,35	1,32	6,35
3	1066	1,21	1,94	13,32	66,27	3,57	7,74	5,95
	1028	-	-	2,40	13,13	0,77	82,31	1,39
	1063	0,61	1,03	14,80	66,08	3,32	11,85	2,31

Примечание: Х – неидентифицированный моносахарид, выходящий после глюкозы.

Уникальность данного препарата также состоит в том, что в его составе полностью отсутствует галактоза, наличие которой было бы более характерно для криптококков. Особенностью внеклеточного полисахарида было присутствие в нём глюкозы, связанное, вероятно с экстракцией растворимых глюканов клеточной стенки [11]. Полученный препарат может быть перспективен для дальнейшего исследования в качестве сорбента микотоксинов как составляющая часть кормовых добавок.

Авторы публикации благодарят сотрудников Института микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины д.б.н., профессора Варбанец Людмилу Дмитриевну за консультативную помощь, к.б.н. Броварскую Оксану Степановну за помощь при определении содержания общего количества углеводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов – К.: Наук. думка, 2006. – 237 с.
2. Витовская Г.Л., Самаркина Г.М., Ананьева Е.П., Сеницкая И.А. Синтез внеклеточных гетерогликанов дрожжами рода *Cryptococcus* // Микробиология. – 1989. – т. 58, в. 2. – С. 240-245
3. Голубев В.И., Манукян А.Р., Циоменко А.Б., Ушаков В.М. Получение капсульного материала дрожжей // Прикл. биохимия и микробиол. – 1980. – 16, № 4. – С. 591-596
4. Голубев В.И., Свиридов А.Ф., Бабьева И.П. Моносахаридный состав внеклеточных и капсульных полисахаридов дрожжей // Микробиология. – 1971. – т. 40, в. 4. – С. 610-616.
5. Елинов Н.П., Витовская Г.Л., Ананьева Е.П., Абелян В.А., Киселева С.М. Биосинтез гетерополисахаридов некоторыми видами криптококков // Прикл. биохимия и микробиол. – 1982. – 18, № 5. – С. 636-639



6. Елинов Н.П., Иозеп А.А., Голяков П.Н., Тихонова Т.А. Строение внеклеточного маннана, продуцируемого *Sporobolomyces species* ДС 26-М // Прикл. биохимия и микробиол. — 1975. — т. 11, в. 3. — С. 346-348
7. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — К.: Наук. думка, 1982. — 192 с.
8. Квасников Е.И., Щёлокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. — К.: Наукова думка, 1991. — 328 с.
9. Коваленко О.Г., Баркалова А.О., Нагорна С.С. Антифiтовiрусна активнiсть капсульних речовин з дрiжджiв *Cryptococcus albidus* // Мiкробiол. журн. — 2005. — 67, № 3. — С. 81-84
10. Метод окраски капсул по Дюгиду: Пер. с англ. /Под ред. Ф.Герхардта и др. — М.: Мир, 1983. — т. 1. — 536 с.
11. Тихомирова О.М., Витовская Г.А., Синицкая И.А. Полисахариды клеток *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner — продуцента внеклеточного гетерогликана // Микробиология. — 1998. — 67, № 1. — С. 73-78
12. Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography // Carbohydr. Res. — 1976. — № 3. — P. 340-345
13. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. — 1956. — 28, № 2. — P. 350-356
14. Kurtzman C.P., Fell J.M. The yeasts, a taxonomic study. Chemotaxonomy based on the polysaccharide composition of cell walls and capsules. — Amsterdam: Elsevier, — 1998. — 1055 p.
15. Ross A. and Taylor I.A. Extracellular glycoprotein from virulent and avirulent *Cryptococcus species* // Infection and Immunity. — 1981. — 31, № 3. — P. 911-918.

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

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Заболотного 154, Київ, ДСП, Д03680, Україна, тел.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

ПОЗАКЛІТИННІ ПОЛІСАХАРИДИ ДРІЖДЖІВ *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* (SAITO) SKINNER

Реферат

Вивчений моносахаридний склад позаклітинних полісахаридних препаратів дріжджів *C. albidus* УКМ У-1028, УКМ У-1063 і УКМ У-1066, домінуючим вуглеводом яких була маноза (до 67 %). Відібраний штам *C. albidus* УКМ У-1066, в складі позаклітинних полісахаридів якого переважали маноза (58 %), глюкоза (21 %) і ксилоза (16 %). Отриманий препарат може бути використаний в якості сорбенту мікотоксинів.

К л ю ч о в і с л о в а: *Cryptococcus albidus*, позаклітинні полісахариди, моносахаридний склад.



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

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Zabolotny str., 154, Kyiv, Ukraine тел.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: mameeva@ukr.net

EXTRACELLULAR POLYSACCHARYDES OF YEASTS' *CRYPTOCOCCUS ALBIDUS* (SAITO) SKINNER

Summary

It was studied the monosaccharide composition of extracellular polysaccharide preparations of yeasts *C. albidus* UCM U-1028, UCM U-1063 and UCM U-1066, with mannose (up to 67 %) as dominating carbohydrates. It was selected the strain *C. albidus* UCM U-1066 in the extracellular polysaccharides structure in which mannose (58 %), glucose (21 %) and xylose (16 %), prevailed. The received preparation can be used in further as the sorbent of mycotoxins as the making part of fodder additives.

K e y w o r d s: *Cryptococcus albidus*, monosaccharide composition.



О.А. Ковтун

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 74 65 716,
e-mail: hydrobiostation@gmail.com

НОВЫЕ ТАКСОНЫ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ БЕНТОСА ТИЛИГУЛЬСКОГО ЛИМАНА (СЕВЕРО-ЗАПАДНОЕ ПРИЧЕРНОМОРЬЕ)

*В бентосе Тилигульского лимана выявлен 181 видовой и внутривидовой таксон диатомовых водорослей. Из них впервые приводятся для водоема – 74, впервые для лиманов Северо-Западного Причерноморья – 25. Описаны как новые для науки – *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Koutun var. nov. и *Fallacia gusliakovi* Koutun sp. nov., представлены их микрофотографии.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: Bacillariophyta, новые таксоны, бентос, Тилигульский лиман.

Тилигульский лиман, в сравнении с другими причерноморскими лиманами юга Украины, выделяется высоким биологическим разнообразием и уникальными ландшафтными системами. Многие из них в последние десятилетия приобрели различные статусы заповедования. К важнейшей особенности лимана следует отнести присутствие в его фауне и флоре большого числа редких, эндемичных и реликтовых видов, в том числе и представителей понто-каспийских комплексов.

Тилигульский лиман – слабо изученный в альгологическом плане водоем Северо-Западного Причерноморья. После исследований И. И. Погребняка [1], который указывал для водоема 128 видовых и внутривидовых таксонов, микрофитобентос лимана изучался эпизодически и на ограниченных участках. Н. Е. Гусяковым [2] в 1981 и 1988 гг. в лимане обнаружено 85 видов диатомей. На 47 из них приведены ссылки в монографии [3]. Краткая обзорная информация по планктонным видам, куда часто попадают и бентосные виды, приведена в известных монографических сводках [4, 5], а также в работах А. И. Иванова [6]. В последние годы опубликован ряд работ, в которых существенно пополнен список известных для водоема таксонов диатомовых водорослей [7 – 9].

Исследования видового состава диатомовых водорослей бентоса Тилигульского лимана на основе световой и электронной микроскопии, а также сводный анализ источников литературы позволил установить 216 видовых и внутривидовых таксонов диатомовых водорослей, относящихся к 3 классам, 7 подклассам, 22 порядкам, 39 семействам и 60 родам. Нами не обнаружен 41 таксон из ранее указанных различными авторами, что, по-видимому, связано с исчезновением их после осолонения лимана (до 21–22 ‰ в 2004 г.), а также с возможной неточностью идентификации при использовании только светового микроскопа.

© О.А. Ковтун, 2008



Цель работы — изучить с помощью сканирующего электронного и светового микроскопов таксономический состав диатомовых водорослей бентоса Тилигульского лимана и описать новые для науки *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov. и *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov.

Материалы и методы

Материалом для работы послужили более 1200 проб микрофитобентоса и обрастаний, собранных на протяжении 1990-2005 гг. по всей акватории Тилигульского лимана.

Определение, изучение структуры клеток, а также фотографирование водорослей в целях их таксономической идентификации и иллюстрации производили с помощью светового микроскопа (СМ) «Ergaval» (Carl Zeiss — Йена, Германия) и сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) «JSM — 35С» (Jeol, Япония) в институте ботаники имени Н. Г. Холодного НАН Украины (г. Киев).

Материал для просмотра в СЭМ предварительно готовили по методике, применяемой при изучении диатомовых водорослей [10]. Панцири очищали от органического вещества методом холодного сжигания в концентрированной серной кислоте с последующей трехкратной отмывкой дистиллированной водой. Отмытые пробы сохраняли в 70 % этиловом спирте.

Очищенные панцири диатомовых водорослей (осадок) наносили на специальные столики из нержавеющей стали или латуни, которые предварительно полировали мелкой абразивной пастой и обезжиривали ацетоном. Столики с пробами помещали в прибор для ионного испарения JEC-1100 для напыления тончайшим слоем углерода, а затем золотом высокой пробы. Образцы просматривали в СЭМ при увеличениях в 2-22 тысячи раз и фотографировали.

Результаты и их обсуждение

Оригинальными электронно-микроскопическими и оптическими исследованиями микрофитобентоса Тилигульского лимана выявлено 167 видов, представленных 181 видовым и внутривидовым таксоном диатомовых водорослей. Из них 74 являются новыми для этого водоема, 25 — впервые указываются для лиманов Северо-Западного Причерноморья.

Это такие виды, как: *Thalassiosira incerta* Makar., *T. parva* Pr.-Lavr., *T. weissflogii* (Grun.) Fryx. et Hasle, *Cyclostephanos dubius* (Fricke) Round, *Stephanodiscus astraea* (Ehr.) Grun., *S. rotula* (Kütz.) Hend., *S. costatum* (Grev.) Cl., *Coccinodiscus perforatus* Ehr., *C. radiatus* Ehr., *C. granii* Gough., *C. gigas* Ehr., *Melosira varians* Ag., *Aulacoseira granulata* (Ehr.) Sim. f. *granulata*, *A. islandica* (O. Müll.) Sim., *Pseudosolenia calcar-avis* (M. Shultze) Sunstrom, *Chaetoceros affinis* Lauder, *Ch. curvisetus* Cl., *Ch. rigidus* Цстф., *Diatoma tenue* Ag., *Licmophora communis* (Grun.) Grun., *L. ehrenbergii* (Kütz.) Grun., *Ardissonia baculus* (Greg.) Grun., *A. crystallina* (Ag.) Grun. in Cl. et Grun., *Toxarium undulatum* Bail., *Striatella interrupta* (Ehr.) Heib., *S. unipunctata* (Lyngb.) Ag., *Lyrella abrupta* (Donk.) Gusl. et Kar., *Mastogloia pumila* (Cl. et Moll.) Cl., *Cymbella cistula* (Hemp. in Hemp. et Ehr.) Kirch., *Gomphonema angustatum* Kütz., *Anomoeoneis sphaerophora* (Ehr.) Pfit., *Achnanthes manifera* Brun., *A. triconfusa* V. L., *Achnantheidium minutissima* (Kütz.) Czarn. var. *minutissima*, *Anorthoneis hummii* Hust., *Cocconeis kujalnitzkensis* Gusl. et Geras., *C. maxima* (Grun.) Perag., *C. notata* Petit., *C. pellucida* Grun. ex Rab.,



C. quarnerensis (Grun.) A.S. var. *adjuncta* A. S., *Luticola mutica* (Kütz.) Mann in Round, Crawf., Mann, *Caloneis liber* (W. Sm.) Cl., *Fallacia forcipata* (Grev.) Stick. et Mann, *Pinnularia microstauron* (Ehr.) Cl., *Diploneis chersonensis* (Grun.) Cl., *D. didyma* (Ehr.) Ehr., *D. subadvena* Hust., *Gyrosigma prolongatum* (W. Sm.) Grif. et Henfr., *Navicula palpebralis* Breb., *N. ramosissima* Ag., *N. tripunctata* (O.F. Müll.) Bory, *Proschkinia complanatoidea* (Hust. ex Simonsen) Mann, *Amphora caroliniana* Giff., *A. commutata* Grun. in V. H., *A. eunotia* Cl., *A. exigua* Greg., *A. genkalii* Gusl., *A. graeffeana* Hendey, *A. subacutiuscula* Schoeman, *Nitzschia acicularis* (Kütz.) W. Sm., *N. fasciculata* (Grun.) Grun. in V. H., *N. filiformis* (W. Sm.) Schutt, *N. lanceolata* W. Sm. f. *minor* V. H., *N. obtusa* W. Sm. var. *scalpeliformis* (Grun.) in V.H., *N. pseudohybrida* Hust., *N. pusilla* Grun., *N. sigmoidea* (Nitzsch) W. Sm., *N. vermicularis* (Kütz.) Hant. in Rabenh., *Tryblionella angustata* W. Sm., *T. coarctata* (Grun.) D. G. Mann, *T. gracilis* W. Sm., *Camphylodiscus fastuosus* Ehr., *E. alata* (Ehr.) Ehr., *Surirella brebissonii* Kram. et L.-B. var. *kuetzingii* Kram. et L.-B.

Анализ электронных микрофотографий ранее не идентифицированных мелких видов, обнаруженных в бентосе лимана, позволил выделить два интересных экземпляра. Эти экземпляры, согласно изученной нами литературе и диагностическим признакам известных таксонов диатомовых водорослей, являются новыми для науки. Описание новых таксонов, их диагнозы и оригинальные микрофотографии приводятся ниже.

1. *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov.

Valva longa-elliptica, 14 mkm longae, 7 mkm latae, area axiali, angusta, rasili, lineata, aequali latitudine per omnem longitudinem. Area axialis columnibus paulo prolatans in parvas areolas valvae versurae incurrens. Transversae series areolarum ad fines valvae paulo radialae. In series foramina areolarum prolongata in longitudinali directo. Areolae 30, serius areolarum 11 per 10 mkm. Serius areolarum in valvae rectae sine flexurae. Sex series centrales septeni areolas habent, tum numeros earum minuit singuli per seriem; perveniens ad duas. In versura valvae series areolarum de una serie se transferentes in duas, tres, quatuor lineas simili flabello. Valvae se terminantes partes superiores seriebus parvatum areolarum pariter dispositis per versuram areolarum ad 40 per 10 mkm (fig. 1).

Н о л о т у п у s: negativ № 155, SEM.

Створка удлинено — эллиптическая, 14 мкм длины, 7 мкм ширины, с узким, гладким линейным осевым полем, одинаковой ширины по всей длине. Осевое поле на концах немного расширяется, упираясь в мелкие ареолы загиба створки. Поперечные ряды ареол слегка радиальные к концам створки. В рядах форамены ареол удлинены в продольном направлении. Ареол — 30, рядов ареол — 11 в 10 мкм. Ряды ареол относительно осевого поля створки прямые, без изгибов. В шести центральных рядах по 7 ареол, далее их количество уменьшается по единице на ряд, доходя до 2-х. На загибе створки ряд ареол из однорядной полосы веерообразно переходит в 2-х, 3-х и 4-х рядные. Вершины створки заканчиваются рядами мелких, равномерно распределенных по загибу ареол, до 40 в 10 мкм (рис. 1).

Т и п. Украина, Тилигульский лиман, в районе с. Кошары; единично в бентосе на песчаном грунте, соленость 17,3 ‰, VI. 1996, О. А. Ковтун; хранится на Гидробиологической станции ОНУ имени И. И. Мечникова (г. Одесса).

Г о л о т и п : негатив № 155, СЭМ.



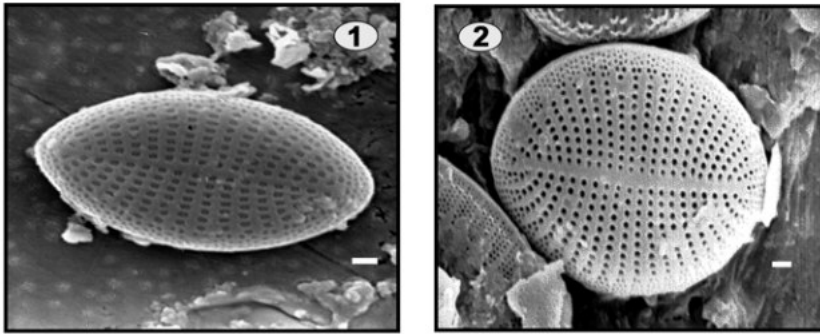


Рис. 1. Верхняя бесшовная створка *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov. (1); типичная верхняя бесшовная створка *Cocconeis scutellum* var. *scutellum* (2) (СЭМ, линейка на фото – 1 мкм).

Fig. 1. Upper araphid valve of *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov. (1); typical upper araphid valve of *Cocconeis scutellum* var. *scutellum* (2-3); (SEM, line at photo – 1 mkm).

Размерами и количеством штрихов при световой микроскопии проявляет сходство с мелкими экземплярами *C. scutellum* var. *parva* Grun., однако отличается овальными ареолами в рядах, направленными вдоль осевого поля, и их параллельным расположением. По мелким ареолам загиба створки больше всего похож на типовой *C. scutellum* var. *scutellum*, но отличается от него меньшими размерами, большим количеством рядов ареол в 10 мкм, формой ареол, их расположением, а также расположением ареол в вершинах створки (у *C. scutellum* var. *scutellum* клинообразные пучки) (рис. 1, фото 2).

Согласно [11, 12], *C. scutellum* var. *scutellum*: длина 20 – 60 мкм, ширина 12 – 40 мкм; на верхней створке 5 – 8 продольных и поперечных рядов ареол в 10 мкм; на нижней створке 7 – 9 штрихов и 10 – 12 точек в 10 мкм, край гиалиновый с кольцом точек в небольших группах. Для *C. scutellum* var. *parva* указывается: длина до 30 мкм, 11 – 14 штрихов в 10 мкм, створки эллиптические, реже ромбические. Отмечается, что часто встречаются переходные формы между var. *parva* и var. *minutissima* и между var. *parva* и типичной формой.

Н. И. Караева [13] для Каспийского моря указывала типичную форму (длина 20,8 – 46,2 мкм, ширина 14,2 – 22,0 мкм) и только один var. *adjuncta*, с размерами: длина 11,0 – 29,7 мкм, ширина 7,7 – 20,9 мкм. На мелких створках вдоль краев отсутствуют группы мелких рудиментированных ареол, тогда как на крупных они имеются. Ареолы круглые, 10 – 12 в 10 мкм, для типичной формы 8 – 10 штрихов в 10 мкм.

Известно, что *C. scutellum*, как указывала А. И. Прошкина-Лавренко [14], очень изменчивый вид, особенно в водоемах с изменяющимися условиями среды, к которым можно отнести и всю северо-западную часть Черного моря, и многие лиманы юга Украины. В настоящее время, кроме типовой разновидности *C. scutellum* var. *scutellum* выделяют еще две – *C. scutellum* var. *adjuncta* A. S. и *C. scutellum* var. *parva* Grun. [15] или три разновидности – *C. scutellum* var. *adjuncta* A. S., *C.*

scutellum var. *parva* Grun., *C. scutellum* var. *minutissima* Grun. ex V.H. [16]. Разновидность *C. scutellum* var. *stauroneiformis* трансформирована в самостоятельный вид — *C. stauroneiformis* (V. H.) Okuno. По поводу другого таксона — *C. scutellum* var. *minutissima* Grun. in V. H. A. И. Прошкина — Лавренко [14] указывала, что, по-видимому, за этот таксон ошибочно были приняты мелкие экземпляры *C. scutellum* var. *parva*, однако эта точка зрения требует подтверждения.

У разных авторов встречается много несоответствий, выражающихся в нечетком разграничении *C. scutellum* на внутривидовые таксоны. Такая ситуация, по-видимому, связана со сложностью точного определения мелких видов в световом микроскопе и недостаточной четкостью диагностических признаков, полученных при анализе фотографий со сканирующего электронного микроскопа.

Таким образом, обнаруженный и иллюстрированный (рис. 1, фото 1) с помощью СЭМ экземпляр значительно отличается от упомянутых выше таксонов видового и внутривидового ранга, что дает нам основание описать его как новую разновидность — *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov.

Ограниченный объем исследованного материала требует дальнейшего тщательного изучения ультраструктуры нижней створки и ее внутренней поверхности.

2. *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov.

Valvae lata-ovata paulo excussus 16 mkm longae, 7 mkm latae, areolae rotundae in parallelas paulo radiales serius formate. Series 40-44 per 10 mkm et 48 areolae per 10 mkm. Iter raphe continuum in finibus paulo curvum in unum latus. Area centralis nitida sine areolis transversa-lata-ovata (fig. 2).

Н о л о т у р у: diapositivum № 301, SEM.

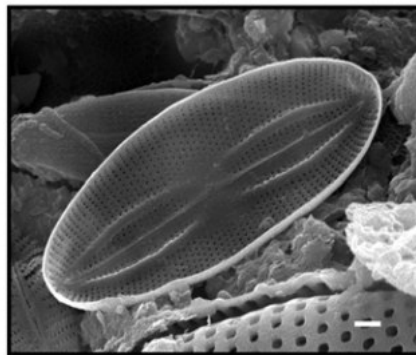


Рис. 2. *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov. — внутренняя поверхность створки (СЭМ, линейка на фото — 1 мкм).

Fig. 2. *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov. — internal surface of valve (SEM, line at photo — 1 mkm).

Створка широкоовальная, слегка вытянутая, длина 16 мкм, ширина 7 мкм. Ареолы круглые, собраны в параллельные, слабо радиальные ряды. 40 — 44 рядов в 10 мкм и до 48 ареол в 10 мкм ряда. Шовный канал непрерывный, на концах слегка загнут в одну сторону. Центральное поле чистое, без ареол, поперечно-широкоовальной формы. Осевое поле линейное, среднее более или менее поперек-

расширенное и соединены с гладкими боковыми продольными полями, образующими вместе лировидную фигуру (рис. 2).

Т и п. Украина, Тилигульский лиман; в бентосе на илисто-песчаном грунте, соленость 15 ‰, температура 17 °С, единично, Х. 1998, О.А. Ковтун; хранится на Гидробиологической станции ОНУ имени И. И. Мечникова (г. Одесса).

Г о л о т и п : диапозитив № 301, СЭМ.

Формой и общей структурой створки сходна с *Fallacia forcipata* (Grev.) Stick. et Mann (= *Navicula forcipata* Grev., *Lyrella forcipata* (Grev.) Gusl. et Kar.), однако сильно отличается от нее размерами и количественными характеристиками ареол.

Из других видов по размерным характеристикам сравнима только с *Fallacia pygmaea* (Kütz.) Stick. et Mann (= *Navicula pygmaea* Kütz., *Lyrella pygmaea* (Kütz.) Makar. et Kar.), для которой характерны клетки длиной 17-35 мкм, шириной 8-10 мкм и 25-27 рядами ареол в 10 мкм, а также с описанным Н. Е. Гусяковым и др. [3] видом *Lyrella phylophorae* Gusl. Для этого вида указаны следующие размерные характеристики: длина 7-12 мкм, ширина 4-6 мкм, до 60 ареол в 10 мкм, около 30 рядов ареол в 10 мкм (табл.).

Новый вид проявляет также некоторое сходство с ископаемым внутривидовым таксоном *Navicula hyalina* Donk. var. *fossilis* Pant., для которого указываются следующие размерные данные: 23,5 мкм длина, 9 мкм ширина. Вид известен из миоценовых отложений Керченского полуострова [14].

Таблица

Сравнительная характеристика видов *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov. и *Fallacia forcipata* (Grev.) Stick. et Mann

Вид	Длина	Ширина	Количество рядов в 10 мкм	Количество ареол в 10 мкм
<i>Fallacia forcipata</i> , по [3]	54-60	16-22	13-14	не приводят
<i>F. forcipata</i> , по [11]	30-80	12-24	13-16	22
<i>F. forcipata</i> , по [12]	40-80	20-26	13	17-20
<i>F. forcipata</i> , по [14]	55-68	21-25	13-14	не приводят
<i>F. forcipata</i> , по [17]	20-80	10-24	13-16	22
<i>Fallacia gusliakovi</i> Kovtun sp. nov.	16	7	40-44	До 48

Таким образом, описание найденного нами вида не совпадает ни с одним из известных по литературе таксонов диатомовых водорослей. Этот вид, особенно отличаясь от всех близких видов, имеет значительно большее количество ареол в рядах и в 10 мкм ряда. Изучение структуры этого вида в световом микроскопе малоперспективно из-за очень мелких размеров вида и невозможности увидеть и посчитать мелкие диагностические структуры. В связи со скудностью исследованного материала и для более полного изучения основных морфологических параметров, необходимо изучить на СЭМ ультраструктуру наружной поверхности створки.

Вид назван в честь известного украинского альголога, доктора биологических наук Гусякова Николая Емельяновича.

Нахождение большого количества новых таксонов в Тилигульском лимане свидетельствует о значительных перестройках в его биоте, которые произошли в последнее время из-за изменившихся гидролого-гидрохимических условий. Об-

нарушение новых и редких видов, в том числе новых и для лиманов Северного Причерноморья, свидетельствует об оригинальности его флоры, что дает основание для дальнейшего, более детального её изучения.

Автор благодарит научных сотрудников Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины (г. Киев) О.А. Закордонца и А.Ф. Крахмального за неоценимую помощь при работе на электронном сканирующем микроскопе, в результате которой и получены исходные фотографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Погребняк И.И.* Донная растительность лиманов Северо-Западного Причерноморья и сопредельных им акваторий Черного моря: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Одесса, 1965. — 31 с.
2. *Гусялков Н.О.* Діатомові водорості бентосу Чорного моря та суміжних водойм (морфологія, систематика, екологія, біогеографія). Автореф. дис. ... доктора биол. наук. — 03.00.05, Київ, 2002. — 36 с.
3. *Гусялков Н.Е., Закордонец О.А., Герасимюк В.П.* Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Черного моря и прилегающих водоемов. — Киев: Наук. думка, 1992. — 112 с.
4. *Лиманно-устьевые комплексы Причерноморья: географические основы хозяйственного освоения / Под ред. Г. И. Швевса.* — Л.: Наука, 1988. — 303с.
5. *Лиманы Северного Причерноморья // Полищук В.С., Замбриборщ Ф.С., Тимченко В.М. и др. / Отв. ред. Миронов О.Г.; Киев: Наукова думка, 1990. — 204 с.*
6. *Иванов А.И.* Фитопланктон устьевых областей рек Северо-Западного Причерноморья. — Киев: Наук. думка, 1982. — 212 с.
7. *Герасимюк В.П., Ковтун О.А.* Микроскопические водоросли Тилигульского лимана // Альгология. — 2007. — Т. 17, № 1, — С. 42-52.
8. *Ковтун О.А.* Итоги альгофлористических исследований микрофитобентоса Тилигульского лимана // Матеріали XII з'їзду УБТ, (м. Одеса, 15-18 травня 2006 р.): тез. доп. — Одесса, 2006. — С. 222.
9. *Ковтун О.А.* Многолетние изменения в структуре микрофитобентоса Тилигульского лимана // Актуальні проблеми ботаніки, екології та біотехнології: Матеріали Міжнародної конференції молодих учених-ботаніків (м. Київ, 27-30 вересня, 2006 р.): тез. доп. — Київ: Фітосоціоцентр, 2006. — С. 7-8.
10. *Караева Н.И., Шевченко А.Я.* К методике исследования диатомовых в сканирующем электронном микроскопе // Ботан. журн. — 1974. — Т. 59, № 7. — С. 988 — 991.
11. *Hustedt F.* Die Kieselalgen Deutschlands Osterreichs und der Schweiz mit Berücksichtigung der ubrigen Lander Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete // L. Rabenhorst Kryptogamen Flora, Leipzig. — 1927 — 1966. — V. 7 — 816 s.
12. *Диатомовый анализ.* Определитель ископаемых и современных диатомовых водорослей / А.П. Жузе, И.А. Кисилев, В.С. Порецкий и др. — Л.: Госгеолитиздат, 1949. — Кн. 1. — 273 с.; 1949. — Кн. 2. — 283 с.; 1950. — Кн. 3. — 398 с.
13. *Караева Н.И.* Диатомовые водоросли бентоса Каспийского моря. — Баку: Элм, 1972. — 258 с.
14. *Прошкина — Лавренко А.И.* Диатомовые водоросли бентоса Черного моря.- М.-Л.; Изд-во АН СССР. М. — Л., 1963. — 243 с.
15. *Разнообразие водорослей Украины / Под. общ. ред. С.П. Вассера, П. М. Царенко // Альгология. — 2000. — Т. 10, № 4. — 309 с.*
16. *Рябушко Л.И.* Микроводоросли бентоса Черного моря (Чек — лист, синонимика, комментарий). — Севастополь, НПЦ «ЭКОСИ-Гидрофизика», 2006. — 143 с.
17. *Krammer K., Lange-Bertalot H.* Bacillariophyceae // Subwasserflora von Mitteleuropa, 1986. — Bd. 2/1. — 876 s.



О.О. Ковтун

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 74 65 716,
e-mail: hydrobiostation@gmail.com

НОВІ ТАКСОНИ ДІАТОМОВИХ ВОДОРΟΣТЕЙ БЕНТОСУ ТИЛІГУЛЬСЬКОГО ЛИМАНУ (ПІВНІЧНО-ЗАХІДНЕ ПРИЧОРНОМОР'Я)

Реферат

У бентосі Тилігульського лиману виявлений 181 видовий і внутрішньовидовий таксон діатомових водоростей. З них вперше приводяться для водойми — 74, вперше для лиманів Північно-Західного Причорномор'я — 25. Описані як нові для науки — *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov. и *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov., представлені їх мікрофотографії.

К л ю ч о в і с л о в а: Bacillariophyta, нові таксони, бентос, Тилігульський лиман.

O.A. Kovtun

Odesa National Mechnikov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (048) 74 65 716,
e-mail: hydrobiostation@gmail.com

NEW TAXONS OF BENTHIC DIATOM ALGAE OF THE TILIGUL ESTUARY (THE NORTH-WESTERN PART OF THE BLACK SEA COAST)

Summary

181 species and taxons of the diatom algae were revealed in benthos of the Tiligul Estuary. 74 of them are represented for the reservoir for the first time and 25 for the first time for the estuaries of the north-western part of the Black Sea. *Cocconeis scutellum* var. *tiligulicus* Kovtun var. nov. and *Fallacia gusliakovi* Kovtun sp. nov. are described as new species for science. The original micrographs are presented.

К e y w o r d s: Bacillariophyta, new taxons, benthos, the Tiligul Estuary.



**В.В. Клочко, А.Н. Остапчук, Л.Н. Буценко, О.М. Онищенко,
Е.А. Киприанова**

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного
НАН Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, ГСП, Д 03680, Украина,
тел.: 8 (044) 526 23 79, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSYCHROBACTER*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ ЧЕРНОГО МОРЯ

Жирнокислотные спектры трех штаммов бактерий, выделенных из воды Черного моря и отнесенных, согласно данным фенотипического анализа и частичного сиквенса 16S рРНК к роду Psychrobacter, были типичными для представителей этого рода и содержали в качестве важнейших компонентов ненасыщенные жирные кислоты C18:1 (61,89 – 74,86 %), C17:1 (6,48 – 22,96 %) и C16:1 (4,58 – 7,26 %). В качестве минорных компонентов присутствовали C12:0, C16:0, C18:0, у отдельных штаммов – 12-изо-C15:0 и изо-C17:0 кислоты. Результаты фенотипических и хемотаксономических исследований свидетельствуют об отличиях черноморских изолятов от эволюционно близкого им вида P. glacincola.

К л ю ч е в ы е с л о в а: состав жирных кислот, бактерии рода Psychrobacter, Черное море.

Род *Psychrobacter* [7] с типовым видом *P. immobilis* описан в 1986 г. для граммотрицательных оксидазоположительных неферментирующих беспигментных неподвижных коккобацилл, принадлежащих к семейству *Moraxellaceae* и широко распространенных в морской и наземной среде обитания.

Психробактеры были изолированы из морской воды [8, 9], жабр и кожи рыб, морских беспозвоночных [9], пищевых продуктов и клинических источников [10]. Новые экстремофильные виды рода *Psychrobacter* были найдены в последние годы во льдах, морской воде и почвах Антарктики – в местах поселения пингвинов [4, 5].

При исследовании галофильных бактерий Черного моря нами из образцов воды, отобранных в Карадагском заповеднике, были выделены три штамма граммотрицательных неподвижных психротрофных микроорганизмов, нуждающихся в ионах натрия и отнесенных, на основании изучения их фенотипических свойств и данных частичного сиквенса 16S рРНК, к роду *Psychrobacter*. Филогенетически и фенотипически исследованные изоляты были близки экстремофильному виду *P. glacincola*, выделенному из материкового льда Антарктиды [10]. Однако они отличались от него уровнем галотолерантности, отношением к температуре и некоторыми особенностями спектров углеродного питания. Таким образом, вопрос о том, относятся ли черноморские изоляты к какому-то экотипу *P. glacincola* или принадлежат к самостоятельному виду рода *Psychrobacter*, не был решен окончательно.

© .В. Клочко, А.Н. Остапчук, Л.Н. Буценко, О.М. Онищенко, Е.А. Киприанова, 2008



Одним из важных хемотаксономических критериев, широко используемых при характеристике новых видов бактерий, является их жирнокислотный состав.

Целью настоящей работы было исследование общих жирнокислотных спектров названных бактерий с целью уточнения их таксономического положения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили штаммы *Psychrobacter* spp. УКМ (Украинская Коллекция Микроорганизмов) В-11100, УКМ В-11101 и УКМ В-11102. Бактерии хранили на полужидкой питательной среде В для морских бактерий [3] под слоем стерильного вазелинового масла при комнатной температуре. Среда содержала г/л: пептона — 5,0; дрожжевого экстракта — 2,5; глюкозы — 1,0; K_2HPO_4 — 0,3; $MgSO_4$ — 0,05; NaCl — 12,5; агар-агар — 20; pH 7,5-7,8. Для изучения свойств бактерий, в том числе жирнокислотного состава, их высевали на скошенную агаризованную среду В и инкубировали при 26 °С. Методы фенотипических исследований, амплификации ДНК и филогенетического анализа описаны нами ранее [2].

Жирнокислотный состав клеточных липидов изучали методом хромато-масс-спектрометрии. Пробы для анализа готовили согласно методике приготовления метиловых эфиров жирных кислот бактерий [6].

Исследования проводили на хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 inert (капиллярная колонка HP-5MS: 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm (J&W Scientific, USA). Объем пробы — 1,0 мкл; режим — split; газ-носитель — гелий; скорость потока — 1,0 мл/мин; начальная температура колонки — 150 °С; конечная температура колонки — 250 °С; температурный градиент — 4 °С/мин; температура интерфейса — 280 °С; тип ионизации — электронный удар; энергия ионизации — 70 эВ.

Обработку данных хромато-масс-спектрометрического анализа проводили с помощью компьютерной программы ChemStation и интегрированной базы данных масс-спектров NIST 02, а также стандарта метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco, № 4708-U, USA).

Результаты и их обсуждение

Данные ПЦР-амплификации и последующего секвенирования участков гена 16S рРНК с длиной от 448 до 456 нуклеотидов свидетельствовали о принадлежности исследуемых микроорганизмов к роду *Psychrobacter*. Эволюционно наиболее близким к ним оказался штамм *Psychrobacter glacincola* U 85876, обнаруживший 98 % сходства последовательностей с идентичными фрагментами их 16S рРНК.

По своим фенотипическим свойствам бактерии соответствовали диагнозу рода *Psychrobacter* [7] и представляли собой аэробные, грамотрицательные неподвижные, неспорообразующие коккобациллы, каталазо- и оксидазоположительные, лишенные аргининдигидролазы, орнитин- и лизин-декарбоксилазы, не требующие дополнительных факторов роста. Они хорошо росли на простых минеральных средах и усваивали бутират, аспарагин, глютамат и пролин в качестве единственного источника углерода и энергии.

Однако, если результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствовали об эволюционной близости черноморских культур экстремофильному *Psychrobacter glacincola*, то в их фенотипических характеристиках наблюдались определенные отличия (табл.1).



**Некоторые фенотипические отличия между черноморскими штаммами
Psychrobacter и антарктическим *Psychrobacter glacincola***

Свойство	Штаммы <i>Psychrobacter</i> из воды Черного моря	<i>P. glacincola</i> [4]
Рост в присутствии 15 % NaCl в среде	–	+
Оптимальная температура роста	+26 °С	+13÷15 °С
Усвоение в качестве единственного источника углерода:		
D-глюкозы	+	–
Сахарозы	+	–
D-фруктозы	+	–
трегалозы	+	–
целлобиозы	+	–
сорбита	+	–
l-малата	+	–

Примечание: “+” признак положителен; “–” признак отрицателен

Черноморские культуры требуют для роста ионы Na⁺ и сходны в этом отношении с *P. glacincola*. Однако, если последний выдерживает до 15 % NaCl в среде, то для большинства исследуемых бактерий максимально переносимой является в три раза меньшая концентрация. Отличия в спектрах углеродного питания двух рассматриваемых групп микроорганизмов касаются способности черноморских психробактеров усваивать углеводы и некоторые другие соединения, недоступные для антарктического вида.

Наконец, подобно другим психробактериям, черноморские изоляты — психротрофы. Однако в отличие от *P. glacincola*, для которого верхняя граница температуры роста +19÷22 °С, теоретически рассчитанный минимум — минус 18 °С, а оптимум лежит при +13÷15 °С, выделенные нами психробактеры растут при более высоких температурах.

Результаты изучения липидного состава рассматриваемых бактерий представлены в табл. 2.

Подобно остальным представителям рода *Psychrobacter* (в том числе и *P. glacincola*), черноморские изоляты отличаются наличием в своих жирнокислотных профилях трех ненасыщенных кислот — C18:1, C17:1 и C16:1, составляющих более 70 % их жирнокислотного пула. Более того, по утверждению авторов, описывавших антарктические виды [5], их жирнокислотные спектры практически идентичны и неотличимы от таковых у остальных представителей рода *Psychrobacter*.

Однако существует другая точка зрения, подтверждаемая и полученными нами данными: видовую специфику психробактерий обуславливают как количественные соотношения названных выше важнейших жирных кислот, так и минорные компоненты их жирнокислотных спектров (рис. 1).



Жирнокислотный состав черноморских психробактерий и некоторых видов рода *Psychrobacter*

Жирные кислоты	<i>Psychrobacter</i> spp.			<i>Psychrobacter submarinus</i> КММ 225 [†] [9]	<i>Psychrobacter marincola</i> КММ 277 [†] [9]
	УКМ В-11100	УКМ В-11101	УКМ В-11102		
C10:0	0	0	0	3,4	3,1
C12:0	5,272	4,08	3,08	7,1	4,4
3-ОН C12:0	0	0	0	2,1	3,1
<i>12iso</i> -C15:0	0	2,98	0	–	–
C16:0	3,08	2,94	2,80	–	–
C16:1	5,08	7,26	4,58	5,5	5,0
<i>iso</i> -C17:0	0	0	1,27	–	–
C17:1	17,15	6,48	22,96	–	–
C18:0	1,56	1,40	3,42	–	–
C18:1	67,84	74,86	61,89	78,9	84,4

Примечание: “–” данные в литературе не приводятся.

Заметим, что мы не нашли упоминания об обнаруженных нами минорных жирных кислотах в описании жирнокислотного спектра *P. glacincola* [4]. Вывод о видовой специфике липидного состава психробактерий подтверждают и представленные в табл. 2 для сравнения жирнокислотные профили двух других морских видов *Psychrobacter*.

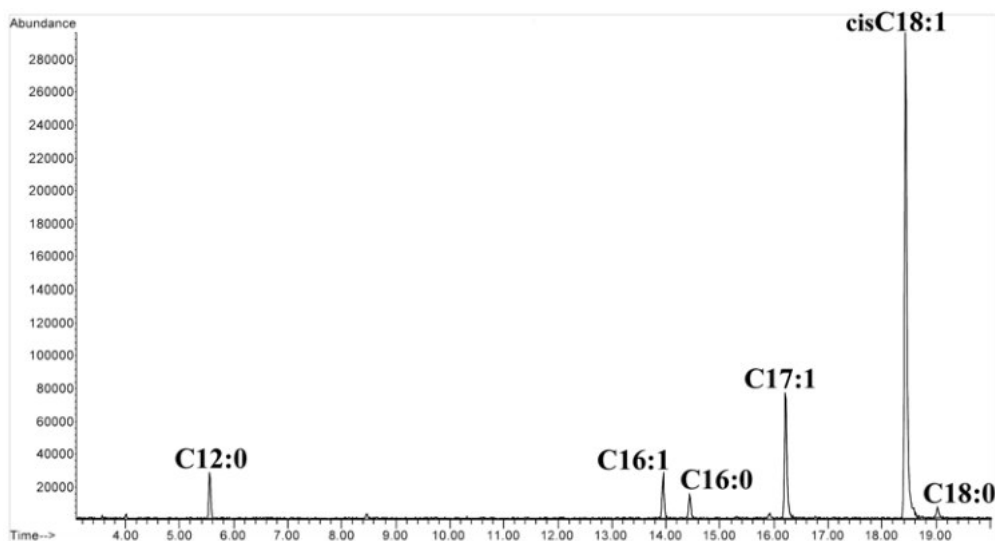


Рис. 1. Жирнокислотный спектр штамма *Psychrobacter* sp.УКМ В-11100

Fig. 1. Fatty acidic spectrum of the strain *Psychrobacter* sp. UKM B-11100

Еще более разительные отличия обнаруживаются при анализе жирнокислотного состава типового штамма *Moraxella phenylpyruvica* (в настоящее время *Psychrobacter phenylpyruvicus* [10]), содержащего в качестве минорных компонентов С14:0 и С15:0 кислоты, также 3-оксидекановую кислоту [1]. Этот вид отличается и экологией — в отличие от остальных видов психробактерий, он выделен из клинических источников.

Таким образом, бактерии, выделенные из воды Черного моря, по своим фенотипическим свойствам, результатам частичного сиквенса 16S рРНК, жирнокислотному составу являются типичными представителями рода *Psychrobacter*. В то же время, некоторые фенотипические свойства и хемотаксономические особенности (липидный состав) свидетельствуют об их существенных отличиях от эволюционно близкого экстремофильного вида *P. glacicola*, что позволяет предположить их принадлежность к новому виду рода *Psychrobacter*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных. — К.: Наукова думка, 1992. — 264 с.
2. Онищенко О.М., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Psychrobacter*, выделенные из воды Черного моря // Микробиология. — 2004. — т.73, № 2. — С. 1-2.
3. Baumann P., Baumann L. The marine Gram-negative Eubacteria // The Prokaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Ed. By Starr M.P., Stolp H., Truper H. et al., Berlin: Springer-Verlag, 1986. v.2, p.1302-1331.
4. Bowman J. P., Nichols D.S., McMeekin T.A. *Psychrobacter glacicola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice // Syst. Appl. Microbiol. — 1997. — v.20. — P. 209-215.
5. Bowman J.P., Cavanagh J., Austin J., Sanderson K. Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornitogenic soils. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1996. — v.46. — P. 841-848.
6. Brian B.L., Gardner E.W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography // Appl. Microbiol. — 1967. — v. 15, № 6. — P. 1499 — 1500.
7. Juni E., Heym G.A. *Psychrobacter immobilis* gen. nov. sp. nov. genospecies composed of Gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1986. — v. 36. — P. 388-391.
8. Maruyama A., Honda D., Yamamoto H., Kitamura K., Higashihara T. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacifiensis* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2000. — v. 50. — P. 835-846.
9. Romanenko L., Schumann P., Rohde M., Lysenko A., Mikhailov V., Stackerbrandt E. *Psychrobacter submarinus* sp.nov. and *Psychrobacter marincola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2002. — v. 52. — P. 1291-1297.
10. Rossau R., Van Landschoot A., Gillis M., De Ley J. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1991. — v.41. — P. 310-319.



**В.В. Клочко, А.М. Остапчук, Л.М. Буценко, О.М. Онищенко,
О.А. Кіпріанова**

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д 03680, Україна,
тел.: 8 (044) 526 23 79, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД БАКТЕРІЙ РОДУ *PSYCHROBACTER*, ВИДІЛЕНИХ З ВОДИ ЧОРНОГО МОРЯ

Реферат

Жирнокислотні спектри трьох штамів бактерій, виділених з води Чорного моря та віднесених, згідно даних фенотипового аналізу і часткового сіквенсу 16S рРНК, до роду *Psychrobacter*, були типовими представниками цього роду і містили як найважливіші компоненти ненасичені жирні кислоти C18:1 (61,89 – 74,86 %), C17:1 (6,48 – 22,96 %) і C16:1 (4,58 – 7,26 %). Як мінорні компоненти були присутні C12:0, C16:0, C18:0, у окремих штамів – 12-ізо-C15:0 та ізо-C17:0 кислоти. Результати фенотипових і хемотаксономічних досліджень свідчать про відмінність чорноморських ізолятів від еволюційно близького їм виду *P. glacincola*.

К л ю ч о в і с л о в а: склад жирних кислот, бактерії роду *Psychrobacter*, Чорне море.

**V.V. Klochko, A.N. Ostapchuk, L.N. Butsenko, O.M. Onischenko,
E.A. Kiprianova**

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, UNAS, Zabolotno str.,
154, Kiev, D 03680, Ukraine,
tel.: 8 (044) 526 11 79, e-mail: vvk@serv.imv.kiev.ua

FAT-ACIDIC COMPOSITION OF BACTERIA OF THE GENUS *PSYCHROBACTER* ISOLATED FROM THE BLACK SEA WATER

Summary

The fat-acidic spectra of three bacterial strains isolated from the Black sea water and assigned to *Psychrobacter* genus according to the phenotypical analysis and partial 16S rRNA sequence data were common for the representatives of this genus. They contained as the main components the unsaturated fatty acids: C18:1 (61,89 – 74,86 %), C17:1 (6,48 – 22,96 %) and C16:1 (4,58 – 7,26 %). C12:0, C16:0, C18:0, and in the isolated strains – 12-iso-C15:0 and iso-C17:0 fatty acids were present as the minor components. The results of phenotypical and chemotaxonomic study give evidence of the difference between the Black sea isolates and evolutionary related to them *Psychrobacter glacincola*.

К e y w o r d s: fat-acidic composition, bacteria of the genus *Psychrobacter*, the Black Sea.



М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.О. Гнатуш

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул.Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: 8 (067) 492 76 81,
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net

РІСТ *CHLOROBIVUM LIMICOLA* YA-2002 ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

*Досліджено умови росту *C. limicola* Ya-2002. Показано, що максимальний ріст бактерій відбувається за інтенсивності освітлення в 40 лк. Збільшення інтенсивності освітлення супроводжується зниженням росту культури. За допомогою електронної мікроскопії показано, що різна інтенсивність освітлення культури викликає зміни у фотосинтетичному апараті клітин *C. limicola* Ya-2002. Концентрація сірководню, що забезпечує максимальний ріст *C. limicola*, складає 4 мМ, збільшення вмісту сірководню в середовищі супроводжується пригніченням росту культури. Клітини бактерій *C. limicola* Ya-2002 не використовують глюкозу, фруктозу, галактозу як джерело вуглецю та донор електронів. Лише додавання ацетату і пірувату стимулює ріст культури за наявності CO_2 і H_2S в середовищі. Показано, що зелені сіркобактерії *C. limicola* Ya-2002 здатні використовувати амонійний, амінний і молекулярний азот. Нітратна форма азоту не використовується бактеріями. Додавання нітратів до середовища пригнічує процес азотфіксації.*

К л ю ч о в і с л о в а : зелені сіркобактерії, ріст, сірководень.

Зелені фототрофні сіркові бактерії зустрічаються майже в кожному водному басейні. Однак, основними місцями їх існування є прісні та солоні водойми, котрі містять сірководень [2, 9, 11]. Переважно, це водойми застійного типу з високим вмістом органічних речовин. У таких середовищах фотосинтезувальні зелені сіркобактерії розвиваються у великих кількостях і є домінуючою мікрофлорою при концентрації сірководню 50-100 мг/л. Вони утворюють скупчення у вигляді зелених плям чи суцільних нальотів на дні освітлених ділянок водойм [1, 4, 3]. Фототрофні зелені сіркобактерії є першим бар'єром на шляху поширення сірководню у верхні шари водойм, що забезпечує можливість розвитку там багатьох рослинних та тваринних організмів. У випадку достатньої освітленості ці бактерії стають головними споживачами сірководню, використовуючи його як донор електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [9, 12].

Метою роботи було дослідити вплив освітлення, концентрації сірководню та різних джерел вуглецевого живлення на процес нагромадження біомаси зеленими фотосинтезувальними сіркобактеріями *C. limicola* Ya-2002.



Матеріали і методи

У досліджах використовували культуру зелених фотосинтезувальних сіркових бактерій *C. limicola* Ya-2002, виділену з водойм Яворівського сіркового родовища, що багаті сірководнем [1, 2]. Бактерії вирощували в анаеробних умовах у рідкому середовищі Ван Ніля [2] протягом 8-10 діб при температурі 24–25 °С і постійному освітленні променями з довжиною хвилі 740-800 нм. Інтенсивність освітлення вимірювали за допомогою люксметра Ю-116.

Визначення біомаси бактерій проводили фотоелектроколориметрично ($\lambda=450$ нм, довжина оптичного шляху 3 мм, ФЕК–2 МП–УХЛЧ4.2).

Морфологічні зміни в клітинах бактерій вивчали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа УЕМВ–100Б. Для виготовлення мікрофотографій двічі відмиті дистильованою водою клітини осаджували центрифугуванням при 10 тис. об./хв протягом 15 хв. Клітини фіксували в 1,5 % розчині OsO_4 у какодилатному буфері (рН 7,2) протягом 90 хв при 0 °С. Фіксовані клітини промивали, обезводнювали в розчинах із зростаючими концентраціями етанолу і окису пропілену. Зразки переносили в епоксидну смолу Епон 812. Зрізи клітин отримували на ультрамікромомі УМТП – 6 і контрастували цитратом свинцю за Рейнольдсом. Дослідження зразків проводили на електронному трансмісійному мікроскопі УЕМВ–100Б [2]. Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми “Microsoft Excel 2003”. Вибір тактики статистичного оброблення і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [7] за рівня достовірності $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Відомо, що інтенсивність нагромадження біомаси зеленими фотосинтезувальними сіркобактеріями залежить від різних факторів середовища: природи і інтенсивності освітлення, концентрації первинного донора електронів, вуглецевого живлення, мінерального складу середовища, температури тощо [5, 6, 7].

Представники родини *Chlorobiaceae* – облігатні фотолітоавтотрофи. Особливістю цих бактерій є наявність у клітинах спеціальних світлочутливих везикул хлоросом [6]. У цих структурах, залежно від виду бактерій, знаходяться бактеріохлорофіли *c*, *d* та *e*, а також ліпіди і каротиноїди. Локалізовані в хлоросомах бактеріохлорофіли виконують функцію світловловлюючих антен. Останні зв'язані з реакційним центром, локалізованим у плазматичній мембрані через бактеріохлорофіл *a*, який знаходиться в базальній пластинці і виконує функцію проміжної ланки при переносі енергії світла від хлоросом на реакційні центри [6, 8]. Високий ступінь впорядкованості даних пігментів здійснюється за допомогою білкових молекул.

Процес нагромадження біомаси зеленими сіркобактеріями залежить не лише від спектрального складу світлових променів, але і від інтенсивності світлового потоку. На рис 1. показано, як впливає інтенсивність освітлення культури на ріст *C. limicola* Ya-2002.

Дані цього експерименту показують, що інтенсивність освітлення відіграє важливу роль у процесі росту бактерій. Найбільш інтенсивно ріст культури відбувався при слабкому освітленні, інтенсивність якого не перевищувала 40 лк. Подальше зростання інтенсивності освітлення супроводжувалося пригніченням росту культури, про що свідчило зменшення біомаси бактерій. При інтенсивності 150 лк біомаса бактерій зменшувалась у два рази, а при 600 лк рівень біомаси був у п'ять разів меншим від максимального.



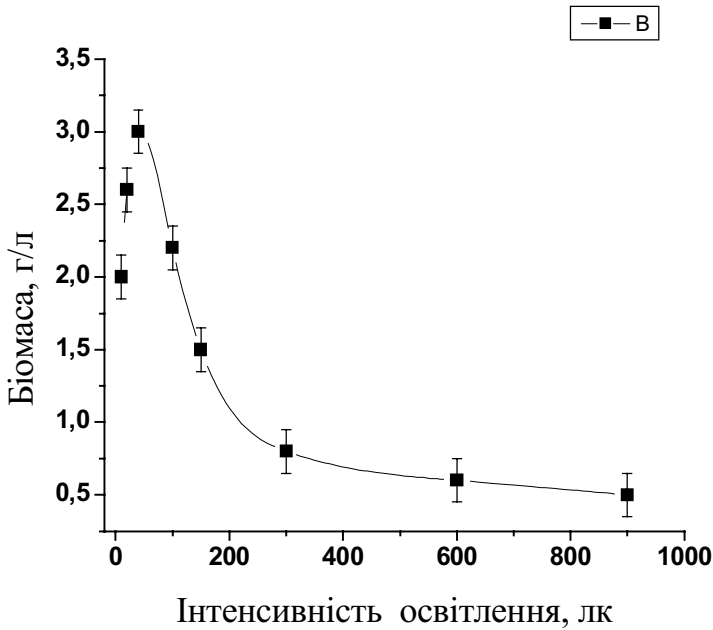


Рис. 1. Вплив інтенсивності освітлення на ріст *C. limicola* Ya-2002

Fig. 1. Correlation between lighting intensity and growth *C. limicola* Ya-2002

Електронна мікроскопія клітин, вирощених за умов різної освітленості, показала, що клітини, вирощені при 40 лк (рис. 2), містять добре розвинену систему хлоросом, що в свою чергу свідчить про високу інтенсивність процесу фотосинтезу в клітинах. У той час, як за освітлення в 600 лк ці структури розвинені слабо. Подібні закономірності синтезу бактеріохлорофілів і утворення хлоросом зеленими сірковими бактеріями описані в літературі [9].

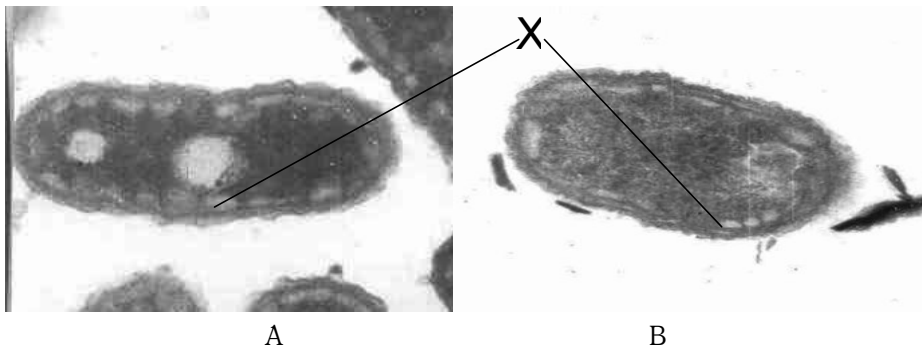


Рис. 2. Ультратонкі зрізи клітин *C. limicola* Ya-2002, вирощених за різної освітленості: А – 40 лк, В – 600 лк. X – хлоросоми (x 50 000)

Fig. 2. Ultrathin sections of the cells *C. limicola* Ya-2002, grown under different intensity of light

Фототрофні сіркові бактерії мають лише одну фотосистему першого типу, в результаті чого не здатні використовувати воду як первинний донор електронів [6]. Замість води, зелені сіркобактерії використовують більш відновлені сполуки, наприклад, сірководень. Побічним продуктом у процесі фотосинтезу у цих бактерій є сірка або сульфати [9, 11]. Очевидно, у фототрофних сіркових бактерій концентрація донора електронів у середовищі відіграє провідну роль у процесі їх життєдіяльності. На рис. 3 показано ріст *C. limicola* Ya-2002 на середовищі з різними концентраціями сульфиду натрію.

Як видно з рис. 3, найвищий вихід біомаси бактерій забезпечує концентрація сірководню, яка складає 4 мМ (рис. 3). Подальше зростання вмісту сульфиду в середовищі не сприяло збільшенню біомаси, а супроводжувалось пригніченням росту культури, що, очевидно, обумовлено токсичною дією цієї сполуки на клітини *C. limicola* Ya-2002.

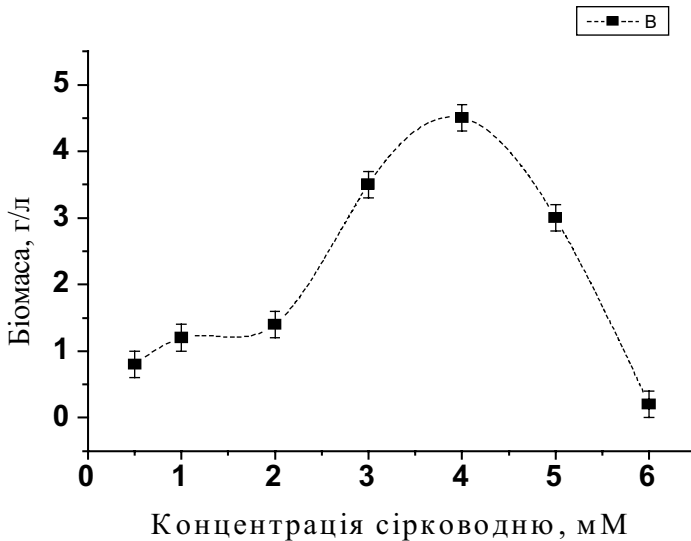


Рис. 3. Вплив різної концентрації сульфиду натрію на ріст *C. limicola* Ya-2002

Fig. 3. Correlation between different sulphur nitrogen concentration and the growth of *C. limicola* Ya-2002

Зелені сіркобактерії є облігатні фотолітоавтотрофи. Однак, у літературі [11, 12] зустрічаються повідомлення про те, що деякі представники родини *Chlorobiaceae* можуть засвоювати невеликі кількості органічних сполук: глюкози, фруктози, цукрози, маніту, мальтози, пірувату, ацетату, цитрату. Додавання цих сполук в середовище супроводжувалось деяким стимулюванням росту культури, завдяки їх використанню як джерела вуглецю. Однак, це використання було можливе лише за наявності в середовищі культивування сірководню та вуглекислоти. При вивченні здатності *C. limicola* Ya-2002 використовувати глюкозу, фруктозу, цукрозу нами показано (рис. 4), що ці цукри не використовувались бактеріями ні як донори електронів, ні як джерело вуглецю.

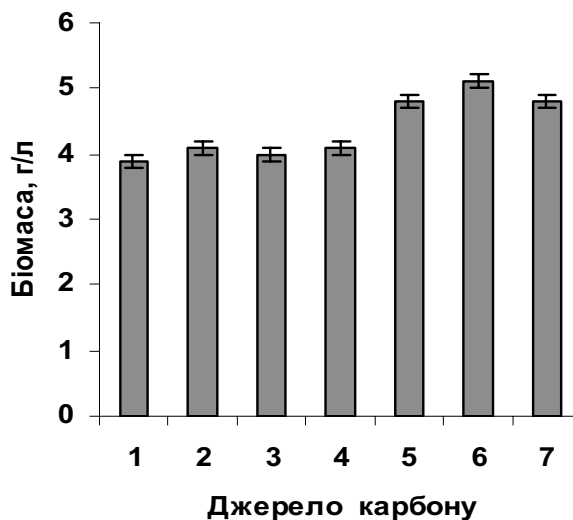


Рис. 4. Вплив органічних сполук на ріст *C. limicola* Ya-2002.
 1 – контроль (без органічних сполук); 2 – глюкоза; 3 – фруктоза;
 4 - сахароза; 5 - ацетат; 6 - піруват + ацетат; 7 - піруват

Fig. 4. Correlation between organic compounds and the growth of *C. limicola* Ya-2002. 1 – control (without any organic compounds); 2 - glucose; 3 - fructose; 4 - sucrose; 5 - acetate; 6 - piruvat + acetate; 7 - piruvat

Лише внесення пірувату та ацетату сприяло збільшенню біомаси *C. limicola* Ya-2002 на 20 %. Такий вплив цих сполук можна пояснити функціонуванням у *C. limicola* Ya-2002 циклу Арнона, одним із проміжних продуктів якого є ацетат. Останній у представників родини *Chlorobiaceae* карбоксилується до пірувату, який використовується у реакціях глюконеогенезу [4, 11]. Слід відмітити, що клітини бактерій не р остуть за відсутності гідрокарбонату натрію в середовищі. Щоб визначити форми азоту, які засвоюються *C. limicola* Ya-2002, бактерії вирощували на середовищах з різними сполуками азоту. Виявилось, що *C. limicola* Ya-2002 здатні використовувати різні джерела азоту в процесі росту (рис. 5).

Після 10-ти діб культивування найбільший вихід біомаси спостерігали при рості бактерій на середовищі з NH_4Cl . Згідно з літературними даними [4, 9, 11], асиміляція солей амонію зеленими сіркобактеріями відбувається за допомогою глутамінсинтетази і глутаматсинтази. Очевидно, у *C. limicola* ці ферменти також проявляють високу активність.

Біомаса клітин на середовищі з пептоном і сумішшю амінокислот була лише на 25-30 % менша, ніж на середовищі з солями амонію, що свідчить про здатність *C. limicola* Ya-2002 засвоювати амінний азот середовища.

Подібно, як на середовищі з амінним азотом, бактерії добре росли і за відсутності джерела азоту, що, очевидно, свідчить про їх здатність до фіксації атмосферного азоту [4]. Ця властивість у *C. limicola* Ya-2002 підтверджується дослідями з 10-ти кратними пересівами культури на середовища без азоту.

Особливої уваги заслуговує експеримент з вивчення нагромадження біомаси бактеріями на середовищі з нітратами. Практично ріст у цьому випадку відсутній. З літературних джерел відомо [11], що у більшості представників родини



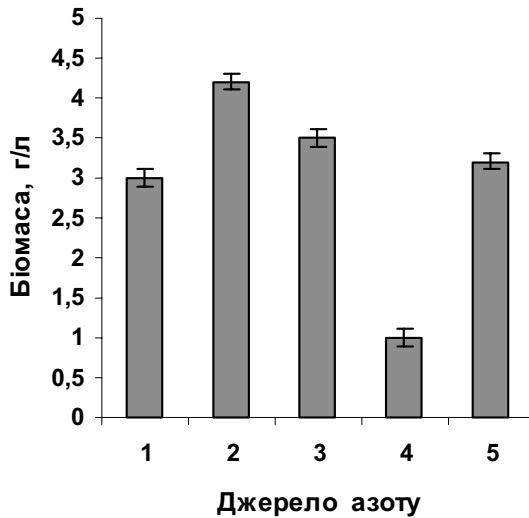


Рис. 5. Ріст *C. limicola* Ya-2002 на середовищі з різними джерелами азоту: 1 – без азоту, 2 – NH_4Cl , 3 – пептон, 4 – KNO_3 , 5 – аспарагін + аргінін + гліцин

Fig. 5. *C. limicola* Ya-2002 growth on the medium with different nitrogen sources: 1 – without nitrogen, 2 – NH_4Cl , 3 – peptone, 4 – KNO_3 , 5 – asparagine + arginine + glycine

Chlorobiaceae відсутня активність нітратредуктази. Однак, якщо врахувати, що бактерії *C. limicola* Ya-2002 здатні до азотфіксації, напрашується висновок, що у цих мікроорганізмів не тільки відсутня нітратредуктаза, але й те, що нітрати виявляють сильну інгібуючу дію на активність нітрогенази.

Таким чином, виділений нами штам зелених сіркобактерій *C. limicola* Ya-2002 добре росте на мінеральному середовищі і нагромаджує біомасу до 5 мг/мл протягом 8-10 діб культивування. Ріст культури визначається наявністю сірководню та вуглекислоти в середовищі культивування. Нагромадження біомаси культурою стимулює низька інтенсивність освітлення (40 лк), збільшення інтенсивності призводить до пригнічення росту. Суттєвий вплив на ріст бактерій має концентрація сірководню. Максимальний ріст бактерій забезпечує 4 мМ Na_2S , збільшення вмісту сульфиду натрію в середовищі супроводжується пригніченням росту культури. Зелені сіркобактерії *C. limicola* Ya-2002 не використовують органічні сполуки, в якості джерел вуглецевого живлення та електронів в процесі фотосинтезу. Виділений штам використовує лише піруват і ацетат як додаткове джерело вуглецю за умов наявності H_2S і CO_2 в середовищі культивування.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баран І., Мороз О., Гудзь С., Гнатуш С. Метаболізм органічних сполук у зелених фототрофних сіркобактерій та утилізація ними сірководню // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2003. Вип. 33. С. 132-140.
2. Гудзь С.П., Баран І.М., Кіт Л.Я. та ін. Зелені сіркобактерії водоїм Яворівського сіркового родовища // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2002. – Вип. 28. – С. 246-251.

3. Грабович М.Ю. Участие прокариот в круговороте серы // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — Т.1, №12. — С.16-20.
4. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии. — М.: Изд-во. Москов. ун-та, 1989. — С. 82-103.
5. Кульский Л. А., Гороновский И. Т. Справочник по свойствам, методам анализа и очистке вод. — К.: Наук. думка, 1980. — 1260 с.
6. Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. Современная микробиология. М.: Мир, 2005. Т.1. — С. 207-215.
7. Лапач С.И., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследований с использованием Excel. — К.: Морион, 2001. — 408с.
8. Хоулт Дж., Криг. Р., Снит. П. Определитель бактерий Берджи. — М.: Мир, 1997. — С. 361-379.
9. Alexander B., Cox R. Phylogeny of green sulfur bacteria on the basis of gene sequences of 16s rRNA and of the Fenna-Matthews-Olson protein // Arch. Microbiol. — 2002. — Vol. 178. — P. 131.
10. Kuster E., Dorusch F., Altenburger R. Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia Magna* // Environ. Toxicol. Chem. — 2005. — Vol. 24, № 10. — P. 2621-2629.
11. Overmann j., Tuschak.C. Phylogeny and molecular fingerprinting of green sulfur bacteria //Arch. Microbiol. — 1997. — Vol. 167. — P. 302-309.
12. Sireveg R., Ormerod J. Synthesis, storage, and degradation of polyglucose in *Chlorobium thiosulfatophilum* // Arch. Mikrobiol. — 1977. — Vol. 111. — P.239.

УДК 579. 266 / 68 (474)

М.Б. Горішний, С.П. Гудзь, С.А. Гнатуш

Львовский национальный университет имени Ивана Франко, ул.Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел.: 8 (067) 492 76 81, e-mail: M_Gorishniy@ukr.net

РОСТ *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Реферат

Исследованы условия роста *C. limicola* Ya-2002. Показано, что максимальный рост бактерии происходит при интенсивности освещения в 40 лк. Увеличение интенсивности освещения сопровождается снижением роста культуры. С помощью электронной микроскопии показано, что разная интенсивность освещения культуры вызывает изменения в фотосинтетическом аппарате клеток *C. limicola* Ya-2002. Концентрация сероводорода, что обеспечивает максимальный рост *C. limicola* Ya-2002, составляет 4 мМ, увеличение содержания сероводорода в среде сопровождается снижением роста культуры. Клетки бактерий *C. limicola* Ya-2002 не используют глюкозу, фруктозу, галактозу как источник углерода и донор электронов. Лишь добавление



ацетата и пирувата стимулює рiст культури при наявнiстi CO₂ и H₂S в середi. Показано, що зеленi серобактерии *C. limicola* Ya-2002 способны использовать аммонийный и молекулярный азот. Нитратная форма азота не используется бактериями. Добавление нитратов в среду культивирования подавляет процесс азотфиксации.

К л ю ч е в ы е с л о в а : зеленi серобактерии, рiст, сероводород.

M.B. Gorishniy, C.P. Gudz, S.O. Hnatush

Ivan Franco Lviv National University,
Hrushevskogo st., 4, Lviv, 79005, Ukraine, tel.: 8 (067) 492 76 81,
e-mail: M_Gorishniy@ukr.net

THE GROWTH OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* YA-2002 UNDER VARIOUS CULTIVATION CONDITIONS

Summary

The conditions of *Chlorobium limicola* Ya-2002 growth have been studied. It has been shown that the maximum growth of the bacteria takes place under the light intensity of 40 lx. The increase in the light intensity is accompanied by the decrease in the growth of the culture. By means of electronic microscopy it has been revealed that various light intensity causes changes in the photosynthesising apparatus of the cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002. The concentration of sulphur hydrogen which insures the maximum growth of *Chlorobium limicola* Ya-2002 amounts to 4 mM. The increase in the sulphur hydrogen content in the environment is accompanied by the decrease in the growth of the culture. The cells of *Chlorobium limicola* Ya-2002 bacteria do not make use of glucose, fructose, galactose as a carbonic source and an electron donor. Exclusively the addition of acetate and piruvat stimulates the growth of the culture, on condition CO₂ and H₂S are present in the environment. It has been shown that green sulphur bacteria *Chlorobium limicola* Ya-2002 are capable of utilizing ammonium, amino and atmospheric nitrogen. Nitrate form of nitrogen is not utilized by the bacteria. Addition of nitrates into the environment decelerates the process of nitric fixation.

K e y w o r d s : green sulphur bacteria, growth, hydrogen sulfide.



С.Г. Каракис¹, Л.М. Карпов¹, Е.Г. Драгоева¹, Т.И. Лавренюк¹,
В.А. Сагариц¹, В.С. Марченко²

¹ Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 32,
e-mail: karakis_sg@mail.ru

² Одесский региональный центр инноваций и инвестиций
пр. Шевченко, 4, Одесса, 65032, Украина

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БИОМАССЫ ШТАММОВ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

*Проведено сравнительное изучение биохимического состава биомассы родительского штамма *Arthrospira (Spirulina) platensis* дикого типа и полученных из него мутантных штаммов 198В и 27G с повышенным содержанием метионина в белках и биомассе. Установлено, что общее содержание белка, незаменимых аминокислот, с-фикоцианина, аллофикоцианина и хлорофилла *a* в биомассе мутантных штаммов выше, чем у штамма дикого типа. Штамм 198В отличается также повышенным содержанием каротиноидов. Выявленные отличия свидетельствуют о повышенной питательной ценности и антиоксидантной активности биомассы мутантных штаммов, что позволяет рассматривать их как перспективные источники БАВ и рекомендовать для дальнейшего изучения в качестве адаптогенов.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Spirulina spp.*, белок, аминокислоты, пигменты.

В условиях ухудшающейся экологической обстановки особую актуальность приобретает поиск новых препаратов биологически активных веществ (БАВ) природного происхождения, способствующих более быстрой адаптации человеческого организма к меняющимся условиям окружающей среды.

Среди природных адаптогенов по эффективности и спектру положительного биологического действия на организм человека и лабораторных животных в неблагоприятных условиях окружающей среды выделяются цианобактерии из рода *Arthrospira (Spirulina)*: *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Spirulina fusiformis* и некоторые другие [1, 11]. В биомассе этих цианобактерий содержится до 70 % белка с полным набором незаменимых аминокислот, до 11 % липидов, в составе которых имеется γ -линоленовая кислота, до 20 % углеводов, комплекс почти всех, необходимых для жизни человека витаминов, широкий спектр важнейших микроэлементов [9,13]. Благодаря своему уникальному составу биомасса спирулины обладает антиоксидантным, иммуномодулирующим, иммуностимулирующим действием и способна корригировать возникающие под воздействием неблагоприятных внешних факторов изменения метаболизма [1,11]. Этими способностями обладает не только биомасса спирулины, но и отдельные ее компоненты, особенно такие как β -каротин, с-фикоцианин, аллофикоцианин, хлорофилл *a*, α -токоферол, фенолы и др. [11, 7].



Однако потенциальные возможности спирулины как источника ценных биологически активных веществ могут быть улучшены. Учитывая тот факт, что по содержанию метионина белок спирулины уступает таким лучшим пищевым белкам как яичный альбумин и казеин коровьего молока [2, 9, 13], нами были проведены селекционно-генетические исследования по созданию штаммов *S. platensis* с повышенным содержанием метионина [3, 4]. В результате проведенных работ создана коллекция мутантных штаммов *S. platensis* с измененными биохимическими свойствами (работы по селекции в 1985-1997 годах проводились под руководством И.И.Броуна). Среди полученных мутантов максимальное содержание метионина в биомассе наблюдали у штаммов 198В и 27G.

Цель данной работы — провести сравнительное изучение биохимического состава биомассы родительского штамма *Spirulina platensis* дикого типа и мутантных штаммов 198В и 27G для оценки перспектив их использования в качестве источников препаратов БАВ.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordst.) Geitl. из коллекции культур цианобактерий Одесского национального университета имени И.И. Мечникова: родительский штамм *Moysse* дикого типа (ДТ) и полученные из него селекционно-генетическими методами мутантные штаммы 198В и 27G.

Для получения биомассы штаммы цианобактерий выращивали в среде Зарука [15] в условиях накопительной культуры при круглосуточном освещении лампами ЛД-40 и продувке воздухом. Культивирование штаммов проводили в стеклянных сосудах типа параллелепипеда размером 40 x 90 x 140 мм с содержанием ростовой среды 400 мл при освещении 6-8 клк и $t = 35$ °C. Толщина клеточной суспензии между освещаемыми параллельными поверхностями была 40 мм. Начальный засев — 0,4 г/л сухой биомассы. После выхода культур в стационарную фазу роста биомассу собирали фильтрованием через мелкоячеистую сеть, тщательно промывали дистиллятом и лиофильно высушивали.

Содержание белка в биомассе определяли по методу Лоури [5], углеводов — антроновым методом [5], жиров — по методу Рушковского [6]. Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли путем их экстракции из биомассы 96 % этанолом [12]. Содержание с-фикоцианина и аллофикоцианина определяли путем их экстракции из биомассы 20 мМ Na-ацетатным буфером (рН 5,5) и последующей спектроскопии экстрактов при OD_{650} и OD_{620} . Содержание пигментов в биомассе рассчитывали по формулам, представленным в работе [14].

Полный аминокислотный анализ биомассы (суммарное содержание свободных и связанных в белках аминокислот) проводили с помощью аминокислотного анализатора «Hitachi-836» после ее гидролиза 6N HCl в запаянных стеклянных ампулах при температуре 105 °C в течение 24 часов.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты общего биохимического анализа биомассы исследуемых штаммов *S. platensis*. Показатели биохимического состава штамма ДТ не противоречат данным, представленным в работах других исследователей [9,13]. В отличие от родительского штамма ДТ, мутантные штаммы характеризуются повышенным содержанием белков и пониженным содержанием углеводов. Штамм 198В имеет также пониженное содержание липидов. Очевидно, повышение синтеза белковой продукции у штамма 27G происходит в основном за

счет снижения синтеза углеводов, а у штамма 198В – за счет снижения синтеза как углеводов, так и липидов.

Таблица 1

**Общий биохимический состав биомассы штаммов *Spirulina platensis*
(% от веса сухой биомассы)**

№ п.п.	Штамм	Белки	Углеводы	Липиды
1	ДТ	60,5 ± 3,2	19,6 ± 3,1	6,3 ± 1,2
2	198В	71,4 ± 1,8	11,2 ± 1,8	2,1 ± 0,1
3	27G	78,1 ± 1,3	9,0 ± 0,8	5,4 ± 0,1

В таблице 2 представлены результаты полного аминокислотного анализа биомассы исследуемых штаммов. Согласно этим данным, у мутантных штаммов по сравнению со штаммом ДТ наряду с повышением суммы определяемых аминокислот наблюдается повышение содержания незаменимых аминокислот в биомассе. Так, содержание незаменимых аминокислот в биомассе у мутантов 198В и 27G в 1,5 и 1,7 раз выше, чем у штамма ДТ, соответственно. Изменения в композиции определяемых аминокислот у мутантных штаммов касаются существенным образом содержания метионина. Содержание метионина в сумме определяемых аминокислот у штаммов 198В и 27G в 1,6 и 1,4 раза выше, чем у штамма ДТ, соответственно. По содержанию метионина в биомассе (% от сухого веса биомассы) эти штаммы превосходят штамм ДТ в 2,2 раза.

Таблица 2

Содержание аминокислот в биомассе штаммов *Spirulina platensis*

Аминокислота	% от веса сухой биомассы			% от веса определяемых аминокислот		
	штамм			штамм		
	ДТ	198В	27G	ДТ	198В	27G
asp	4,97±0,14	7,28±0,05	6,60	9,72±0,14	10,33±0,08	8,08
thr*	2,78±0,09	4,00±0,01	4,61	5,44±0,04	5,67±0,09	5,64
ser	2,75±0,06	3,57±0,01	3,96	5,38±0,14	5,07±0,05	4,84
glu	7,71±0,15	9,78±0,31	11,39	15,08±0,43	13,89±0,24	13,95
gly	2,68±0,09	3,66±0,01	4,07	5,23±0,04	5,19±0,09	4,98
ala	4,50±0,26	5,81±0,21	8,16	8,80±0,18	8,24±0,17	10,00
val*	3,00±0,21	3,70±0,10	5,18	5,86±0,20	5,25±0,06	6,34
met*	1,48±0,12	3,20±0,06	3,26	2,90±0,12	4,54±0,01	4,00
ile*	2,43±0,18	3,65±0,16	4,44	4,74±0,16	5,18±0,14	5,43
leu*	4,84±0,19	6,93±0,00	7,49	9,47±0,09	9,84±0,15	9,17
tyr	2,51±0,12	2,92±0,05	4,26	4,91±0,07	4,14±0,01	5,22
phe*	2,47±0,11	3,36±0,25	3,44	4,84±0,03	4,77±0,43	4,21
lys*	2,54±0,13	3,81±0,08	3,92	4,96±0,06	5,41±0,04	4,80
his*	0,79±0,05	1,10±0,01	0,93	1,55±0,05	1,56±0,03	1,14
arg*	3,62±0,15	5,42±0,10	6,79	7,08±0,09	7,70±0,03	8,31
pro	2,07±0,06	2,27±0,19	3,17	4,05±0,05	3,21±0,22	3,88
Сумма	51,56±2,01	70,43±1,04	82,50	100	100	100
Сумма незаменимых	24,37	35,16	40,89	47,26	49,92	49,05

* – незаменимые аминокислоты



Особенно важным является тот факт, что в биомассе мутантных штаммов в повышенных количествах содержатся серусодержащие аминокислоты — метионин и серин, а также фенилаланин, который относится к фенольным соединениям. Роль этих аминокислот в функционировании системы антиоксидантной защиты уже установлена.

На основе данных аминокислотного анализа биомассы штаммов можно предположить, что биомасса мутантных штаммов может быть более эффективной пищевой добавкой, используемой для балансировки белкового питания, чем биомасса штамма ДТ.

Учитывая тот факт, что многие пигменты цианобактерии *S. platensis* являются антиоксидантами и оказывают иммуномодулирующее и иммуностимулирующее действие на человека и лабораторных животных в условиях патологий и воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды [1,11], нами было проведено сравнительное изучение пигментного состава биомассы мутантных штаммов и штамма ДТ.

Согласно полученным нами данным (табл. 3), показатели пигментного состава биомассы штамма ДТ находятся в пределах показателей, представленных в литературе [9]. В то же время нами было установлено, что штамм 198В превосходит штамм ДТ по содержанию каротиноидов в 1,9 раза, хлорофилла *a* — в 1,4 раза, с-фикоцианина — в 1,7 раза, аллофикоцианина — в 1,6 раза. Также было найдено, что штамм 27G отличается от других изученных штаммов самым высоким содержанием фикобилипротеинов. В частности, содержание с-фикоцианина и аллофикоцианина у штамма 27G в 3,2 и 2,4 раза выше, чем у штамма ДТ, соответственно. На основе представленных выше данных можно предположить, что биомасса мутантных штаммов может обладать более сильным антиоксидантным и иммунокорректирующим действием, чем биомасса штамма ДТ.

Таблица 3

Содержание пигментов в биомассе штаммов *Spirulina platensis* (% от веса сухой биомассы)

Штамм	Каротиноиды	Хлорофилл <i>a</i>	С-фикоцианин	Аллофикоцианин
ДТ	0,22± 0,01	0,93± 0,04	5,59± 0,02	3,04± 0,39
198В	0,42± 0,02*	1,29± 0,07*	9,49± 0,06*	4,77± 0,16*
27G	0,19± 0,02	1,25± 0,06*	17,64± 0,46*	7,30± 0,48*

Примечание: * — разница со штаммом ДТ достоверна ($p < 0,05$)

В результате проведенных исследований установлено, что биомасса мутантных штаммов *Spirulina platensis* 198В и 27G отличается от биомассы штамма ДТ повышенным содержанием аминокислот, в том числе незаменимых, особенно — метионина. Улучшенный аминокислотный состав биомассы мутантных штаммов позволяет рассматривать их в качестве перспективных пищевых добавок для коррекции белкового состава пищевого рациона человека и домашних животных. В биомассе мутантных штаммов, в отличие от штамма ДТ, повышено содержание пигментов: с-фикоцианина, аллофикоцианина и хлорофилла *a*. Мутантный штамм 198В отличается также повышенным содержанием каротиноидов. Повышенное содержание в биомассе мутантных штаммов целого ряда природных антиоксидантов (метионин, серин, фенилаланин, с-фикоцианин, аллофикоцианин, каротиноиды, хлорофилл *a*) позволяет предположить, что она, в отличие от биомассы штамма

ДТ, будет обладать более сильным антиоксидантным действием при использовании ее в качестве пищевых добавок.

Таким образом, выявленные отличия в биохимическом составе биомассы мутантных штаммов и штамма ДТ позволяют рассматривать мутантные штаммы в качестве перспективных источников новых препаратов БАВ и рекомендовать их для дальнейшего изучения в качестве адаптогенов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блинкова Л.П., Горобец О.Б., Батуро А.П. Биологическая активность спирулины // Микробиология, эпидемиология, иммунобиология. — 2001. — №2. — С.114 — 118.
2. Блок Р. и Боллинг Д. Аминокислотный состав белков и пищевых продуктов. — М.: Издательство иностранной литературы, 1949. — С. 368-371.
3. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагариц В.А., Карпов Л.М. Особливості метаболізму мутантного штаму *Arthrospira (Spirulina) platensis* G-27 — надпродуцента с-фікоціаніну // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — т. 10. — В. 7. — С. 44 — 50.
4. Каракіс С.Г., Драгоева О.Г., Лавренюк Т.І., Сагариц В.А., Карпов Л.М. Селекція мутантних штамів *Spirulina platensis* з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі // Вісник Одеського національного університету. — 2005. — т. 10, в. 3. — С. 55 — 62.
5. Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1984. — Т. 2. — С. 292 — 358.
6. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. — Л.: Агропромиздат, 1987. — С.200 — 201.
7. Brown I.I., Karakis S.G., Filippova T.O., Sarkisova S.A., Levitskiy A.P. The physiological effects of phycocyanin crude extract obtained from the G-27 overproducing strain of *Spirulina platensis* // 2nd European Workshop. Biotechnology of microalgae. — 1995. — P.70 — 73.
8. Burton G.W., Ingold K.U. Beta-carotene: an unusual type of antioxidant // Science. — 1984. — 224. — P. 569 — 73.
9. Ciferri O. *Spirulina*, the edible microorganism // Microbiol. Rev. — 1983. — 47. — P. 551 — 558.
10. Jaime I., Mendiola J.A., Herrero M., Soler-Rivas C., Santoyo S., Senorans F.J., Cifuentes A., Ibanez E. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD // J. Sep. Sci. — 2005. — V.28. — №16. — P.2111-2119.
11. Khan Z., Bhadouria P., Bisen P.S. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina* // Curr. Pharm. Biotechnol. — 2005. — №5. — P.373 — 379.
12. Litchenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // In: Packer L., Glazer N, editors. Methods in enzymology. — San Diego: Acad. Press. — 1987. — V.148. — P. 350 — 381.
13. Reed R. H., Warr S. R. C., Richardson D. L., Moore D. J. and Stewart W. D. P. Blue-green algae (cyanobacteria): prospects and perspectives // Plan. and Soil. — 1985. — V. 89. — P. 97 — 106.
14. Tandeau de Marsac N. [34] Complementary chromatic adaptation: physiological conditions and action spectra // In: Packer L., Glazer N, editors. Methods in enzymology. — San Diego: Acad. Press. — 1988. — V.167. — P.318 — 328.
15. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. // Ph.D. Thesis, University of Paris. — 1966. — P. 85.



С.Г. Каракіс¹, Л.М. Карпов¹, О.Г. Драгоєва¹, Т.І. Лавренюк¹,
В.А. Сагаріц¹, В.С. Марченко²

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis_sg@mail.ru

² Одеський Регіональний центр інновацій та інвестицій, пр. Шевченка, 4, Одеса, 65032, Україна

БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД БІОМАСИ ШТАМІВ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Реферат

Здійснено порівняльне вивчення біохімічного складу біомаси батьківського штаму *Arthrospira (Spirulina) platensis* дикого типу та отриманих із нього мутантних штамів 198В і 27G з підвищеним вмістом метіоніну в біомасі. Встановлено, що вміст білка, незамінних амінокислот, с-фікоціаніну, алофікоціаніну, хлорофілу *a* в біомасі мутантних штамів вищий, ніж у штаму дикого типу. Штам 198В відзначався також підвищеним вмістом каротиноїдів. Виявлені відміни свідчать про високу поживну цінність та антиоксидантну активність біомаси мутантних штамів, що дає змогу розглядати їх як перспективні джерела препаратів БАР та рекомендувати їх для подальшого вивчення в якості адаптогенів.

К л ю ч о в і с л о в а: *Spirulina spp.*, білок, амінокислоти, пігменти.

S.G. Karakis¹, L.M. Karpov¹, E.G. Dragoeva¹, T.I. Lavrenjuk¹,
V.A. Sagarcic¹, V.S. Marchenko²

¹ Odesa National Mechnikov University, Dvoryanskaya Str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, тел.: 8 (0482) 68 79 32, e-mail: karakis_sg@mail.ru

² Odesa Regional Centre of investment and innovation, Shevchenko Pr., 4, Odesa, 65032, Ukraine

BIOCHEMICAL BIOMASS CONTEST OF THE STRAIN OF *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Summary

Comparative analysis of biochemical composition of the wild strain *S. platensis* (Nordst.) Geitl. and its mutants, selected after chemical mutagenesis, has been carried out. It was found out that mutant strains 198B and 27G contain higher quantities of total protein, essential amino acids, *c*-phycocyanin, allophycocyanin and chlorophyll *a* than parental wild strain *S. platensis*. The strain 198B is also characterized by increased content of carotenoids. The revealed biochemical peculiarities of mutant strains suggest that strains 198B and 27G might serve as an additional source of essential amino acids as well as phycobiliproteins and carotenoids. That is why mutant strains 198B and 27G can be considered as the prominent resources of bioactive substance and recommended for further study of their adaptogenic activity.

К e y w o r d s: *Spirulina spp.*, protein, amino acids, pigments.



L.I. Sapunova

Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences,
Kuprevich str., 2, Minsk, 220141, Belarus, tel.: 8 (017) 26 76 209,
e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

XYLOSE ISOMERASE SYNTHESIS IN ACTINOBACTERIA *ARTHROBACTER UREAFACIENS* BIM B-6

*The role of different carbon sources in biosynthesis of cell-bound xylose isomerase by *Arthrobacter ureafaciens* BIM B-6 was investigated. It was found that in this prokaryotic actinobacterium enzyme production is under control of induction and catabolite repression. High level of xylose isomerase production was recorded when bacterium was grown both on xylose media and on media with soy, citrus pulp and wheat bran.*

*Key words: *Arthrobacter ureafaciens*, producer, xylose isomerase, biosynthesis*

Xylose isomerase (D-xylose ketol isomerase, E.C. 5.3.1.5) is a key enzyme of xylose metabolism in prokaryotes and commodity in top demand at world biocatalyst market. Possessing non-strict substrate specificity, xylose isomerase, in addition to xylose isomerization into xylulose, catalyzes glucose-fructose conversion. The latter motivates wide commercial application of the enzyme for manufacturing glucose-fructose syrup from saccharified starchy feedstock.

Prerequisite for efficient management of genetic potential of strains producing biologically active agents, including xylose isomerase, is to reveal the factors affecting enzyme biosynthesis. As a rule, a critical role in generating enzymes involved in carbohydrate metabolism belongs to the source of carbon nutrition. In prokaryotes specific substrate and/or its structural analogues in most cases serve as the inducers of biosynthesis, in contrast to glucose repressing xylose isomerase production [1]. Among xylose-utilizing bacteria of genus *Arthrobacter* species showing inducible and constitutive type of xylose isomerase synthesis were detected [2-4]. Yet, detailed studies on mechanisms controlling enzyme formation in this group of gram-positive prokaryotes were not performed.

Earlier we have screened xylose isomerase-producing actinobacteria *Arthrobacter ureafaciens* BIM B-6 [5]. The aim of this investigation is to study the effect of different carbon sources on the growth of the culture and biosynthesis of xylose isomerase.

Materials and Methods

Actinobacteria *Arthrobacter ureafaciens* BIM B-6 deposited at National collection of non-pathogenic microorganisms (Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences) were chosen as the object of investigation.

© L.I. Sapunova, 2008



Under the laboratory conditions the microbial culture was maintained on yeast-peptone agar of the following composition (%): peptone – 1.0; yeast extract – 0.5; glucose – 0.5; NaCl – 0.5; agar-agar – 1.5; initial pH 7.2-7.4.

Submerged cultivation of bacteria *A. ureafaciens* was carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of nutrient medium on the shaker (180-200 rpm) at temperature 26-28 °C during 72 hours. The nutrient medium comprised (%): peptone – 1.0; yeast extract – 0.5; K_2HPO_4 – 0.3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0.1. The compounds of different chemical composition in concentration 1% (calculated as carbon) or, in case of polysaccharides, 1% (w/v) were used as carbon sources. Initial pH of the medium was adjusted to 6.8 with 0.1 M NaOH.

Water suspension of bacterial cells grown on peptone-yeast agar at 26-28 °C during 72 hours served as an inoculum in dose of 2% (v/v).

Biomass accumulation was estimated photoelectrocolorimetrically at wavelength $\lambda=540$ nm and expressed in optical density units (OD_{540}) or in mg dry biomass per 1 ml of the medium (mg/ml). Dry biomass amount was determined from pre-plotted graph reflecting relationship between optical density of bacterial cell suspension (OD_{540}) and cell weight.

Specific growth rate of bacteria was calculated according to the following formula: $\mu = dx/dt \cdot x^{-1}$, where μ – specific growth rate (h^{-1}), x – biomass (OD_{540}), dx – biomass accumulation (OD_{540}) for the time interval dt (h).

Cells of bacteria *A. ureafaciens* separated from the cultural liquid by centrifuging (8000 g, 15 min), were washed with distilled water and used to assay xylose isomerase activity.

Reaction mixture for quantitative evaluation of xylose isomerase contained: 0.2 ml of 1 M D-glucose solution; 0.5 ml of 0.2 M K,Na-phosphate buffer, pH 7.8; 0.1 ml of 0.1 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.5 ml of cell suspension and distilled water to 2 ml volume. Duration of isomerization reaction was 1 hour at 70 °C.

Fructose amount was determined by the cystein-carbazole method [6].

One unit of xylose isomerase activity was defined as the amount of enzyme transforming 1 μ M glucose during 1 min under above-described conditions. Enzyme activity was expressed in U/mg dry biomass and in U/ml cultural liquid (productivity).

The presented results are the average values of data from 2-3 experiments performed in triplicate. In the course of statistical data processing confidence interval of arithmetical mean was calculated for probability level 0.05 [7-8]. The difference of 2 mean values was regarded reliable if their confidence intervals did not overlap. The obtained results were processed using Microsoft Windows package software.

Results and Discussion

Functioning of any living cell, like microbial one, is based on the balanced intracellular biochemical processes promoted by concerted catalytic activities of numerous different enzymes. It appears therefore that investigation of mechanisms regulating enzymatic reactions at metabolic, structural and genetic levels is an attractive challenge for contemporary biological science allowing to lay the theoretical basis for the controllable biotechnological systems governing synthesis of microbial products.

Conversion of pentoses dominated by xylose plays a key role in the cell metabolism. Xylose isomerization into xylulose mediated by xylose isomerase occurs at the initial metabolic stages in prokaryotic microorganisms.



Elucidation of mechanisms controlling production of xylose isomerase in actinobacteria *A. ureafaciens* will enable to intensify the process of enzyme biosynthesis and thereby to raise efficiency of derived enzyme preparation for fabrication of glucose-fructose syrup – the natural sweetener for diatetic and preventive-therapeutic products.

Polysaccharides, mono-, di-, aldo-, ketosugars, sugaralcohols, organic acids were supplemented as the carbon sources into the nutrient medium for culturing *A. ureafaciens* in studies on xylose isomerase biosynthesis. It may be seen from the data presented in Table 1 that bacteria generated the enzyme only if a specific substrate – xylose or its structural analogue xylitol was available in the cultural medium. It should be noted that natural polymer xylan (which may be hydrolyzed to xylose) did not stimulate xylose isomerase synthesis although it promoted the growth of *A. ureafaciens*.

Table 1

**Effect of carbon sources on the growth of *A.ureafaciens*
and xylose isomerase synthesis**

Carbon source, 1%	Final pH	Biomass, mg/ml	Xylose isomerase	
			U/mg	U/ml
Apple pectin	7.5±0.3	8.1±0.15	0	0
Citric acid	6.9±0.2	5.3±0.11	0	0
Fructose	6.9±0.3	5.1±0.12	0	0
Glucose	7.2±0.2	7.9±0.16	0	0
Glycerol	7.4±0.2	4.9±0.15	0	0
Pyruvic acid	6.8±0.2	4.8±0.09	0	0
Starch	6.5±0.2	5.9±0.13	0	0
Sucrose	6.8±0.1	7.8±0.17	0	0
Xylan	7.3±0.1	7.1±0.14*	0	0
Xylitol	7.3±0.1	7.8±0.14	0.064±0.0018	0.499±0.008
Xylose	6.9±0.1	7.6±0.15	0.055±0.0016	0.418±0.012

Note: * – biomass contains residual not utilized carbon source

Xylose acting as an inducer of xylose isomerase production is a hardly digestible source of carbon nutrition for many microbial species, including the representatives of the genus *Arthrobacter* [2, 9]. The experimental data summed up in Figure 1a indicate that xylose is a favourable source of carbon and energy for the growth of the tested strain *A. ureafaciens*. Bacterial growth started after 1-2 h lag-phase, with maximum specific growth rate of 0.114 h⁻¹ recorded by 11 h of fermentation. This parameter for bacterial culture growing on the xylitol medium is equal to 0.146 h⁻¹ upon 14 h (Figure 1b).

Xylose isomerase activity was detected at early exponential phase of *A. ureafaciens* growth, biosynthetic process progressed during subsequent 2 days, reaching the peak at stationary phase by the 3rd day of bacterium cultivation (figure 2). The level of enzyme production by *A. ureafaciens* on the media with xylose and xylitol under non-optimized conditions constituted 0.064 U/mg and 0.073 U/mg and did not decline throughout the whole fermentation period.

It may be stated that xylose inducing effect was directly correlated with its concentration in the medium, and enzyme production by bacteria *A. ureafaciens* attained top value at specific substrate concentration 1.25 % (Figure 3).



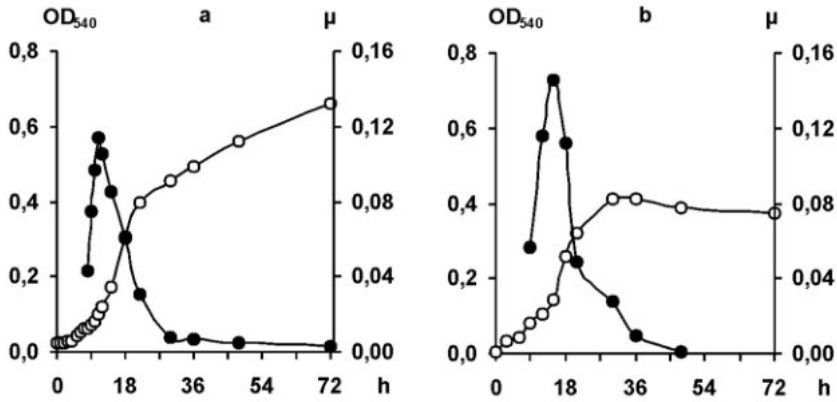


Figure 1. Specific growth rate (μ , h^{-1} , ●) and biomass accumulation (OD_{540} , ○) by *A. ureafaciens* on the media with xylose (a) and xylitol (b)

Рис. 1. Сравнительные характеристики скорости роста и накопления биомассы (OD_{540} , ○) *A. ureafaciens* на средах, содержащих (а) ксилозу и (в) ксилит

It is evident that application of xylose for commercial manufacturing of xylose isomerase is not profitable. To define production media for growing strain-producers, xylose is partially replaced by cheaper carbon sources or substituted by xylan-containing plant substrates (wheat bran, corn cobs, grain husk, fruit pulp, cotton seeds, rice bran) and their hydrolyzates [1, 4, 10-13]. According to our findings, chopped plentiful and cheap wastes of vegetable origin, like soya, beet and citrus cake, along with wheat bran, oat and soya meals exerted similar and, in some cases, even stronger beneficial effect in comparison with xylose on xylose isomerase synthesis by *A. ureafaciens* (Table 2).

Table 2

Effect of xylan-containing plant substrates on the growth of *A. ureafaciens* and xylose isomerase synthesis

Carbon source, 1%	Final pH	Biomass, mg/ml	Xylose isomerase	
			U/mg	U/ml
Xylose	6.9±0.1	7.6±0.15	0.055±0.002	0.418±0.011
Wheat bran	8.3±0.3	8.4±0.16*	0.063±0.003	0.529±0.011
Oat meal	7.9±0.2	7.4±0.15*	0.053±0.004	0.392±0.010
Beet cake	8.0±0.4	7.6±0.12*	0.059±0.002	0.448±0.012
Soya cake	8.4±0.2	8.3±0.16*	0.060±0.005	0.498±0.014
Citrus cake	8.0±0.2	8.0±0.14*	0.054±0.002	0.432±0.010
Soya meal	8.2±0.1	7.3±0.18*	0.058±0.001	0.423±0.013

Note: * – biomass contains residual not utilized carbon source

The complete absence of xylose isomerase activity in *A. ureafaciens* cells grown on media lacking the specific substrate points to the inducible type of xylose isomerase synthesis and to possible role of catabolite repression as a regulating factor. It provoked

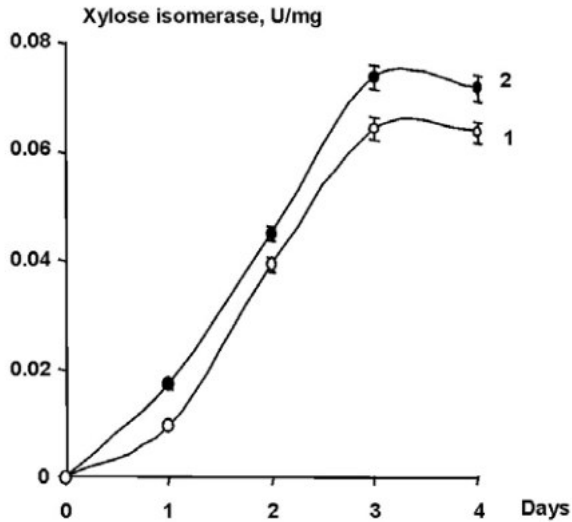


Figure 2. Dynamics of xylose isomerase synthesis by *A. ureafaciens* on the media with xylose (1) and xylitol (2)

Рис. 2. Динамика синтеза ксилоизомеразы *A. ureafaciens* на средах, содержащих (1) ксилозу и (2) ксилит

studies on impact of different carbon sources supplied into xylose medium on enzyme production by the examined bacterial strain. The data presented in Table 3 provide the evidence that enzyme synthesis in growing culture *A. ureafaciens* was inhibited by all tested compounds, though minimal repressing effect was shown by disaccharides lactose and sucrose, maximum repressing effect – by glucose and fructose.

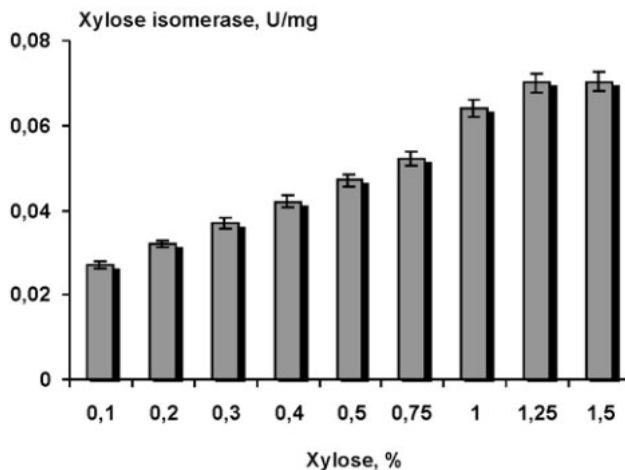


Figure 3. Correlation of xylose isomerase synthesis by *A. ureafaciens* with xylose concentration

Рис. 3. Зависимость синтеза ксилоизомеразы актинобактериями *A. ureafaciens* от концентрации ксилозы

Effect of different carbon sources on growth of *A. ureafaciens* and xylose isomerase synthesis on xylose media

Carbon source, 1%	Final pH	Biomass, mg/ml	Xylose isomerase	
			U/mg	U/ml
Xylose*	6.6±0.1	2.2±0.12	0.010±0.0003	0.022±0.0007
+ xylose**	6.8±0.2	3.3±0.10	0.058±0.0017	0.191±0.0054
+ xylitol	7.0±0.1	3.3±0.08	0.061±0.0015	0.201±0.0050
+ glucose	6.9±0.2	3.8±0.09	0.016±0.0005	0.061±0.0013
+ fructose	6.9±0.2	3.2±0.10	0.019±0.0007	0.061±0.0015
+ sucrose	6.7±0.1	3.0±0.11	0.031±0.0009	0.093±0.0023
+ lactose	6.9±0.1	2.9±0.09	0.030±0.0008	0.087±0.0027

Notes:

* - bacteria were cultured on the media with 0.5% xylose during 24 h;

** - after sampling and supplementing 0.5% of respective carbon sources bacteria were additionally grown for 48 h

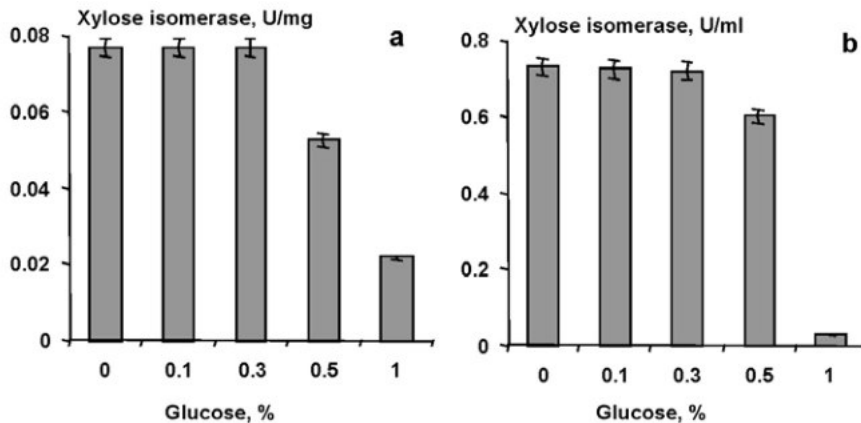


Figure 4. Correlation of xylose isomerase (a – U/mg, b – U/ml) synthesis by *A. ureafaciens* with concentration of glucose supplied into xylose medium

Рис. 4. Взаимосвязь синтеза ксилоизомеразы (а) – U/mg; (в) – U/ml актинобактериями *A. ureafaciens* и концентрации глюкозы при выращивании бактерий на средах с ксилозой

It should be noted that under experimental conditions glucose repressing effect depended on its concentration. It may be seen from Figure 4 that production of xylose isomerase by *A. ureafaciens* was not suppressed in presence of 0.1-0.3 % levels of catabolic repressor in the cultural medium. When concentration of glucose fed into the nutrient medium simultaneously with bacterial inoculation increased to 0.5 and 1.0 %, enzyme production decreased by 32 % and 72 % as compared to the control.

Summing up, synthesis of xylose isomerase by *A. ureafaciens*, induced by specific substrate xylose and its structural analog xylitol, is repressed by glucose and other readily digestible carbohydrates. High level of xylose isomerase production under non-optimized conditions and possibility of using diverse xylose-containing plant materials and derived processing wastes as components of nutrient media for culturing *A. ureafaciens* motivate the choice of this microbial strain as potential industrial xylose isomerase producer.

REFERENCES

1. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase // *Microbiol. Rev.* — 1996. — 60, № 2. — P. 280 — 300.
2. Ананьин В.М., Головлев Е.Л. Активность ксилозоизомеразы в процессе роста *Arthrobacter* sp. // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1981. — 17, № 6. — С. 826 — 831.
3. Лобанок А.Г., Сапунова Л.И., Казакевич И.О., Парахня Е.В. Независимый от специфического субстрата синтез ксилозо(глюкозо)изомеразы бактериями *Arthrobacter species* // *Доклады НАН Беларуси.* — 2000. — 4, № 1. — С. 69 — 71.
4. Sapunova L.I., Lobanok A.G., Kazakevich I.O., Parakhnya E.V. Effect of medium composition on constitutive production of glucose isomerase in *Arthrobacter* sp. // *Bul. Polish Acad. Sci.: Biol.* — 2002. — 50, № 4. — P. 213 — 222.
5. Lobanok A.G., Sapunova L.I., Dikhtievski Ya.O., Kazakevich I.O. Screening of glucose isomerase-producing microorganisms // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 1998. — 14, № 2. — P. 259 — 262.
6. Dische Z., Borenfreund E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses // *J. Biol. Chem.* — 1951. — 192, № 2. — P. 583 — 587.
7. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика.— Минск: Высшая школа, 1973. — 320 с.
8. Тюрин Ю.Н., Макаров А.А. Статистический анализ данных на компьютере.— М.: ИНФА-М, 1998. — 544 с.
9. Joo G.J., Rhee I.K. Production of glucose isomerase from xylB mutant *Streptomyces chibaensis* J-59 // *Sanop Misaengmul Hakhoechi.* — 1997. — 25, № 1. — P. 75 — 81.
10. Wang F., Whitaker R.D., Batt C.A. Production of glucose isomerase in a recombinant strain of *Streptomyces lividans* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 1998. — 50, № 1. — P. 65 — 70.
11. Joo G.-J., Kwon G.-S., Rhee I.-K. Isolation and identification of a *Streptomyces chibaensis* J-59 producing thermostable glucose isomerase // *Sanop Misaengmul Hakhoech.* — 1997. — 25, № 1. P. 15 — 22.
12. Teeradakorn S., Kishimoto M., Seki T., Pinphanichakarn P., Yoshida T. Process development and simulation of glucose isomerase production from birchwood xylan by a *Streptomyces fusant* // *Biochem. Eng. J.* — 1998. — 1, № 2. — P. 159 — 168.
13. Христов Л., Стойчев М., Григорова Й., Джежева Г., Драганова Р., Видимски Е. Биосинтеза на гликозоизомераза от *Streptomyces thermovulgaris* щам 127 с използване на обработен предхидролизат // *Acta Microbiol. Bulg.* — 1990. — 26. — P. 53 — 59.

УДК 579.222 577.152.531

Л.І. Сапунова

Інститут мікробіології НАН Білорусі, вул. Купревіча, 2, Мінськ, 220141, Білорусь, tel.: 8 (017) 26 76 209, e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

СИНТЕЗ КСИЛОЗОІЗОМЕРАЗИ АКТИНОБАКТЕРІЯМИ *ARTHROBACTER UREAFACIENS* БІМ В-6

Реферат

Вивчено вплив джерел вуглецю різного хімічного складу на утворення клітиннозв'язаної ксилозоізомеразы у *Arthrobacter ureafaciens* БІМ В-6. Встановлено індукований підвержений катаболітній репресії характер біосинтезу фермента бактеріями. Високий рівень утворення ксилозоізомеразы при вирощуванні бактерій на середовищах з ксилозою або ксилозовміщуючи-



ми відходами переробки рослинної сировини — соєвим та цитрусовим жомом, пшеничними висівками — обумовлюють вибір *Arthrobacter ureafaciens* БІМ В-6 як потенційного продуцента фермента.

К л ю ч о в і с л о в а: *Arthrobacter ureafaciens*, продуцент, ксилозоізомераза, біосинтез.

УДК 579.222 577.152.531

Л.И. Сапунова

Институт микробиологии НАН Беларуси, ул. Купревича, 2, Минск, 220141, Беларусь, tel.: 8 (017) 26 76 209, e-mail: leonida@mbio.bas-net.by

СИНТЕЗ КСИЛОЗОИЗОМЕРАЗЫ АКТИНОБАКТЕРИЯМИ *ARTHROBACTER UREAFACIENS* БИМ В-6

Реферат

Исследовано влияние источников углерода различного химического строения на образование клеточносвязанной ксилозоизомеразы у *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6. Установлен индуцированный подверженный катаболитной репрессии характер биосинтеза фермента бактериями. Высокий уровень образования ксилозоизомеразы при выращивании бактерий на средах с ксилозой или ксилозосодержащими отходами переработки растительного сырья — соевым и цитрусовым жомом, пшеничными отрубями — обуславливают выбор *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6 в качестве потенциального продуцента фермента.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Arthrobacter ureafaciens*, продуцент, ксилозоізомераза, біосинтез.



І.І. Романовська, О.В. Осійчук, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов

Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, тел.: 8 (048) 76 594 31, e-mail: irinagoma@gmail.com; osey4uk@gmail.com

ФЕРМЕНТАТИВНІ МЕТОДИ ЕЛІМІНАЦІЇ ФЕНОЛЬНИХ ПОЛЮТАНТІВ

*З використанням частково очищених препаратів окиснювано-відновлюваних ферментів: пероксидази хрону і тирозинази грибів *Agaricus bisporus* розроблені методи кількісної елімінації фенолу при оптимальних значеннях рН, температури, часу, концентрацій ферментів, субстратів і неорганічних коагулянтів. Показано вплив природи фенольного субстрату у розташування замісників у його молекулі (о-, м-, п-хлорфеноли) на процес пероксидазного окиснення.*

Ключові слова: пероксидаза, тирозиназа, елімінація, фенольні сполуки

Існуючі методи очищення стічних вод від фенолів, небезпечних забруднювачів навколишнього середовища (хімічне окиснення, мікробна деградація, адсорбція активованим вугіллем, екстракція розчинниками), незважаючи на їх ефективність, мають низку істотних недоліків, таких як висока вартість, неповнота очищення, утворення токсичних продуктів.

Перспективним напрямом в очищенні стічних вод є розробка нових технологій з використанням окиснювано-відновлюваних ферментів (пероксидази хрону та тирозинази з грибів) завдяки їх селективності, можливості застосування у широкому діапазоні рН, температур, концентрацій токсикантів, утворенню менш токсичних продуктів [1 – 3].

Пероксидаза (К.Ф. 1.11.1.7) каталізує у присутності пероксиду водню окиснення фенолів [4] з утворенням, в основному, нерозчинних, легко відокремлюваних продуктів окиснення; однак, пероксид водню може стати додатковим забруднювачем навколишнього середовища.

Тирозиназа (К.Ф. 1.14.18.1) каталізує окиснення фенольних субстратів у присутності молекулярного кисню до відповідних о-хінонів, які піддаються неферментативному окисненню до розчинних темно-забарвлених олігомерних продуктів [5], внаслідок чого виникає необхідність застосування коагулянтів для їх видалення. Однак, відомі методи елімінації продуктів біоконверсії за допомогою полімерів природного та синтетичного походження [2, 3] є не досить економічними.

Одним з суттєвих факторів, що обмежують застосування ферментів, є висока вартість їх комерційних препаратів, тому доцільно дослідження елімінації фенольних полютантів з використанням частково очищених препаратів ферментів.

Метою даного дослідження є розробка ферментативних методів видалення фенольних сполук з використанням частково очищених препаратів пероксидази хрону (ПОХ), тирозинази грибів (ТИР) та неорганічних коагулянтів.



Матеріали і методи

У роботі використовували частково очищені препарати пероксидази хрону і тирозинази з грибів *Agaricus bisporus*, виділені за модифікованими нами методами [6] та [7], відповідно. У ферментних препаратах визначали вміст білка методом Лоурі в модифікації Хартрі [8], активність за тирозином [7] (ТИР), спектральний показник чистоти ($RZ=A_{403}/A_{278}$), (ПОХ) [6], ступінь очищення за вмістом іонів міді (ТИР) [3], рН-, термооптимум, строк зберігання і вартість.

Концентрацію пероксидази та пероксиду водню визначали спектрофотометрично, використовуючи молярні коефіцієнти поглинання $\varepsilon=102000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при 403 нм і $\varepsilon=72,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ при 230 нм, відповідно [7]. Концентрації субстратів (фенолу, *o*-, *m*-, *p*-хлорфенолів) визначали 4-аміноантипіриновим методом [9].

рН-залежність реакції трансформації фенолів вивчали в діапазоні значень рН 3,0 – 10,0 з використанням відповідних буферних розчинів; вплив температури реакції в інтервалі 5 – 70 °С при рН 7,0.

Коагуляцію продуктів ферментативного окиснення фенолу проводили за допомогою алюмоамонійних, алюмокалієвих та залізоамонійних галунів, при вихідній концентрації фенолу 0,5 – 10 ммоль/дм³, концентрації коагулянтів 1 – 20,7 г/дм³. При визначенні необхідної для очищення води концентрації коагулянтів використовували методику пробного коагулювання [10], що імітує коагуляційне очищення з наступним відстоюванням. Ступінь видалення продуктів окиснення фенолу визначали спектрофотометрично [2].

Результати та їх обговорення

З метою оптимізації пероксидазного методу елімінації фенолів з використанням ПОХ, був виділений фермент з коренів хрону за модифікованим методом Баха та вивчені його біохімічні властивості.

Як видно з даних, представлених у табл. 1, вивчення біохімічних властивостей виділеного ферменту (RZ , активність, рН-, термооптимум), зберігання і порівняння отриманих характеристик з аналогічними даними комерційного препарату ПОХ ("Sigma", $RZ = 2,7$) свідчить про досить близькі властивості препаратів ферменту, за винятком ступеня чистоти, строків зберігання і вартості. Отриманий препарат ПОХ відрізняється більшою економічністю у порівнянні із комерційним.

Таблиця 1

Характеристики частково очищеної і комерційної ПОХ

Характеристики ферменту	Частково очищений препарат ПОХ	Комерційний препарат ПОХ ("Sigma")
$RZ (A_{403}/A_{278})$	1,0	2,7
Активність, од/хв · мг ферменту	100	100
рН-оптимум	6,0-7,0	6,0-7,0
Термооптимум, °С	30-40	30-40
Строк зберігання, міс.	5	24
Вартість 1г, грн	65	1580



З грибів *Agaricus bisporus* отримано частково очищений препарат тирозинази. Метод виділення ферменту був модифікований додаванням полікапроаміду, що привело до збільшення активності ТИР в 3 рази та зниження її вартості порівняно з комерційною (Fluka) в 11 разів. Отримано препарат ТИР з питомою активністю 500 од/хв · мг білка, вмістом білка 0,3 мг/г, строком зберігання 6 міс; вмістом міді в препараті 0,193 %, що дозволило розрахувати ступінь його чистоти — 84,5 %.

Важливо було встановити, наскільки ефективність процесу дефенізації, що каталізується частково очищеними ферментними препаратами, залежить від рН, температури інкубаційного середовища, концентрації реагентів і часу проведення реакції.

Як свідчать дані, представлені на рис. 1, максимальний ступінь біоконверсії досліджуваних полютантів (фенолу — 80,4 %, *o*-, *m*-, *p*-хлорфенолів — 68,1 %, 25,2 %, 71,0 %, відповідно) з використанням ПОХ спостерігається в інтервалах 6,0 — 7,5 і 4,0 — 5,0 од. рН і в діапазоні 20 — 40 °С — для фенолу, 30 — 40 °С — для хлорфенолів.

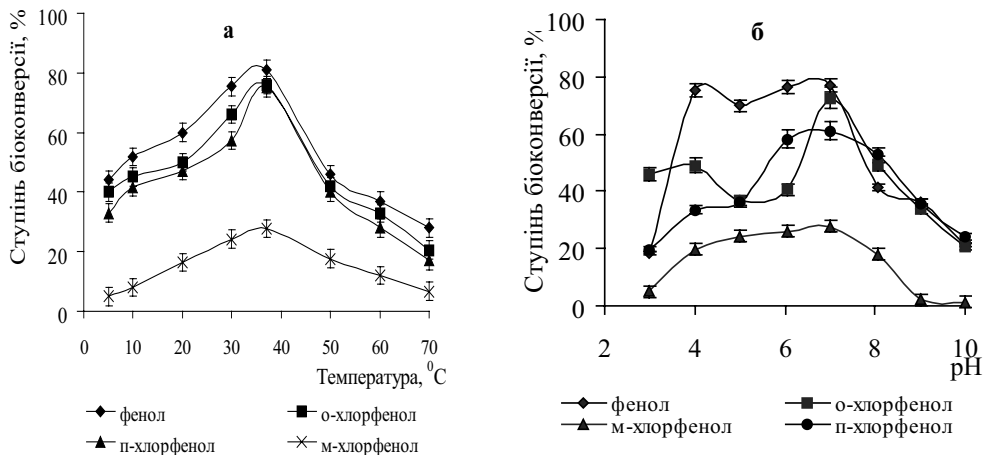


Рис. 1. Залежність ефективності пероксидазного окиснення фенолів від температури (а) і рН (б) інкубаційного середовища ([фенольний субстрат] = 1,0 ммоль/дм³, [H₂O₂] = 1,0 ммоль/дм³, активність ПОХ 0,1 од/см³, рН 7,0, t = 37 °С, τ = 1 год.)

Fig. 1. Correlation of fenol peroxidative oxidation efficiency with the temperature (a) and pH (b) of the incubative environment (phenol substrate) = 1,0 Mmol/dm³, {H₂O₂} = 1,0 Mmol/dm³, activity POX 0,14 U/cm³ pH=7,0, t=37 °C, τ=1 hour

Як видно з даних, представлених у табл. 2, максимальний ступінь трансформації фенолу тирозиназою спостерігається при рН 5,5 — 7,0 і температурі 20 — 50 °С.

Ефективність трансформації фенолів ПОХ зростає при підвищенні концентрації окислювача-пероксиду водню (до 1,0 ммоль/дм³) (рис. 2а) і активності ПОХ (до 0,1 од/см³) (рис. 2б).

Вивчення ступеня біоконверсії фенольних сполук від їх концентрації свідчить про те, що в інтервалі концентрацій 0,1 — 3,0 ммоль/дм³ спостерігається її зниження з 100 % до 25,2 % для фенолу, до 29,5 % — для *o*-хлорфенолу, до 17,2 % — для *p*-хлорфенолу і до 0 % — для *m*-хлорфенолу.



Вплив рН і температури інкубаційного середовища на ступінь окиснення фенолу, що каталізується тирозиназою

рН	Ступінь трансформації фенолу, % від макс.	Температура, °С	Ступінь трансформації фенолу, % від макс.
3	1,9	2	23,7
4	28,3	10	62,3
5	53,3	20	79,2
5,5	90,2	25	88,3
6	98,1	30	93,4
6,5	100,0	40	100,0
7	97,5	50	90,4
8	50,5	60	66,0
9	28,1	70	47,9
10	2,2	80	31,3

Час, необхідний для досягнення максимального ступеня біоконверсії досліджуваних фенолів, досягає 0,5 – 1 год. (мольне співвідношення фенол: $H_2O_2 = 0,1(0,5):1$, рН 7,0, $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, активність ПОХ 0,1 од/см³); збільшення часу інкубації до 24 годин істотно не сприяє (на 5 – 10 %) підвищенню ступеня трансформації токсикантів.

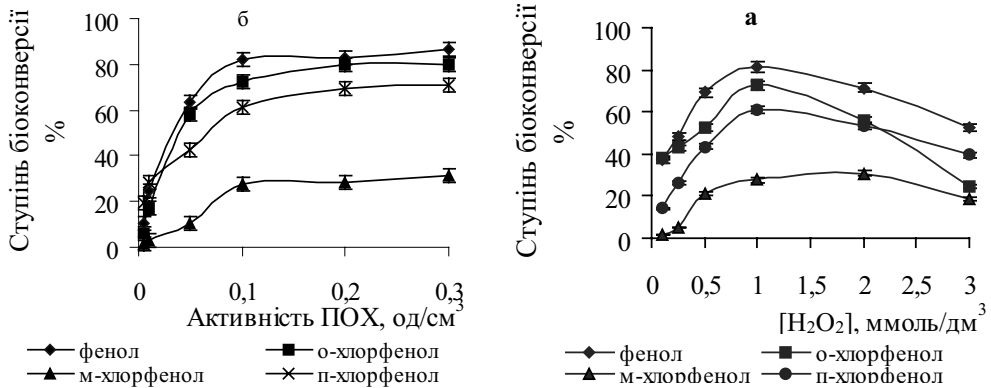


Рис. 2. Залежність ефективності пероксидазного окиснення фенолів від концентрації перексиду водню (а) ([фенольний субстрат] – 1,0 ммоль/дм³, активність ПОХ 0,1 од/см³, рН 7,0, $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 1$ год) і активності ПОХ (б) ([фенольний субстрат] – 1,0 ммоль/дм³, $[H_2O_2] = 1,0$ ммоль/дм³, рН 7,0, $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 1$ год)

Fig. 2. Correlation between phenol peroxidative oxidation efficiency and hydrogen peroxide concentration (а) {phenol substrate} – 1,0 Mmol/dm³ activity POX 0,1 u/cm³, рН – 7,0, $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 1$ hour and activity POX (б) {phenol substrate} – 1 Mmol/dm³, $[H_2O_2] = 1,0$ Mmol/dm³, рН – 7,0, $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $\tau = 1$ hour

За допомогою виділеної тирозинази проведено окиснення фенолу в широкому діапазоні концентрацій (0,5 – 10 ммоль/дм³), при цьому ступінь окиснення у всіх випадках становив більше 98 %, що відповідає даним Ikehata K. et al. [2], які використовували комерційний препарат ТИР. Слід зазначити, що ступінь біоконверсії фенолу підвищується при збільшенні активності ферменту, досягаючи максимального рівня після 1 год. інкубації з тирозиназою з активністю 50 од/см³. При використанні ферменту меншої активності (30 і 10 од/см³) час, необхідний для максимального ступеня трансформації, збільшується до 3 і 24 годин, відповідно (рис. 3).

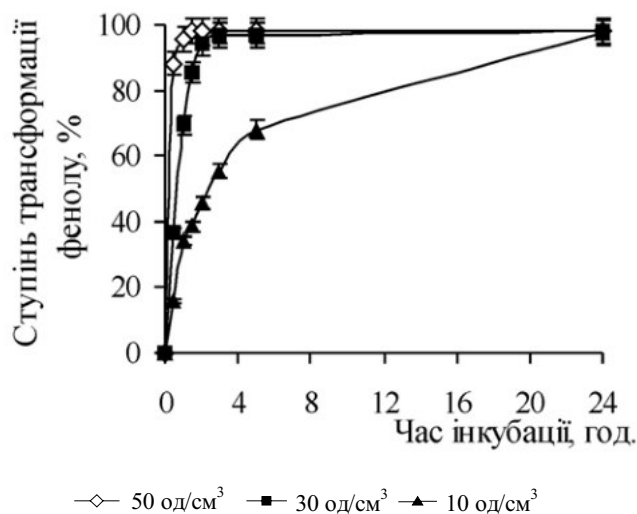


Рис. 3. Залежність ступеня трансформації фенолу від часу (концентрація фенолу 0,5 ммоль/дм³, температура 30 °С, рН 6,5)

Fig. 3. Correlatin between phenol transphormation level and time (phenol concentration 0,5 mM/dm³, temperature 30 °C, pH 6,5)

У результаті пероксидазного окиснення досліджуваних фенолів спостерігалось утворення полімерних продуктів (розмір часток 15-75 мкм), нерозчинних у воді та органічних розчинниках, що обвуглювалися при температурі 240 – 260 °С, які за даними ІЧ-спектроскопії і мас-спектрометрії є поліоксифеніленами.

Для видалення розчинних забарвлених продуктів окиснення фенолу, що каталізується тирозиназою, використовували коагулянти: алюмокалієві, алюмоамонійні та залізоамонійні галуни, які для цього процесу раніше не застосовувалися. Очищенню коагулянтами піддавалися розчини фенолу (0,5 – 10 ммоль/дм³), окиснені в присутності тирозинази більш, ніж на 98 %.

За допомогою обраних коагулянтів була здійснена елімінація продуктів реакції з ступенем видалення у всіх випадках більше 97 %; при цьому концентрації алюмоамонійних і алюмокалієвих галунів становили 1,0 – 17,5 г/дм³, залізоамонійних – 1,7 – 20,7 г/дм³ (рис. 4). Подібний ступінь елімінації продуктів окиснення фенолу спостерігався при використанні хітозану, але даний спосіб має суттєві недоліки – високу вартість хітозану та незручність його застосування через отримання хітозану за допомогою дезацетилювання хітину з панцирів ракоподібних [2].



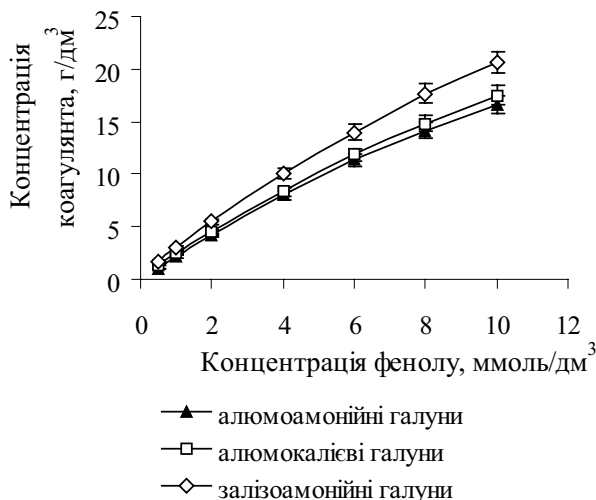


Рис. 4. Концентрації коагулянтів, необхідні для 97 %-ної елімінації продуктів біоконверсії ($t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,5$, $\tau = 3$ год)

Fig. 4. Coagulants concentration values needed for 97 % bioconversion products elimination ($t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH } 6,5$ $\tau=3$ hours)

Таким чином, з використанням частково очищених препаратів окиснювано-відновлюваних ферментів: пероксидази хрому і тирозинази грибів досліджені методи кількісної елімінації фенолу при оптимальних значеннях рН, температури, часу, концентрацій ферментів, субстратів, та вперше застосованих неорганічних коагулянтів. Показано вплив природи фенольного субстрату та розташування замісників у його молекулі (*o*-, *m*-, *p*-хлорфеноли) на процес пероксидазного окиснення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Wagner M., Nicell J.A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Water Res.* — 2002. — V. 36. — P. 4041 — 4052.
2. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // *Biotechnol. Prog.* — 2000. — V.16, N 4. — P. 533 — 540.
3. Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and applications // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — V.100. — P. 219 — 232.
4. Guopsing Z., Nicell J.A. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Water Res.* — 2000. — V. 34. — P. 1629-1637.
5. Singh A., Billinsley K.A., Ward O.P. Transformation of polychlorinated biphenyls with oxidative enzymes // *Bioprocess Engineering.* — 2000. — V. 23, № 3. — P. 421-425.
6. Михлин Д.М. Биологическое окисление. — М.: Изд-во Академии наук СССР, 1956. — 442 с.
7. Гребешова Р.Н. Способы стабилизации ферментных препаратов // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1994. — № 2. — С. 196-203.
8. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, № 1. — P. 422-427.
9. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975. — 360 с.
10. Ярошевская Н.В., Сергиенко А.Н., Муравьев В.Р. и др. Оценка особенностей процесса коагуляционной очистки воды на основании кривых коагуляции // *Химия и технология воды.* — 2005. — Т. 27, N 2. — С. 173 — 183.

**И.И. Романовская, О.В. Осейчук, Ю.А. Шестеренко,
О.В. Севастьянов**

Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина, тел.: 8 (048) 765 43 31, e-mail: irinaroma@gmail.com; osey4uk@gmail.com

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ЭЛИМИНАЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ ПОЛЛЮТАНТОВ

Реферат

С использованием частично очищенных препаратов окислительно-восстановительных ферментов: пероксидазы хрена и тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* разработаны методы количественной элиминации фенола при оптимальных значениях рН, температуры, времени, концентраций ферментов, субстратов и неорганических коагулянтов. Показано влияние природы фенольного субстрата и расположения заместителей в его молекуле (*o*-, *m*-, *p*-хлорфенолы) на процесс пероксидазного окисления.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пероксидаза, тирозиназа, элиминация, фенольные соединения

**I.I. Romanovska, O.V. Oseychuk, Yu.A. Shesterenko,
O.V. Sevastyanov**

A.V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, UNAS, Lyusdorfska road, 86, Odesa, 65080, Ukraine, tel.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: irinaroma@gmail.com; osey4uk@gmail.com

**ENZYMATIC METHODS OF PHENOLIC POLLUTANTS
ELIMINATION**

Summary

With usage of partially purified oxidative-reductive enzymes: horseradish peroxidase and mushroom *Agaricus bisporus* tyrosinase, the methods of quantitative phenol elimination were developed at optimal pH-, temperature, time, enzyme, substrates and inorganic coagulants concentration values; the influence of phenolic substrate nature and the substituents position in its molecule (*o*-, *m*-, *p*-chlorophenols) on the peroxidative oxidation process was shown.

К e y w o r d s: peroxidase, tyrosinase, elimination, phenolic compounds.



Ю.О. Павлова, С.П. Гудзь

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна, тел.: 8 (0322)96 40 53,
e-mail: indrekis@icmp.lviv.ua

ВИКОРИСТАННЯ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА НАГРОМАДЖЕННЯ ЕЛЕМЕНТНОЇ СІРКИ В КЛІТИНАХ *THIOCYSTIS SP. YA 2006*

Досліджено закономірності утилізації сірководню та нагромадження сірки в клітинах пурпурових сіркових бактерій Thiocystis sp. Швидкість використання сірководню бактеріями залежить від його вмісту в середовищі. Освітлення культури 1000 лк та високі концентрації сірководню (понад 200 мг/л) сприяють більш швидкій його утилізації клітинами. Максимальне нагромадження елементної сірки спостерігається на 6 добу культивування. Інтенсивність освітлення та вміст сірководню в середовищі є тими факторами, які регулюють накопичення сірки в клітинах бактерій. Після використання сірководню із середовища гранули сірки в клітинах звільняються від білкової мембрани і сірка використовується в процесі аноксигенного фотосинтезу як донор електронів.

Ключові слова: пурпурові сіркобактерії, сірководень, елементна сірка.

Пурпурові сіркові бактерії (родина *Chromatiaceae*) використовують відновлені сполуки сірки, зокрема, сірководень, як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [8]. Більшість представників родини – облігатні фотолітоавтотрофи і ростуть за таких концентрацій сульфідів, які є згубними для інших фототрофних несіркових бактерій [2, 3, 11]. Окиснення сірководню (а, отже, його детоксикація) пурпуровими сірковими бактеріями супроводжується нагромадженням в клітинах елементної сірки [8, 9].

Здатність знешкоджувати сірководень і нагромаджувати сірку дозволяє розглядати пурпурові сіркові бактерії як перспективні модельні організми для різних біотехнологічних процесів, в тому числі і для одержання сірки.

Метою роботи було дослідити здатність фотосинтезувальних пурпурових сіркових бактерій *Thiocystis sp. Ya 2006* утилізувати сірководень середовища та нагромаджувати сірку.

Матеріали і методи

У дослідах використовували культуру пурпурових сіркобактерій *Thiocystis sp. Ya 2006*, виділену з води озера “Яворівське”, що розташоване на території Язівського сіркового родовища (Україна, Львівська область).

Культуру вирощували на рідкому середовищі АТСС № 1449 у пробірках об'ємом 20 мл, які закривали гумовими корками так, щоб не залишилося пухирців повітря. Час культивування 10 діб при температурі 28 °С за умов постійного освітлення.



Джерелом світла слугували лампи розжарювання різної потужності. Інтенсивність освітлення регулювали зміною відстані між джерелом світла і об'єктом дослідження. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю116.

Біомасу клітин визначали турбідометрично на фотоколориметрі КФК-3 при 600 нм, кювета 3 мм.

Гранули сірки в клітинах виявляли за допомогою електронної мікроскопії. Фіксацію і контрастування клітин проводили як описано [1, 10]. Зразки переглядали і фотографували в електронному трансмісійному мікроскопі ПЕМ-100 за прискорювальної напруги 75 кВ.

Кількість сірководню визначали фотоелектроколориметрично ($\lambda = 400$ нм) після його взаємодії з вісмутовим реактивом [5].

Кількість сірки визначали йодометрично [6].

Статистичне опрацювання результатів проводили з використанням програм Excel та Origin.

Результати та їх обговорення

Сірководень виявляє токсичну дію на живі організми. Незначні його концентрації (0,06 – 0,2 ммоль) пригнічують розвиток деяких бактерій та найпростіших [7]. Пурпурові сіркобактерії виявляють підвищену стійкість до цієї сполуки і добре ростуть в широкому діапазоні концентрацій сірководню (0,5 – 11 ммоль) в середовищі [2, 3, 11]. Вони використовують його як донор електронів в реакціях відновлення CO_2 у процесі фотолітоавтотрофного росту.

Вивчення динаміки використання сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006*, показало, що вже на третю добу культивування його концентрація у середовищі зменшується у 30 разів (рис. 1). На шосту добу культивування бактерії окиснюють практично весь наявний у середовищі сірководень.

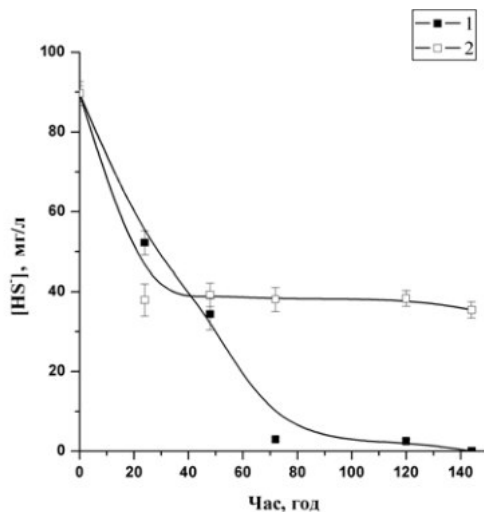


Рис. 1. Використання сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* в процесі росту культури (1). 2 – середовище без клітин.

Fig. 1. Hydrogen sulfide utilization during the *Thiocystis sp. Ya 2006* growth (1). 2 – the medium without cells.



У попередніх дослідженнях нами показано, що високі концентрації сірководню негативно впливають на ріст культури та викликають різні деструктивні зміни в клітинах бактерій [3]. *Thiocystis sp. Ya 2006* утилізує до 95 % сірководню середовища, якщо останній присутній у невеликих концентраціях (80 мг/л) (рис. 2, Б). Вища початкова концентрація сірководню (200 мг/л) сприяє кращому росту бактерій (рис. 2, А). При цьому сірководень окиснюється бактеріями в 1,5 рази швидше, порівняно із клітинами, вирощеними у середовищі із концентрацією H_2S 80 мг/л. В обидвох експериментах бактерії окиснювали сірководень швидше, ніж це відбувається за участю кисню повітря.

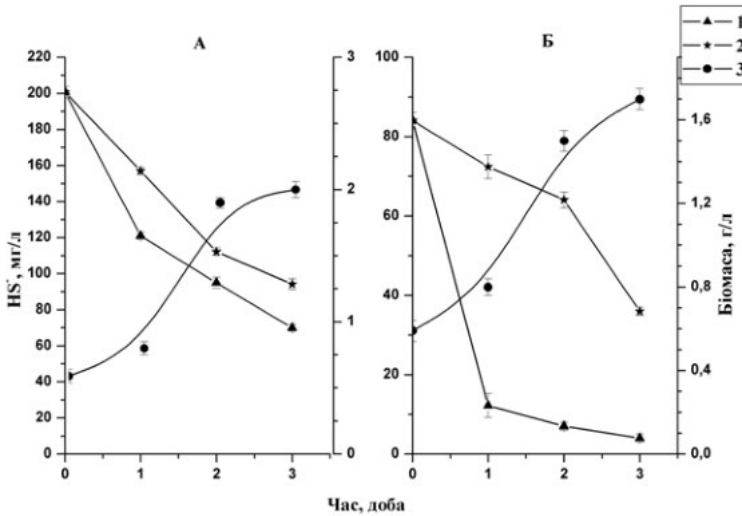


Рис. 2. Використання сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* із середовища з різними його концентраціями
 1 – окиснення сірководню в присутності клітин;
 2 – окиснення сірководню киснем повітря; 3 – ріст культури.

Fig. 2. The utilization of different hydrogen sulfide concentration by *Thiocystis sp. Ya 2006*

1 – hydrogen sulfide oxidation in cells presence; 2 -hydrogen sulfide oxidation by oxygen from the air; 3 – the growth of culture.

Аноксигенні фотосинтезувальні бактерії використовують енергію світла для перенесення електронів від сірководню до НАД(Ф)⁺ і ферредоксину [4]. Отже, утилізація сірководню пурпуровими сірковими бактеріями в першу чергу визначається інтенсивністю освітлення. На рис. 3 показана утилізація сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* за умов різної освітленості. Швидкій утилізації сульфідів сприяє вирощування культури за інтенсивності освітлення 1000 лк. Нами показано, що за таких умов, протягом двох діб культивування бактерії використовують понад 80 % сірководню (рис. 3). Зниження інтенсивності освітлення (700 лк, 300 лк) зумовлює сповільнення темпів окиснення сірководню. Недостатнє або надмірне освітлення (40 лк, 2000 лк) супроводжується суттєвим сповільненням його утилізації (рис. 3) та зменшенням кількості сірки в клітинах (рис. 4).

Різні сіркові бактерії у процесі росту використовують відновлені сполуки сірки як донор електронів для аноксигенного фотосинтезу або аеробного чи анаеробного хемотрофного росту [2, 4, 8, 9]. Як проміжний продукт окиснення сірководню чи

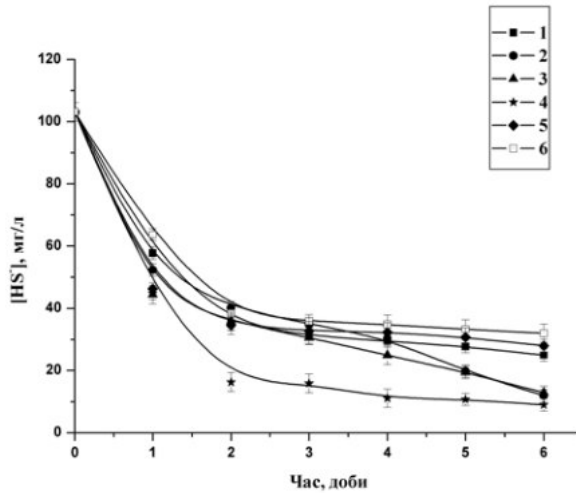


Рис. 3. Утилізація сірководню *Thiocystis sp. Ya 2006* за умов різної освітленості — 1 — 40 лк; 2 — 300 лк; 3 — 700 лк; 4 — 1000 лк; 5 — 2000 лк; 6 — середовище без клітин.

Fig. 3. Hydrogen *Thiocystis sp. Ya 2006* sulfide utilization under different light intensity condition — 1 — 40 lx; 2 — 300 lx; 3 — 700 lx; 4 — 1000 lx; 5 — 2000 lx; 6 — the medium without cells.

тіосульфату бактерії накопичують глобули “елементної” сірки в клітині (*Chromatiaceae*, *Beggiatoa sp.*) або виділяють її в навколишнє середовище (*Ectothiorhodospiraceae*, *Chlorobiaceae*) [8, 9].

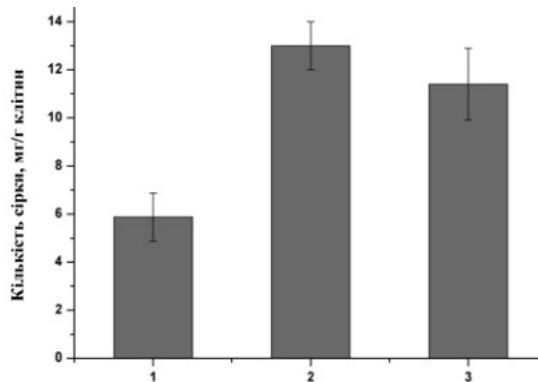


Рис. 4. Нагромадження сірки в клітинах *Thiocystis sp. Ya 2006* за умов різної освітленості: 1 — 40 лк; 2 — 700 лк; 3 — 2000 лк.

Fig. 4. Sulfur accumulation in *Thiocystis sp. Ya 2006* cells under different light intensity conditions: 1 — 40 lx; 2 — 700 lx; 3 — 2000 lx.

Утворена в клітинах сірка за дефіциту сірководню у зовнішньому середовищі служить джерелом електронів при фотосинтезі. Максимальне нагромадження сірки в клітинах *Thiocystis sp. Ya 2006* (13 мг/г клітин) спостерігається на 6 добу культивування (рис. 5).



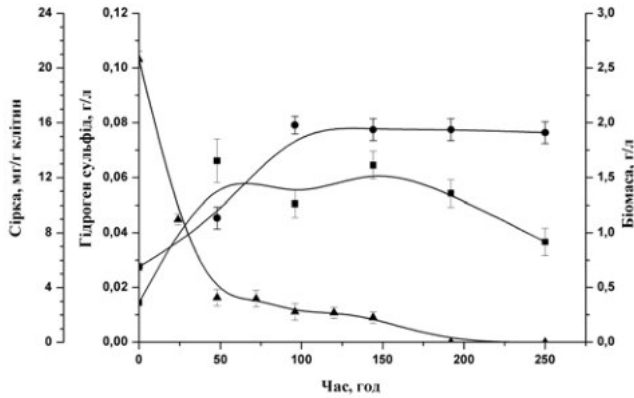


Рис. 5. Ріст (-●-) та нагромадження сірки (-■-) в клітинах *Thiocystis sp. Ya 2006* на середовищі із сульфідом. -▲- утилізація бактеріями сірководню.

Fig. 5. The growth (-●-) and sulfur accumulation (-■-) in *Thiocystis sp. Ya 2006* cells in the medium with hydrogen sulfide. -▲- hydrogen sulfide utilization by bacteria.

На цей час сірководень середовища повністю використовується клітинами і вони переходять в стаціонарну фазу росту. При сповільненні темпів росту бактерій спостерігається зниження вмісту сірки в клітинах, що, очевидно, пов'язане з її використанням в енергетичному метаболізмі.

На електронних фотографіях (рис. 6) видно наповнені гранулами сірки клітини. На початку їх формування — за наявності сірководню у середовищі — вони ото-

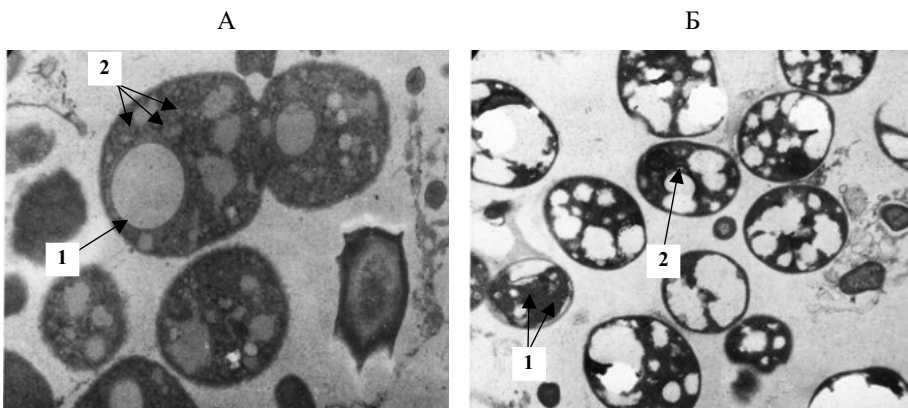


Рис. 6. Мікрофотографії клітин *Thiocystis sp. Ya 2006*, вирощених у середовищі із сірководнем до середини логарифмічної (А) та стаціонарної (Б) фази росту. 1 — білкова оболонка, 2 — фотосинтетичні везикули.

Fig. 6. Electron microscopic photomicrographs of *Thiocystis sp Ya 2006* cells, which were grown in the medium with hydrogen sulfide to middle of logarithmic (left) and stationary (right) stage of growth. 1 — protein membrane, 2 — photosynthetic vesicles.

чені добре помітною білковою мембраною. Використання сірководню середовища стимулює використання гранул сірки “нових” донорів електронів. При цьому мембрана, що оточує гранули руйнується і сірка вивільняється в цитоплазматичний простір. На електронних фотографіях видно, що із звільненою від мембран сіркою взаємодіють фотосинтетичні везикули, що очевидно, пов’язано з більш інтенсивним використанням сірки як донора електронів в процесі фотосинтезу.

Таким чином, в результаті приведених досліджень встановлено, що пурпурові сіркові бактерії роду *Thiocystis* здатні утилізувати сірководень і перетворювати його в сірку, яка нагромаджується в клітинах. Максимальне нагромадження сірки клітинами спостерігається на шосту добу культивування. Кількість утворюваної клітинами сірки регулюється інтенсивністю освітлення і концентраціями сірководню в середовищі. Описані бактерії слід розглядати як перспективні для біотехнологічного одержання сірки.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Кім Л.Я., Гудзь С.П.* Пурпурові сіркобактерії з водою Яворівського родовища сірки // Мікробіол. журн. — 2007. — 69, № 1 — С. 12-19.
2. *Кондратьева Е. Н.* Фотосинтезирующие микроорганизмы. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 374 с.
3. *Павлова Ю.О., Гудзь С.П., Гнатуш С.О., Кулачковський О.Р.* Структурно-функціональні зміни в клітинах *Thiocystis sp.* викликані сірководнем і освітленістю // Агроекологічний журнал — в друці.
4. *Dahl Ch., Engels S., Pott-Sperling A., Schulte A., Sander A., Lübbe A., Deuster O., Brune D.* Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of *dsr* proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* // J. Bacteriol. — 2005 — 187, № 4. — P. 1392-1404.
5. *Dean G.A.* A simple colorimetric finish for the Johnson-Nishita micro-distillation of sulfur // The analyst: the journal of the society of Analytical Chemistry. — 1966. — 91, № 1085. — P. 530 — 532.
6. *Jorgensen B.B., Kuenen J., Cohen Y.* Microbial transformations of sulfur compounds in a stratified lake (Solar Lake, Sinai) // Limnol. Oceanogr. — 1979. — 24. — P. 799-822.
7. *Küster E., Dorusch F., Altenburger R.* Effects of hydrogen sulfide to *Vibrio fischeri*, *Scenedesmus vacuolatus*, and *Daphnia magna* // Environ. Toxicol. Chem. — 2005. — 24. — P. 2621-2629.
8. *Phennig N., Tröper H.* The family *Chromatiaceae* // The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Ecophysiology, isolation, identification, applications. — 2nd edn. — New York: Spinger, 1992. — P. 3200-3221.
9. *Prange A., Chauvistre R., Modrow H., Hormes J., Tröper H., Dahl Ch.* Quantative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur // Microbiology — 2002 — 148. — P. 267-276.
10. *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at pH as an electronopaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17. — P. 208—212
11. *Zaar A., Fuchs G., Golecki J., Overmann J.* A new purple sulfur bacterium isolated from littoral microbial mat, *Thiorhodococcus drewsii sp. nov.* // Arch. Microbiol. — 1979, №3. — P. 173-183.



Ю.А. Павлова, С.П. Гудзь

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина, тел. 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: *indrekis@icmp.lviv.ua*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРОВОДОРОДА И НАКОПЛЕНИЕ ЭЛЕМЕНТНОЙ СЕРЫ В КЛЕТКАХ *THIOCYSTIS SP. YA 2006*

Реферат

Исследованы закономерности утилизации сероводорода и накопления серы в клетках пурпурных серобактерий *Thiocystis sp. Ya 2006*. Скорость использования сероводорода бактериями зависит от его содержания в среде. Освещение культуры 1000 лк и высокие концентрации сероводорода (свыше 200 мг/л) содействуют более быстрой его утилизации клетками. Максимальное накопление элементной серы наблюдается на 6-е сутки культивирования. Интенсивность освещения и содержащее сероводорода в среде являются теми факторами, которые регулируют накопление серы в клетках бактерий. После использования сероводорода из среды, гранулы серы в клетках освобождаются от белковой мембраны, и сера используется в процессе бескислородного фотосинтеза как донор электронов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: пурпурные серобактерии, сероводород, сера.

Yu.O. Pavlova, S.P. Gudz

Ivan Franko Lviv National University,
Hrushevsky Str., 4, Lviv, 79005, Ukraine, тел. 8 (0322) 96 40 53,
e-mail: *indrekis@icmp.lviv.ua*

HYDROGEN SULFIDE UTILIZATION AND ACCUMULATION OF SULFUR IN *THIOCYSTIS SP. YA 2006* CELLS

Summary

The mechanisms of hydrogen sulfide utilization and accumulation of hydrogen sulfide in *Thiocystis sp. Ya 2006* cells were investigated. The intensity of hydrogen sulfide using depends on its quantity in the medium. The light intensity 1000 lx and high hydrogen sulfide concentration made the positive influence on hydrogen sulfide utilization by the cells. The maximum of sulfur accumulation was observed after six days of cultivation. The light intensity and hydrogen sulfide content in the medium have regulated the accumulation of sulfur in bacteria cells. When hydrogen sulfide was used from the medium, sulfur globules lost their protein membrane and then sulfur was used in the process of anoxic photosynthesis as electron donor.

К e y w o r d s: purple sulfur bacteria, hydrogen sulfide, sulfur.



**М.Б. Галкін, З.І. Жиліна, Ю.В. Ішков, М.О. Петрова,
В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПІРИДИЛ) ПОРФІРИНУ З ВІСМУТОМ НА РІСТ ТА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853

Комплекс мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом суттєво інгібує ріст Pseudomonas aeruginosa у суспензійній культурі. Підвищення інгібуючого ефекту спостерігається в двох інтервалах концентрацій: від 0,04 до 4,0 та від 40 до 80 мкмолей. Максимальна з досліджених концентрацій (80 мкмолей) зменшувала приріст біомаси P. aeruginosa на 80 %. Металокомплекс у концентраціях 0,04 та 40 мкмолей запобігає формуванню біоплівки у 1,8 і 2,7 рази, відповідно. При цьому знижується здатність клітин P. aeruginosa синтезувати кислі мукополіцукриди та об'єднуватися у конгломерати.

К л ю ч о в і с л о в а: мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірин, металокомплекс з вісмутом, антимікробна активність, біоплівка, Pseudomonas aeruginosa.

Процес формування біоплівки численими умовно-патогенними мікроорганізмами має величезне значення у медичній практиці. Здатність до її утворення є одним з вирішальних факторів у передачі внутрішньолікарняних інфекцій, що викликаються, зокрема, псевдомонадами, стафілококами, кандидами тощо. Дані літератури свідчать про утворення біоплівок умовно-патогенними мікроорганізмами на катетерах довгострокового використання, які слугують джерелами інфікування людей [3, 7]. Формування біоплівок має місце не тільки на катетерах та іншому медичному обладнанні, але і на зубах та зубних протезах; системах кондиціонування повітря; та, у певних випадках, в організмі людини, наприклад, у дихальних шляхах хворих на муковісцидоз. Сформовані біоплівки є джерелами хронічних інфекцій, які погано піддаються лікуванню [8].

Найчастіше спалахи внутрішньолікарняних інфекцій обумовлені *Pseudomonas aeruginosa*, яка у складі біоплівок практично нечутлива до антибіотиків [3, 6]. Тому пошук принципово нових груп антимікробних засобів, ефективних по відношенню до мікроорганізмів, що знаходяться у складі біоплівок, є сучасною, актуальною проблемою.



Раніше нами було показано, що синтетичні мезо-заміщені порфірини та їх металокомплекси володіють значною антимікробною активністю, яка не залежить від чутливості бактерій до антибіотиків [5,10].

Метою роботи було вивчення впливу вісмутового комплексу мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірина (Ві-ТПП) на формування біоплівки та синтез кислих екзополісахаридів *P. aeruginosa*.

Матеріали і методи

У роботі був використаний штам *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, отриманий з музею культур мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ імені І. І. Мечникова. Мезо-тетра(4-N-метил-піридил)-порфірин (ТПП) та його комплекс з вісмутом синтезовані у ПНДЛ-5 ОНУ імені І. І. Мечникова [1].

Антимікробну активність Ві-ТПП щодо *P. aeruginosa* досліджували з використанням методу серійних розведень у середовищі Гісса, в діапазоні концентрацій від 0,04 до 80 мкмоль. Антимікробний ефект оцінювали за оптичною густиною 24-годинної культури на спектрофотометрі "Spekol-10".

Для оцінки формування біоплівки у стерильні бюкси з покрівними скельцями (18x18 мм) додавали 2 мл середовища Гісса та клітини тест-штаму до концентрації 10^3 КУО/мл. У дослідні проби додавали синтезовані сполуки до кінцевих концентрацій 0,04 і 40 мкмоль та інкубували при 37 °С у термостаті впродовж 24 годин. По закінченні інкубації скельця відмивали від неприкріплених клітин фізіологічним розчином, фіксували 96 % етанолом та фарбували впродовж 10 хв кристалічним фіолетовим. Після відмивання барвника і висушування на повітрі оцінювали стан біоплівок візуально та під мікроскопом [11].

Для вивчення кількісного впливу досліджуваних сполук на формування біоплівки та синтез кислих полісахаридів *P. aeruginosa* використовували 96-лункові пластикові планшети. У лунки вносили 0,1 мл суспензії бактерій (10^3 КУО/мл). У дослідні проби додавали сполуки до кінцевих концентрацій 0,04 і 40 мкмоль та інкубували при 37 °С у термостаті. Через 24 год надосадову рідину видаляли і тричі промивали біоплівку, додаючи у кожен лунку по 0,2 мл фізіологічного розчину. Стан біоплівок на дні лунок оцінювали після фарбування кристалічним фіолетовим, або алціановим блакитним. Облік результатів здійснювали на фотометрі для імуноферментного аналізу при $\lambda=570$ нм та $\lambda=605$ нм, відповідно [11].

Усі експерименти повторювали 4 рази. Кількість паралелей кожного з варіантів дорівнювала 5. Для обробки та аналізу даних використовували методи варіаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної та її середньоквадратичного відхилення. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Ст'юдента. Математичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel [2].

Результати та їх обговорення

Вивчення впливу Ві-ТПП на ріст *P. aeruginosa* показало, що досліджена нами сполука має високу антимікробну активність щодо даного мікроорганізму (рис. 1). Характер інгібуючого впливу виявився подібним до впливу цієї ж сполуки на ріст *Salmonella enteritidis* як було показано нами раніше [5]. Підвищення інгібуючого впливу спостерігалось у діапазоні концентрацій від 0,04 до 4 та від 40 до 80 мкмоль. У діапазоні концентрацій 4-40 мкмоль спостерігалось плато, відсутність залежності зростання інгібуючої активності від концентрації Ві-ТПП. При цьому інтенсивність росту тест-штаму становила 40 % від контролю. Найбільша з вивчених концентрацій (80 мкмоль) пригнічувала ріст тест-штаму майже на 80 %.



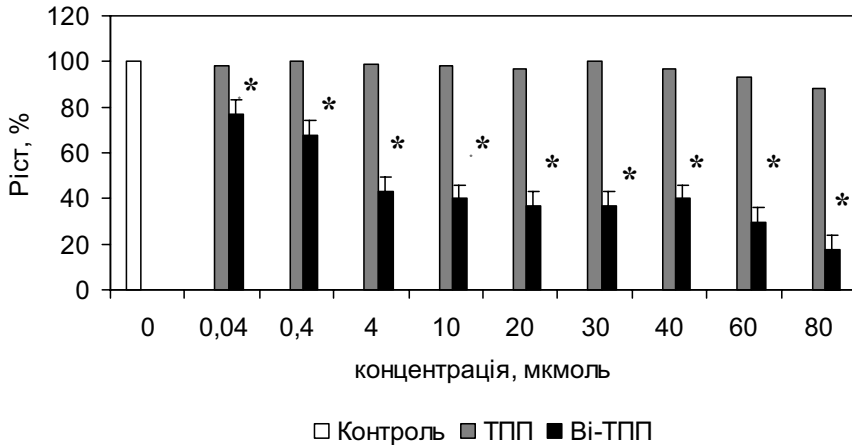


Рис. 1. Ріст *P. aeruginosa* ATCC 27853 за присутності мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину та його комплексу з вісмутом
* – різниця вирогідна у порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

Fig. 1. *P. aeruginosa* ATCC 27853 growth in presence of meso-tetra(4-N-methyl-pyridyl)porphyrin and its bismuth complex
* – $p < 0,05$ by Student's test

На нашу думку подібна картина інгібування росту *P. aeruginosa* може свідчити про те, що у зонах малих та великих концентрацій механізм антимікробної дії досліджуваної сполуки може суттєво відрізнятися. Не виключно також, що за різних концентрацій транспорт Ві-ТПП усередину клітин бактерій може здійснюватися за різними механізмами. Вільна основа та нітрат вісмуту суттєвого впливу на *P. aeruginosa* не спричиняли. Лише найбільша концентрація ТПП пригнічувала ріст мікроорганізму на 12 %.

Вивчення ефекту досліджуваної сполуки на формування біоплівки у планшеті показало, що у присутності вісмутового комплексу цей процес суттєво пригнічується (рис. 2). За присутності комплексу у концентрації 0,04 мкмоль, число клітин тест-штаму прикріплених до дна лунки зменшувалось у 1,8 рази, а за концентрації 40 мкмоль – майже у 2,7 рази. Ефект вільної основи синтетичного порфірину виявився меншим за ефект металокомплексу і склав 25 та 57 %, відповідно. Нітрат вісмуту на процес формування біоплівки суттєвого впливу не спричиняв. Цікавим є той факт, що вісмутовий комплекс мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину має значно більшу здатність до пригнічення формування біоплівки, ніж до інгібування росту *P. aeruginosa* у суспензійній культурі. Так, ефект найнижчої з використаних концентрацій склав у першому випадку майже 80 % (рис. 2), тоді як у другому (рис. 1) лише 23 %.

Це дає змогу припустити, що пригнічення формування біоплівки Ві-ТПП пов'язано не тільки з впливом його на ріст *P. aeruginosa*. Можливо ця сполука може гальмувати або модифікувати деякі метаболічні процеси в клітинах бактерії, зокрема впливати на синтез екзополісахаридів, які разом з фімбріями та іншими факторами сприяють адгезії *P. aeruginosa* до різних поверхонь. Така здатність була показана для комплексів вісмуту з ліпофільними тіолами, які інгібували синтез екзополісахаридів у *P. aeruginosa* та деяких інших бактерій [9,12].



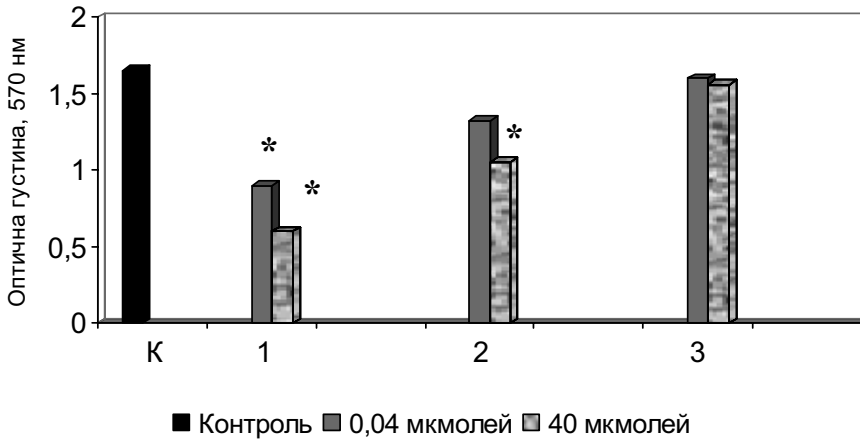


Рис. 2. Вплив досліджених сполук на інтенсивність формування біоплівки *P. aeruginosa*
 К - контроль, 1 – Bi-ТПП, 2 – ТПП, 3 – Bi(NO₃)₃
 * – різниця вирогідна у порівнянні з контролем (p < 0,05)

Fig. 2. Influence of studied compounds on the *P. aeruginosa* biofilm formation process
 K - kontrol, 1 – Bi-TPP ; 2 – TPP; 3 – Bi(NO₃)₃
 * – p < 0,05 by Student's t test

Результати дослідження якісного впливу металокомплексу на формування біоплівки показані на рис. 3 і 4. Загальний вигляд біоплівки на скельцях (рис. 3), пофарбованих кристалічним фіолетовим, свідчить про пригнічення цього процесу. Вплив Bi-ТПП виявився залежним від його концентрації.

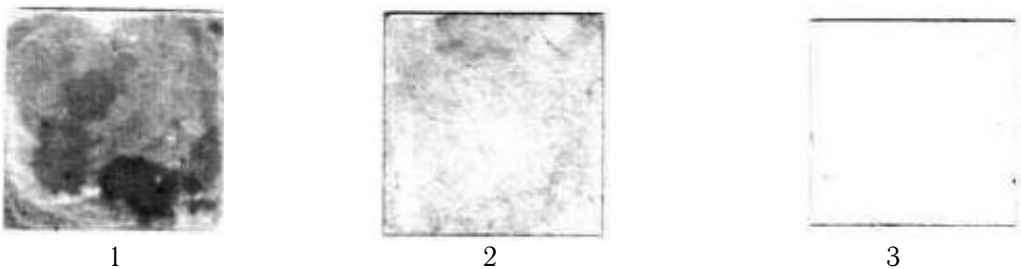


Рис. 3. Загальний вигляд біоплівки, пофарбованої кристалічним фіолетовим
 1 – контроль; 2 – 0,04 мкмоль Bi-ТПП; 3 – 40 мкмоль Bi-ТПП

Fig. 3. General view of the *P. aeruginosa* biofilm stained by crystal violet
 1 – control; 2 – 0,04 μM Bi-TPP; 3 – 40 μM Bi-TPP

На мікрофотографіях скельць, представлених на рис. 4, видно, що металокомплекс значно знижує здатність *P. aeruginosa* до формування конгломератів клітин, які лежать в основі біоплівки. При концентрації 0,04 мкмоль у препаратах присутня значна кількість поодиноких клітин, тоді як у контролі практично усі клітини зібрані

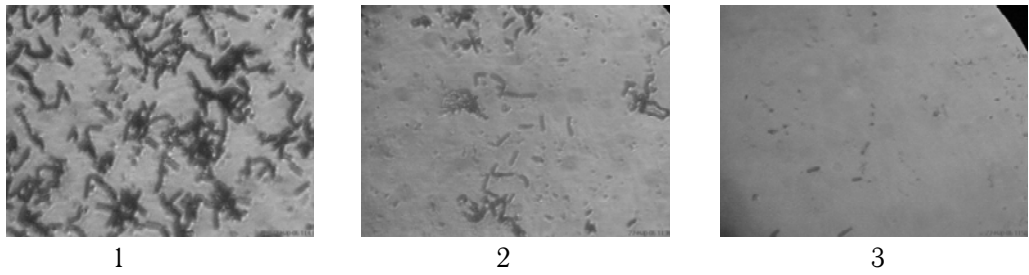


Рис. 4. Вигляд біоплівки, сформованої в присутності різних концентрацій Ві-ТПП, під мікроскопом (x900)
1 – контроль; 2 – 0,04 мкмоль; 3 – 40 мкмоль

Fig. 4. Microscopic view of the *P. aeruginosa* biofilm formed in presence of different concentrations of Bi-TPP (x900)
1 – control; 2 – 0,04 μM; 3 – 40 μM

у великі конгломерати. За концентрації 40 мкмоль Ві-ТПП, на скельцях присутні лише поодинокі клітини розкидані по усьому полю зору і сформована біоплівка практично відсутня.

Фарбування біоплівки алциановим блакитним (рис. 5) виявило також залежне від концентрації Ві-ТПП пригнічення синтезу кислих мукополісахаридів, які є важливими компонентами слизу *P. aeruginosa* і сприяють адгезії цього мікроорганізму. Незначне гальмування синтезу екзополісахаридів відмічено у присутності ТПП, а нітрат вісмуту зовсім не впливав на цей процес.

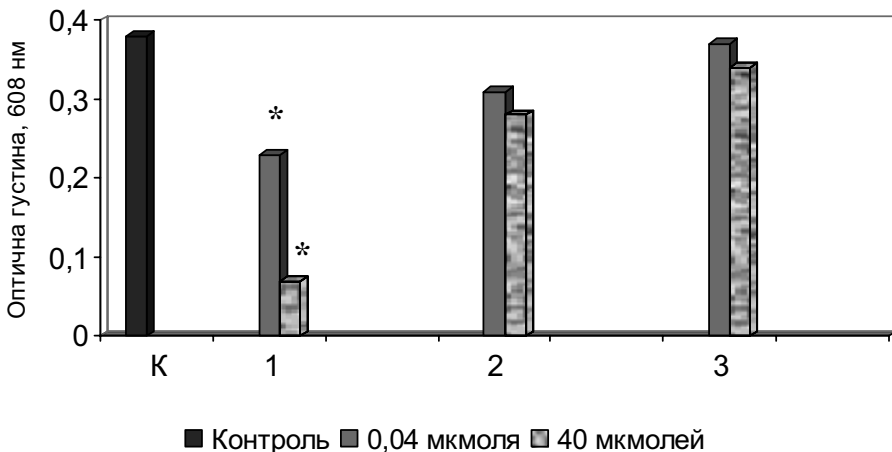


Рис. 5. Вплив досліджених сполук на інтенсивність синтезу кислих полісахаридів в біоплівці *P. aeruginosa*
К - контроль, 1 – Ві-ТПП, 2 – ТПП, 3 – $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$
* – різниця вирогідна у порівнянні з контролем ($p < 0,05$)

Fig. 5. Influence of studied compounds on the acid polysaccharides synthesis intensity
K - kontrol, 1 – Bi-TPP; 2 – TPP, 3 – $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$
* – $p < 0,05$ by Student's test

Таким чином, отримані експериментальні дані дають можливість вважати, що комплекс мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом не тільки пригнічує ріст *P. aeruginosa*, але і запобігає утворенню нею біоплівки. За попередніми результатами останнє обумовлюється інгібуючим впливом дослідженої сполуки на синтез кислих полісахаридів та формування клітинних конгломератів. Подальші дослідження будуть спрямовані на більш глибоке вивчення механізмів дії вісмутового комплексу на процес утворення біоплівки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ишков Ю.В., Жилина З.И., Водзинский С.В. Порфирины и их производные. XXI. // Журн. орг. химии. — 2000.— т. 36, вып. 4. — С. 609-612.
2. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морнон, 2001. — 260 с.
3. Рафальский В.В. Особенности выбора антимикробной терапии при осложненных инфекциях мочевыводящих путей // Consilium medicum. — 2004. — т. 6, вып. 7. — С. 75-79.
4. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175 — 177.
5. Філіпова Т.О., Жилина З.І., Іваниця В.О., Галкін М.Б., Малярчик І.О. Ішков Ю.В., Зінченко О.Ю. Антибактеріальна активність металокомплексу мезо-тетра(4-N-метил-піридил)порфірину з вісмутом // Вісник ОНУ. Біологія. — 2005. — т. 10, вип. 7. — С. 167- 171.
6. Anwar H., Strap J.L., Costerton J.W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy // Antimicrob. Agents Chemother. — 1992. — V. 36. — P. 1347-1351.
7. Ching-Tsan Huang, Stewart P.S. Reduction of polysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by bismuth dimercaprol (BisBAL) treatment // Journal of antimicrobial chemotherapy. — 1999. — V. 44. — P. 601-602.
8. Costerton J.W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection // Trends Microbiol. — 2001. — V. 9. — P. 50-52.
9. Domenico P., Tomas J.M., Merino S., Rubires X., Burke A.C. Surface Antigen Exposure by Bismuth Dimercaprol Suppression of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide // Infect. Immun. — 1999. — V. 67. — P. 664-669.
10. Philippova T.O., Galkin B.N., Zinchenko O.Yu., Rusakova M.Yu., Ivanytsya V.O., Zhilina Z.I. The antimicrobial properties of new synthetic porphyrins // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. — 2003. — V. 12, № 11-12. — P. 141-148.
11. Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // J. Microbiol. Methods. — 2000. — V. 40. — P. 175-179.
12. Wu C. L., Domenico P., Hassett D. J., Merino S., Tomas J.M. Subinhibitory Bismuth-Thiols Reduce Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. — 2002. — V. 26. — P. 731-738.

Н.Б. Галкин, З.И. Жилина, Ю.В. Ишков, М.А. Петрова, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА МЕЗО-ТЕТРА(4-N-МЕТИЛ-ПИРИДИЛ) ПОРФИРИНА С ВИСМУТОМ НА РОСТ И ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853

Реферат

Комплекс мезо-тетра(4-N-метилпиридил) порфирина с висмутом обладает выраженной способностью ингибировать рост *Pseudomonas aeruginosa* в суспензионной культуре. Повышение ингибирующего эффекта наблюдалось в интервалах концентраций от 0,04 до 4 и от 40 до 80 мкмоль. Максимальная из использованных концентраций (80 мкмоль) ингибировала рост *P. aeruginosa* на 80 %. Металлокомплекс в концентрациях 0,04 и 40 мкмоль ингибировал образование биоплёнки в 1,8 и 2,7 раз, соответственно. При этом снижается способность клеток *P. aeruginosa* синтезировать кислые мукополисахариды и образовывать конгломераты.

К л ю ч е в ы е с л о в а: мезо-тетра(4-N-метил-пиридил) порфирин, металлокомплекс с висмутом, антимикробная активность, биопленка, *Pseudomonas aeruginosa*.

M.B. Galkin, Z.I. Zhilina, Yu.V. Ishkov, M.O. Petrova, V.O. Ivanytsya

Odesa National Mechnykov University,
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, тел.: 8 (0482) 765 33 61,
e-mail: volandaron@ukr.net

INFLUENCE OF MESO-TETRA (4-N-METHYLPIRYDIL) PORPHYRIN COMPLEX WITH BISMUTH ON PSEUDOMONAS AERUGINOSA ATCC 27853 BIOFILM GROWTH AND FORMATION

Summary

The complex of meso-tetra (4-N-methylpyridil) porphyrin with bismuth can truly inhibit the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. Increasing of inhibitory effect was observed at two intervals of concentration from 0.04 to 4 and from 40 to 80 μM . At interval of concentration of 4 - 40 μM the inhibitory effect was constant and arranged 60 %. The highest of used concentrations – 80 μM inhibited *P. aeruginosa* growth to 80 %. The complex can effectively prevent the biofilm formation used the strain of *P. aeruginosa*. Under discovered property concentrations – 0.04 and 40 μM , the biofilm formation was inhibited into 1,8 and 2,75 times. Under this decreasing of mucopolysaccharides synthesis was detected.

К e y w o r d s: meso-tetra (4-N-methylpyridil) porphyrin, metallocomplex with bismuth, antimicrobial activity, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*.



УДК 579:923 Тульчинська (447.74)

**В.О. Іваниця, Т.В. Бурлака, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Гудзенко,
Г.А. Кожанова, Л.Б. Котлярова**

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

ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА В.П. ТУЛЬЧИНСЬКОЇ



Стаття присвячена 100-річчю від дня народження видатного вченого-мікробіолога, члена-кореспондента АН України, професора Віри Петрівни Тульчинської (31.07.1907 – 27. 05.1994). Спектр наукових інтересів В.П. Тульчинської був надзвичайно широким і торкався актуальних проблем медичної, загальної, водної мікробіології, вірусології, екології та охорони навколишнього середовища. В.П. Тульчинська 32 роки (з 1951 по 1983 рр.) займала посаду завідувача кафедри мікробіології і вірусології Одеського державного університету імені І.І. Мечникова.

К л ю ч о в і с л о в а: історія мікробіології, В.П. Тульчинська, Одеський університет.



Віра Петрівна була однолюбом у науці, із студентських років вона захопилася мікробіологією і присвятила їй усе своє життя. На примірнику своєї книжки “Морські бактерії служать людині” (1974 р.) Віра Петрівна зробила напис: “Со студенческих лет занимаюсь бактериологией, я не устаю удивляться открывающимся под микроскопом мирам, которые населяют разнообразные микроорганизмы» [12].

Віра Петрівна Тульчинська народилася 31 липня (13 серпня) 1907 року в м. Казані в родині службовця, батько — Тульчинський Петро Степанович був лікарем-фармацевтом, мати — Тульчинська Анна Семенівна.

Після успішного закінчення жіночої гімназії В.П. Тульчинська вступила до Казанського університету на медичний факультет, де навчалася протягом трьох років, а потім до Казанського Ветеринарного Інституту. Свою наукову діяльність вона почала ще у студентські роки, під керівництвом академіка М.П. Тушнова займалася імунологічними проблемами мікробіології.

Одразу після закінчення Казанського Ветеринарного Інституту В.П. Тульчинська почала свою трудову діяльність. Вона працювала на периферії практичним ветлікарем (м. Агріз Татарської АРСР, 1929 — 1930 рр.); керівником лабораторії по дослідженню на сибірку (м. Семипалатинськ, 1930 — 1932 рр.). Протягом 1932 — 1936 років В.П. Тульчинська працювала науковим співробітником Казанського НДІ Наркомзему Татарської АРСР. Там вона виконала низку досліджень, присвячених імунології бруцельозу, а також методам культивування та імунології віспяного вірусу. Останні дослідження стали матеріалом кандидатської дисертації молодого вченого. Дисертацію “Культивирование вируса оспы” на здобуття ступеня кандидата наук В.П. Тульчинська захистила під керівництвом професора Н.П. Рухлядева у Казанському Ветеринарному Інституті у 1935 році. Опонентами на захисті дисертації були професори М.Н. Верещагін, К. Боль та Н.П. Рувімський.

Понад півстоліття життя і праці В.П. Тульчинська присвятила вищій школі. З 1936 року вона перейшла на викладацьку роботу у вищій навчальній заклад. Працювала завідувачем кафедри мікробіології Киргизького сільськогосподарського інституту з 1936 по 1941 рік у м. Фрунзе. У цей період вона виконала докторську дисертацію, присвячену мінливості туберкульозних бактерій. Докторську дисертацію на тему «Материалы к учению о туберкулезных палочках (экспериментальные исследования)» В.П. Тульчинська, захистила на відкритому засіданні Вченої ради Казанського Ветеринарного інституту у лютому 1940 року. Опонентами на захисті докторської дисертації були провідні спеціалісти з питань мікробіології та імунології професори Б.Л. Мазур та С.І. Афонський. Після успішного захисту дисертації В.П. Тульчинській було присвоєно ступінь доктора біологічних наук.

З 1941 по 1942 рік В.П. Тульчинська працювала завідувачем відділу Інституту епідеміології та мікробіології Наркомзему Киргизької РСР; з 1942 по 1945 рік — завідувачем кафедри мікробіології та ветсанекспертизи Киргизького сільськогосподарського інституту. У період з 1945 по 1948 роки В.П. Тульчинська суміщає завідування кафедрами мікробіології Білоцерківського та Одеського сільськогосподарських інститутів.

Керуючи кафедрою мікробіології Одеського сільськогосподарського інституту, В.П. Тульчинська в широкому аспекті виконує наукові дослідження, присвячені актуальним питанням мікробіології та імунології бруцельозу, туберкульозної інфекції, фагоцитозу та іншим проблемам.

Визнанням наукових заслуг професора Віри Петрівни Тульчинської стало обрання її 2 липня 1948 року членом-кореспондентом АН УРСР (відділення біохімії і теоретичної медицини). З цього часу наукова діяльність В.П. Тульчинської тісно пов'язана з Українською академією наук.



Кафедру мікробіології Одеського державного університету професор В.П. Тульчинська очолила у 1951 році. Розширення тематики досліджень, введення нових спецкурсів в навчальний процес віднайшли своє відображення і в назві кафедри. За ініціативи професора В.П. Тульчинської у 1963 році кафедра мікробіології була перейменована і отримала сучасну назву — кафедра мікробіології і вірусології. В.П. Тульчинська керувала навчальною та науково-дослідницькою роботою кафедри до 1983 року; з 1984 року по 1994 рік вона працювала на посаді професора кафедри мікробіології і вірусології.

У кожної людини є головні риси, які вирізняють її серед інших. Ми, хто багато років знали В.П. Тульчинську, підкреслили б її житейську мудрість і сильний, вольовий характер. Безсумнівно, ці якості вченого і педагога вищої школи (понад п'ять десятиліть нараховує її викладацький стаж) сприяли призначенню Віри Петрівни проректором з наукової роботи у дуже складний для вищої школи період з 1951 по 1954 роки. Ї багато хто з ветеранів університету вдячні були їй за ту допомогу і підтримку, яку вона надала своїм колегам у ті непрості часи, що було не тільки виявом порядності, але й громадської сміливості.

Згадуючи складні для біологів часи — початок 50-х років минулого століття, професор Р.О. Файтельберг у своїй книзі “Пережитое” [15] писав: «Професор В.П. Тульчинская возглавила кафедру микробиологии. Знаком был с нею еще по совместной работе в Одесском сельскохозяйственном институте, в котором она заведовала кафедрой микробиологии, а я — кафедрой физиологии животных. В сотрудничестве с ней мы выполнили несколько научных работ. Довольно часто на ее долю выпадала трудная задача — рассказывать на собрании ученых то об «открытиях» Бошняна, то об «открытиях» Лепешинской, в которые она сама не верила. Что и говорить, положение более чем не завидное».

Віра Петрівна багато і з захопленням, як на лекціях в студентській аудиторії, так і в особистих бесідах говорила про мікробіологію — її історію, сучасний стан і перспективи розвитку цієї науки; про мікроорганізми, про які Віра Петрівна говорила: «Мы знаем так много и так мало». Вона обожнювала імена Іллі Ілліча Мечникова та Луї Пастера, часто промовляла ім'я великого француза на французький манер.

Віра Петрівна добре знала історію розвитку мікробіології в Одеському (Новоросійському) університеті, шанувала пам'ять корифеїв-природодослідників та своїх попередників. В статті, присвяченій видатному вченому Я.Ю. Бардаху, опублікованій в журналі “Микробиология” (1959), В.П. Тульчинська писала: “(...) Получивши приват-доцентуру по бактериологии (1895 г.), Бардах первый в России вводит бактериологию, как самостоятельную дисциплину на естественном отделении Физико-математического факультета”. Таким образом, он впервые создает в университете самостоятельную доцентуру по микробиологии, впоследствии преобразованную в кафедру микробиологии. (...) Только Я.Ю. Бардаху удалось добиться введения курса микробиологии в Новороссийском университете” [11].

Спектр наукових інтересів В.П. Тульчинської був надзвичайно широким і торкався актуальних проблем медичної, загальної, водної мікробіології, вірусології, екології та охорони навколишнього середовища. Її наукова інтуїція визначала багатогранність дослідницької діяльності. Нові наукові напрямки захоплювали цю натхненну людину і часом навіть шкодили темам, де вона досягла певних успіхів, як це було, наприклад, з інфекційними захворюваннями сільськогосподарських тварин (профілактика, діагностика і лікування бруцельозу), імунологічними проблемами



ветеринарної мікробіології тощо. Тільки з цих проблем нею було опубліковано близько 70 наукових праць, у тому числі монографія “Бруцеллєз сільськогосподарських тварин и меры борьбы с ним» [1].

Відданість мікробіології, глибокі знання спеціальності і літератури цього предмета, знання особливостей і тонкощів навчального процесу і кафедральної наукової роботи, з залученням до неї студентів-мікробіологів, сприяли забезпеченню широкого фронту дослідницької роботи на кафедрі, а вихованці кафедри після закінчення університету були завжди бажаними на виробництві, у школі, у науці.

Крім проблеми класичної мікробіології, а потім і вірусології, на кафедрі під керівництвом В.П. Тульчинської проводилися дослідження пов'язані з діяльністю мікроорганізмів у природі, з антимікробною активністю вищих наземних рослин і гідробіонтів. Захопившись проблемою фітонцидів, після знайомства з професором Б.П. Токінім, Віра Петрівна виконала низку досліджень, котрі знайшли відображення у понад двох десятках наукових праць. Практичні питання застосування фітонцидної активності вищих рослин знайшли відображення у книзі “Растения — против микробов», яка мала три видання [13].

Так само із захопленням, зацікавившись проблемою біопозшкодження, Віра Петрівна, разом з колективом кафедри, взялася за дослідження, які мали практичне значення. На кафедрі були розроблені методики визначення та підвищення грибостійкості синтетичних та природних матеріалів. Отримані результати були запроваджені в суднобудівельній, радіотехнічній, харчовій та інших галузях промисловості, де застосовувалися ці матеріали.

Особливого значення надавала Віра Петрівна дослідженням з екологічної тематики, захисту навколишнього середовища, зокрема, захисту моря від забруднення нафтою та нафтопродуктами, морській мікробіології в цілому. Дослідженнями з морської мікробіології вона захопилася завдяки відомому мікробіологу, чл.-кор. АН СРСР М.А. Красильникову.

Ще з часів чорноморських експедицій академіка Б.Л. Ісаченко Чорне море стало своєрідним “науковим полігоном” для декількох поколінь морських мікробіологів. Професором В.П. Тульчинською спільно із співробітниками кафедри було здійснено понад 50 експедицій в північно-західній частині Чорного моря, в Одеській затоці та чорноморських лиманах, в дельті Дунаю. Виконано низку досліджень з морської мікробіології. Вивчалася мікробна населення північно-західної частини моря, дельти Дунаю, Азовського та Білого морів. За результатами досліджень були складені мапи мікробного населення Чорного, Азовського та Білого морів.

Було розгорнуто дослідження по вишукуванню і вивченню нових біологічних речовин серед біоценозів морських організмів і мікробів Чорного моря та прилеглих водоймищ. Результатами цих досліджень встановлено, що багато мікроорганізмів, виділених із водоростей, води і безхребетних, що живуть у ній (краби, креветки, устриці, губки), синтезують вітаміни групи В, екзоамінокислоти та антибіотичні і ростові речовини.

Виділені мікроби-продуценти біологічно-активних речовин, а також водорості були використані В.П. Тульчинською та її співробітниками в умовах птахофабрики для підкорму курчат з метою підвищення їх продуктивності.

Наукові роботи представлені на міжнародних конгресах: IX Міжнародному — по мікробіології, XII Міжнародному — по птахівництву, VII Міжнародному — біохімічному. Ці та нові результати досліджень були темами доповідей на XI Міжнародній конференції “Лімнологічні дослідження Дунаю” (1967 р., Київ); на симпозіумах, присвячених вивченню Чорного та Середземного морів (1973 р., Севастополь) та з марікультури (1982 р., Київ), в якому брали участь японські вчені;



на IV з'їзді мікробіологів України (1975 р., Київ); на XI Тихоокеанському науковому конгресі (1979 р., Хабаровськ); на конференції "Океан" (1983 р., Владивосток).

Разом із своїми учнями професор В.П. Тульчинська розробила новий напрям — біологічний моніторинг морського середовища. Вперше було запропоновано нові методи біологічного контролю якості водного середовища на токсичність і мутагенну активність з використанням організмів різних трофічних рівнів: бактерій, водоростей, культури клітин теплокровних і холоднокровних тварин.

Велику увагу науковців і практиків привертала роботи В.П. Тульчинської з біотехнології охорони навколишнього середовища. Цикл досліджень з розробки способу очистки промислових стічних вод іммобілізованими бактеріями-деструкторами має практичне застосування.

Тематика морської мікробіології знайшла відображення не тільки в низці наукових публікацій професора В.П. Тульчинської, але і в науково-популярній книзі "Морські бактерії служать людині" [12], яка адресована широкому колу читачів. Популяризації знань у сфері мікробіології професор В.П. Тульчинська надавала великого значення.

Наукову діяльність — Віра Петрівна постійно підкреслювала це і на засіданнях кафедри, і в особистих бесідах із співробітниками та аспірантами, — необхідно розглядати невідривно від педагогічного процесу: навчання і виховання, долучення студентів до дослідницької роботи буквально з перших курсів. Педагогічна діяльність В.П. Тульчинської була надзвичайно плідною, вона присвячувала їй багато часу, віддавала свій талант і майстерність лектора і користувалася заслуженою повагою і пошаною студентів.

Віра Петрівна з повагою ставилася до студентів та аспірантів, бачила в кожному із них особистість. На кафедрі спеціалізувалися студенти-іноземці. Вони представляли широку палітру географії планети: з Монголії, Куби, В'єтнама, Гвінеї, Малі, Нігерії, Індії, Польщі, Болгарії тощо. Знання, набуті на кафедрі, об'єктивно поширювалися по всьому світу. Багато студентів-іноземців, у тому числі і аспірантів, після закінчення навчання на кафедрі мікробіології і вірусології Одеського університету поїхали на батьківщину з великим запасом знань. Це дало їм можливість обіймати керівні посади в державних і приватних наукових та навчальних установах своїх країн.

Протягом багатьох років В.П. Тульчинська була членом проблемних рад АН СРСР, секції генетичних аспектів проблеми "Людина і біосфера" при ДКНТ СРСР, входила до складу делегації УРСР на Міжнародній конференції ЮНЕСКО з питань екології (Монтевідео). Її науково-громадська діяльність отримала визнання з боку широкого кола громадськості.

В.П. Тульчинська мала творчі контакти з відомими вченими — Б.П.Токіним, М.А. Красильниковим, В.Г. Дроботько, Є.І. Квасніковим, М.С. Єгоровим, В.В. Смірновим та іншими. Вона запровадила традицію на проведення великих наукових форумів, які організувала кафедра. Так, було проведено з'їзд гідробіологів, засідання робочих груп ДКНТ СРСР з біотестування, Першу Всесоюзну методичну школу з мікробіологічного моніторингу природних вод разом з Інститутом океанології (м. Москва), низку засідань та конференцій з проблем біопошкодження. Багато цікавих та важливих заходів було проведено у творчій співдружності з провідними академічними та галузевими інститутами, навчальними закладами, у тому числі Хімії АН СРСР (м. Москва), Інститутом мікробіології і вірусології АН України, Інститутом колоїдної хімії та хімії води АН України, Київським державним університетом імені Тараса Шевченка, Московським державним університетом імені М.В. Ломоносова, Інститутом антибіотиків (м. Москва) — всього не перерахувати.



Поєднуючи наукову та педагогічну діяльність В.П. Тульчинська створила наукову школу. Серед її учнів 4 доктори наук та 36 кандидатів, її творчий доробок налічує більше 270 наукових праць, вона співавтор робіт, на які одержано авторські свідоцтва.

Наукова та громадська праця Віри Петрівни мала велике визнання. Вона була почесним членом Всесоюзного мікробіологічного товариства, Українського мікробіологічного товариства, членом редакційної ради "Мікробіологічного журналу" АН України, членом Одеського обласного та міського виконавчих комітетів.

За плідну наукову та педагогічну діяльність Віра Петрівна Тульчинська була нагороджена орденом "Знак пошани", ювілейними медалями Луї Пастера, Д.К. Заболотного, "За доблесну працю", срібними та бронзовими медалями ВДНГ.

Про Віру Петрівну є низка публікацій у енциклопедіях, бібліографічних збірниках, періодичних виданнях [2 – 10, 15].

Віра Петрівна не обмежувала своїх інтересів наукою, якій була віддана – мікробіологією. Вона постійно була в курсі політичних подій як в країні, так і за кордоном. Добре знала і любила класичну літературу, живопис, поезію. У неї було непогане зібрання книг з афоризмами, вона часто цитувала їх. У своїх науково-просвітницьких роботах, розрахованих на масового читача, вона вважала їх обов'язковою і важливою справою вченого і ставилася до такої роботи так само серйозно і ретельно, як і до наукових публікацій (10, 12, 13), Віра Петрівна часто цитувала відомих вчених ХХ та минулих століть, причому не тільки медиків та біологів.

Віра Петрівна цікавилася життям своїх студентів, співробітників, переймалася особистими і побутовими проблемами та негараздами і допомагала у їх вирішенні. Співробітники та учні Віри Петрівни, яким випадала честь бути разом з нею учасниками симпозіумів, конференцій, засідань, бачили, як привітно, радісно зустрічали її всюди, виявляли повагу і шанування усі присутні.

На кафедрі мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова нині наряду з новими науковими напрямками розвиваються ті, які започаткувала професор В.П. Тульчинська.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бруцеллѳз сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ним.* – К.: Изд-во АН УССР, 1950. – 36 с.
2. *Віра Петрівна Тульчинська: до 60-річчя з дня народження та 40-річчя наукової, педагогічної і громадської діяльності* // Мікробіол. журн. – 1968. – Т.20. вип.1. – С.92-93.
3. *Вера Петровна Тульчинская: к 80-летию со дня рождения В.П. Тульчинской* // Микробиол. журн. – 1987. – Т. 49, №6. – С. 100.
4. *Гудзенко Т.В., Кожанова Г.А.* Член-корреспондент АН України Тульчинская Вера Петровна // Видные ученые Одессы. – Вып. 3, к 200-летию г. Одесса. – Одесса, 1993. – С. 10-13.
5. *Іваниця В.О., Юргелайтіс Т.В., Бурлака Т.В.* Мікробіологія в Одеському національному університеті імені І.І. Мечникова (1865 – 2003). – Одеса: Фенікс, 2004. – С. 20 – 22.
6. *Історія Одеського університету (1865 – 2000).* – Одеса: Астропринт, 2000. – С. 124.
7. *Професори Одеського університету.* – В 4-х т. – Одеса: Астропринт, 2000. – Т. 4. – С. 246 – 250.
8. *80-річчя члена-корреспондента АН УРСР В.П. Тульчинської* // Вісн. АН УРСР. 0 1987. – № 8. – С. 100. Тульчинська Віра Петрівна // Укр. рад. енцикл. – К., 1962. – т.14. – С. 588.
9. *Український радянський енциклопедичний словник.* – 1968. – Т.3. – С. 385.
10. *Українська радянська енциклопедія* – 2-е вид. – К., 1984. – Т. II. кн.І. – С. 385.
11. *Тульчинская В.П.* Преподавание Я.Ю. Бардахом общей микробиологии (бактериологии) и его научная деятельность в Новороссийском университете // Микробиология. – 1959. – т. XXVIII, в. 1. – С. 140 – 143.
12. *Тульчинская В.П.* // Химическая деятельность микроорганизмов. – М. : Знание, 1978. – 63 с.



13. *Тульчинська В.П.*, Короткий Р.М. Морські бактерії служать людині. — К.: Наукова думка, 1974. — 96 с.

14. *Тульчинская В.П.*, Юргелайтис Н.Г. Растения против микробов. — К.: Урожай, 1975, 2-е изд. — 1987. — 94 с.

15. *Тульчинская Вера Петровна* // Биологи: Биограф. справ. — К., 1984. — С. 630 — 631.

16. *Файтельберг Р.О.* «Пережитое». — Одесса: Маяк, 1991. — С. 44.

**В.А. Иваница, Т.В. Бурлака, Н.Г. Юргелайтис, Т.В. Гудзенко,
Г.А. Кожанова, Л.Б. Котлярова**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 86 79 64,
e-mail: v_ivanit@net.ua

ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА В.П. ТУЛЬЧИНСЬКОЇ

Реферат

Статья посвящена 100-летию со дня рождения выдающегося ученого-микробиолога, члена-корреспондента АН Украины, профессора Веры Петровны Тульчинской (31.07.1907 — 27.05.1994).

Спектр научных интересов В.П. Тульчинской был чрезвычайно широким и касался актуальных проблем медицинской, общей, водной микробиологии, вирусологии, экологии и охраны окружающей среды. В.П. Тульчинская 32 года (с 1951 по 1983 гг.) работала заведующей кафедрой микробиологии и вирусологии Одесского государственного университета имени И.И. Мечникова.

К л ю ч е в ы е с л о в а: В.П.Тульчинская, история микробиологии, Одесский университет.

**V.O.Ivanytsya, T.V. Burlaka, N.G. Yurgelaitis, T.V. Gudzenko,
G.A. Kozhanova, L.V. Kotlyarova**

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

IN MEMORY OF THE PROFESSOR V.P. TULCHYNSKA

Summary

The article is devoted to the centenary of the prominent scientist-microbiologist, corresponding member of NAS of Ukraine professor Vera Petrivna Tulchynska (31.07.1907 — 27.05.1994).

The spectrum of scientific interests of V.P. Tulchynska was extremely wide and dealt with Medical, General and Water Microbiology, Virology, Ecology and Environmental Protection. V.P. Tulchynska has worked for 32 yeas (1951 — 1983) as the Head of the Chair of Microbiology and Virology of Odesa State University after I.I. Mechnykov.

K e y w o r d s: V.P. Tulchynska, history of Microbiology, Odesa University.



В.О. Іваниця, В.С. Підгорський, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Бурлака,
Б.П. Мацелюх, І.Г. Скрипаль

“СЛОВНИК ТЕРМІНІВ У МІКРОБІОЛОГІЇ”

Київ: Наукова думка, 2006.—200 с.

Рецензований словник відноситься до серії «Словники України», що видається академічним видавництвом «Наукова думка» в Києві. Насамперед мусимо сказати добре слово в адресу видавництва, бо своїми випусками воно робить велику справу для України взагалі, у випуску наукової літератури зокрема.

Сьогодні, завдяки бурхливому розвитку демократії в Україні склалася досить дивна ситуація, коли в державі існують принаймні три центри термінологічної орфографії — Київський, Львівський, Харківський і, можливо, тут варто б назвати також Одеський. Справа в тому, що наш офіційний правопис не всіх задовольняє (а це стосується вживання «г» і «ґ» у словах греко-латинського походження, приголосної «х». Наприклад, Мехіко (коли чужоземне х [ікс] ототожнюється з українським “х”), “г” у слові Гельсінки, а не Хельсінки та ін. У минулому ми мали багато варіантів українського правопису (Ів. Огієнка, Ст. Смаль-Стоцького, Бориса Грінченка, Гр. Голоскевича, Михайла Возняка, Василя Сімовича, Михайла Рудницького та ін.).

Українська літературна мова, якою користувалися в Галичині в кінці ХІХ на початку ХХ ст. була добре розвинутою, звучною і широко використовувалася. Вона і сьогодні живе і функціонує в західних областях України. Цією мовою, в основному, також користується українська діаспора. Сьогодні українська мова в Україні дуже збідніла, беззвучна, глуха переважно через те, що забрали з неї букву “г” у словах греко-латинського походження. У колишньому правописі була ясно і чітко виписана вимога: писати і вимовляти іншомовні власні імена (назви осіб, географічні назви) так, як вони вимовляються в мові оригіналу. Зазначу — це питання буде завжди актуальним, доки ця проблема не буде розв’язана. Задаємо собі питання: чи не є причиною такий стан української літературної мови того, що вона до решти зникає на території Великої України?

Задаємо собі питання: чому українська діаспора не переходить на сучасний офіційний правопис?

Отже, приступаючи до рецензування названого вище термінологічного словника з мікробіології, ставимо питання про правопис термінів. Тут у словнику застережень немає. Він складений у строгій відповідності до сучасного правопису української літературної мови. Хочемо ми того чи ні, але мусимо дотримуватися цього офіційного і затвердженого авторитетною комісією орфографічного словника, хоча, як вже було сказано, не можемо погодитися з низкою положень у ньому. Наприклад, “хімія” повинно бути “хе́мія”, “ґліколіз”—“ґліколі́з”, гістохе́мія (лат. *chemia* — алхімія, означає підробку під хімію).



Авторів ми винити не можемо, вони виконали величезну працю, зібрали великий обсяг матеріалу і, відповідно до сучасного правопису склали словник, який, поза усяким сумнівом, дуже потрібний для розвитку науки і для навчальних цілей.

Авторитетний склад авторської групи, як і склад рецензентів — видатних вчених України, викликає повну довіру до змісту словника, який є потрібним не лише для вузької фахової спеціальності з мікробіології, але і для суміжних фахових напрямів, включаючи фармацію, яка зараз набула широкого розвитку в українській медичній науці.

Заслугове на схвалення структура словника в цілому та його кожна окремо взята стаття, в якій назви подаються російською та українською мовами, а також нерідко етимологія терміна в оригіналі — із мови походження, що підсилює науковість словника. Слова запозичені супроводяться навіть відповідними наголосами.

На завершення констатуємо, що названий словник заслугове на всебічне схвалення, а наші міркування стосовно правопису є питанням іншим.

Т.Й. Лещук,
професор кафедри іноземних мов національного університету
“Львівська політехніка”



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

Рубрики журналу: “Оглядові та теоретичні статті”, “Експериментальні праці”, “Дискусії”, “Короткі повідомлення”, “Конференції, з'їзди, школи”, “Сторінки історії”, “Ювілеї і дати”, “Рецензії”, “Книжкова полиця”.

До статті додається висновок експертної комісії установи про можливість публікування роботи у відкритих засобах масової інформації, рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють співавтори.

Вимоги до оформлення статей, які подаються до редакції журналу:

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

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

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

При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

- індекс УДК у лівому верхньому кутку першого аркуша;
- прізвища та ініціали автора (авторів) мовою оригіналу, місце роботи кожного автора; повна поштова адреса установи (за міжнародними стандартами); телефон,



електронна адреса (e-mail). Прізвища авторів та назви установ, де вони працюють, позначають одним і тим самим цифровим індексом (вгорі);

- назва статті великими літерами;
- анотація із зазначенням новизни дослідження (до 200 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

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

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

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

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

Таблиці мають бути компактними, мати порядковий номер; графі, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

Рисунки виконуються у вигляді чітких креслень (за допомогою комп'ютерного графічного редактора у форматі Word, TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті та дублюються окремим файлом на CD.

Підписи, а також пояснення, примітки до таблиць та рисунків подаються мовою оригіналу та англійською.

Розділ “Результати досліджень та їх обговорення” має бути написаний коротко: необхідно чітко викласти виявлені ефекти, показати причинно-результативні зв'язки між ними, порівняти отриману інформацію з даними літератури, дати відповідь на питання, поставлені у вступі.

Список літератури складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця) і розміщується в кінці статті. Якщо перший автор у декількох працях одині той самий, то праці розміщуються у хронологічному порядку. Список посилань треба пронумерувати, а у тексті посилатися на відповідний номер джерела літератури (у квадратних дужках).

У посиланні пишуть прізвища усіх авторів. В експериментальних працях має бути не більше 15 посилань літературних джерел.

Патентні документи розміщуються у кінці списку посилань.



ЗРАЗКИ ПОСИЛАНЬ ЛІТЕРАТУРИ**На книги**

- Векірчик К.М. Мікробіологія з основами вірусології. — К.: Либідь, 2001. — 312 с.
- Патика В.П., Тихонович І.А. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. — К.: Урожай, 1993. — 176 с.
- Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.
- Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. — М.: Мир, 1983. — Т. 1. — 536 с.; Т. 2. — 470 с.; — Т. 3. — 263 с.
- Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 566 с.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — 9th ed. — Baltimore; London, 1986. — Vol. 2. — 1599 p.
- Rogers H., Perkins H., Ward I. Microbial cell walls and membranes. — London; New York: Fcfd. Press, 1980. — 364 p.

На журнальні статті

- Подгорский В.С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // Микробиол. журн. — 1998. — 60, № 5. — С. 27-42.
- Андреюк Е.И., Козлова И.А., Рожанская А.М. Микробиологическая коррозия строительных материалов // Биоповреждения в строительстве. — М.: Стройиздат, 1984. — С. 209 — 221.
- Глоба Л.І., Подорван Н.І. Біотехнологія очищення забрудненої природної води // Вісник ОНУ. — 2001. — т. 6, в. 4. — С. 65 — 67.
- Eaton R.W., Ribbons D.V. Utilization of phtalate esters by micrococci // Arch. Microbiol. — 1982. — 132, № 2. — P. 185 — 188.

На тези доповідей

- Мацелюх Б.П. Розробка біотехнології одержання ландоміцину Е // Міжнародна наук. конф. „Мікробні біотехнології” (Одеса, вересень, 2006 р.): тез. доп. — О.: „Астропринт”, 2006. — С. 17.

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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



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

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

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

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

Відхилені статті не повертаються.

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



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

Здано до набору 27.04. 2008 р. Підписано до друку 25. 05. 2008 р.
Формат 70 x 108/16. Друк офсетний. Обл.-вид. арк. 8,25. Ум.-друк. арк. 8,75.
Тираж 300 прим. Зам. № 0805-03.

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