

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

Microbiology & Biotechnology

№ 1

2007

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsya

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filippova

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, Yu. P. Zaytsev, G. O. Iutynska,
L. V. Kapreliants, I. K. Kurdysh, B. P. Matseliuh, 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

EDITORIAL STAFF

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

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

*The journal is established
by Odesa National Mechnykov University*

Registration certificate — Registration KV № 11462 — 335R

Date of issue 07.07.2006

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine
Tel. 7317151, 7466391
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР

В.О. Іваниця

ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

Т.О.Філішова

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, Ю.П. Зайцев, Г.О. Іутинська,
Л.В. Капрелянц, І.К. Курдиш, Б.П. Мацелюх, Б.Н. Мілкус, Г.Г. Мінічева,
В.П. Патика, 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

РЕДАКЦІЯ

Завідувач редакцією Н.Г. Юргелайтис

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

*Журнал заснований Одеським національним
університетом імені І.І. Мечникова*

Свідоцтво про реєстрацію — серія КВ № 11462 — 335Р
від 07.07.2006 р.

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

CONTENS

EXPERIMENTAL WORKS

| | |
|---|----|
| P.V. Rokytko, V.O. Romanovska, J.R. Malashenko Sintabolism of non-growth substrates by methanotrophic bacteria..... | 10 |
| O. L. Rakhimova, V.O. Ivanytsya, S. McEldowney Permanent attachment of myxobacteria <i>Myxococcus xanthus</i> | 18 |
| Yu.A. Gonchar, E.V. Nadkernychnaja, I.V. Volkova Formation of artificial symbiosis azospirillum with mulberry trees..... | 27 |
| A.G. Chinchlei, S.A. Tolochkina, I.O. Rastimeshina, I.P. Dragalin New products of microbiological transformation of sclareol: characteristical and biological activity..... | 34 |
| S.A. Burtseva, T.F. Syrbu, V.A. Slanina, S.A. Tolochkina, S.N. Kodryanu Antagonistic properties of new microorganisms strains isolated from the soils of Moldova..... | 40 |
| A.A. Desyatnyc, J.P. Tiurina, S.V. Labliuc, O.A. Bologna, A.G. Lazarescu The peculiarities of lipases biosynthesis by <i>Aspergillus niger</i> CNMN FD 01L strain on the media with optimal composition..... | 46 |
| G.V. Yamborko, I.L. Solovyova The effectiveness of different storage techniques of industrial strains of genus <i>Lactobacillus</i> | 53 |
| M.V. Stratan, A.A. Desyatnyc Inoculum influence on amylolytic activity of the strain <i>Aspergillus niger</i> 33-19 CNMN FD-02 | 60 |
| E.P. Kopylov Selection of effective strains of nitrogen-fixing bacteria for inoculation of spring wheat..... | 67 |
| V.V. Chaykovska, J.V. Chabanjuk, O.V. Sherstoboeva Multifunctional microbial complex for the agricultural integral systems..... | 75 |

GLIMPSE OF HISTORY

| | |
|--|----|
| V.O. Kuznetsov, N.V. Kuznetsova Life, scientific and pedagogical activity of academician D.K. Zabolotny in Odesa (28.12.1866—15.12.1929)..... | 82 |
|--|----|

CHRONICLE OF SCIENTIFIC LIFE

| | |
|---|----|
| II summer school "Molecular microbiology and biotechnology", Odesa, may 14-26, 2007..... | 93 |
|---|----|

REVIEW

| | |
|----------------------------------|----|
| Glossary as training manual..... | 96 |
|----------------------------------|----|

BOOK SHELF

| | |
|----------------------------------|----|
| Published works..... | 97 |
| Information for the authors..... | 98 |

З М І С Т

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

| | |
|---|----|
| П.В.Рокитко, В.О. Романовська, Ю.Р. Малашенко Синтаболізм неростових субстратів метанотрофними бактеріями..... | 10 |
| О. L. Rakhimova, V.O. Ivanysya, S. McEldowney Permanent attachment of myxobacteria <i>Myxococcus xanthus</i> | 18 |
| Ю. А. Гончар, Е.В. Надкерничная, И.В. Волкова Формирование искусственного симбиоза азоспирилл с растениями шелковицы..... | 27 |
| А.Г. Чинчлей, С.А. Толочкина, И.О. Растимешина, И.П. Драгалин Новые продукты микробной трансформации склареола: получение, свойства, оценка..... | 34 |
| С.А. Бурцева, Т. Ф. Сырбу, В.А. Сланина, С.А. Толочкина, С.Н. Кодряну Антагонистические свойства новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы..... | 40 |
| А.А. Десятник, Ж.П. Тюрина, С.В. Лаблюк, О.А. Болога, А.Г. Лазареску Особенности биосинтеза липаз штаммом <i>Aspergillus niger CNMN FD 01L</i> на средах оптимального состава..... | 46 |
| Г.В. Ямборко, І.Л. Соловйова Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду <i>Lactobacillus</i> | 53 |
| М.В. Стратан, А.А. Десятник Влияние посевного материала на амилалитическую активность штамма <i>Aspergillus niger 33-19 CNMN FD-02</i> | 60 |
| Е.П. Копылов Селекция эффективных штаммов diaзотрофов для инокуляции яровой пшеницы..... | 67 |
| В.В. Чайковська, Я.В. Чабанюк, О.В. Шерстобоева Поліфункціональний мікробний комплекс для інтегрованих систем землеробства..... | 75 |

СТОРИНКИ ІСТОРІЇ

| | |
|---|----|
| В.О. Кузнєцов, Н.В. Кузнєцова Життя та науково-педагогічна діяльність академіка Д.К. Заболотного в Одесі (28.12.1866 – 15.12.1929) | 82 |
|---|----|

ХРОНІКА НАУКОВОГО ЖИТТЯ

| | |
|--|----|
| II літня школа «Молекулярна мікробіологія і біотехнологія» Одеса, 14-26 травня, 2007р | 93 |
|--|----|

РЕЦЕНЗІЇ

| | |
|-------------------------------------|----|
| Словник як навчальний посібник..... | 96 |
|-------------------------------------|----|

КНИЖКОВА ПОЛИЦЯ

| | |
|--|----|
| Вийшли в світ..... | 97 |
| Інформаційне повідомлення для авторів..... | 98 |



Вельмишановні колеги!

Ви тримаєте в руках перший номер нового журналу "Мікробіологія і біотехнологія", засновником якого є Одеський національний університет імені І.І. Мечникова.

Виходячи з загально визнаного визначення терміну "мікроорганізми", ми вирішили започаткувати періодичне видання, програмною метою якого є висвітлення результатів наукових досліджень у сфері мікробіології і біотехнології, об'єктами яких є прокаріотні (еубактерії і архебактерії) та еукаріотні (мікроскопічні гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші) мікроорганізми і віруси.

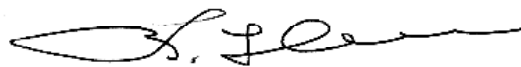
В журналі публікуватимуться результати фундаментальних (екологія, систематика, цитологія, біохімія, генетика, молекулярна біологія, геноміка і протеоміка мікроорганізмів тощо) та прикладних (створення та селекція нових штамів мікроорганізмів, мікробні препарати, біосенсори, діагностикуми, мікробні технології в сільському господарстві, харчовій промисловості, інших галузях народного господарства, захист та оздоровлення природного середовища, отримання біопалива та нових матеріалів тощо) досліджень.

Крім експериментальних праць, в журналі будуть друкуватися оглядові, теоретичні та дискусійні статті, короткі повідомлення, статті з історії мікробіології і біотехнології, інформація щодо проведення конференцій, з'їздів, шкіл, виходу у світ нових книг, ювілеї і дати, рецензії.

Журнал зареєстровано як загальнодержавне наукове видання. Маємо надію, що він приверне до себе увагу широкого кола фахівців—мікробіологів і біотехнологів університетів і науково-дослідних інститутів. То ж запрошуємо до співпраці на сторінках нового журналу "Мікробіологія і біотехнологія" усіх, хто може сказати своє вагомє слово в мікробіологічній науці.

З побажанням творчих успіхів

Володимир Іваниця



УДК 579.22

П.В. Рокитко, В.О. Романовська, Ю.Р. Малашенко

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д03680, Україна, rokitko@serv.imv.kiev.ua

СИНТАБОЛІЗМ НЕРОСТОВИХ СУБСТРАТІВ МЕТАНОТРОФНИМИ БАКТЕРІЯМИ

Облігатні метанокиснювальні бактерії здатні рости тільки на метані. Однак за певних умов (а саме у присутності ростового субстрату) метанотрофи здатні трансформувати неростові для цих бактерій субстрати. Такий процес одержав назву кометаболізму. Нами показано, що метанотрофи спроможні до спільної асиміляції двох неростових субстратів, наприклад, метанолу та субстратного аналога метану (етану або окису вуглецю), результатом чого є синтез біомаси. Встановлено, що метанотрофи окиснюють етан (або окис вуглецю) завдяки субстратній неспецифічності метанмонооксигенази (ММО). Відновні еквіваленти для ММО можуть бути отримані при дегідруванні іншого неростового субстрату – метанолу та інтермедіатів його окиснювання – формальдегіду та форміату. Цей процес названо синтаболізмом. Таким чином, показано, що синтаболізм неростових субстратів у метанотрофів реалізується внаслідок субстратної неспецифічності ММО та спряженості процесів окиснення двох неростових субстратів, які забезпечують ріст і розмноження клітин.

К л ю ч о в і с л о в а: метанотрофи, метанмонооксигеназа, неростовий субстрат, кометаболізм, синтаболізм.

Метанотрофні бактерії здатні кометаболізувати аналоги метану, а також деякі інші органічні речовини. Часто такі сполуки (наприклад, хлоровані аліфатичні вуглеводні, у тому числі етилен; 1,2-цис-дихлоретилен; 1,2-транс-дихлоретилен; хлорид винілу; толуол; фенол і крезол тощо) є токсичними та дуже важко розкладаються і внаслідок цього забруднюють довкілля. Під кометаболізмом мають на увазі процес трансформації неростових субстратів у присутності ростового субстрату. Ферментативний механізм кометаболізму неростових субстратів у метанотрофних бактерій реалізується завдяки спряженості процесів окиснювання ростового субстрату (метану) і субстрату, що кометаболізується (наприклад, етану) [1]. Кометаболізм зазвичай завершується внаслідок накопичення токсичних продуктів.

Метою нашого дослідження було вивчення кометаболізму двох неростових субстратів, при якому відбувається синтез біомаси, метилотрофними бактеріями.

©П.В. Рокитко, В.О.Романовська, Ю.Р. Малашенко



Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами облигатних метанокиснювальних бактерій *Methylomonas rubra* 15ш та *Methylococcus thermophilus* 111п [2].

Культивування метанокиснювальних бактерій проводили на рідкому й агаризованому середовищі К, (г/л): $K_2HPO_4 \times 3H_2O$ – 0,4; KH_2PO_4 – 0,4; NaCl – 0,3; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,3; $FeCl_3 \times 6H_2O$ – 0,001; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,5 (або KNO_3 – 1,0) методами, які було описано раніше [3].

Як неростові субстрати, використовували метанол, етан та окис вуглецю в різних концентраціях у залежності від мети окремого досліду. У рідке середовище вносили метанол у концентрації від 0 до 50 мМ. Концентрація етану в повітряно-газовій суміші становила 5 - 20 об.%, окису вуглецю 0 - 10 об.%.

Після внесення інокулюму метанокиснювальних бактерій колби ставили на качалки при температурі 30 °С (для штаму *Methylomonas rubra* 15ш) або при 55 °С (для штаму *Methylococcus thermophilus* 111п). Бактерії культивували протягом 48 - 72 год.

Бактеріологічну чистоту вирощених культур контролювали методом посіву на агаризовані середовища з іншими джерелами вуглецю: глюкозо-картопляний (ГКА) і м'ясопептонний агар (МПА).

Швидкість окиснювання газоподібних субстратів інтактними (у стані спокою) клітинами визначали за зміною концентрації субстратів у реакційній суміші: кисню – полярографічно, вуглеводнів – газохроматографічно. В експериментах використовували хроматографічно чисті гази: CH_4 і C_2H_6 (99,9%). Необхідні концентрації метану й етану в полярографічній кюветі створювали способом введення в неї певних об'ємів буферного розчину, який був попередньо насичений відповідним газом. Проби (5 мкл) відбирали з полярографічної кювети (з інтервалом 1 хв) і вводили в хроматограф для визначення концентрації метану або етану [3].

Швидкість утворення продуктів монооксигенування етану або метану (етанолу або метанолу, відповідно) визначали газохроматографічно [3].

Швидкість споживання енергогенеруючих косубстратів визначали: метанолу – газохроматографічно, за зміною його концентрації [3]; формиату – за витратами NaOH, як титранту, що компенсує підвищення рН, яким супроводжується споживання формиату.

Результати та їх обговорення

Тип кометаболізму, відмінною рисою якого є використання двох неростових субстратів у енергетичних і конструктивних процесах, що приводить до синтезу біомаси, названо синтаболізмом. Синтаболізм уперше описав Ю.Р. Малашенко [5, 6]. Однак основні закономірності, що характеризують цей процес, не було опубліковано. Тому у статті ми розглянемо експериментальні дані, що підтверджують синтаболізм неростових субстратів у метанокиснювальних бактерій. У цілому, за даними Ю.Р. Малашенка, ферментативний механізм синтаболізму неростових субстратів у метанотрофів реалізується завдяки субстратній неспецифічності метанмонооксигенази (ММО), та спряженості процесів окиснення двох неростових субстратів, які забезпечують ріст і розмноження клітин (наприклад метанолу та етану, або метанолу та СО). Такий механізм підтверджується наступними результатами.

Встановлено, що *Methylomonas rubra* 15ш ріс на метанолі тільки за низького його вмісту в середовищі (25 мМ). При цьому ріст характеризувався



незначною ефективністю й супроводжувався накопиченням формальдегіду в середовищі (табл. 1). Із збільшенням концентрації метанолу (75 мМ) ріст практично припинявся і концентрація формальдегіду збільшувалася. Відомо, що метанол є першим продуктом окиснювання метану, який далі дегідрується метанолдегідрогеназою (МДГ) до формальдегіду. На рівні формальдегіду відбувається розгалуження метаболізму. Частина формальдегіду витрачається на біосинтез клітини, інша частина окиснюється до CO_2 (енергетичний метаболізм). Співвідношення цих процесів, очевидно, визначає здатність бактерій залучати метанол до біосинтезу. Інший досліджений штаб (*Methylococcus thermophilus* 111п) не ріс на метанолі, хоча були перевірені різні умови культивування: концентрація метанолу в рідкому середовищі від 2,5 до 50,0 мМ; інкубація на агаризованому середовищі в парах метанолу; різні джерела азотного живлення – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ або KNO_3 ; концентрація кисню в газовій фазі від 5 до 20 об. %; культивування в присутності вуглекислого газу (5 % CO_2 у газовій фазі та 0,5 г/л NaHCO_3 у середовищі); температура від 42 °С до 55 °С.

Після 3 - 4 днів культивування формальдегід було виявлено (до 1 мМ) у середовищі з метанолом, яке було інокульовано *Methylococcus thermophilus* 111п (табл. 1). Тобто, метанол окиснювався внесеними клітинами, однак біомаса не збільшувалася. Причина накопичення формальдегіду могла бути обумовлена спроможністю метанмонооксигенази окиснювати метанол [7] (одночасно з окиснюванням метанолу метанолдегідрогеназою). Очевидно, активність утворення формальдегіду з метанолу (два ферменти — ММО і МДГ — продукують цей інтермедіат), була вищою, ніж активність окиснювання формальдегіду до CO_2 .

Таблиця 1

Показники синтезу біомаси при рості облигатних метанокиснювальних бактерій на метанолі

| Початкова концентрація CH_3OH (мМ) | Спожитий CH_3OH (мМ) в 1 л середовища | Біомаса (г/л) | $Y_{\text{CH}_3\text{OH}}$ (г біомаси на г метанолу) | Накопичені продукти (мМ) в 1 л середовища | |
|--|---|---------------|--|---|---------------|
| | | | | НСОН | CO_2 |
| <i>Methylomonas rubra</i> 15ш | | | | | |
| 12,5 | 6,25 | 0,07 | 0,35 | 0,83 | 2,68 |
| 25 | 18,75 | 0,16 | 0,33 | 1,67 | 9,19 |
| 75 | 21,88 | 0,11 | 0,16 | 2,50 | 15,1 |
| <i>Methylococcus thermophilus</i> 111п | | | | | |
| 12,5 | 3,20 | 0 | 0 | 0,70 | 2,50 |
| 25 | 9,26 | 0 | 0 | 0,83 | 8,43 |

Грунтуючись на вищенаведених результатах, метанол використовували в експериментах як один з неростових субстратів. Як другий неростовий субстрат використовували етан.

Показано, що метанотрофи здатні окиснювати етан завдяки субстратній неспецифічності ММО – ферменту, який окиснює метан. Крім того, для окиснювання етану метанотрофам необхідний косубстрат, який генерує відновні еквіваленти для кометаболізму неростового субстрату [8, 9]. Відновні еквіваленти для ММО можуть бути отримані при дегідруванні метанолу та інтермедіатів його окиснювання – формальдегіду та форміату [1].

Полярнографічно було показано, що *Methylococcus thermophilus* 111п без косубстратів окиснював етан із низькою, загасаючою швидкістю, очевидно,



тільки за рахунок ендогенних запасів енергії. Газохроматографічно продуктів окиснювання етану при цьому не було виявлено. Окиснювання етану в присутності косубстрату (наприклад, форміату) відбувалося активніше. Процес супроводжувався накопиченням продуктів окиснювання етану (етанолу, ацетальдегіду, ацетату) і продукту окиснювання форміату (вуглекислоти). Встановлено також, що *Methylococcus thermophilus* 111п, який не асимілює метанол як єдине джерело вуглецю й енергії, був здатний рости на метанолі (20 мМ) у присутності етану (20 об.%). При цьому формальдегід не накопичувався.

Більш докладно ми розглянемо процес перетворення метанолу на біомасу в іншого метанотрофа *Methylomonas rubra* 15ш. Як впливає з наведених результатів (табл. 1, рис. 1), ефективність перетворення метанолу на біомасу збільшувалася в присутності етану. Співвідношення продуктів окиснення етану (етанолу, ацетальдегіду, ацетату) залежало від концентрації метанолу (при постійній концентрації етану). Максимальний вихід біомаси спостерігався при концентраціях метанолу 20 мМ – близько 0,3 г/л. При цьому етан окиснювався до оцтового альдегіду й ацетату пропорційно використаному метанолу (рис. 1).

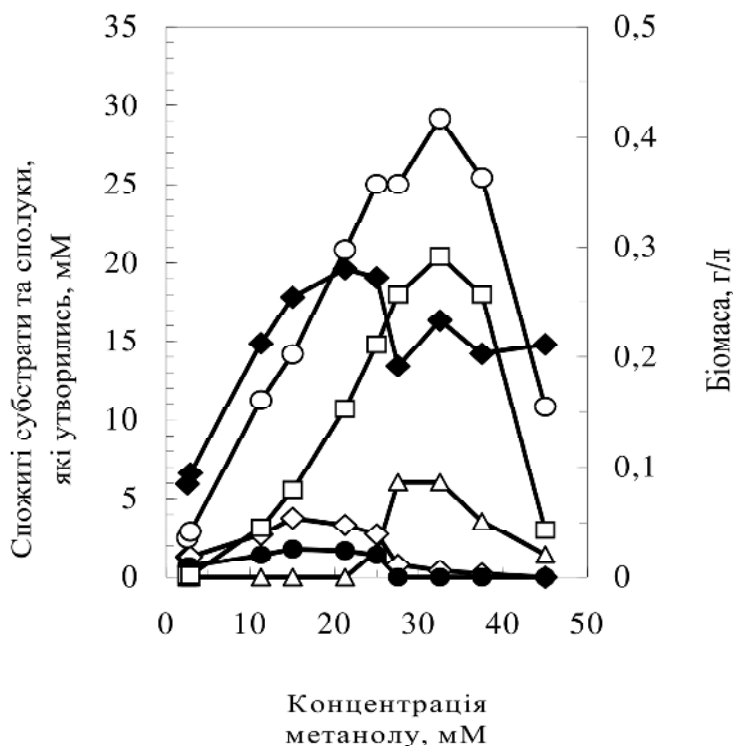


Рис. 1. Вплив початкової концентрації метанолу в середовищі на ріст *Methylomonas rubra* 15ш. (◆) біомаса, (○) CO₂, (△) етанол, (◇) ацетальдегід, (●) ацетат, (□) спожитий метанол. Концентрація етану в газово-повітряній суміші – 5 об.%

Вихід біомаси від метанолу (Y_{CH_3OH}) свідчить, що вуглець метанолу, який було використано і витрачено на синтез біомаси і, можливо, деяку кількість додаткового вуглецю було отримано при окиснюванні етану (відомо, що ацетат може залучатися до метаболізму метанотрофів [10]). Оскільки вуглекислого газу не виявлено, то, очевидно, весь метанол було трансформовано у біома-

су. Таким чином, єдиною реакцією перетворення метанолу, спряженою з монооксигенуванням етану, могло бути окиснювання метанолу метанодегідрогеназою. Окиснювання етанолу (продукту монооксигенування етану) через оцтовий альдегід до ацетату також може давати джерело відновника для ММО.

При високих концентраціях метанолу (понад 30,0 мМ), можливо, виникала конкуренція процесів окиснювання етанолу й метанолу за МДГ, у результаті чого етанол виділявся в культуральне середовище (рис. 1). У цьому випадку спостерігалось інтенсивне окиснювання метанолу до вуглекислого газу, а ефективність синтезу біомаси була низькою. Співокиснення етану було пропорційним кількості трансформованого в біомасу метанолу. Результатом спільної трансформації метанолу й етану клітинами метанотрофів був синтез клітинної біомаси. Даний процес одержав назву синтаболізм неростових субстратів, на відміну від процесу кометаболізму, що закінчується одержанням продуктів метаболізму, але не ростом клітинної популяції.

Для демонстрації синтаболізму неростових субстратів у метанотрофів використовували також інший субстрат – окис вуглецю (СО). Відомо, що метанотрофи не ростуть на СО, як єдиному джерелі вуглецю. Встановлено, що СО має високу спорідненість до ММО, а продукт його монооксигенування (вуглекислий газ) не токсичний.

Як видно з таблиці 2, ріст двох досліджених штамів метанотрофів за низьких концентрацій метанолу (12,5 - 25,0 мМ) у присутності СО характеризувався більш високим виходом біомаси, ніж коли метанол був єдиним субстратом. Стехіометрія процесу росту залежала від концентрації метанолу (табл. 2). При рості *Methylomonas rubra* 15ш відношення витраченого СО₂ і метанолу зменшувалося від 1,25 (при 12,5 мМ метанолу) до 0,41 (при 75,0 мМ метанолу). Це корелювало зі зменшенням Y_C .

Таблиця 2

Показники синтезу біомаси при рості метанотрофів на суміші субстратів (метанол + СО) або на метанолі

| Початкова концентрація субстратів | | Спожиті субстрати (мМ) в 1 л середовища | | Біомаса (г/л) | Y_{CH_3OH} (г біомаси на г метанолу) | Y_C (г С біомаси на г С метанолу) | Накопичені продукти (мМ) в 1 л середовища | |
|--|--------------|---|--------------------|---------------|---|--|---|-----------------|
| СО (об. %) | Метанол (мМ) | СО | CH ₃ OH | | | | НСОН | СО ₂ |
| <i>Methylomonas rubra</i> 15sh | | | | | | | | |
| 0 | 12,5 | ** | 6,25 | 0,07 | 0,35 | 0,44 | 0,83 | 2,68 |
| 0 | 25,0 | ** | 18,75 | 0,20 | 0,33 | 0,42 | 1,67 | 9,19 |
| 0 | 75,0 | ** | 21,88 | 0,11 | 0,16 | 0,20 | 2,50 | 15,1 |
| 10 | 12,5 | 13,65 | 10,90 | 0,23 | 0,65 | 0,82 | 0 | 15,6 |
| 10 | 25,0 | 18,75 | 18,75 | 0,36 | 0,60 | 0,75 | 0 | 23,4 |
| 10 | 75,0 | 7,69 | 18,75 | 0,18 | 0,30 | 0,38 | 1,17 | 18,2 |
| <i>Methylococcus thermophilus</i> 111p | | | | | | | | |
| 0 | 12,5 | - | 3,2 | 0 | 0 | 0 | 0,70 | 2,50 |
| 0 | 25,0 | - | 9,26 | 0 | 0 | 0 | 0,83 | 8,43 |
| 10 | 12,5 | 13,3 | 8,75 | 0,16 | 0,57 | 0,72 | 0 | 15,6 |
| 10 | 25,0 | 10,5 | 13,13 | 0,19 | 0,45 | 0,57 | 0,40 | 15,8 |

П р и м і т к а:

$Y_C = (32,0/25,5) Y_{CH_3OH}$, де 32,0 – молекулярна вага метанолу, 25,5 – молекулярна вага сполуки

CH₂O_{0,5}N_{0,25}, що відображає склад біомаси метанотрофних бактерій

**В цих варіантах СО не додавали



Отже, спільна трансформація метанолу й субстратного аналога метану (етану або CO) метанотрофами приводить до росту клітин. Кожний із цих субстратів окремо не є ростовим для метанотрофів. Таким чином, синтаболізм – це трансформація двох неростових субстратів, результатом якої є синтез біомаси (рис. 2). Цей процес реалізується завдяки, по-перше, субстратній неспецифічності метанмонооксигенази, і, по-друге, наявності точок спряження способів перетворення двох неростових субстратів:

- дегідрування метанолу;
- монооксигенування другого субстрату (етану або CO).

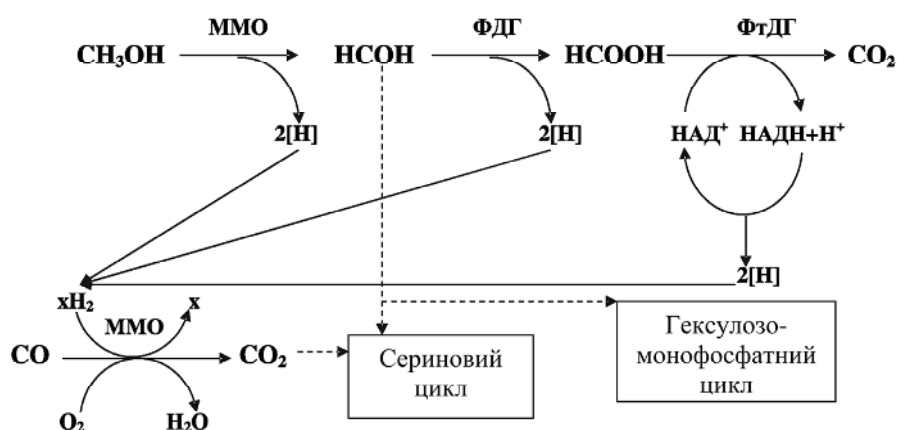


Рис. 2. Схема синтаболізму метанолу та окису вуглецю метанотрофними бактеріями

На відміну від синтаболізму, інші варіанти кометаболізму являють собою трансформацію неростового субстрату до певного продукту разом з використанням ростового субстрату (при цьому можливий ріст мікроорганізмів) або разом з використанням неростового енергогенеруючого субстрату (ріст мікроорганізмів при цьому неможливий).

У цілому ж синтаболізм неростових субстратів у бактерій – це явище, що розширює уявлення мікробіологів стосовно:

- діапазону трофічних властивостей бактерій у природі;
- виняткового пристосування бактерій до екстремальних умов їх існування, наприклад, у разі відсутності традиційних джерел живлення;
- здатності бактерій трансформувати в природних умовах неростові субстрати за наявності декількох субстратів, що обумовлено, насамперед, неспецифічністю певних ферментів;
- можливості бактерій втягувати в обмінні процеси важкодоступні, а іноді й токсичні сполуки й, таким чином, захищати навколишнє середовище від антропогенного забруднення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Малашенко Ю.Р., Соколов И.Г., Романовская В.А. Микробный метаболизм неростовых субстратов. — К.: Наук. думка, 1991. — 198 с.
2. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р. Систематика метилотрофных бактерий. — К.: Наук. думка, 1993. — 194 с.
3. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Троценко Ю.А. Метанокисляющие микроорганизмы. — М.: Наука, 1978. — 195 с.
4. Баславская С.С., Трубецкова О.М. Практикум по физиологии растений. — М.: Изд-во МГУ, 1964. — 326 с.
5. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Соколов И.Г. Особенности метаболизма и управление ростом метанокисляющих бактерий // Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов: Материалы Всесоюз. симпоз. — Пущино: ОНТИ НЦБИАН СССР, 1979. — С. 265 - 272.
6. Malashenko Y.R. Syntabolism, the transformation of non-growth substrates up to biomass by obligate methane-oxidizing bacteria // Abstr. 4th Int. Symp. Microbial growth on C₁-compounds. — Washington, 1984. — Thes. P. 2 - 10.
7. Cornish A., Nicholls K.M., Scott D., Hunter B.K., Aston W.J., Higgins I.G., Sanders J.K.M. In vivo ¹³C NMR investigation of methanol oxidation by the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b//*J. Gen. Microbiol.* — 1984. — 130. — P. 2565 - 2575.
8. Romanovskaya V.A., Malashenko Yu.R., Sokolov I.G. The competitive inhibition of the microbial oxidation of methane by ethane // In: Microbial Production and Utilization of Gases (H₂, CO, CH₄) / Eds.: H.G. Schlegel, G. Gottschalk, N. Pfenning, E. Goltze KG, Gottingen, 1976. — P. 345 - 351.
9. Stirling D.J., Dalton H. The fortuitous oxidation and cometabolism of various carbon compounds by whole-cell suspensions of *Methylococcus capsulatus* (Bath)//*FEMS Microbiol. Lett.* — 1979. — 5. — P. 315 - 318.
10. Patel R.N., Hoare S.L., Hoare D.S. 1-C¹⁴ Acetate assimilation by obligate methylotrophs, *Pseudomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium*//*Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* — 1979. — 45. — P. 499 - 511.

П.В. Рокитко, В.А. Романовская, Ю.Р. Малашенко

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д03680, Украина, rokitko@serv.imv.kiev.ua

СИНТАБОЛИЗМ НЕРОСТОВЫХ СУБСТРАТОВ МЕТАНОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Реферат

Облигатные метанокисляющие бактерии способны расти только на метане. Однако, в определенных условиях (а именно, в присутствии ростового субстрата) метанотрофы могут трансформировать неростовые для этих бактерий субстраты. Такой процесс получил определение кометаболизм. Нами показано, что метанотрофы спо-



способны к совместной ассимиляции двух неростовых субстратов, например, метанола и субстратного аналога метана (этана или окиси углерода), в результате чего синтезируется биомасса. Установлено, что метанотрофы окисляют этан (или окись углерода) благодаря субстратной неспецифичности метанмонооксигеназы (ММО). Восстановительные эквиваленты для ММО могут быть получены при дегидрировании другого неростового субстрата – метанола и интермедиатов его окисления – формальдегида и формиата. Этот процесс назван синтаболизмом. Таким образом, показано, что синтаболизм неростовых субстратов у метанотрофов реализуется вследствие субстратной неспецифичности ММО и сопряженности процессов окисления двух неростовых субстратов, которые обеспечивают рост и размножение клеток.

К л ю ч е в ы е с л о в а: метанотрофы, метанмонооксигеназа, неростовой субстрат, кометаболизм, синтаболизм.

P.V. Rokytko, V.O. Romanovska, J.R. Malashenko

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology Nat. Acad. Sci. Ukraine,
Zabolotny str., 154, Kyiv, Ukraine*

SINTABOLISM OF NON-GROWTH SUBSTRATES BY METHANOTROPHIC BACTERIA

Summary

The obligate methane oxidizing bacteria are capable to grow only on methane. However, under certain conditions (namely, in presence of growth substrate) methanotrophs can transform non-growth substrates. Such process has obtained the definition "cometabolism". It was shown by us, that methanotrophs are capable to joint assimilation of two non growth substrates, for example, methanol and substrate analogue of methane (ethane or carbon oxide). This process results in biomass synthesis. It is established, that methanotrophs oxidize ethane (or carbon oxide) owing to methane monoxygenase's (ММО) non specificity to substrate. The reducing equivalents for ММО can be obtained at dehydrogenation of other non-growth substrate - methanol and intermediates of its oxidation - formaldehyde and formiate. This process is named "sintabolism". Thus, it is shown, that the sintabolism of non-growth substrates by methanotrophs is realized owing to substrate non specificity of the ММО and interlinking of processes of oxidation of two non-growth substrates which provide growth and reproduction of the cells.

К e y w o r d s: methanotrophs, methane monoxygenase, non-growth substrate, cometabolism, sintabolism.



O. L. Rakhimova¹, V.O. Ivanytsya¹, S. McEldowney²

¹ Department of Microbiology and Virology, Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, rakhimo@mail.ru

² School of Biosciences, University of Westminster, 115 New Cavendish Str., London, England

PERMANENT ATTACHMENT OF MYXOBACTERIA MYXOCOCCUS XANTHUS

The permanent attachment of Myxococcus xanthus V-25 and M. xanthus 422 to the hydrophobic and hydrophilic surface was studied. The strains attached mostly to the hydrophobic surface. Protease and chloramphenicol did not promote the cells to detach from both surfaces, but sodium periodate did. This suggests that exopolysaccharide may play a role in their permanent attachment. The presence of Zn, Pb, Cd and Cr induced the changes in the permanent attachment of the strains to both types of the surfaces. It appeared to be reflected in the changes to the charge and hydrophobic characteristics of the cell surfaces measured by hydrophobic and electrostatic interaction chromatography. There was a decline in attachment for death phase cells compared exponential and stationary phase cells but there were no major changes in the cell surface characteristics with growth phase. This suggests that cell physiological activity may contribute to irreversible adhesion for myxobacteria, however, CICCP, a metabolic inhibitor, did not affect the permanent attachment of the cells. The attachment of both strains declined with increasing pH. Possible mechanisms for the permanent attachment are discussed in the light of these results.

Key words: myxobacteria, attachment, hydrophobic and hydrophilic surface

Myxobacteria are gliding bacteria which have complex life cycles involving extensive communication and co-operation between cells e.g. in fructuation [1]. The gliding habit of myxobacteria makes contact with solid surfaces crucial [2], but although the mechanisms for their gliding motility have been much studied, little is known about the other surface contact interactions e.g. the permanent attachment.

Gliding motility involves temporary attachment to a solid surface. *Myxococcus xanthus* Beebe, 1941 shows two distinct forms of gliding motility. The first is movement that involves co-operation between cells and cell-cell proximity termed S-motility. S-motility appears based on the extension pili and their adhesion to a matrix of fibrils, composed of proteins and carbohydrates, followed by the retraction of the pili. The second type of movement, A-motility, allows individual cell movement and is driven by the extrusion of slime. A-motility under some conditions may contribute to group motility. S-motility appears to dominate the movement of *M. xanthus* on soft surfaces while A-motility is more important on hard surfaces



such as hard agar. The complex developmental life-cycle of myxobacteria requires cell-cell signaling, motility and contact with solid surfaces. In low nutrient conditions vegetative cells aggregate and differentiate into fruiting bodies. S-motility contributes substantially to this process [2, 3]. Other gliding bacteria, such as *Flexibacter sp.*, are capable of both the temporary adhesion, allowing lateral movement, to substrata that is prerequisite of gliding motility and permanent (irreversible) attachment. Permanent attachment is characterized by bacterial cells being firmly attached to one site on the surface even when exposed to the considerable shear forces. There are two phases in permanent attachment of bacterial cells, reversible and irreversible adhesion. The former is controlled by long-range forces e.g. London-van der Waals forces, while the irreversible adhesion is driven by short-range interactions e.g. hydrophobic and charge interactions between the solid and cell surfaces. The extent of permanent attachment to the surfaces is determined by a number of factors including the characteristics of the bacterial cell surface, the nature of the solid surface and liquid phase [4].

The aim of this study was to investigate the permanent (irreversible) attachment of two *M. xanthus* strains to the hydrophobic and relatively hydrophilic polystyrene surface.

Materials and Methods

Mycococcus xanthus V-25, isolated from Ukrainian soil, and *M. xanthus* 422 (provided by Professor J. Ma Arias-Penalver, Granada University, Spain) were used in this study.

CT broth (100 ml) containing 2 % (w/v) casitone (Difco) and 0.2% MgSO₄ · H₂O in 0.01M potassium phosphate buffer (pH 7.6) was inoculated with 1 ml *M. xanthus* from CT starter cultures. The cultures were grown under 30 °C before harvesting (11,000 av. g, 4 °C) and suspending in 10 ml 0.2 mM maleate buffer (pH 7). The cells were washed once and resuspended in maleate buffer (pH 7) to cell density of 1-2 x 10⁹ cells ml⁻¹. Five ml of each cell suspension were transferred to duplicate 5 cm polystyrene petri dishes (PD) (Sterilin), a hydrophobic surface, and duplicate tissue culture treated polystyrene dishes (TCD) (Costar), relatively hydrophilic surface. The attachment substrata were incubated for 2 h at 30 °C and then washed gently three times with 0.2 mM maleate buffer (pH 7) to remove loosely attached bacteria. The attached bacteria were then fixed and stained with crystal violet. Bacterial attachment was estimated by measuring the A₅₄₀ of the stained attached bacteria. Four readings of randomly selected areas were taken from each of the duplicate dishes. The results were expressed as A₅₄₀ (x 10³) of the attached cells with the 95 % confidence limits of the mean (n=8).

The adhesion assays determined the effect of growth phase on attachment, the effect of selected heavy metals on adhesion, the effect of the inhibitor carbonil cyanide m-chlorophenyl-hydrazone (CICCP), the effect of pH on adhesion.

To determine the detachment assay the substrata with the attached cells inoculated with 5-ml volumes of one of the following: (i) 0.2 mM maleate buffer (pH 7) (control); (ii) 5 mg chloramphenicol ml⁻¹ (Sigma) in maleate buffer; (iii) 1 unit per 5 ml bacterial protease (Sigma) in maleate buffer; (iv) 1% (w/v) sodium periodate (Sigma). The duplicate plates were incubated at 30 °C for further 2 hrs before washing, staining and determining the A₅₄₀ of attached cells. The results were expressed as the percentage of A₅₄₀(x 10³) detached by the treatment in comparison with the detachment control. If the 95% confidence limits of the mean (n=8) for treatments and control overlapped then no additional detachment was considered to have occurred.

Cell surface characteristics were investigated by adapting the method previously described [16]. The strains were grown in CT medium at 30 °C to



exponential, stationary, or death phase. The cells were harvested, washed once and resuspended in maleate buffer (pH 7) or buffer containing 1.0 mM ClCCP. The strains were also grown for 48 h in CT medium containing 0 mM (control) or 0.1 mM $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ or $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. The cells were harvested by centrifugation, washed once and resuspended in maleate buffer (pH 7) to optical density of $1 - 2 \times 10^9$ cells ml^{-1} .

The results were expressed as the percentage of A_{540} retained in the column: the larger percentage, the more hydrophobic, anionic, or cationic the cells. Discrepancy of $< \pm 5\%$ between duplicate columns was considered acceptable.

All experiments were repeated at least once.

Results and discussion

Attachment of both myxobacterial strains was far greater to the hydrophobic surface than the relatively hydrophilic surface in all the growth phases (Table 1). There was no significant difference in permanent attachment between the late exponential phase cells and the stationary phase cells for both strains. There was, however, a significant reduction in the attachment for death phase cells (Table 1). The presence of ClCCP did not inhibit attachment in any growth phase for either strain, in fact there was a slight rise in the attachment induced by ClCCP for death phase cells. *M. xanthus* 422 showed higher attachment to the relatively hydrophilic surface (TCD) than *M. xanthus* V-25, but the extent of the attachment to the hydrophobic surface was similar for both strains (Table 1).

Table 1
The effect of growth phase and ClCCP on the attachment of *M. xanthus* strains to the hydrophobic surface (PD) and relatively hydrophilic surface (TCD)

| Strain <i>M. xanthus</i> | Surface | Condition | A_{540} of attached cells ($\times 10^3$) | | |
|-----------------------------|---------|---------------------|---|------------------------|-------------------|
| | | | Exponential phase cells | Stationary phase cells | Death phase cells |
| V-25 | PD | Control | 27.00 ± 4.00^a | 30.00 ± 3.00 | 1.50 ± 0.02 |
| | | +ClCCP ^b | 36.00 ± 5.00 | 31.05 ± 4.00 | 1.72 ± 0.03 |
| | TCD | Control | 3.00 ± 0.20 | 3.17 ± 1.00 | 0.35 ± 0.06 |
| | | +ClCCP | 3.00 ± 0.30 | 3.20 ± 1.00 | 0.71 ± 0.01 |
| 422 | PD | Control | 32.00 ± 6.00 | 35.55 ± 5.00 | 2.46 ± 0.03 |
| | | +ClCCP | 43.00 ± 7.00 | 36.17 ± 3.00 | 2.82 ± 0.04 |
| | TCD | Control | 8.00 ± 0.80 | 8.50 ± 0.80 | 0.68 ± 0.06 |
| | | +ClCCP | 8.90 ± 0.90 | 8.57 ± 0.60 | 1.50 ± 0.06 |

^a 95 % confidence limits of mean (n=8)

^b 1 mM carbonil cyanide m-chlorophenyl-hydrazone

The effect of the heavy metals on the permanent attachment of the two strains was broadly similar, but varied with the solid surface (Table 2). The presence of each metal, in general, significantly increased the attachment of the strains to the relatively hydrophilic surface. There was no rise in attachment to this surface with increasing metal concentration (0,1 and 5,0 mM). The attachment



to the hydrophobic surface, however, increased significantly in the presence of 0,1 mM concentrations of all three metals but showed the marked decline at 5,0 mM concentrations of the metals (Table 2).

Table 2

The effect of selected heavy metals on the attachment of *M. xanthus* strains to the relatively hydrophilic surface (TCD) and hydrophobic surface (PD)

| Strain <i>M. xanthus</i> | Heavy metal | A_{540} of attached cells ($\times 10^3$) | | | | | |
|-----------------------------|-------------|---|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| | | PD | | | TCD | | |
| | | 0,0 mM | 0,1 mM | 5,0 mM | 0,0 mM | 0,1 mM | 5,0 mM |
| V-25 | Cr | 27.0 \pm 0.5 ^a | 33.0 \pm 1.0 | 16.0 \pm 5.0 | 3.0 \pm 0.2 | 8.0 \pm 2.0 | 7.0 \pm 2.0 |
| | Zn | 27.0 \pm 0.5 | 30.0 \pm 1.0 | 15.0 \pm 3.0 | 3.0 \pm 0.2 | 4.0 \pm 0.5 | 4.0 \pm 0.1 |
| | Cd | 27.0 \pm 0.5 | 31.0 \pm 1.0 | 15.0 \pm 4.0 | 3.0 \pm 0.2 | 6.0 \pm 1.0 | 5.0 \pm 0.5 |
| | Pb | 27.0 \pm 0.5 | 32.0 \pm 1.0 | 16.0 \pm 5.0 | 3.0 \pm 0.2 | 4.0 \pm 0.5 | 4.0 \pm 0.1 |
| 422 | Cr | 32.0 \pm 1.0 | 39.0 \pm 3.0 | 18.0 \pm 3.0 | 8.0 \pm 0.8 | 15.0 \pm 4.0 | 15.0 \pm 1.0 |
| | Zn | 32.0 \pm 1.0 | 38.0 \pm 3.0 | 15.0 \pm 3.0 | 8.0 \pm 0.8 | 9.0 \pm 2.0 | 10.0 \pm 0.5 |
| | Cd | 32.0 \pm 1.0 | 37.0 \pm 2.0 | 15.0 \pm 3.0 | 8.0 \pm 0.8 | 10.0 \pm 3.0 | 12.0 \pm 1.0 |
| | Pb | 32.0 \pm 1.0 | 38.0 \pm 2.0 | 16.0 \pm 4.0 | 8.0 \pm 0.8 | 11.0 \pm 0.5 | 12.0 \pm 1.0 |

^a 95 % confidence limits of mean (n=8)

As pH increased so the levels of the permanent attachment to the hydrophobic and the hydrophilic surface declined and looks similar for both strains (Fig. 1).

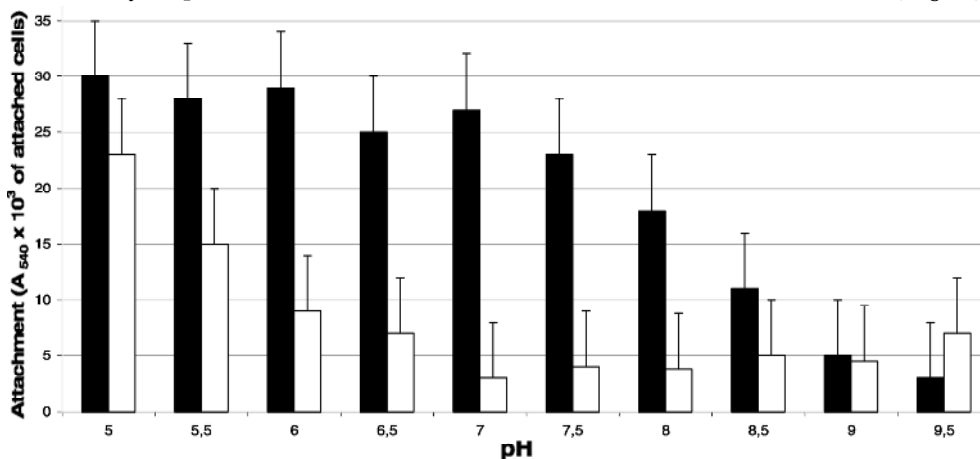


Fig. 1. Effect of pH on the permanent attachment of *M. xanthus* V-25 to the hydrophobic (PD) surface (■) and relatively hydrophilic (TCD) surface (□). The bars represent the 95% confidence limits of the mean (n=8)

The attached cells of *M. xanthus* V-25 and 422 did not desorb in the presence of either chloramphenicol, the inhibitor of protein synthesis, or protease. The presence of sodium periodate, which denatures exopolysaccharide, resulted in 30% and 10% detachment of *M. xanthus* V-25 from PD and TCD respectively. In the case of *M. xanthus* 422 a 40% and 20% detachment occurred from PD and TCD respectively after treatment with sodium periodate.

Cell surface hydrophobicity (measured by HIC) of the two myxobacterial strains was similar and remained relatively constant with growth phase (Table 3). There was more variation in the electrostatic interactions (measured by EIC) for the two organisms. Both strains showed greater binding to the EIC (A + C) exchange resin, which binds both negative and positive groups, than to EIC (A), which binds negative groups, in all three growth phases. This suggests that the cells of both strains tended to be electropositive. In general, the presence of ClCCP, the metabolic inhibitor, had little effect on the cell surface characteristics of either strains (Table 3).

Table 3
The effect of growth phase on the cell surface characteristics of *M. xanthus* strains measured by electrostatic and hydrophobic interaction chromatography

| Strain <i>M. xanthus</i> | Column ^b | % of cells retained in the columns ^a | | | | | |
|-----------------------------|---------------------|---|--------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| | | Exponential Growth phase | | Stationare Growth phase | | Death Growth phase | |
| | | Control | ClCCP ^c | Control | ClCCP ^c | Control | ClCCP ^c |
| | | V-25 | HIC | 84 ± 4 ^d | 90 ± 5 | 88 ± 5 | 90 ± 6 |
| EIC(A+C) | 73 ± 4 | | 69 ± 3 | 74 ± 5 | 71 ± 3 | 95 ± 8 | 73 ± 7 |
| EIC(A) | 53 ± 2 | | 48 ± 3 | 48 ± 2 | 46 ± 2 | 51 ± 4 | 70 ± 7 |
| 422 | HIC | 80 ± 4 | 85 ± 5 | 90 ± 6 | 91 ± 5 | 92 ± 6 | 95 ± 6 |
| | EIC(A+C) | 60 ± 3 | 50 ± 2 | 85 ± 6 | 80 ± 7 | 91 ± 8 | 90 ± 6 |
| | EIC(A) | 50 ± 2 | 45 ± 2 | 55 ± 2 | 50 ± 1 | 65 ± 3 | 60 ± 4 |

^a Calculated as the percentage of A₅₄₀ retained in the column.

^b HIC, hydrophobic interaction chromatography column; EIC(A+C), mixed anion and cation interaction column; EIC(A), anion interaction column.

^c 1 mM carbonil cyanide m-chlorophenyl-hydrazone

^d SEM (n=3)

The presence of Cr, Zn, Cd and Pb increased both the hydrophobic and charge characteristics of the *M. xanthus* V-25 and *M. xanthus* 422 cell surfaces (Table 4). The most substantial increasing was found for EIC (A) suggesting the increase in the positive charge of the cells in the presence of the metals (Table 4).



Table 4

The effect of heavy metal cations on the cell surface characteristics of *M.xanthus* strains measured by electrostatic and hydrophobic interaction chromatography

| Strain | Column ^b | % of cells retained in the columns ^a | | | | |
|--------|---------------------|---|--------|--------|---------|--------|
| | | Control | Cr | Zn | Cd | Pb |
| V-25 | HIC | 90 ± 1 ^c | 97 ± 2 | 99 ± 1 | 98 ± 2 | 99 ± 1 |
| | EIC(A+C) | 70 ± 3 | 88 ± 2 | 87 ± 3 | 90 ± 4 | 79 ± 4 |
| | EIC(A) | 50 ± 3 | 90 ± 2 | 90 ± 4 | 100 ± 1 | 83 ± 2 |
| 422 | HIC | 90 ± 1 | 99 ± 1 | 97 ± 4 | 96 ± 2 | 97 ± 3 |
| | EIC(A+C) | 70 ± 2 | 81 ± 3 | 88 ± 3 | 86 ± 2 | 85 ± 3 |
| | EIC(A) | 55 ± 4 | 90 ± 4 | 92 ± 4 | 87 ± 1 | 89 ± 3 |

^a Calculated as the percentage of A₅₄₀ retained in the column.

^b HIC, hydrophobic interaction chromatography column; EIC(A+C), mixed anion and cation interaction column; EIC(A), anion interaction column.

^c SEM (n=2)

This research demonstrates that *M. xanthus* strains not only exhibit the temporary adhesion of gliding motility but are also capable of permanent attachment to solid substrata. Our results suggest that the mechanism of permanent attachment of these organisms may involve complex interactions between several different cell characteristics.

M. xanthus 422 and *M. xanthus* V-25 both showed far greater permanent adhesion to the hydrophobic surface than to the relatively hydrophilic surface (Table 1 and Table 2, Fig. 1). Hydrophobic interactions are believed to be key determinants of bacterial attachment [1], that is well known that cell surface charge is only important at cell low surface hydrophobicity. The myxobacterial strains studied both had high surface hydrophobicity and, we are sure cell hydrophobicity might be considered largely responsible for their permanent attachment. This is supported by the greater adhesion to the hydrophobic surface, and by the fact that cells became more hydrophobic, as well as more highly charged (Table 4), after accumulating all the heavy metals studied, when they also tended to show increased adhesion (Table 2).

Hydrophobicity was not, however, the only determinant of permanent attachment for the two *M. xanthus* strains. This was indicated by the findings that death phase cells attached least (Table 1), despite these cells have similar hydrophobicity to stationary and exponential phase cells (Table 3). Moreover, exposure to 5 mM metal solutions resulted in reduced attachment to the hydrophobic but not the relatively hydrophilic surface (Table 2), even though the cell surface hydrophobicity increased after exposure to the metals (Table 3). In their classic study Marshall et al [4] proposed actively related adhesion process specifically through the production of exopolymer. A role for bacterial activity and exopolymer production in permanent attachment has subsequently been supported by a number of studies [1, 5]. The reduced attachment of the



myxobacterial strains we observed in death phase may have been due to some activity driven component in their permanent attachment. The metabolic inhibitor, ClCCP, however, did not reduce their attachment (Table 1). The life-cycle of myxobacteria requires sophisticated co-operation and aggregation of cells largely controlled by cell-cell signaling [3]. Communication and co-operation between cells has been suggested to be exceptionally important in the permanent attachment of bacteria [6]. The apparent contradiction between the reduced attachment for death phase cells but no similar reduction for ClCCP-treated cells, may be due to different effects on the functioning of inter-cell communication and co-operation mechanisms. The role of cell-cell communication and co-operation in permanent attachment of these micro-organisms certainly warrants further study.

The results of our investigation suggest that exopolymer contributes to the irreversible attachment of *M. xanthus* and it is probable that a key effect of metals on attachment was through an effect on exopolymer. Neither chloramphenicol nor protease caused the detachment of the myxobacteria permanently attached to the solid surfaces, but sodium periodate, which denatures exopolysaccharide, did. Attachment of the strains to the hydrophobic surface tended to decline with increasing pH (Fig. 1), as was found for *Flexibacter* sp, another type of gliding bacterium [18]. The effects of pH are, of course, multifaceted, but it is noteworthy that changes in pH can cause the alterations in the viscosity of exopolymer. Similarly, binding of metal cations to exopolymer might increase its viscosity. Cadmium bound to the exopolymer of *Citrobacter* sp. changed the morphology of the exopolymer from diffuse and amorphous to electron opaque and structured [7]. Viscosity has been suggested as one factor that determines whether exopolymer acts as a temporary adhesive in gliding motility or as a permanent adhesive [8]. Binding of metals to bacterial cell walls also substantially changes the charge and hydrophobic characteristics of the cell surface [5], which in turn may influence attachment. In the case of myxobacteria we found that there was increasing in both hydrophobicity and charge interactions, particularly the positive charge interactions of the cells (Table 4). Cadmium and zinc have previously been found to cause similar increases in the charge and hydrophobic characteristics of the cell surface of *Pseudomonas fluorescens* H2 [5]. In addition, the presence of the metals had a considerable impact on the physiological activity of the strains, clearly demonstrated by the reduction in respiration rate. Variations in the physiological status of bacteria are known to induce changes in the cell surface characteristics [5]. Metal induced changes in the cell surface characteristics of the *Myxococcus* strains are likely to have impacts on the cell-surface interactions permanent adhesion influencing the levels of attachment as observed in this study.

It is clear from our research that myxobacteria are capable permanent attachment to solid surfaces and that a number of different cellular characteristics contribute to this process. The life-style and gliding motility of these bacteria makes the contact with the surfaces essential. Whether the ability to irreversibly attach plays a role for *M. xanthus* in soil environments is unclear, but is worthy of further study.

Acknowledgments. This research was funded in part by INTAS Fellowship grant for Young Scientists. Fellowship Reference. No YSF99-08.

REFERENCES

1. Li Y., Sun H., Ma X., Lu A., Lux R., Zusman D., Shi W. Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100.P. 5443 – 5448.



2. Wolgemuth C., Hoiczky E., Kaiser D., Oster G. How myxobacteria glide // *Current Biology* 2002. V. 12. P. 369 – 377.
3. Welch R., Kaiser D. Cell behavior in traveling wave patterns of myxobacteria // *Proc. Nat. Acad. Sciences. USA*. 2001. V. 98. P. 14907 – 14912.
4. Marshall K.C., Stout R., Mitchell R. Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces // *J. Gen. Microbiol.* 1971. V. 68. P. 337 – 348.
5. McEldowney S. Effect of Cadmium and Zinc on Attachment and Detachment Interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with Glass // *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. V. 60: P. 2759 – 2765.
6. Cunliffe G.C., Smart C.A., Vulfson E.N. Bacterial adhesion at synthetic surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. V. 65. P. 4995 – 5002.
7. Bonthron K.M., Quarmby J., Hewitt C.J., Allan V.J.M., Paterson-Beedle M., Kennedy J.F., Macaskie L. The effect of the growth medium on the composition and metal binding behaviour of extracellular polymeric material of a metal-accumulating *Citrobacter* sp. // *Environ. Technol.* 2000. V. 21. P. 123 – 134.
8. McEldowney S., Fletcher M. Effect of pH, temperature and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene // *Microb. Ecol.* 1988. V. 16. P. 183 – 195.

Е.Л. Рахимова¹, В.А. Иваница¹, Ш. Мак Элдовней²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

²Школа биол. наук, Университет Вестминстера, 115, Нью Кавендиш ст., Лондон, Великобритания

ДОЛГОСРОЧНОЕ ПРИКРЕПЛЕНИЕ МИКСОБАКТЕРИЙ *MYXOCOCCUS XANTHUS*

Реферат

Изучено долгосрочное прикрепление бактерий *Myxococcus xanthus* V-25 и *M. xanthus* 422 к гидрофобным и гидрофильным поверхностям. Показано, что миксобактерии лучше прикреплялись к гидрофобным поверхностям. Периодат натрия способствовал откреплению от обоих типов поверхностей, в отличие от протеазы и хлорамфеникола. Присутствие Zn, Pb, Cd и Cr приводило к изменениям в прикреплении штаммов к обоим типам поверхностей. Наблюдалось снижение прикрепления в фазе гибели клеток, по сравнению с экспоненциальной и стационарной фазами. Существенных отличий в изученных свойствах клеточной поверхности на различных фазах роста не выявлено. Прикрепление бактерий обоих штаммов снижалось с повышением pH. В свете полученных результатов обсуждены возможные механизмы долгосрочного прикрепления миксобактерий.

К л ю ч е в ы е с л о в а: миксобактерии, прикрепление, гидрофобные и гидрофильные поверхности.



О.Л. Рахімова¹, В.О. Іваниця¹, Ш. Мак Елдовней²

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

²Школа біологічних наук, Університет Вестмінстера, 115, Нью Кавендіш ст., Лондон, Велика Британія

ДОВГОТРИВАЛЕ ПРИКРІПЛЕННЯ МІКСОБАКТЕРІЙ *МУХОСОCCUS XANTHUS*

Реферат

Вивчено довготривале прикріплення бактерій *Mucosoccus xanthus* V-25 і *M. xanthus* 422 до гідрофобних і гідрофільних поверхонь. Показано, що міксобактерії краще прикріплювалися до гідрофобних поверхонь. Періодат натрію сприяв відкріпленню від обох типів поверхонь, на відміну від протеази та хлорамфеніколу. Присутність Zn, Pb, Cd і Cr призводила до змін в прикріпленні бактерій до обох типів поверхонь. Спостерігалось зниження прикріплення у фазі загибелі клітин, в порівнянні з експоненціальною та стаціонарною фазами. Суттєвих відмін вивчених властивостей поверхні клітин на різних фазах росту не виявлено. Прикріплення бактерій обох штамів знижувалось з підвищенням рН. В світлі одержаних результатів обговорено можливі механізми довготривалої адгезії міксобактерій.

К л ю ч о в і с л о в а: міксобактерії, прикріплення, гідрофобна і гідрофільна поверхні.



Ю.А. Гончар, Е.В. Надкерничная, И.В. Волкова

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
ул. Шевченко, 97, г. Чернигов, Украина, 14027

ФОРМИРОВАНИЕ ИСКУССТВЕННОГО СИМБИОЗА АЗОСПИРИЛЛ С РАСТЕНИЯМИ ШЕЛКОВИЦЫ

*С использованием абиогенного фактора нодуляции (2,4-дихлорофеноксиацетата) получены параклубеньки на корнях растений шелковицы. Для изучения способности бактерий рода *Azospirillum* заселять данные новообразования была получена штаммоспецифичная антисыворотка к штамму *Azospirillum brasilense* 54. Установлено, что азоспириллы способны проникать в параклубеньки растений шелковицы, выращенных в пробирках на стерильной среде и в условиях вегетационного опыта на нестерильной почве.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Azospirillum brasilense*, шелковица, параклубеньки, антисыворотка.

Клубеньки на корнях небобовых растений образуются у ряда культур: ольхи, облепихи, восковника, кориарии, кукурузы, вейника, осоки, подмаренника и т.д. под воздействием биогенных и абиогенных факторов нодуляции [1-7]. Бактерии, которые способны проникать в корни растений и индуцировать образование клубеньков, адсорбируются на поверхности корней растений, синтезируют гормоноподобные вещества и ферменты, разрушающие клеточную стенку растений, а также проникают во внутренние ткани кортикальной паренхимы и распространяются по системе межклетников [8, 9]. В клубенькоподобные структуры могут проникать различные микроорганизмы, в том числе и патогенные [10]. Для увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур предпринимаются попытки искусственно индуцировать образование клубеньков, одновременно заселяя их азотфиксирующими бактериями. Исследовано искусственное образование псевдоклубеньков на корнях капусты и рапса под воздействием разнообразных нодулирующих агентов при одновременной инокуляции азотфиксирующими микроорганизмами [11, 12].

В Институте шелководства обнаружен феномен гигантизма растения шелковицы. На корнях исследуемого растения обнаружили большое количество клубенькоподобных утолщений [13]. Было установлено, что данные структуры характеризуются высокой азотфиксирующей активностью, сравнимой с нитрогеназной активностью клубеньков бобовых. Из клубеньков на корнях шелковицы были выделены азотфиксирующие бактерии: *Agrobacterium radiobacter* и *Azospirillum brasilense*.

Бактерии рода *Azospirillum* привлекают внимание многих исследователей вследствие их способности развиваться как в ризоплане и ризосфере, так и проникать в корковые ткани корней [14, 15].

Цель работы: искусственно индуцировать образование клубеньков на корнях растений шелковицы и заселить их активными штаммами diaзотрофов.



Материалы и методы

Для получения антисыворотки был выбран наиболее эффективный штамм азоспирилл - *Azospirillum brasilense* 54. В условиях лабораторного опыта стерильные проростки шелковицы, выращенные в пробирках на полужидкой среде, инокулировали исследуемым штаммом при одновременной обработке семян 2,4-дихлорофеноксиацетатом в концентрации 5×10^{-6} г действующего вещества на 1 растение. Явление паранодуляции изучали также в условиях вегетационного опыта на нестерильной почве. Через 30 дней для дальнейших исследований параклубеньки семян шелковицы стерилизовали раствором сулемы и 96% этиловым спиртом, многократно промывали стерильной водой. В стерильных условиях параклубеньки раздавливали стеклянной палочкой и производили посев на чашки с картофельной агаризованной средой и средой Касераса. Для дальнейших исследований отбирали колонии азоспирилл по характерным культурально-морфологическим признакам.

Антитела получали, используя модифицированную схему иммунизации кролей целыми клетками *Azospirillum brasilense* 54, поверхность которых была предварительно обработана глутаровым альдегидом. В качестве адъюванта использовали мантанид ISA 25. Инъекцию проводили 2 мл антигена с оптической плотностью $D_{660} = 1,3$ (при длине волны света 660 нм) в кювете толщиной 1 см, что соответствует концентрации примерно 3×10^{10} кл/мл. Схема иммунизации включала 6 инъекций, которые проводили с интервалом в 3 дня. В нашей модификации инъекции проводили, чередуя подкожное введение антигена в область шеи с внутривенной инъекцией в 5 - 7 точек вдоль позвоночника. Титр антител в реакции двойной иммунодиффузии составил 1:8 и 3×10^3 в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА). Через 40 дней проводили реиммунизацию, которая включала 3 инъекции с недельным интервалом: 1-я — внутримышечная, 2-я и 3-я — внутривенные, возрастающим количеством антигена (от 3×10^{10} до 3×10^{12} кл/мл). Кровь отбирали через 10 дней после завершения иммунизации. Консервирование сыворотки проводили борной кислотой (2 г на 100 мл сыворотки).

Для постановки реакции преципитации по Оухтерлони [16] использовали 1 % агарозу на физиологическом растворе с добавлением борной кислоты (10 мг/мл) [17]. Расплавленный агар разливали тонким слоем на покровные стёкла. В нём вырезали 2 ряда лунок диаметром 3 мм: 5 — сверху и 6 — внизу на расстоянии 5 мм одна от другой. Для наблюдения реакции преципитации между антигеном и полученной сывороткой лунки наполняли пастеровскими пипетками с оттянутыми концами: верхний ряд — раствором антигена, а нижний — растворами антител с титром 1:16 (3 левые лунки) и 1:32 (3 правые лунки). Стёкла помещали в чашки Петри и ставили в эксикатор с налитой на дно водой. Реакцию проводили в термостате при температуре 37 °С. Линии преципитации учитывали через 2 дня визуально. Препараты окрашивали красителем кумасси R-250.

Иммуноферментный анализ (ТИФА) проводили на полистироловых планшетах фирмы Sarstedt USA в непрямом варианте. Для сенсibilизации лунок планшеты бактериальными антигенами проводили сорбцию белков в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере при 4 °С в течение 14-16 часов. Специфическую сыворотку кроля (разведение 1:1000) и антикроличий пероксидазный конъюгат инкубировали 60 минут при 37 °С. Субстрат/хромогенным раствором в ТИФА служил H_2O_2 /ортофенилендиамин. Оптическую плотность определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 492 нм. При анализе отобранных образцов в качестве положительного контроля исполь-



зовали бактериальный антиген *A. brasilense 54*, а в качестве отрицательного — бактериальный антиген *A. brasilense Sp7*. Все образцы стандартизировали по концентрации белка — 25 мкг/мл.

Определяли отношение оптической плотности (ОП) положительного контроля к ОП отрицательного контроля. В случае, если его значение превышало 2, принадлежность исследуемых бактериальных штаммов к маркерному считалась доказанной.

Результаты и их обсуждение

На корнях стерильных проростков шелковицы, обработанных 2,4-дихлорофеноксиацетатом при одновременной интродукции бактерий *A. brasilense 54* в корневую зону растений, на 10-14 сутки образовывались параклубеньки округлой формы (рис. 1).

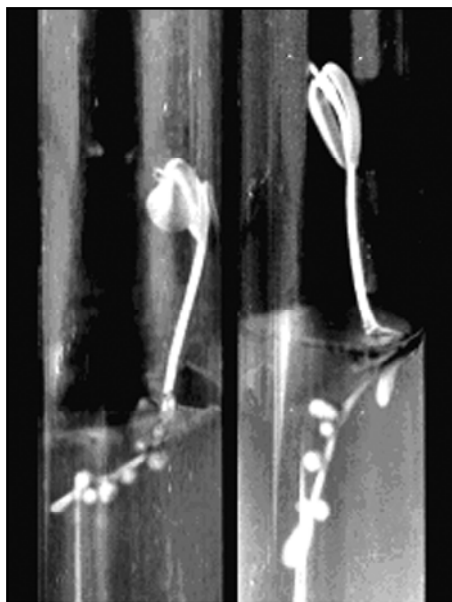


Рис. 1. Влияние 2,4-Д и инокуляции азоспириллами на проростки шелковицы

На корнях сеянцев шелковицы, выращенных в условиях вегетационного опыта на нестерильной почве и обработанных 2,4-Д при инокуляции азоспириллами, крупные клубеньки образовывались ниже корневой шейки и вдоль главного корня, более мелкие — на нижней части тонких молодых корней (рис. 2).

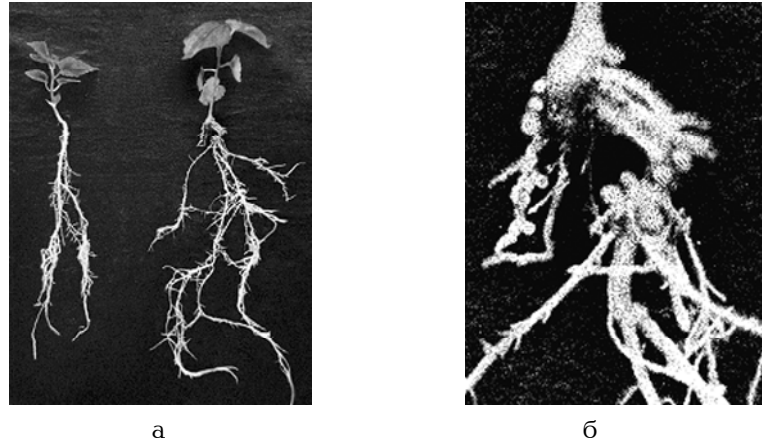


Рис. 2. Параклубеньки на корнях сеянцев шелковицы
 а: зліва — контрольное растение, справа — растение шелковицы, корневая система которого была обработана 2,4-Д при одновременной инокуляции бактериями *A. brasilense 54*;
 б: увеличенный фрагмент корня сеянца шелковицы с параclubеньками

При интродукции diaзотрофов в параclubеньки, полученные с помощью абиогенного фактора нодуляции, азотфиксирующая активность бактерий в данных структурах сохраняется не всегда. Результаты определения азотфиксирующей активности параclubеньков шелковицы свидетельствуют в пользу того, что нитрогеназная активность параclubеньков, полученных при инокуляции растений штаммами азоспирилл в 17,2 раза превосходила активность параclubеньков, которые образовывались на корнях сеянцев вследствие обработки их только 2,4-Д (табл.1).

Таблица 1

Нитрогеназная активность параclubеньков на корнях сеянцев шелковицы в результате обработки корневой системы 2,4-дихлорофеноксиацетатом и азоспириллами

| Варианты опыта | Нитрогеназная активность параclubеньков, мкг N на 1 растение за час |
|---|---|
| Обработка 2,4-Д | 0,22 |
| Обработка 2,4-Д и <i>A. brasilense 54</i> | 3,79 |
| НСР ₀₅ | 0,58 |

Из параclubеньков были выделены изоляты, не отличающиеся по культурально-морфологическим признакам между собой и соответствующие по данным признакам штамму *Azospirillum brasilense 54*.

Применение модифицированной схемы иммунизации животных и реиммунизация позволила получить антисыворотку к штамму *Azospirillum brasilense 54* с титром 1:32 в реакции преципитации и 4×10^5 — в реакции



ТИФА, достаточном для решения поставленных задач.

Анализируя данные двойной иммунодиффузии в геле, мы установили, что все изоляты, выделенные из параклубеньков шелковицы, соответствуют штамму *Azospirillum brasilense 54* (рис. 3).

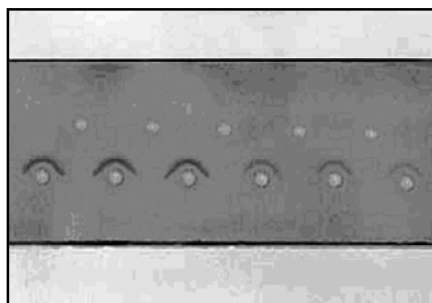


Рис. 3. Полосы преципитации между сывороткой (разведения: 1:16 и 1:32) и антигеном (изолят из клубеньков шелковицы)

Результаты двумерной иммунодиффузии в геле и ТИФА согласуются между собой и свидетельствуют о том, что из 3-х изолятов, выделенных из параклубеньков шелковицы, все три обеспечили положительную реакцию в ТИФА и образование линий преципитации со штаммоспецифичной анти-сывороткой (табл. 2).

Таблица 2

Результаты иммунодиффузии и иммуноферментного анализа изолятов бактерий, выделенных из параклубеньков семян шелковицы

| Образцы | ТИФА | | Иммунодиффузия в геле |
|--|------------|----------------------------------|-----------------------|
| | ОП, 492 нм | ОП образца/ ОП обр. контроля* | |
| Положительный контроль (<i>A.brasilense 54</i>) | 2,984 | 4,76 | +++ |
| Отрицательный контроль (<i>A.brasilense Sp7</i>) | 0,627 | 1,0 | - |
| Изолят №1 | 2,791 | 4,45 | +++ |
| Изолят №2 | 2,847 | 4,54 | +++ |
| Изолят №3 | 2,096 | 3,34 | ++ |

* Соотношение ОП исследуемого образца к ОП отрицательного контроля.

Результаты проведенных нами исследований свидетельствуют, что изучение серологических свойств бактерий может быть использовано для выяснения механизма контактных взаимодействий микроорганизмов с растениями, а также для надёжной и быстрой идентификации штаммов азоспирилл, выделенных из параклубеньков растений.

Таким образом, нами получены параклубеньки с высокой нитрогеназной активностью на корнях семян шелковицы в результате обработки абиогенным агентом нодуляции – 2,4-дихлорофеноксиацетатом при одно-

временной инокуляции азоспириллами. Используя модифицированную нами схему иммунизации кролей, мы получили штаммоспецифичную антисыворотку с титром 1:32 в реакции преципитации, что позволило использовать её для доказательства проникновения бактерий *Azospirillum brasilense* 54 в параклубеньки, искусственно индуцированные на корнях шелковицы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Надкерничная Е.В., Мамчур А.Е., Лохова В.И. Образование клубеньков на корнях моркови, инокулированной азоспириллами // Микробиол. журн. — 1989. — Т. 51, №5. — С. 11–16.
2. Krol M. J., Kobus J., Fuk B. Wiazanie azotu w parabrodawkach korzeni zboz przez *Azospirillum* lip. i Acin. — like // Zezz. Nauk. Pol. / AR Szczecinie. — 1997. — № 68. — С. 153–161.
3. Nie Y.F. Nitrogen fixation in 2,4-D forced associative wheat-diazotroph system. // Int. Workshop Assoc. Interactions Nitrogen-Fix. Bact. Plants. (Saratov, June 5-8, 1995): Abstr. — Saratov, 1995. — P. 32–34.
4. Майстренко Г.Г. Симбиоз у небобовых древесных растений на примере облепихи // Структурные и функциональные связи высших растений и микроорганизмов. — Н.: Наука, 1977. — С. 17–55.
5. Burgess D., Peterson R.I. Development of alnus japonica root nodules after inoculation with Frankia strain HFPArl₃ // Can. J. Bot. — 1987 — Vol.65, № 8. — P. 1647–1657.
6. Рогынюк И.С., Клевенская И.Л. Симбиотическая фиксация азота травянистыми растениями Сибири // Проблемы сибирского почвоведения. — 1977. — С. 200–213.
7. Рогынюк И.С., Клевенская И.Л. Азотфиксирующие системы с участием клубеньковых бактерий небобовых растений // Тез. докл. VI съезда Всесоюз. микробиол. о-ва. — Рига, 1980. — Т.5. — С. 47–48.
8. Емцев В.Т., Чумаков М.И. Критерии ассоциативности для бактерий, находящихся в диазотрофном биоценозе с небобовыми растениями // Микробиол. журн. — 1988. — Т. 50, №3. — С. 93–102.
9. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация: проблемы и перспективы // Бюл. ВНИИСХМ. — 1985. — №42. — С. 9–13.
10. Zinniel D. K., Lambrecht P., Harris N. B. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants // Appl. Environ. Microbiol. — 2002. — Vol.68, № 5. — P. 2198–2208.
11. Ковальская Н.Ю., Лобакова Е.С., Умаров М.М. Формирование искусственного азотфиксирующего симбиоза у растений рапса (*Brassica Napus* Var. *Napus*) в нестерильной почве // Микробиология. — 2001. — Т. 70, №5. — С. 701–708.
12. Glagoleva O.B., Kovalskaya N.U., Umarov M.M. Nodule - like structures formation by nitrogen-fixing *Pseudomonas caryophylli* strain on rape roots // Int. Workshop Assoc. Interactions Nitrogen-Fix. Bact. Plants. (Saratov, June 5-8, 1995): Abstr. — Saratov, 1995. — P. 18.
13. Пилипенко Б.Ф., Мальцева Н.Н., Надкерничная Е.В., Сальник В.П. Азотфиксирующие клубеньки на корнях шелковицы // Микробиол. журн. — 1996. — Т. 58, №5. — С. 93–95.
14. Bashan B.Y., Levanony H., Klein E. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots // J. Gen. Microbiol. — 1986. — Vol.132, № 11. — P. 3069–3073.
15. Magalhaes F.M.M., Patriquin D., Dobereiner J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. // Rev. Brazil. Biol. — 1979. — Vol.39, № 3. —



P. 587–596.

16. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion // Acta pathol. et microbial. Scand. – 1953 – Vol.32, № 2. – P. 231–240.

17. Никитин В.М. Справочник методов иммунологии. – Кишинев: Штиинца, 1982. – 304 с.

Ю.А. Гончар, О.В. Надкернична, І.В. Волкова

Інститут сільськогосподарської мікробіології УАНН, вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна

ФОРМУВАННЯ ШТУЧНОГО СИМБІОЗУ АЗОСПИРИЛ З РОСЛИНАМИ ШОВКОВИЦІ

Реферат

З використанням абіогенного чинника нодуляції (2,4-дихлорфеноксиацетату) отримані парабульбочки на коренях рослин шовковиці. Для вивчення здатності бактерій роду *Azospirillum* заселяти дані новоутворення була отримана штамоспецифічна антисироватка до штаму *Azospirillum brasilense* 54. Установлено, що азоспірили здатні проникати у парабульбочки рослин шовковиці, які були вирощені у пробірках на стерильному середовищі і в умовах вегетаційного дослідження на нестерильному ґрунті.

К л ю ч о в і с л о в а: *Azospirillum brasilense*, шовковиця, парабульбочки, антисироватка

Yu.A. Gonchar, E.V. Nadkernichnaya, I.V. Volkova,

Institute of agricultural microbiology, Shevchenko str., 97, Chernigov, 14027, Ukraine

FORMATION OF ARTIFICIAL SYMBIOSIS AZOSPIRILLUM WITH MULBERRY TREES

Summary

Using the abioogenous factor of modulation (2,4-dichlorophenocsyacetata) there were received the tubercles on the roots of mulberry trees. For investigation of the ability of bacteria of genus *Azospirillum* to inhabit the given new growth it has been received the strainspecific antiserum to strain *Azospirillum brasilense* 54. It was revealed that azospirilles are capable to penetrate into tubercles of the mulberry trees grown up in the test tubes on the sterile medium and under the conditions of vegetative experience on the nonsterile soil.

К e y w o r d s: *Azospirillum brasilense*, a mulberry tree, the tubercles, antiserum.



УДК 579.64

**А.Г. Чинчлей¹, С.А. Толочкина¹, И.О. Растимешина¹,
И.П. Драгалин²**

¹ Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая, 1, MD-2028 Кишинев, Молдова; тел.: +373 22 725055; angela_cincilei@yahoo.fr

² Институт химии АНМ, Академическая, 1, Кишинев, Молдова.

НОВЫЕ ПРОДУКТЫ МИКРОБНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ СКЛАРЕОЛА: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА, ОЦЕНКА

*Впервые из почв Центральной зоны Молдовы были отобраны активные штаммы микроскопических грибов, способные к трансформации молекулы склареола по окислительно-восстановительному пути. Была детально исследована скорость разложения и продукты микробной трансформации лабданового дитерпеноида склареола, подобраны среда и оптимальные условия для накопления ценных метаболитов склареола грибами родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Полученные новые продукты биотрансформации склареола активны против ряда фитопатогенов.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: биотрансформация, дитерпеноид склареол, микромицеты, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*

Склареол (лабдановый дитерпеноид) является природным компонентом эфирного масла *Salvia sclarea L. (Labiatae)*. Это главный компонент конкрета шалфея. Его получают также из отходов эфиромасличного производства. На основе склареола производят ароматизаторы для пищевой и табачной промышленности, а также вещества для фармацевтики [1]. Склареол известен как ингибитор роста растений, регулятор роста грибов и антибактериальный агент [1, 2].

Многообразие сфер применения производных склареола и растущие потребности производства ставят задачу разработки более эффективных способов и методов их получения. Наряду с химическими методами, для модификации молекулы склареола используют энзимные системы микроорганизмов, которые действуют как биокатализаторы при проведении высокоселективной стереотрансформации склареола в соединения, труднодоступные для химического синтеза, и которые могут использоваться как основа синтеза в химии природных соединений. Метод микробной трансформации может применяться для направленного получения новых производных склареола [3].

© А.Г. Чинчлей, С.А. Толочкина, И.О. Растимешина, И.П. Драгалин



Материалы и методы

Отбор активных культур проводили из лабораторной коллекции микроорганизмов-деструкторов различных ароматических и гетероциклических соединений, выделенных из почв Центральной зоны Молдовы. Скрининг и микробную трансформацию веществ осуществляли на жидкой безуглеродной минеральной среде Е-8 [4] при 28 °С на термостатируемой качалке (180 об/мин). Кроме того, используя физиологически апробированные параметры содержания органического углерода, эксперименты по микробной трансформации склареола проводили на среде Е-8 в градиенте углерода (глюкозы):

глюкоза, (г/л): 1,0 2,5 5,0 7,5 10,0 12,5 15,0 17,5 20,0

углерод, (г/л): 0,41 1,03 2,07 3,10 4,41 5,17 6,21 7,24 8,28

Склареол вносили из расчета 50 мг/л. Для учета абиотических эффектов (фотодеградации и др.) и возможных артефактов, в каждом опыте ставили по два контроля: химический - «среда + склареол», и биологический - «среда + культура». Реализацию процесса биотрансформации склареола проверяли в течение 30 дней, через каждые 24 часа. Экстракцию продуктов трансформации склареола из культуральной жидкости (КЖ) проводили этилацетатом или хлороформом [1]. Для качественного определения склареола и его метаболитов использовали метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах "Silufol UV 254" в системе растворителей этилацетат-гексан (9:1). Вещества на пластинах проявляли иодом и анисовым альдегидом в серной кислоте [5]. Более полная характеристика полученных метаболитов была дана с применением методов УФ-, ИК-, масс-спектрологии, а также ¹H и ¹³C ЯМР-спектроскопии.

Для изучения антибиотической активности склареола использовали метод диффузии в агар [6]. На поверхности агаровой пластинки, засеянной тест-культурой, раскладывали бумажные диски с веществами согласно схеме:

1. Культуральная жидкость *Penicillium sp. 176*;
2. Склареол — «химический контроль»;
3. Метаболит А-5 — димеризованный продукт трансформации склареола.

Учет роста микроорганизмов и измерение диаметра зон лизиса проводился: для бактерий — на 1, 3, 5 сутки, для грибов — спустя 3, 5, 7 суток.

Результаты и их обсуждение

На способность к биотрансформации склареола были изучены 14 штаммов бактерий и грибов. В результате скрининга выделено три штамма микроскопических грибов, активно утилизирующих склареол в качестве единственного источника углерода. Это представители родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* [7-10]. Установлено, что отобранные микромицеты различаются как по скорости и степени разложения склареола, так и по спектру его метаболитов.

В целом процесс трансформации склареола протекает наиболее интенсивно первые 7 суток, когда степень утилизации препарата достигает 60 % от внесенного количества. Далее процесс замедляется, и в период с 22-х до 30-х суток ферментации грибы используют всего 6 % субстрата (табл. 1).

Убыль склареола в культуральной жидкости сопровождается ростом мицелия активных культур.



Таблица 1

Динамика микробной трансформации склареола

| Микроорганизмы | Остаточное количество склареола, % | | | |
|----------------------------|------------------------------------|---------|---------|---------|
| | 7 сут. | 14 сут. | 21 сут. | 30 сут. |
| <i>Penicillium sp. 176</i> | 78,9 | 63,5 | 54,5 | 48,9 |
| <i>Aspergillus sp. 120</i> | 78,9 | 58,8 | 45,7 | 39,8 |

Установлено, что на процесс трансформации склареола микромицетами *Penicillium sp. 176* влияют доступность и количество углерода в среде. На безуглеродной среде Е-8, где склареол служит единственным источником углерода, грибы проводят глубокое ферментативное расщепление субстрата и образуют 7 - 8 стабильных метаболитов. Это свидетельствует о высоких потенциальных возможностях ферментативных систем исследуемых микромицетов. Однако образование большого числа метаболитов существенно усложняет их разделение и очистку до индивидуальных веществ. На среде Е-8 в присутствии глюкозы как дополнительного источника углерода образуется только 3 стабильных продукта трансформации склареола.

На основании ТСХ анализов, для препаративной ферментации и наработки метаболитов были отобраны штаммы *Penicillium sp. 176* и *Aspergillus sp. 120*, которые активно трансформируют склареол с образованием 5-ти метаболитов. Были изучены и сформулированы физиологические и биохимические характеристики активных культур *Penicillium sp.176* и *Aspergillus sp.120*, с идентификацией их как штаммы *Penicillium camemberti CNM-FP-03* и *Aspergillus alliaceus CNM-FA-01* и депонированием в Национальную коллекцию непатогенных микроорганизмов как культуры микроорганизмов, способные к трансформации склареола.

Предварительные исследования химической структуры полученных соединений позволили предположить, что трансформация склареола активным штаммом *Penicillium camemberti CNM-FP-03* протекает по окислительному пути, с формированием смеси из 7 индивидуальных продуктов – гомодримановые С(16) полифункциональные соединения (-СНО; -СООН; -ОН и α , β -ненасыщенный кетон).

Наибольший интерес представляет димеризованный продукт трансформации А-5 (химическая формула $C_{20}H_{22}O_7$), выделенный нами из кислой части неполярной фракции гидроксированных метаболитов. Это аморфное соединение А-5 впервые получено и описано нами в процессах трансформации склареола микроорганизмами ($T_{пл}$ 183-185 °С, $[\alpha]_D^{25} = -1258$ (С=0,055%, MeOH, l=100 мм). Выявленная биологическая и оптическая активность нового димерного соединения может быть обусловлена его химической структурой с хиральными углеродными атомами и внутримолекулярными водородными связями, которая в растворе, благодаря кето-енольной таутомерии, проявляется и в виде фенольной формы молекулы.

Получение и очистка необходимого количества метаболитов склареола позволило нам выявить их биологическую активность по отношению к фитопатогенным тест-культурам (табл. 2).



Таблица 2

Антибиотическое действие склареола и его производных
(диаметр зон лизиса, мм)

| Вариант опыта | <i>Pseudomonas syringae</i> 0010 | <i>Corynebacterium michiganense</i> 13 - A | <i>Corynebacterium citri</i> 0011 | <i>Erwinia carotovora</i> 8902 | <i>Xanthomonas campestris</i> 8003 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628 | <i>Aspergillus niger</i> 0012 |
|------------------|--------------------------------------|---|--|---------------------------------------|---|--|--------------------------------------|
| 1 | 10,7 | 10,0 | 10,0 | 0 | 10,0 | 10,0 | 0 |
| 2 | 16,5 | 11,0 | 16,7 | 13,2 | 14,7 | 18,2 | 16,7 |
| 3 | 13,2 | 13,0 | 13,7 | 13,0 | 15,2 | 13,0 | 0 |

П р и м е ч а н и е:

1. Культуральная жидкость *Penicillium camemberti* CNM-FP-03;
2. Склареол – «химический контроль»;
3. Метаболит А-5 – димеризованный продукт трансформации склареола.

Согласно данным, представленным в таблице 2, исследуемые тест-культуры были устойчивы к действию экстракта КЖ *Penicillium camemberti* + склареол. Размер зон лизиса изучаемых фитопатогенов под действием склареола варьирует от 11,0 до 18,0 мм. Бактерии *Pseudomonas syringae* (диаметр зоны лизиса – 16,5 мм), *Corynebacterium citri* (16,7 мм), *Agrobacterium tumefaciens* (18,2 мм) могут быть охарактеризованы как чувствительные к действию склареола.

Установлено антибиотическое действие склареола на грибы *Aspergillus niger*. В зоне лизиса диаметром 16,7 мм наблюдалось уменьшение плотности газона более чем на 50 %.

Диапазон негативного действия метаболита А-5 по отношению к испытуемым тест-культурам варьирует в пределах 13,0 - 15,2 мм – «средняя чувствительность» по шкале Биргер [6]. В то же время, угнетение роста фитопатогенов под действием метаболита А-5 было самым продолжительным (более 40 суток), в отличие от варианта «чистый склареол».

Таким образом, проведенные исследования подтвердили наличие биологической активности микробных метаболитов склареола. На основании полученных результатов был получен патент на штамм *Aspergillus alliaceus* CNMN FA 01 [11]. В дальнейшем был разработан лабораторный регламент для получения соединений с антимикробной активностью в процессе глубинного культивирования микроскопического гриба *Penicillium camemberti* CNMN FP-03.

Исследования химических структур полученных веществ позволяют предположить окислительный путь метаболизма склареола микромицетами родов *Penicillium* и *Aspergillus*, возможность получения ранее не известных продуктов его трансформации. Этот механизм ведет к окислительной деградации не только боковой цепи, но и цикла А декалиновой системы лабдановой структуры, а также к полифункционализации цикла В молекулы склареола. Под действием активных культур-трансформаторов происходит димеризация как исходных соединений, так и их производных, с



образованием кислородных мостиков у димеров.

Полученные данные представляют большой интерес в экологическом плане (утилизация отходов местной эфиромасличной промышленности) и для расширения арсенала химии природных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kouzi S.A., McChesney J.D. Microbial Metabolism of the Diterpene Sclareol // *Helvetica Chimica Acta*. — 1990. — Vol. 73. — P. 2157-2164.
2. Aranda G., Lallemand J.-I., Hammoumi A., Azerad R. Microbial Hydroxylation of Sclareol by *Mucor plumbeus* // *Tetrahedron Letters*. — 1991. — Vol. 32. — Nr. 15. — P. 1783-1786.
3. J.R.Hanson. The Microbiological Transformation of Diterpenoids // *Natural Product Reports*. — 1992. — Nr. 9. — P. 139-149.
4. Ерошин В.К., Перцовская А.Ф., Скрыбин Г.К. О росте гриба *mucorales* на парафине // *Микробиология*. — 1965. — Т. 34. — Вып. 5. — С. 883-887.
5. Курхнер Ю. Тонкослойная хроматография.—М.: Мир, 1981. — С. 222-284.
6. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. Под ред. М.О. Биргера.— М.: Медицина, 1982. — 464 с.
7. Raper K.B., Thom Ch. A manual of the Penicillia. Baltimore: Williams, Wilkins & Co, USA, 1949. — 817 p.
8. Raper K.B., Fennell D.I. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams, Wilkins & Co, USA, 1965. — 686 p.
9. Пугоничко Н.М. Пенициллин: Ключи для определения видов.—Киев: Наук. думка, 1972. — 150 с.
10. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы: Определитель.—К.: Наук. думка, 1988. — 204 с.
11. Cincilei A., Dvornikova T., Tolocikina S. Tulpina de fungii *Aspergillus alliaceus* CNMN FA 01 — destructoare a xenobioticelor // *Brevet de Invenție MD 2364*, 2004.

А.Г. Чинчлей¹, С.А. Толочкина¹, И.О. Растимешина¹, И.П. Драгалін²

¹ Институт микробиологии та біотехнології АНМ, вул. Академічна, 1, MD-2028 Кишинів, Молдова; тел.: +373 22 725055; angela_cincilei@yahoo.fr

² Институт химии АНМ, вул. Академічна, 1, Кишинів, Молдова.

НОВІ ПРОДУКТИ МІКРОБНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ СКЛАРЕОЛУ: ОТРИМАННЯ, ВЛАСТИВОСТІ, ОЦІНКА

Реферат

Вперше, серед місцевих мікроскопічних грибів, були відібрані активні штами, здатні до трансформації молекули склареолу на рівні периферичних окиснювально-відновних реакцій. Була детально досліджена швидкість розкладання та продукти мікробної трансформації склареолу, здійснено добір середовищ та оптимальних умов



для акумуляції цінних метаболітів склареолу активними штамми грибів родів *Aspergillus* та *Penicillium*. Отримані нові продукти біотрансформації склареолу, активні щодо деяких фітопатогенів. Штами *Penicillium camemberti* CNM-FP-03 і *Aspergillus allicaceus* CNM-FA-01 були ідентифіковані та депоновані в Національну колекцію непатогенних мікроорганізмів як культури мікроорганізмів, що здатні до трансформації склареолу.

К л ю ч о в і с л о в а: біотрансформація, лабдановий дитерпеноїд, склареол, мікроміцети, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*

A.G. Chinchlei¹, S.A. Tolochkina¹, I.O. Rastimeshina¹, I.P. Dragalin²

¹ Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM, Academicheskaya str., 1, Chisinau, Moldova;

² Institute of Chemistry of ASM, Chisinau, Moldova
Academicheskaya str., 1, MD-2028 Chisinau, Moldova, angela_cincilei@yahoo.fr

NEW PRODUCTS OF MICROBIOLOGICAL TRANSFORMATION OF SCLAREOL: CHARACTERISTICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Summary

For the first time, the active strains of local micro fungus were selected, responsible for the transformation of sclareol molecule at the peripheral level of oxidation-reduction reactions have been selected. The speed of biodegradation of sclareol and the optimal conditions for preparative gathering of the precious metabolites of sclareol by the active fungus of gg.*Aspergillus* and *Penicillium* have been thoroughly investigated. There were obtained new products of the sclareol biotransformation, with activity against some phytopathogens. The physiological and biochemical characteristics of active strains of *Penicillium sp.176*, *Aspergillus sp. 120* were formulated, with their further identification; the strains *Penicillium camemberti* CNM-FP-03 and *Aspergillus alliaceus* CNM-FA-01 were identified and deposited in the NCNM as the strains of microorganisms capable to the transformation of sclareol.

К e y w o r d s: biotransformation, diterpenoid sclareol, micromycetes, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*



УДК 579.646 31.46, 573.6.086.8/35

**С. А. Бурцева, Т.Ф. Сырбу, В.А. Сланина,
С.А. Толочкина, С.Н. Кодряну**

Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая 1, МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)725754,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

АНТАГОНИСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОЧВ МОЛДОВЫ

У выделенных из почв Молдовы новых 7 штаммов грибов рода *Penicillium*, 6 штаммов бактерий рода *Bacillus*, 2 — рода *Pseudomonas*, 6 — актиномицетов рода *Streptomyces* изучены антагонистические свойства в отношении ряда фитопатогенных бактерий и грибов, а также возбудителей микозов пчел. Выявлены штаммы бактерий родов *Bacillus* и *Streptomyces*, активно задерживающих или полностью подавляющих рост грибов *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* и *Fusarium graminearum*.

К л ю ч е в ы е с л о в а: почвенные грибы, бактерии, актиномицеты, антагонистические свойства.

Широкое использование микроорганизмов в биотехнологии основано на их разнообразии. В литературе последних лет приводятся многочисленные примеры использования микроорганизмов в промышленности: получение традиционных пищевых продуктов, аминокислот, нуклеотидов, антибиотиков, ферментов, биodeградируемых пластмасс, применение которых играет важную роль в решении экономических вопросов и проблемы загрязнения окружающей среды [1-5].

При получении новых лекарственных веществ более эффективен, в сравнении с химическим синтезом, поиск природных соединений, специфически действующих на определенные биохимические процессы. Так, поиск ингибитора роста клеточных стенок привел к обнаружению цефамицинов и нокардиоцинов, а изучение таких мало исследованных ранее родов актиномицетов как *Micromonospora*, *Actinoplanes* и *Chromobacterium* позволили выявить аминогликозиды, гликопептиды. Успешным оказался и направленный поиск веществ с иными типами фармакологической активности — антигельминтных соединений, иммуномодуляторов, ингибиторов ферментов и веществ с противоопухолевой активностью [6-8].

В настоящее время в арсенале сельскохозяйственной микробиологии имеется значительное количество препаратов и научных рекомендаций, целью использования которых являются экологизация сельского хозяйства и получение экологически безопасных видов микроорганизмов, имеющих практическое значение для растениеводства, животноводства, защиты растений, хранения и переработки сельхозпродукции [9].

© С.А. Бурцева, Т.Ф. Сырбу, В.А. Сланина, С.А. Толочкина, С.Н. Кодряну



Находят дальнейшее продолжение и исследования биологического метода борьбы с патогенными грибами и бактериями с помощью актиномицетов и бактерий [10-14]. Известны многочисленные сообщения об антагонистическом действии актиномицетов, бактерий рода *Bacillus* и рода *Pseudomonas* на фитопатогенные грибы и бактерии [10, 11, 14-18].

Целью нашего исследования являлось изучение антагонистических свойств новых штаммов микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы, и выявление потенциальных штаммов для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами и возбудителями микозов у пчел.

Материалы и методы

Объектами исследований служили 7 штаммов грибов рода *Penicillium*, 6 штаммов бактерий рода *Bacillus*, 2 — бактерии рода *Pseudomonas*, 6 — актиномицетов рода *Streptomyces*, которые были выделены из почвенных образцов чернозема карбонатного, слабогумусного (гумус 2,4 - 2,5 %) под кукурузой (без удобрений).

Изучение антимикробных свойств почвенных изолятов проводили с помощью метода агаровых блоков [20].

Исследуемые штаммы выращивали на средах, соответствующих их физиологическим потребностям: грибы — на агаризованном пивном сусле, бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas* — на питательном агаре, актиномицеты рода *Streptomyces* — на среде Чапека с глюкозой.

Тест-организмами служили фитопатогенные бактерии *Xanthomonas campestris 8003*, *Corynebacterium michiganense 13a*, *Pseudomonas fluorescens B-970*; грибы фитопатогенные и грибы, вызывающие микозы у пчел: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Fusarium graminearum*; дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula gracilis* и грамотрицательные бактерии *Escherichia coli B-60*.

После инкубирования тест-микроорганизмов в термостате при 28 °С (бактерии — 24 часа, грибы — 48 - 72 и дрожжи — 24 - 48 часов) измеряли диаметр зон задержки роста под действием исследуемых почвенных изолятов. Повторность опыта 6-кратная (по 2 блока каждого из изолятов в 3-х чашках Петри с соответствующим тест-организмом).

Результаты и их обсуждение

Сравнивая способность почвенных изолятов задерживать рост *E.coli B-60* в наших исследованиях, следует отметить, что у 7 изолятов грибов рода *Penicillium*, 2 штаммов бактерий рода *Bacillus*, штамма бактерий рода *Pseudomonas* и штамма актиномицетов рода *Streptomyces sp.37* она отсутствовала, тогда как 3 штамма бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus sp.12K*, *Bacillus sp.15K* и *Bacillus sp.33K*), штамм бактерий рода *Pseudomonas* (*Pseudomonas sp. 107*) и 3 штамма актиномицетов (*Streptomyces sp.10*, *Streptomyces sp.14* и *Streptomyces sp.17*) задерживали рост этого тест-организма (диаметр зон задержки роста 15,0 — 20,0 мм), и только у штамма бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus 64K*) и 2 штаммов стрептомицетов (*Streptomyces sp.23*, *Streptomyces sp.33*) активность была больше (22,5 — 30,0 мм).



Таблица 1

Антимикробная активность микроорганизмов, выделенных из почв Молдовы
(диаметр зоны ингибирования роста, мм)

| Антагонисты | <i>E.coli</i> B-60 | <i>Xanthomonas campestris</i> | <i>Corynebacterium michiganense</i> 13a | <i>Pseudomonas fluorescens</i> B-970 | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> N 11 | <i>Rodotorula gracilis</i> | <i>Aspergillus niger</i> | <i>Alternaria alternata</i> | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Fusarium solani</i> | <i>Fusarium graminearum</i> |
|---------------------------|--------------------|-------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <i>Penicillium</i> sp.2 | - | 12,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Penicillium</i> sp.4 | - | 14,0 | 12,0 | - | - | - | - | - | - | 12,0 | 12,0 |
| <i>Penicillium</i> sp.6 | - | 12,0 | - | - | - | - | 8,0 | - | - | 15,0 | 20,0 |
| <i>Penicillium</i> sp.7 | - | 12,0 | - | - | - | - | - | - | 15,0 | 18,0 | 20,0 |
| <i>Penicillium</i> sp.16 | - | 10,0 | - | - | - | - | - | - | 17,0 | 20,0 | 22,0 |
| <i>Penicillium</i> sp.17 | - | 10,2 | 15,0 | - | 13,0 | - | 16,0 | - | 15,0 | 20,0 | 25,0 |
| <i>Penicillium</i> sp.18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 12,0 | 12,0 |
| <i>Streptomyces</i> sp.10 | 15,0 | 14,0 | 14,0 | - | 13,0 | 14,0 | 16,0 | П.п. | П.п. | 14,0 | П.п. |
| <i>Streptomyces</i> sp.14 | 17,0 | 16,0 | 15,0 | - | - | 15,0 | 11,0 | 16,0 | 17,0 | 14,0 | 15,0 |
| <i>Streptomyces</i> sp.17 | 15,0 | 15,0 | 18,0 | - | - | - | 18,0 | 25,0 | П.п. | 11,0 | 13,0 |
| <i>Streptomyces</i> sp.23 | 30,0 | 1,0 | 25,0 | - | 13,0 | 27,0 | - | П.п. | 22,0 | - | 30,0 |
| <i>Streptomyces</i> sp.33 | 28,0 | - | 23,0 | - | 13,0 | 25,0 | - | П.п. | 24,0 | - | 25,0 |
| <i>Streptomyces</i> sp.37 | - | 10,0 | - | - | 14,0 | - | 16,0 | П.п. | 24,0 | 14,0 | 25,0 |
| <i>Bacillus</i> sp.12K | 17,0 | 17,0 | 17,5 | 38,0 | 25,5 | 16,0 | 19,5 | 29,0 | 21,0 | 19,5 | 21,0 |
| <i>Bacillus</i> sp.15K | 20,0 | 20,0 | 21,0 | 14,0 | 16,0 | 20,0 | 14,0 | 20,5 | 22,5 | 21,0 | 20,5 |
| <i>Bacillus</i> sp.31K | - | - | - | 19,5 | - | - | 18,0 | 30,0 | 23,5 | 19,0 | 15,0 |
| <i>Bacillus</i> sp.33K | 18,5 | 18,6 | 16,5 | 14,5 | 25,0 | - | 19,5 | 30,0 | - | 23,5 | 20,0 |
| <i>Bacillus</i> sp.38K | 13,5 | - | 11,0 | 12,5 | - | 14,5 | 37,5 | - | - | 12,0 | 17,5 |
| <i>Bacillus</i> sp.64K | 17,5 | 22,5 | 22,5 | 21,0 | 19,0 | 19,0 | 14,5 | 28,0 | - | 12,0 | 17,0 |
| <i>Pseudomonas</i> sp.107 | 14,0 | 16,0 | 18,0 | - | - | - | 10,0 | 18,0 | 20,0 | 16,0 | 12,0 |
| <i>Pseudomonas</i> S-II | - | - | 6,0 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Примечание: * — диаметр зоны ингибирования роста тест-культуры микроорганизмов.

Проявление антимикробных свойств в отношении *Pseudomonas fluorescens* B-970 замечено у выделенных нами грибов и актиномицетов. У бактерий рода *Bacillus* антимикробная активность к этому тест-организму варьировала в широких пределах (диаметр зон задержки роста от 12,5 до 38,0 мм). Так, например, слабая антимикробная активность была у штаммов *Bacillus* sp. 38K, *Bacillus* sp. 33K и *Bacillus* sp. 15K (12,5 — 14,5 мм), средняя — у штамма *Bacillus* sp. 64K (до 21,0 мм) и самая высокая — у штамма *Bacillus* sp. 12K (до 38,0 мм).

Рост представителей фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris*, вызывающих сосудистый бактериоз капусты, слабо задерживали грибы рода *Penicillium*, актиномицеты рода *Streptomyces* и бактерии рода *Pseudomonas* (диаметр зон ингибирования — от 12,0 до 16,0 мм). Из бактерий рода *Bacillus* 4 штамма (*Bacillus* sp. 12K, *Bacillus* sp. 15K, *Bacillus* sp. 33K и *Bacillus* sp. 64K) обладали средней активностью (17,0 — 20,0 мм).

Способность задерживать рост другого представителя фитопатогенных бактерий *Corynebacterium michiganense* 13a, который вызывает бактериальный рак томатов, не обнаружена у 5 штаммов грибов, штамма актиномицетов (*Streptomyces* sp. 37), тогда как у бактерий рода *Bacillus* антагонистические свойства проявлялись в разной степени (зоны задержки роста — от 11,0 до 24,0 мм). Наиболее активным антагонистом оказался штамм *Bacillus* sp. 64K (22,0 — 24,0 мм).



Не выявлена антимикробная активность по отношению к дрожжам у грибов и бактерий рода *Pseudomonas*. По-разному проявлялись антимикробные свойства по отношению к дрожжам у бактерий рода *Bacillus* и актиномицетов. Так, например, бактерии активнее, чем актиномицеты, задерживали рост *Saccharomyces cerevisiae*: у 2-х штаммов (*Bacillus sp.* 12K и *Bacillus sp.* 33K) чувствительность была средней (25,5 и 25,0 мм соответственно). В отношении *Rhodotorula gracilis* антимикробная активность бактерий рода *Bacillus* проявлялась в меньшей степени (у 4-х штаммов она составляла 14,5 – 20,0 мм).

Среди актиномицетов штамм *Streptomyces sp.* 17 не проявлял антагонистических свойств по отношению к дрожжам, стрептомицеты *Streptomyces sp.* 14 и *Streptomyces sp.* 37 задерживали рост только 1 штамма дрожжей, тогда как штамм *Streptomyces sp.* 10 обладал способностью задерживать рост обеих дрожжевых тест-культур, хотя диаметр зон задержки роста был небольшим (13,0 - 14,0 мм). У 2 других штаммов стрептомицетов (*Streptomyces sp.* 23 и *Streptomyces sp.* 33) антагонистические свойства проявились в большей степени по отношению к *Rhodotorula gracilis* (27,0 и 25,0 мм соответственно), чем к *Saccharomyces cerevisiae* (13,0 мм).

К выбранным в качестве тест-организмов грибам у исследуемых почвенных изолятов, антагонистические свойства отличались большой вариабельностью. Так, например, у бактерий рода *Pseudomonas* штамм S-11 не обладал способностью задерживать рост грибов рода *Fusarium*, тогда как штамм *Pseudomonas sp.* 107 обладал этой способностью. Диаметр зон ингибирования варьировал от 12,0 до 17,0 мм. У *Fusarium solani* зоны были 15,0 – 17,0 мм.

Под воздействием бактерий рода *Bacillus*, у тест-штаммов грибов рода *Fusarium* зоны задержки роста варьировали от 12,0 до 23,5 мм, причем зоны больше были у *Fusarium solani* (19,0 – 23,5 мм).

У 6 штаммов грибов рода *Penicillium* проявлялась способность задерживать рост грибов рода *Fusarium*. Диаметр зон варьировал от 15,0 до 25,0 мм. Большие зоны ингибирования наблюдались у *Fusarium graminearum* (20,0 – 25,0 мм).

Значительное разнообразие в проявлении антагонистических свойств к представителям рода *Fusarium* замечено у почвенных изолятов, относящихся к разным видам рода *Streptomyces*. Так, например, у 2 штаммов они практически отсутствуют, 4 штамма стрептомицетов слабо задерживают рост этих тест-организмов (11,0 – 15,0 мм). Под действием метаболитов 3 штаммов стрептомицетов зоны задержки роста *Fusarium graminearum* достигали диаметра 25,0 – 30,0 мм. Среди стрептомицетов выявлен активный антагонист, вызывающий в условиях наших опытов полное подавление роста указанной тест-культуры (*Streptomyces sp.* 10). Данные, представленные в таблице 1, показывают, что у изучаемых штаммов рода *Pseudomonas* антимикробная активность в отношении такого фитопатогенного гриба как *Alternaria alternata* очень слабая, тогда как среди изучаемых бактерий рода *Bacillus* выявлено 4 активных антагониста. Из грибов рода *Penicillium* не удалось выявить штаммы с антимикробной активностью по отношению к этому тест-организму. Согласно проведенным исследованиям, самыми активными антагонистами среди изучаемых почвенных изолятов, оказались 4 штамма актиномицетов, которые полностью подавляли рост этого штамма.

Из всех изученных почвенных изолятов только у бактерий рода *Bacillus* были обнаружены антагонистические свойства по отношению к *Pseudomonas fluorescens B-970*. Из них 3 штамма были с низкой антагонистической активностью (зоны от 12,5 до 14,5 мм), 2 штамма со средней активностью (19,5 – 21,0 мм) и 1 штамм (*Bacillus sp.* 12K) — с высокой активностью (38,0 мм).



Таким образом, проведенные исследования показали, что почвенные изоляты (бактерии рода *Bacillus* и *Pseudomonas*, грибы рода *Penicillium*, актиномицеты рода *Streptomyces*) в той или иной степени способны подавлять рост культур, используемых в качестве тест-организмов, в т.ч. представителей фитопатогенных бактерий и грибов, а также дрожжей. Наибольшую чувствительность фитопатогенные бактерии проявили к почвенным изолятам — представителям рода *Bacillus* и актиномицетам рода *Streptomyces*.

Выявлены штаммы бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus* sp. 15К и *Bacillus* sp. 64К), а также 2 штамма стрептомицетов (*Streptomyces* sp. 23 и *Streptomyces* sp. 33), которые активно подавляли рост *E.coli*. Установлена способность бактерий рода *Bacillus* задерживать рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а рост *Rhodotorula gracilis* — у 2 штаммов стрептомицетов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bull Alan T. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. // Annu. Rev. Microbiol. Vol. 46. Palo Alto (Calif.), 1992 — p. 219 — 252.
2. Fox F.M. The importance of microbial biodiversity to biotechnology. ICCS — VII; 7 th Int. Congr. Culture Collections, Beijing, Oct. 12 — 16, 1992, (Beijing, 1993), p.13-14.
3. Komazata Kazuo. Microbial diversity and application of microorganismes. Res. Commun. Inst. Ferment. Osaca. 1995, 17, p. 31 — 43.
4. Brandl Helmut. Von Nutzen der Mikroben: Bakterien als Helfer bei der Produktion von industriellen Werkstoffen. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zurich. — 1998. — 143, N 4. p.157 — 164.
5. Флинт В.Е., Смирнова О.В. и др. Сохранение и восстановление биоразнообразия. — М. Науч. и учеб. метод. центр, 2002. 289 с.
6. Garrity George M., Bostian Keith A. A chieving chemical diversity through microbial diversity. The search for new therapeutic agents.// ICCS — VII; 7 th Int. Congr. Culture Collections, Beijing, Oct. 12 — 16, 1992, (Beijing, 1993). С.11.
7. Sussmuth R.D., Wohlleben W. The biosynthesis of glucopeptide antibiotics - a model for complex, non-ribosomally synthesized peptidic secondary metabolites. //Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 2004. — 63, 4, P. 344 - 450.
8. Петрук Т.В. Синтез, біологічна активність авермектинового комплексу *Streptomyces avermitilis*: Автореф. дис. канд. біол. наук. К., 2005. — 21 с.
9. Ослежкин Ю.С. Место и роль коллекций микроорганизмов в системе биотехнологического контроля. //Агро XXI. — 1997.— № 5. — С. 8-9.
10. Захарова Н.Г., Алимova С.К., Егоров С.Ю. Скрининг микроорганизмов, перспективных для биотехнологии. //Конф. «Интродукция микроорг. в окруж. среду», (М. 17-19 мая, 1994г.): тез. докл. — М., 1994. — С. 36.
11. Колomieц Э.И., Згор Н.А., Романовская Т.В. и др. Антигрибная и антибактериальная активность актиномицетов, разлагающих лигноцеллюлозу. // Прикладная биохимия и микробиология. — 1994. — т. 30, в. 4-5. — С. 644-649.
12. Nishimura Tomio, et.all. An endophytic actinimycete, *Streptomyces* sp. АОК — 30, isolated from mountain laurel and its antifungal actyvity. // J. Gen. Plant Pathol. — 2002. — 68, 4, P. 390 — 397.
13. Bressan Wellington. Biological control of maize seed patogenic fungi by use of actinomycetes. //Biocontrol. — 2003. — 48, 2, P. 233 — 240.
14. Sahin Nurettin. Antimicrobial activity of *Streptomyces species* against blotch disease pathogen. //J. Basic microbiol. — 2005. — 45, N 2. — P. 64—71.
15. Родигин В.Н., Железняк М.В. Антагонистические действия *Bacillus fluoringiensis bert.* на фитопатогенные грибы. //Всес. конф. «Микроорганизмы, стимулирующие и регенерирующие рост растений и животных».



(Ташкент, 3 – 5 октября 1989 г.): тез. докл. — Ташкент, 1989. — С. 165.

16. Смирнов В.В., Куприанова Е.А. и др. Антимикробные и энтомопатогенные свойства *Pseudomonas aureofaciens*. //Прикладная биохимия и микробиология. — 1999. — т. 35, № 4. — С. 413 – 416.

17. Тодорова С. Таксономично определене на *B. subtilis* подтискалщ растежа на фитопатогении микроорганизми. //Докл. Научната сессия РУ/СУО2, Русе. — науч.тр. Сер. 4.3. Русен.унив. 2002. — 39. С. 103 – 108.

18. Мелентьев А.И. Бактерии — антагонисты фитопатогенных грибов. //Агро. XXI. — 2001. — № 11. С. 10 – 11.

**С.А. Бурцева, Т.Ф. Сирбу, В.О. Сланина, С.А. Толочкина,
С.М. Кодряну**

Институт микробиологии та биотехнологии АНМ, вул. Академична, 1,
МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)725754,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НОВИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ ҐРУНТІВ МОЛДОВИ

Реферат

Встановлено, що активними антагоністами фітопатогенних грибів *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* та *Fusarium graminearum* є вилучені з ґрунту Молдови представники роду *Streptomyces* та бактерії роду *Bacillus*. Значно менше антимікробні властивості виявляли гриби роду *Penicillium* та бактерії роду *Pseudomonas*. Ріст дріжджів ці штами затримували активніше за інших.

К л ю ч о в і с л о в а: ґрунтові гриби, бактерії, актиноміцети, антагоністичні властивості.

S.A. Burtseva, T.F. Syrbu, V.A. Slanina, S.A. Tolochkina, S.N. Kodryanu

Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM
Akademicheskaya str., 1, MD-2028, Chisinau, Moldova, tel: (373 22)725754,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

ANTAGONISTIC PROPERTIES OF NEW MICROORGANISMS STRAINS ISOLATED FROM THE SOILS OF MOLDOVA

Summary

There was established that active antagonists against phytopathogenic fungi *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum* were representatives of *Streptomyces spp.* and *Bacillus spp.*, isolated from Moldova soil. The fungi of *Penicillium spp.* and *Pseudomonas spp.* bacteria have possessed antimicrobial qualities to a smaller extent. These strains have more actively inhibited the growth of yeast than others.

Key words: fungi, bacteria, actinomycetes, antagonistic properties.



**А.А. Десятник¹, Ж.П.Тюрина¹, С.В. Лаблюк¹,
О.А. Болога², А.Г. Лазареску²**

¹ Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая 1, МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)725754, e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

² Институт химии АНМ, Академическая, 1, Кишинев, Молдова

ОСОБЕННОСТИ БИОСИНТЕЗА ЛИПАЗ ШТАММОМ *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01L НА СРЕДАХ ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА

*Приведены сведения по использованию комплексных соединений (КС) микроэлементов для регуляции биосинтеза микробных липаз. Штамм *Aspergillus niger* CNMN FD 01L, отобранный как перспективный продуцент внеклеточных ферментов липолитического действия, синтезирует неспецифические липазы, гидролизующие все эфирные связи триглицеридов независимо от их положения. Установлено, что использование комплексного соединения не влияет на проявление максимума накопления липолитической активности, который наблюдается на 5 сутки культивирования продуцента как в контрольной, так и в оптимизированной вариантах сред и составляет 12558 ед/мл и 17731 ед/мл, соответственно.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: липазы, *Aspergillus niger*, комплексные соединения кобальта и железа, стимуляторы биосинтеза.

Липазы (К.Ф.3.1.1.3 — триацил-глицерол-гидролазы) играют важную роль в метаболизме липидов и регуляции липидзависимых функций в живых организмах и являются уникальной группой ферментов, поскольку катализируемые ими реакции протекают на границе раздела фаз в гетерогенной системе: масло — вода или мицелла — вода [1]. Это значительно повышает теоретический интерес к их изучению и расширяет границы их практического использования.

Благодаря своим гидролитическим способностям, они широко используются в кожевенной, масложировой промышленности, в сыроделии, в производстве моющих средств, лекарственных препаратов. Известны такие лечебные препараты, как фестал, мезим-форте и др., которые в качестве основного действующего начала содержат микробную липазу. Кроме того, в последние годы выявлено, что они обладают рядом еще и других уникальных особенностей — катализировать реакции этерификации и переэтерификации, ацилирования и алкилирования, осуществлять реакции синтеза глицеридов и т.д. [2,3,4].



В настоящее время для получения липаз, как и многих других ферментов, используют, в основном, микроорганизмы, которые осуществляют синтез этих веществ за короткий цикл развития и на доступных питательных средах [5,6]. Кроме того, большинство микроорганизмов обладают способностью продуцировать внеклеточные ферменты, активность которых во много раз превышает активность внутриклеточных [7].

Учитывая высокую потребность в микробных липазах в вышеназванных отраслях народного хозяйства и теоретический интерес к изучению и активации метаболических процессов их продуцентов, перспективными являются исследования по выявлению возможности регуляции и направленного синтеза липолитических ферментов микромицетов с помощью комплексных соединений микроэлементов.

Микроэлементы в составе минеральных солей не нашли широкого применения ни в медицине, ни в сельском хозяйстве ввиду их высокой токсичности и малой эффективности. Однако координационно-связанные микроэлементы, по своей структуре близкие к биологическим макромолекулам (гемоглобин, хлорофилл, миоглобин и др.), менее токсичны и более реакционноспособны [8] и могут быть использованы в качестве стимуляторов синтеза биологически активных веществ, что подтверждено исследованиями, проведенными на микроводорослях и цианобактериях [9].

Однако сведений по использованию комплексных соединений микроэлементов для регуляции биосинтеза микробных липаз очень мало, что делает актуальным проведение подобных исследований [10].

Материалы и методы

Объектом биологических исследований служил штамм микромицета *Aspergillus niger* CNMN FD 01L, отобранный как перспективный продуцент внеклеточных ферментов липолитического действия. Штамм хранится в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов Республики Молдова при Институте микробиологии и биотехнологии АНМ.

Культивирование штамма осуществлялось при температуре 28 °С в конических колбах Эрленмейера объемом 750 мл, на качалке (180 — 200 об/мин), на среде подобранного состава (г/л): соевая мука — 35,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,0; KH_2PO_4 — 5,0; pH 7,0-7,2; объем питательной среды — 100 мл. В качестве посевного материала использовалась водная суспензия спор 14-дневной культуры, выращенной на скошенной сусло-агаровой среде, в количестве 10 % от инокулированного объема в концентрации 10⁶ спор/мл. Продолжительность культивирования продуцента составила 5 суток.

Для усиления биосинтетических способностей штамма использовались комплексные соединения кобальта и железа: $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$.

В оптимизированные варианты сред комплексные соединения вносились в расширенном диапазоне концентраций: 5, 10, 15, 20, 30 мг/л. Среда без добавления комплексных соединений служила контролем.

Для выявления оптимальной продолжительности культивирования продуцент выращивался в течение 2, 3, 4, 5, 6 суток на среде, содержащей выявленную оптимальную концентрацию (15 мг/л) отобранного комплексного соединения.

Липолитическую активность определяли по расщеплению оливкового масла до олеиновой кислоты, используя модифицированный метод Ота-Ямада [11, 12].

За единицу активности липазы принимали такое количество фермента



(культуральной жидкости), которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40 % эмульсии оливкового масла в поливиниловом спирте при рН 7,2 и температуре 37 °С в течение 1 часа.

Результаты и их обсуждение

Микроорганизмы, находясь в постоянном контакте с внешней средой, приспособились быстро и точно реагировать на происходящие в ней изменения, перестраивая свои ферментные системы. Эта физиологическая изменчивость микроорганизмов позволяет использовать их для получения активных ферментов со специальными и заранее заданными свойствами, используя для этого различные факторы. Одним из таких факторов является применение комплексных соединений микроэлементов в качестве стимуляторов биосинтеза и стабилизаторов активности ферментов. Микромицет *Aspergillus niger* CNMN FD 01L в лаборатории энзимологии Института микробиологии и биотехнологии АНМ был отобран как перспективный продуцент липолитических ферментов. Изучены его физиолого-биохимические особенности и подобраны оптимальные условия культивирования [13].

Для повышения энзиматической активности штамма была исследована большая группа комплексных соединений Co, Fe, Ni, Cu, Zn и др. (около 55), содержащих в составе лигандов пиридин, анилин, тиокарбамид, метил- и диметилглиоксим, аминокислоты (метионин, глицин, валин) и т.д.

Полученные результаты показали, что использованные комплексные соединения могут оказывать на процесс липолиза как ингибирующее, так и стимулирующее воздействие. При этом получаемый эффект определяется влиянием как атома комплекссообразователя, так и входящего в их состав лиганда, что наглядно было показано при изучении новых диоксидов Co(III) [10]. Этот факт свидетельствует о том, что комплексные соединения нельзя рассматривать только как обычные компоненты питательной среды, которые поставляют продуценту углерод, водород, азот и необходимые ему микроэлементы. Очевидно, механизм их воздействия значительно сложнее и определяется особенностями их молекулярного строения.

Известно, что ферментные белки, секретируемые в культуральную жидкость, принимают свойственную им конфигурацию уже после завершения секреции, находясь на наружной поверхности цитоплазматической мембраны [14].

Учитывая сложность строения комплексных соединений, а также высокую избирательность клеточных мембран, затрудняющую их проникновение внутрь клетки, вероятно, именно здесь происходит взаимодействие комплексных соединений с ферментными белками. В зависимости от состава и структуры комплексные соединения могут или содействовать в формировании функционально активных молекул фермента, или нарушать этот процесс, оказывая ингибирующий эффект.

По результатам первичного скрининга в качестве возможных стимуляторов биосинтеза липаз штаммом *Aspergillus niger* CNMN FD 01L были отобраны три вещества: $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$.

Поскольку возникновение стимулирующего эффекта определяется не только составом комплексного соединения, но и его концентрацией, вещества вносились в питательную среду в расширенном диапазоне концентраций (от 5 до 30 мг/л) для выявления наиболее оптимальной.

Согласно полученным результатам (табл.1), комплексное соединение $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ подтвердило свой стимулирующий эффект, в отличие от двух других ($\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$), которые не дали положительных результатов.

Оптимальное воздействие комплексного соединения $[\text{Co}(\text{Mg})_2 \cdot \text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ наблюдается при концентрации 15 мг/л.



Таблица 1

**Изменение липолитической активности микромицета
Aspergillus niger CNMN FD 01L под влиянием
комплексных соединений кобальта и железа**

| Комплексное соединение | Концентрация, мг/л | Активность | |
|--|--------------------|------------|--------|
| | | ед/мл | % |
| [Co(MgH) ₂ ·Py ₂]·BF ₄ ·H ₂ O | 5 | 11250 | 92,79 |
| | 10 | 12375 | 102,07 |
| | 15 | 15750 | 129,9 |
| | 20 | 12375 | 102,07 |
| | 30 | 11250 | 92,79 |
| Co-Digsemi·Cl ₂ ·4H ₂ O | 5 | 13567 | 111,9 |
| | 10 | 11882 | 98,0 |
| | 15 | 11250 | 92,79 |
| | 20 | 10125 | 83,51 |
| FeO ₃ ·Met | 30 | 5625 | 46,39 |
| | 5 | 12375 | 102,07 |
| | 10 | 11250 | 92,79 |
| | 15 | 10125 | 83,51 |
| Контроль | - | 12124 | 100,0 |

Липолитическая активность штамма при использовании этой концентрации составила 15750 ед/мл, а в контрольном варианте (без использования комплексного соединения) – 12124 ед/мл, что свидетельствует о повышении липолитической активности на 29,9 %.

В дальнейшем было изучено изменение липолитической активности микромицета при глубинном выращивании на контрольных и оптимизированных вариантах сред в зависимости от продолжительности культивирования. В оптимизированные варианты сред, кроме основных компонентов – KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄ и соевой муки, вносилось комплексное соединение [Co(MgH)₂·Py₂]·BF₄·H₂O в подобранной оптимальной концентрации – 15 мг/л. Динамика липолитической активности в культуральной жидкости продуцента определялась в течение 6 суток.

Анализ полученных результатов (таблица 2) показывает, что стимулирующий эффект проявляется уже на вторые сутки культивирования продуцента и именно в этот период достигается его максимум – 49,9 %. Можно предположить, что внесение в среду комплексного соединения как бы ускоряет процесс образования функционально активных молекул липолитического фермента.

Таблица 2

Динамика липолитической активности продуцента *Aspergillus niger* CNMN FD 01L при культивировании его на исходной среде (контроль) и на среде с 15 мг/л [Co(MgH)₂·Py₂]·BF₄·H₂O (оптимизированный вариант)

| Сутки | Активность | | | |
|-------|------------|-------|----------|-------|
| | ед/мл | | % | |
| | Контроль | Опыт | Контроль | Опыт |
| 2 | 375 | 562 | 100 | 149,9 |
| 3 | 3750 | 5250 | 100 | 140,0 |
| 4 | 9187 | 12549 | 100 | 136,6 |
| 5 | 12558 | 17041 | 100 | 135,7 |
| 6 | 2775 | 3937 | 100 | 141,9 |



Установлено также, что комплексное соединение не влияет на проявление максимума накопления липолитической активности, который наблюдается на 5 сутки культивирования продуцента, как в контрольных, так и в оптимизированных вариантах сред и составляет 12558 ед/мл и 17731 ед/мл, соответственно (рис. 1).

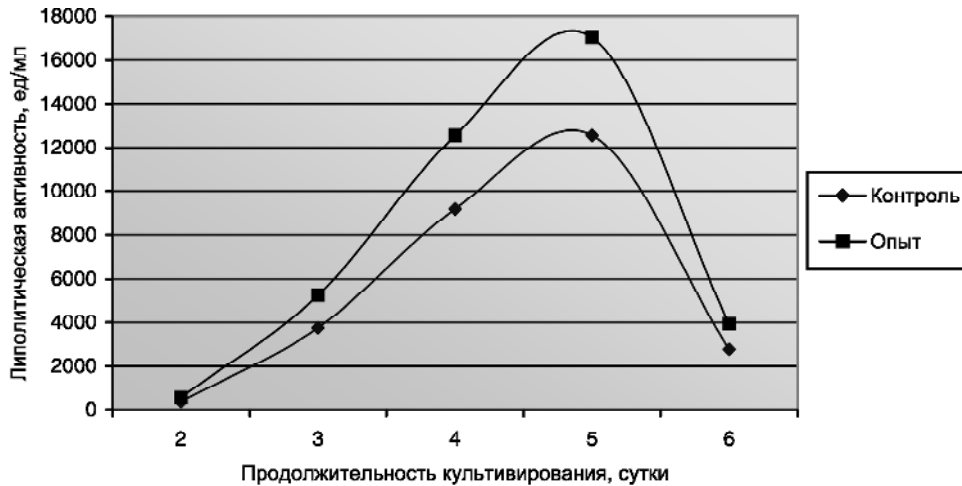


Рис. 1. Динамика липолитической активности продуцента *Aspergillus niger* CNMN FD 01L при культивировании его на исходной среде (контроль) и на среде с 15 мг/л $[\text{Co}(\text{MgH})_2 \cdot \text{Pu}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (оптимизированный вариант)

Анализируя динамику накопления липаз в культуральных жидкостях, можно отметить снижение величины стимулирующего эффекта в стационарной фазе (4 — 5 сутки) с 49,9 % (2-е сутки) до 36,9 — 35,7 %. Этот факт можно объяснить тем, что стационарная фаза и без использования комплексных соединений характеризуется интенсивным накоплением целевых продуктов с высоким уровнем активности.

В подобранных условиях получен ферментный препарат с липолитической активностью 700000-800000 ед/г, оптимум активности при температуре 40 °С и рН 7,0.

Для рационального использования микробных липаз необходимо учитывать специфичность фермента к типу гидролизуемых связей [15]. Штамм *Aspergillus niger* CNMN FD 01L синтезирует неспецифические липазы, гидролизующие все эфирные связи триглицеридов независимо от их положения. Такие липазы эффективны для использования в биотехнологических процессах, связанных с получением чистого глицерина и жирных кислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. — М.: Мир, 1978, — 396 с.
2. Давранов К. Микробные липазы в биотехнологии (обзор) // Прикл. биох. и микр. — Т. 30, вып. 4-5, 1994. — С. 527-534.
3. Безбородов А.М. Ферментативные реакции в биотехнологии // Прикл.



биох. и микр.— 1992, Т. 28, № 6.— С. 801-817.

4. Дарванов Л.Д., Халамейзер В.Б., Вагина О.Н. Синтетазная активность липазы *Penicillium* sp. в водной среде и системе обращенных мицелл // Прикл. биох. и микр., — 1996, Т. 32, №4. — С. 386-388.

5. Безбородов А.М. Биотехнология продуктов микробного синтеза.— М.: Агропромиздат, 1991. — 238 с.

6. Рубан Е.А. Ферменты микроорганизмов и их практическое использование. — М.: Изд-во МГУ, 1976. — С. 3-42.

7. Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. — М.: Мир, 1987. — 117 с.

8. Парпиев Н.А., Кушакбаев А., Азимов М.М. Координационные соединения металлов с лекарственными препаратами. — Ташкент: ФАН, 1982. — 138 с.

9. Rudic V. Aspecte noi ale biotehnologiei moderne. Chisinau: Stiinta, 1993, 140 p.

10. Десятник А.А., Сырбу Т.Ф., Корочану Э.Б., Тюрина Ж.П., Лаблюк С.В. Увеличение липолитической активности штамма *Aspergillus niger* CNMN FD 01L под влиянием координационных соединений // Изв. АНМ биол. хим. и сел.-хоз. науки. — 2003. — №2 (291). — С. 112-117.

11. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов.— М.: Легкая и пищ. пром., 1980. — С.75-76.

12. Рубан Е.А. Микробные липазы и липиды. — М.: Наука, 1977. — С. 216.

13. Deseatnic A., Sorbu T., Tiurin J., Labliuc S. Tulpina de fungi *Aspergillus niger* CNMN FD 01L - producatoare de enzime lipolitice. Brevet de inventie № 2362 ВОРІ, №1, 2004, p 32.

14. Феоктистова Н.В., Знаменская И.В., Лещинская И.В. Влияние ионов металлов на синтез внеклеточных ферментов спорообразующими бактериями. — М.: «Высш. шк.», 1992. — № 2 (338). — С. 19-24. — (Сер.: Биол. науки).

15. Давранов К.Д., Халамейзер, Розмухамедова Б.Х. Специфичность липаз мицелиальных грибов к типу сложноэфирных связей триглицеридов // Прикл. биох. и микр. — 1996. — Т. 32, № 3. — С. 294-297.

О. А. Десятник¹, Ж.П. Тюрина¹, С.В. Лаблюк¹, О.А. Болога², А.Г. Лазареску²

¹ Институт мікробіології і біотехнології АНМ, вул. Академічна, 1, МД-2028, Кишинів, Молдова, тел: (373 22)725754, e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

² Институт хімії АНМ, вул. Академічна, 1, Кишинів, Молдова

ОСОБЛИВОСТІ БИОСИНТЕЗУ ЛІПАЗ ШТАМОМ *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01L НА СЕРЕДОВИЩАХ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ

Реферат

Наведені відомості по використанню комплексних сполук (КС) мікроелементів для регуляції біосинтезу мікробних ліпаз. Об'єктом біологічних досліджень слугував мікроміцет *Aspergillus niger* CNMN FD 01L, відібраний як перспективний продуцент позаклітинних ферментів, що мають ліполітичну дію. Штам *Aspergillus niger* CNMN FD 01L синтезує неспецифічні ліпази, що гідролізують усі ефірні зв'язки тригліцерину незалежно від їхнього положення.

Щодо підвищення ензиматичної активності штаму, було протестовано близько 60-ти комплексних сполук Co, Fe, Ni, Cu, Zn, які містять



у складі лігандів піридин, аналан, тіокарбамід, метил-та диметилглі-
оксим, амінокислоти (метіонін, гліцин, валін).

За результатами первинного скринінгу три речовини: $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Co} \cdot \text{Digsemi} \cdot \text{Cl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeO}_3 \cdot \text{Met}$ було відібрано як стимулятори біосинтезу ліпаз у штаму *Aspergillus niger* CNMN FD 01L. Максимальний ефект зареєстровано у варіанті з використанням комплексної сполуки $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2] \cdot \text{BF}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ у концентрації 15 мг/л.

Встановлено, що використання комплексної сполуки не впливає на виявлення максимуму накопичення ліполітичної активності, який спостерігається на 5-у добу культивування продуцента, як у контрольному, так і в оптимізованому варіантах середовищ і складає 1258 од/мл та 17731 од/мл, відповідно.

К л ю ч о в і с л о в а: ліпази, *Aspergillus niger*, комплексні сполуки кобальта і заліза, стимулятори біосинтезу.

A.A. Desyatnic¹, J.P. Tiurina¹, S.V. Labliuc¹, O.A. Bologa², A.G. Lazarescu²

¹Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM, Academichna str.,1, md 20-28, Chisinau, Moldova.

²Institute of Chemistry of ASM, Academichna str.,1, md 20-28, Chisinau, Moldova.

THE PECULIARITIES OF THE LIPASES BIOSYNTHESIS BY *ASPERGILLUS NIGER* CNMN FD 01L STRAIN ON THE MEDIA WITH OPTIMAL COMPOSITION

Summary

The article contains data referring to the using of coordinative compounds of microelements for the regulation of the biosynthesis of microbial lipases. As the object of biological investigations *Aspergillus niger* CNMN FD 01L strain, selected as perspective producer of exocellular enzymes with lipolytic action was used. *Aspergillus niger* CNMN FD 01L strain synthesize unspecific lipases, which hydrolyse all the ester binding of triglyceride independent of their location.

For increasing of enzymatic activity of the strain there were studied about 60 coordinative compounds of Co, Fe, Ni, Cu, Zn and other, containing in ligands composition pyridine, aniline, thiocarbamid, metil- and dimetilglioxime, amino acids (methionin, glicin, valin) etc.

In the result on the first screening three substances: $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2]\cdot\text{BF}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}\cdot\text{Digsemi}\cdot\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeO}_3\cdot\text{Met}$ have been selected as possible stimulators of the lipases biosynthesis by *Aspergillus niger* CNMN FD 01L strain.

Maximum effect was registered in the variant with the coordinative compound: $[\text{Co}(\text{MgH})_2\cdot\text{Py}_2]\cdot\text{BF}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ in concentration 15 mg/l.

Also, it was established the using of coordinative compounds has not influenced the maximum of lipases accumulation, which is shown at the 5th day of producer cultivation on the control medium (without coordinative compound) as well as on the optimized medium, being 12558 u/ml and 17731 u/ml, respectively.

К e y w o r d s: lypazes, *Aspergillus niger*, combinations of cobalt and iron, stimulators of biosynthesis.



Г.В. Ямборко, І.Л. Соловійова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, yamborko@sky.od.ua

ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ СПОСОБІВ ЗБЕРІГАННЯ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS*

*Проведено вивчення ефективності різних способів зберігання (ліофілізація, висушування у завислому (киплячому) шарі інертного матеріалу та під стерильною вазеліною оливою) 4 штамів бактерій роду *Lactobacillus* з колекції культур кафедри мікробіології та вірусології ОНУ: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* N2, *L. acidophilus* 317/402, *L. acidophilus* OL4. Спосіб висушування культур у киплячому шарі інертного матеріалу забезпечував максимальний рівень виживання досліджуваних штамів лактобацил та збереження їх антагоністичних властивостей протягом 36 місяців.*

К л ю ч о в і с л о в а: лактобацили, способи зберігання, життєздатність, антагоністичні властивості.

Актуальною проблемою є пошук способів тривалого зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus*, основним завданням якого є підтримка їх життєздатності, таксономічно важливих та біотехнологічних ознак. Вирішення проблеми довготривалого зберігання мікроорганізмів полягає в забезпеченні умов анабіозу, тобто в гальмуванні процесів обміну речовин. В колекціях культур життєздатність мікроорганізмів підтримується переважно шляхом субкультивування, зберігання під шаром вазелінової оливи, за низьких та ультранизьких температур, у висушеному стані на фільтрувальному папері та у ліофільно висушеному стані [1]. Однією з причин зниження життєздатності культур бактерій та їх фізіологічної активності в процесі зберігання різними методами є зміна складу мікробної популяції під дією ряду фізико-хімічних факторів зовнішнього середовища, а також накопичення у культурі біохімічно неактивних дисоціантів [2].

Метою даної роботи було порівняння ефективності різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* з колекції культур кафедри мікробіології та вірусології ОНУ. Задачі роботи включали дослідження життєздатності лактобацил за різних умов довгострокового зберігання та вивчення їх антагоністичної активності щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були штами бактерій роду *Lactobacillus*, що застосовуються як стартерні культури при виробництві комерційних препаратів і



продуктів лікувально-профілактичного призначення: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, і штамп *L. acidophilus* OL4, ізольований з некомерційного кисломолочного продукту, виготовленого в Одеському регіоні. Штамп *L. acidophilus* 317/402 (кисломолочний продукт «Наріне», Україна) використовували як контроль. Вирощування лактобактерій проводили у рідкому середовищі MRS [3] за умов періодичного культивування протягом 10 годин. Біомасу досліджуваних штамів лактобацил концентрували методом ультрафільтрації в кінці логарифмічної фази росту; загальна кількість клітин лактобактерій у 1 см³ рідкого концентрату дорівнювала 1 - 2 x 10¹⁰. Для довгострокового зберігання бактерій роду *Lactobacillus* були використані такі методи зневоднювання як ліофілізація та висушування в завислому (киплячому) шарі інертного матеріалу (фторопласту). Суспензію клітин лактобактерій ліофілізували на сублимаційній сушарці TG15 (початкова температура — 30±2 °С, кінцева +20±2 °С, залишковий тиск становив не більше 13,3 x 10³ Па; тривалість висушування 24 - 28 годин. Отриманий бактеріальний концентрат із захисним середовищем [4] висушували на установці завислого шару на інертних носіях при температурі сушильного агента 76 °С. Сухі концентрати досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* були закладені на зберігання при температурі 4 °С. Усі культури відновлювали у фізіологічному розчині через 6, 12, 24 та 36 місяців зберігання.

Одночасно досліджувані штами лактобактерій зберігали під стерильною вазеліною оливою у напіврідкому середовищі MRS. Загальна кількість клітин лактобактерій у 1 см³ бактеріальної суспензії дорівнювала 10⁷ - 10⁸. Тривалість збереження культур під шаром вазеліну складала 12 місяців при температурі +5 °С.

Життєздатність лактобактерій визначали методом дозованого висіву на MRS-агар і підрахунку колоній, що виростили через 18 - 24 години. Антагоністичну активність лактобактерій стосовно різних мікроорганізмів вивчали лунково-дифузійним методом [5]. Як індикаторні мікроорганізми використовували колекційні штами бактерій *Escherichia coli* ОНУ 165, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Proteus vulgaris* ОНУ 209, *Bacillus subtilis* ОНУ 24, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Candida albicans* УКМ У-2501 та *Saccharomyces cerevisiae* В4.

Результати та їх обговорення

Першим етапом нашої роботи було вивчення життєздатності досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* після 6, 12, 24 та 36 місяців їх зберігання у висушеному та ліофільному стані. У таблиці 1 наведено результати досліджень щодо впливу ліофілізації на виживання лактобацил. Як видно з представлених даних, одразу після ліофілізації кількість життєздатних клітин змінилася незначно: частка бактерій, що вижила, становила від 82 до 93 %. Після 6 місяців зберігання для усіх досліджуваних штамів лактобацил спостерігали однакову тенденцію: кількість життєздатних бактерій знизилася лише на порядок. Після 36 місяців зберігання лактобацил у ліофільному стані кількість життєздатних клітин зменшилася на шість порядків для штамів *L. plantarum* 8P-A3 та *L. acidophilus* OL4. Максимальну кількість життєздатних клітин після 2,5 років зберігання у ліофільному стані (4,2 x 10⁶) було відзначено для штаму *L. acidophilus* 317/402.



Таблиця 1

Життєздатність лактобактерій після ліофілізації

| Штам | Кількість клітин у 1 г сухого концентрату | | | | | |
|---|---|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | До Ліофілізації | Одразу після ліофілізації | Після 6 міс. | Після 12 міс. | Після 24 міс. | Після 36 міс. |
| <i>L. plantarum</i> 8P-A3 | $1,4 \times 10^{10}$ | $1,1 \times 10^{10}$ | $9,2 \times 10^9$ | $8,5 \times 10^7$ | $7,6 \times 10^5$ | $1,4 \times 10^4$ |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N2 | $1,2 \times 10^{10}$ | $1,0 \times 10^{10}$ | $5,8 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^8$ | $6,2 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^5$ |
| <i>L. acidophilus</i> OL4 | $1,5 \times 10^{10}$ | $1,2 \times 10^{10}$ | $1,6 \times 10^9$ | $7,2 \times 10^6$ | $5,0 \times 10^5$ | $2,6 \times 10^4$ |
| <i>L. acidophilus</i> 317/402 | $1,8 \times 10^{10}$ | $1,4 \times 10^{10}$ | $9,0 \times 10^8$ | $7,6 \times 10^9$ | $1,4 \times 10^8$ | $4,2 \times 10^6$ |

Відомо, що найбільш прийнятним і якісним способом зневоднювання, який забезпечує збереження і стабілізацію властивостей бактерій, є сублімаційне висушування, при якому відсутні високі температури нагрівання. Однак, у деяких роботах указується на те, що незважаючи на високу якість продуктів, одержуваних методом сублімації, резерви цього способу зневоднювання не повністю використовуються через низку недоліків, основні з яких – велика тривалість і трудомісткість процесу [6,7]. Ряд дослідників [8, 9] вважає, що в процесі сублімаційного висушування спостерігаються значні втрати життєздатності мікробних клітин.

За останні роки для зневоднювання розчинів і суспензій широко застосовують висушування в киплячому шарі інертного матеріалу. Даний спосіб зневоднювання, уперше запропонований і використаний у 1959 році [10], вигідно відрізняється від інших тим, що він збільшує поверхню тепло- і масообміну (практично вся поверхня інертних гранул). Активна гідродинаміка (особливо в апаратах киплячого шару) сприяє компактному апаратному оформленню процесу [7]. Тому саме цей спосіб зневоднювання обраний для зберігання промислових штамів лактобацил.

Таблиця 2

Життєздатність лактобактерій після висушування у киплячому шарі інертного матеріалу

| Штам | Кількість клітин у 1 г сухого концентрату | | | | | |
|---|---|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | До висушування | Одразу після ліофілізації | Після 6 міс. | Після 12 міс. | Після 24 міс. | Після 36 міс. |
| <i>L. plantarum</i> 8P-A3 | $1,4 \times 10^{10}$ | $9,8 \times 10^9$ | $7,6 \times 10^9$ | $8,5 \times 10^7$ | $5,2 \times 10^6$ | $4,1 \times 10^6$ |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> N2 | $1,2 \times 10^{10}$ | $9,0 \times 10^9$ | $3,8 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^8$ | $5,2 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ |
| <i>L. acidophilus</i> OL4 | $1,5 \times 10^{10}$ | $1,1 \times 10^{10}$ | $3,0 \times 10^9$ | $7,2 \times 10^8$ | $6,2 \times 10^7$ | $1,2 \times 10^7$ |
| <i>L. acidophilus</i> 317/402 | $1,8 \times 10^{10}$ | $1,3 \times 10^{10}$ | $5,7 \times 10^8$ | $7,6 \times 10^7$ | $3,4 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^7$ |



Виявлено, що одразу після висушування бактеріальних концентратів лактобацил у киплячому шарі на інертних носіях частка життєздатних клітин складала від 70 до 86 %, що значно менше, ніж виживання клітин одразу після ліофілізації (табл. 1). Після 6 місяців зберігання спостерігали поступове зниження кількості життєздатних клітин, а після першого року зберігання і до кінця терміну дослідження кількість життєздатних клітин усіх штамів лактобацил залишалася практично стабільною; виключенням був штам *L. plantarum* 8P-A3, який характеризувався мінімальною кількістю життєздатних клітин після 2,5 років зберігання у висушеному стані ($4,1 \times 10^6$).

Після зберігання комерційних штамів бактерій роду *Lactobacillus* на живильному MRS середовищі під вазеліною оливою (табл. 3) було виявлено, що життєздатність бактерій штаму *L. plantarum* 8P - A3 знизилася на шість порядків після зберігання протягом 12 місяців, а штамів *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2 та *L. acidophilus* 317/402 – на п'ять порядків. Найкращі результати були отримані після зберігання штаму *L. acidophilus* OL4: кількість життєздатних клітин після першого року зберігання знизилася на чотири порядки і дорівнювала $5,1 \times 10^4$.

Таблиця 3

Життєздатність лактобактерій після зберігання їх під вазеліною оливою

| Штам | Кількість клітин у 1 мл бактеріальної суспензії | | |
|--|---|-------------------|-------------------|
| | До зберігання | Після 6 міс. | Після 12 міс. |
| <i>L. plantarum</i> 8P-A3 | $1,2 \times 10^8$ | $9,8 \times 10^4$ | $5,2 \times 10^2$ |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> N2 | $5,0 \times 10^7$ | $9,0 \times 10^5$ | $7,8 \times 10^3$ |
| <i>L. acidophilus</i> OL4 | $1,7 \times 10^8$ | $1,1 \times 10^5$ | $5,1 \times 10^4$ |
| <i>L. acidophilus</i> 317/402 | $1,0 \times 10^8$ | $1,3 \times 10^5$ | $7,1 \times 10^3$ |

Важливою характеристикою заквашувальних культур для продуктів лікувально-профілактичного призначення є їх здатність пригнічувати розвиток патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів. Було досліджено спектри антагоністичної дії чотирьох штамів бактерій роду *Lactobacillus* після максимального терміну зберігання за різних умов. Антагоністична активність молочнокислих бактерій складається з дії бактеріоцинів, а також кислот, спиртів, перекисів і інших метаболітів, що накопичуються в процесі росту бактерій [5]. Досліджувані штами бактерій роду *Lactobacillus* вирізнялися широким спектром антибіотичної активності. Вони активно пригнічували ріст як грам-позитивних бактерій (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), так і грам-негативних бактерій (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), і незначно пригнічували ріст *Proteus vulgaris*. У даних дослідженнях лактобацили, досить активні стосовно різних мікроорганізмів, слабо пригнічували ріст дріжджів *Candida albicans* та *Saccharomyces cerevisiae*. Ймовірно, це пов'язано зі стійкістю дріжджів до пригнічувальної дії метаболітів лактобацил порівняно з іншими індикаторними мікроорганізмами. У ряді випадків спостерігалася навіть стимуляція лактобацилами росту дріжджеподібних грибків [11].



Найбільш виражену антагоністичну активність стосовно індикаторних культур виявив штам *L. acidophilus* OL4, ізольований з некомерційного кисломолочного продукту. Результати експерименту щодо збереження антагоністичних властивостей досліджуваних промислових штамів лактобацил продемонстровано на рис. 1 та 2 на прикладі штаму *L. acidophilus* OL4.

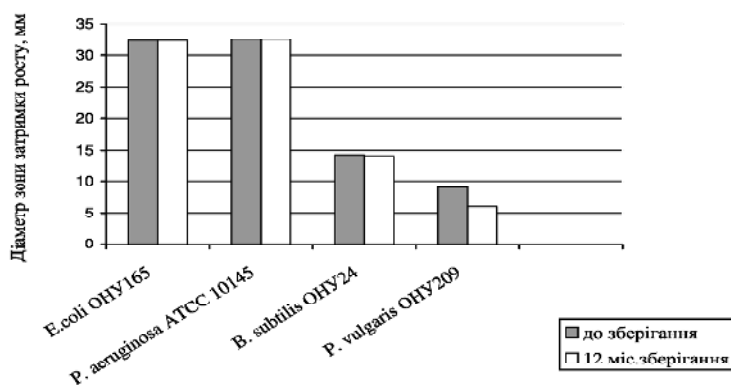


Рис.1 Антагоністична активність *L. acidophilus* OL4 за умов зберігання під вазеліною оливою протягом 12 місяців

Аналіз отриманих даних показав, що спосіб зберігання лактобацил під вазеліною оливою забезпечував високий рівень антагоністичної активності до всіх індикаторних прокаріотних мікроорганізмів, однак число життєздатних клітин при цьому зменшилося на три - п'ять порядків (табл.3). Дослідження антагоністичної активності штамів бактерій роду *Lactobacillus* після довгострокового зберігання (рис. 2) показало, що після ліофілізації та висушування у киплячому шарі інертного матеріалу досліджуваний штам не пригнічував ріст *M. luteus* і *C. albicans*. В цьому випадку спостерігали стимуляцію росту індикаторних мікроорганізмів. До решти індикаторних мікроорганізмів лактобактерії виявляли виражений антагоністичний ефект, проте спостерігалася тенденція до зниження антибіотичної активності відновлених після ліофілізації культур.

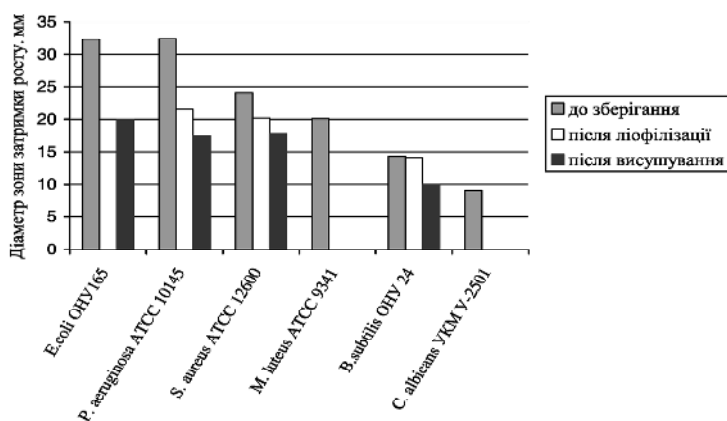


Рис.2. Антагоністична активність *L. acidophilus* OL4 за умов зберігання протягом 36 місяців у ліофільному та висушеному стані.

Однак доведено, що періодичні пасажи ліофілізованих культур молочнокислих бактерій і підтримувальна селекція відновлювали їх фізіологічну активність. Усі досліджувані штами лактобацил, висушені в киплячому шарі на інертних носіях, зберігали високий ступінь антагоністичної активності стосовно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, але слабо інгібували ріст *Proteus vulgaris* та *Bacillus subtilis*.

Таким чином, ліофілізація забезпечує тривале збереження життєздатності лактобацил, однак була відзначена деяка тенденція до зниження антибіотичної активності ліофілізованих культур. Висушування бактерій у киплячому шарі інертного матеріалу забезпечує відносно високий рівень виживання лактобацил та збереження їх антагоністичних властивостей. Спосіб зберігання лактобацил під вазеліною оливою забезпечує високий рівень антагоністичної активності, але число життєздатних клітин при цьому знижується на чотири - шість порядків протягом 12 місяців.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Методы. Проблемы. Перспективы. — Пушино, 1991. — С. 81-159.
2. Герна Р.А. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии. — М., 1983. — Т. 1. — с. 74 — 122.
3. De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of *Lactobacilli* // J. Appl. Bacteriol. — 1960. — 23. — P. 130-138.
4. Ямборко Г.В. Висушування концентрованої бактеріальної закваски в киплячому шарі інертного матеріалу // Холодильна техніка і технологія. — О.: ОДАХ, 2002. — Т. 79-80, № 5-6. — С. 9 -95.
5. Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Vact. Rev. -1976. — 40. — P. 722-756.
6. Гришин М.А., Атаназевич В.И., Семенов Ю. Г. Установки для сушки пищевых продуктов. — М.: Агропромиздат, 1989. — 208 с.
7. Кретов И.Т., Антипов С.Т., Шахов С.В. Исследование процесса сублимационной сушки молочных заквасок // Хранение и переработка сельхозсырья. — 1996. — № 4. — С. 15-16.
8. Шабетник Г. Д., Кузьмин В. М. Новое в производстве сухих бакконцентратов и биологически активных добавок // Молочная промышленность. — 1999. - № 8. — С. 27-29.
9. Гинзбург А.С., Резчиков В.А. Сушка пищевых продуктов в кипящем слое. — М.: Пищевая промышленность, 1966. — 196 с.
10. Бабенко В.Е., Соловьева Т.А., Ойгенблик А.А. Исследование и моделирование процесса покрытия частиц пленками в аппаратах со взвешенным слоем. В сб.: Тепло- и массоперенос. — К.: Наук. думка., 1972. — Т. 5. — Ч. 1. — С. 172-179.
11. Hilton E., Isenberg H. D., Alperstein P., France K., Borenstain M.T. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidial vaginitis // Ann. Intern. Med. — 1992. — V. 116. — P. 353-357.



А.В. Ямборко, И.Л. Соловьева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 687964,
yamborko@sky.od.ua

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ РАЗНЫХ СПОСОБОВ ХРАНЕНИЯ
ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА
LACTOBACILLUS**

Реферат

Проведено сравнение эффективности различных способов хранения (лиофилизация, высушивание во взвешенном (кипящем) слое инертного материала и под стерильным вазелиновым маслом) 4 штаммов бактерий рода *Lactobacillus* из коллекции культур кафедры микробиологии и вирусологии ОНУ: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, *L. acidophilus* 317/402, *L. acidophilus* OL4. Способ высушивания культур в кипящем слое инертного материала обеспечивал максимальный уровень выживания исследуемых штаммов лактобацилл и сохранение их антагонистических свойств на протяжении 36 месяцев.

К л ю ч е в ы е с л о в а: лактобациллы, способы хранения, жизнеспособность, антагонистические свойства.

G.V. Yamborko, I.L. Solovyova

Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 687964, yamborko@sky.od.ua

**THE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT STORAGE TECHNIQUES OF
INDUSTRIAL STRAINS OF GENUS LACTOBACILLUS**

Summary

The different storage techniques (lyophilization, drying method and a method of keeping under mineral oil) of 4 lactobacilli strains: *L. plantarum* 8P-A3, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* N2, *L. acidophilus* 317/402 and *L. acidophilus* OL4 from Odesa National University collection of the sea and useful for ecological biotechnology microorganisms were compared. Drying of bacterial cultures in the layer of an inert material was the method which provided the highest level of viability of the investigated lactobacilli strains and kept their antagonistic properties during 36 months.

К e y w o r d s: lactobacilli, the storage techniques, viability, antagonistic properties.



М.В. Стратан, А.А. Десятник

Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая, 1, МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)739824,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

ВЛИЯНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НА АМИЛОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *ASPERGILLUS NIGER* 33-19 CNMN FD-02

*Изучено влияние типа, возраста и количества посевного материала на биосинтез амилаз штаммом мицелиального гриба *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А. Установлено, что активность как стандартных, так и кислотостабильных амилаз выше при использовании в качестве посевного материала 10 мл (на 200 мл питательной среды) водной суспензии (1×10^6 спор/мл) спор 12 - 14-дневной культуры, выращенной на скошенной среде сусло-агар при температуре 28 - 30 °С. При этом максимум накопления амилолитических ферментов в культуральной жидкости зарегистрирован на 6-й день культивирования и составляет 172,2 ед/мл для стандартных амилаз (рН 4,7) и 274,0 ед/мл для кислотостабильных (рН 2,5). Для вегетативного инокулюма оптимальной является 24-часовая раскладка в количестве 15 мл, что обеспечивает активность стандартных и кислотостабильных амилаз, равную 145,2 и 143,6 ед/мл, соответственно.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: биосинтез амилаз, *Aspergillus niger*, амилолитические ферменты, глубинное культивирование.

При совершенствовании многих технологических процессов широко используются амилазы микроорганизмов, которые заменяют и вытесняют амилазы растительного и животного происхождения. Объясняется это, прежде всего, в сотни раз большей продуктивностью микроорганизмов по сравнению с растениями и животными, дешевизной и доступностью микробиологического сырья.

Наиболее часто как продуценты ферментов амилаз используются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, актиномицеты, бактерии рода *Bacillus*, а также дрожжеподобные микроорганизмы *Endomycopsis* [3,8,12,14].

Среди микроскопических грибов способность к биосинтезу амилаз в большей степени установлена у представителей рода *Aspergillus*. Кроме того, некоторые из них обладают свойством продуцировать кислотоустойчивые α-амилазы. Последние практически полностью, на 90 %, сохраняют активность в кислой среде в течение 30-минутной инкубации при температуре 37 °С. В этих условиях обычные α-амилазы желто-зеленых аспергиллов



необратимо теряют каталитические свойства [4,14,15]. Ферменты амилолитического комплекса, продуцируемые микромицетами рода *Aspergillus*, нашли наиболее широкое применение.

Биосинтез ферментов зависит от физиологического состояния микроорганизмов – продуцентов и ряда физических и химических факторов культивирования: состав питательной среды, наличие биостимуляторов и индукторов для индуцированных ферментов, режим аэрации, pH и температура культивирования. Эти факторы определяют скорость развития и размножения микроорганизмов, образования ферментов, обуславливая модифицирование биосинтетической способности штамма-продуцента. Возраст, количество и тип посевного материала играют важную роль для биосинтеза и накопления ферментов в максимальных количествах, обеспечения воспроизводства технологического процесса, а также для получения некоторых метаболитов с высокой скоростью биосинтеза [1, 2, 4, 5, 8,10].

Цель настоящей работы — изучение влияния типа, возраста и количества посевного материала на биосинтез амилаз новым перспективным продуцентом *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A.

Материалы и методы исследований

Объектом исследований служил штамм-мутант *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A, полученный при гамма-облучении. Культивирование продуцента осуществлялось глубинным методом в колбах Эрленмейера емкостью 1 литр с 200 мл среды, в условиях постоянного перемешивания (180 - 200 об/мин), при температуре 28 - 30 °С, на среде подобранного оптимального состава, содержащей (г/л): крахмал — 3,0, фасолевою муку — 9,0, пшеничные отруби — 18,0, K_2HPO_4 — 2,0, KCl — 0,5, MgSO_4 — 0,5, вода, pH 5,0.

В качестве посевного материала использовали водную суспензию спор (10^6 спор /мл) 12 - 14-дневной культуры, выращенной на среде сусло-агар при температуре 28 - 30 °С, и вегетативный инокулюм, полученный при глубинном культивировании 12 - 14-дневной культуры на вышеназванной среде.

Для определения оптимального возраста спорового посевного материала были тестированы суспензии спор, полученные из культур различного возраста — 5, 10, 15, 20, 25 и 30 дней, выращенных на скошенном сусло-агаре. Амилолитическую активность определяли в фильтрах культуральной жидкости на 4-й, 5-й и 6-й день культивирования.

Амилолитическую активность определяли колориметрическим методом с йодом, используя в качестве субстрата раствор 1 %-ного растворимого крахмала, в стандартных условиях гидролиза при pH 4,7 для обычных амилаз и в экстремальных условиях гидролиза при pH 2,5 для кислотостабильных амилаз [11,13].

Результаты и их обсуждение

Штамм *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A получен при гамма-облучении штамма *Aspergillus niger* 33 CNMN FD-06 A продуцента амилаз. Мутантный вариант характеризуется высокой внеклеточной амилолитической активностью, зарегистрированной на 6-й день культивирования. Оптимальная температура культивирования и биосинтеза 28 - 30 °С, опти-



мальный pH для образования амилаз 5,0 - 5,2. Культура хранится на скошенной сусло-агаровой среде при температуре 3 - 7 °С. Частота пересева — 1 раз в 2 - 3 месяца. Штамм *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А депонирован в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов при Институте микробиологии и биотехнологии Академии Наук Молдовы как активный продуцент амилаз [16].

При глубинном культивировании плесневых грибов в качестве посевного материала используют мицелий или водную суспензию спор. Получение и стандартизация посевного материала осуществляется дифференцированно в зависимости от вида материала. Для каждого продуцента и каждого отдельного технологического процесса оптимальные показатели инокулюма, как и оптимальная фаза эволюции микроорганизма для получения максимального количества метаболитов, устанавливаются или корректируются индивидуально.

В работе тестированы два типа посевного материала: суспензия спор и вегетативный мицелий. Так как физиологическое состояние микроорганизма в момент посева влияет на последовательные фазы его развития, влияние возраста инокулюма на энзиматическую активность штамма *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А исследовалось в динамике на 4-й, 5-й и 6-й день культивирования микроорганизма. Это дало возможность определить в одном опыте время проявления максимума биосинтеза амилаз и продолжительности культивирования. Результаты данных исследований представлены на рисунке 1(а, б). Как следует из рис.1, оптимальным возрастом спорового посевного материала, который обеспечивает наиболее высокую энзиматическую активность как стандартных, так и кислотостабильных амилаз, является 15-дневная культура. Максимум накопления амилолитических ферментов в культуральной жидкости зарегистрирован на 6-й день культивирования и составляет 172,2 ед/мл для стандартных амилаз (pH 4,7) и 274,0 ед/мл для кислотостабильных (pH 2,5).

Для выявления влияния количества засеянных спор на биосинтез ами-

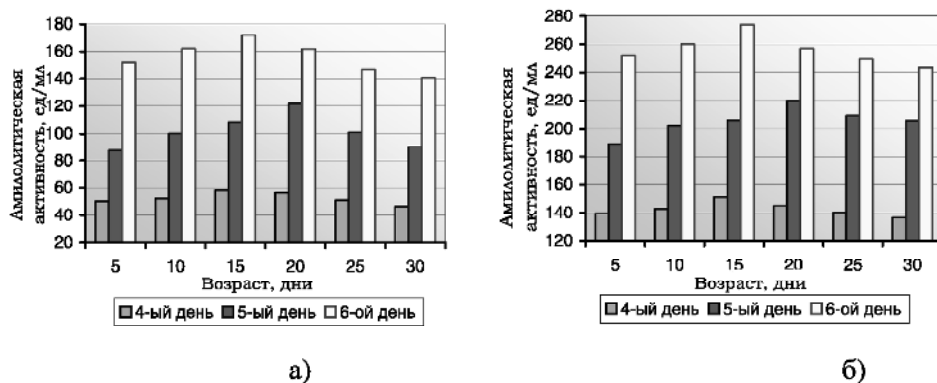


Рис.1. Динамика накопления амилолитических ферментов при глубинном культивировании штамма *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А в зависимости от возраста спорового посевного материала

а) ферментативная активность в стандартных условиях гидролиза, pH 4,7

б) ферментативная активность в экстремально-кислых условиях гидролиза, pH 2,5



лаз изучаемым штаммом, в колбы с 200 мл питательной среды вносили по 5, 10, 15, 20 мл суспензии спор, полученных с 14 — 15-дневной поверхностной культуры. Максимальная активность стандартных и кислотостабильных амилаз в зависимости от количества и возраста вегетативного посевного материала отмечалась в вариантах засеянных 10 мл суспензии спор, достигая уровня 171,3 ед/мл при рН 4,7 и 253,5 ед/мл при рН 2,5 (рис. 2).

Для культур грибов, которые не образуют обилия конидий, посевным материалом служит вегетативный мицелий. Это является ещё одним фактором усложнения стандартизации посевного материала, так как фаза раз-

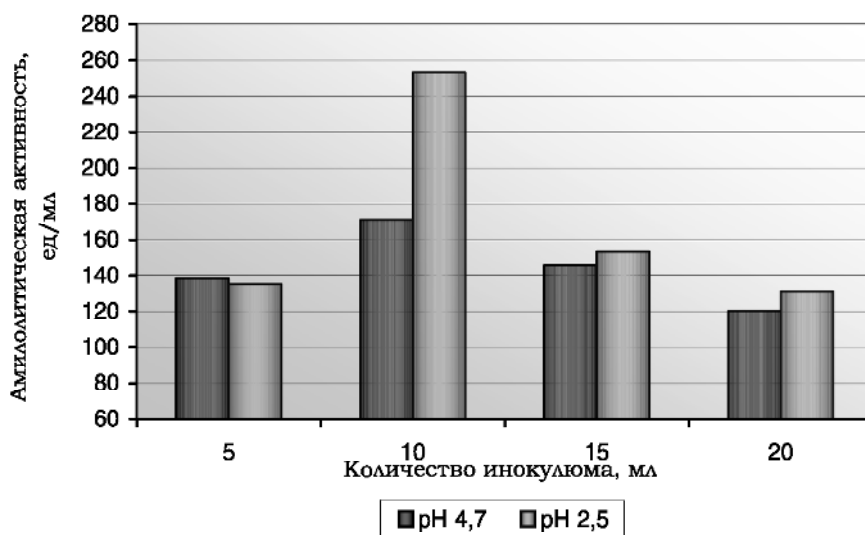


Рис. 2. Влияние количества спорового инокулюма на накопление амилолитических ферментов при глубинном культивировании штамма *Aspergillus niger 33-19 CNMN FD-02 A*

вития мицелия, используемого как посевной материал, влияет на следующие этапы развития микроорганизма.

Количество инокулюма значительно влияет на величину и форму агломератов, проявление диморфизма и выход метаболитов. В случае аскомицета *Aspergillus oryzae*, культуры, засеянные маленьким количеством инокулюма, характеризуются образованием большого количества биомассы, но низким выходом амилаз, так как в основном происходит метаболизм большого количества углеводов для образования биомассы [5].

В дальнейших опытах было изучено влияние возраста и количества инокулюма вегетативного посевного материала на амилолитическую активность штамма *Aspergillus niger 33-19 CNMN FD-02 A*. В исследованиях использовался мицелий 24, 48, 72 - часового возраста в количестве 10 и 15 мл однородного посевного материала. Изменение амилолитической активности в зависимости от количества и возраста вегетативного посевного материала представлено на рисунке 3 (а, б).

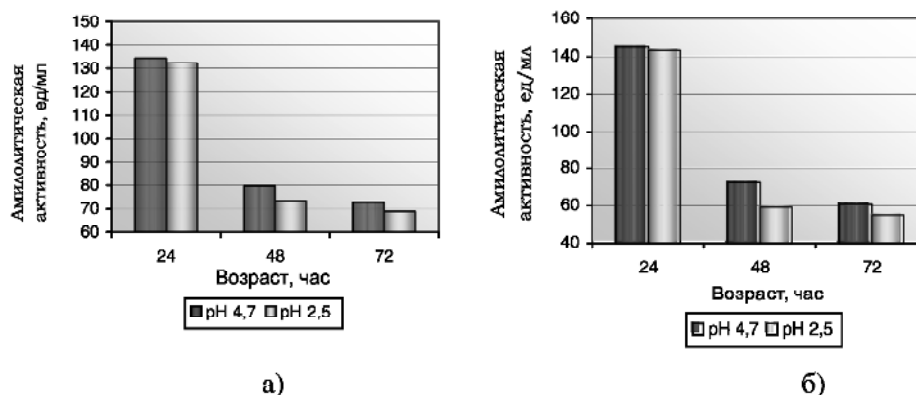


Рис. 3. Биосинтез амилаз штамма *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A в зависимости от возраста и количества вегетативного инокулюма

- а) в количестве 10 мл;
б) в количестве 15 мл.

Показано, что оптимальным посевным материалом является 24-часовая культура, которая находится в логарифмической фазе развития.

Использование в качестве инокулюма 15 мл 24-часовой раскладки вегетативного мицелия обеспечивает активность стандартных и кислотостабильных амилаз, равную 145,2 и 143,6 ед/мл, соответственно. В варианте, где использовали 10 мл того же инокулюма, активность амилаз ниже и составляет 134,5 и 132,3 ед/мл, соответственно, для стандартных и кислотостабильных амилаз.

При сравнении полученных результатов установлено, что в зависимости от типа посевного материала активность обоих видов амилаз выше при использовании спорового посевного материала — 172,2 ед/мл и 274,0 ед/мл по сравнению с 145,2 ед/мл и 143,6 ед/мл в вариантах с вегетативным посевным материалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cascaval Dan*. Bioinginerie on prelucrarea agroalimentara //Univ. Tehnica „Gh. Asachi” Iasi // Iaei 1998
2. *Clapco S* „Influenta unor factori de mediu asupra procesului de biosinteza a pectinazelor la tulpina de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P”. //Analele Stiintifice ale USM Seria „Stiinte chimico-biologice”// Chisinau 2004 p. 94-97.
3. *Deseatnic A*. Morfologia, fiziologia si activitatea biosintetica a unor micromicete producatoare de hidrolaze extracelulare. //Buletinul Academiei de Stiinte 2005 nr.1 p. 123-133//
4. *Deseatnic A., Tiurin J., Labliuc S.*, si al. Stabilirea parametrilor optimali de biosinteza a amilazelor de catre unele tulpini de fungi din genul *Aspergillus* Materialele Simpozionului al II-lea Nationala cu participare Internationala „Inginerie genetica si biotehnologii moderne” Chisinau. 2002. p. 290-293.
5. *Zarnea I*. Mecinicopschi Gh. Bioingineria preparatelor enzimaticе microbiene. Bucuresti 1980. p.195



6. *Zarnea G.* *Tratat de microbiologie generala. Vol II* 1984.I
7. *Коновалов С.А.* Биосинтез ферментов микроорганизмами. — М.: 1973. — № 3. — С. 19.
8. *Галич С.А.* Амилазы микроорганизмов. — К.: Наука, 1987. — 190 с.
9. *Лобанок А.Г., Астапович Н.И.* Биотехнология микробных ферментов // Наука и техника. — 1989.
10. *Закиров М.З.* Ферменты плесневых грибов. — Ташкент, 1975. — С. 51-69.
11. *Грачева И.М., Грачев Ю.П., Мосичев М.С.* Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов // Легкая и пищ. пром. — 1992.
12. *Квеситадзе Г.И.* Грибные и бактериальные амилазы. — Тбилиси: Мецниереба, 1984. — 154 с.
13. *Рухляева А.П.* Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Наука, 1981.
14. *Безбородов А.М.* Биотехнология продуктов микробного синтеза. — М.: Агропромиздат, 1991. — С. 202 - 219.
15. *Scriban Rene.* *Biotechnologie.* — Paris. P. 317 - 360.
16. *Патент MD 2836 B1OP1 8, 2005.*

М.В. Стратан, О.А. Десятник

Институт мікробіології та біотехнології АНМ, вул. Академічна 1, МД-2028, Кишинів, Молдова, тел: (373 22) 739824,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

**ВПЛИВ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ НА АМІЛОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ
ШТАМУ *ASPERGILLUS NIGER* 33-19 CNMN FD-02**

Реферат

Вивчено вплив типу, віку та кількості посівного матеріалу на біосинтез амілаз штамом міцеліального гриба *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A.

Встановлено, що активність як стандартних, так і кислотостабільних амілаз вища при використанні 10 мл (на 200 мл живильного середовища) водної суспензії (1×10^6 спор/мл) спор 12 - 14-денної культури, яка виросла на скошеному середовищі сусло-агар при температурі 28-30 °С. При цьому максимум накопичення амілолітичних ферментів та культуральної рідини зареєстровано на 6-ий день культивування і складає 172,2 од/мл для стандартних амілаз (рН 4,7) та 274,0 од/мл для кислотостабільних (рН 2,5).

Для вегетативного інокулюму оптимальним є 24-годинний розподок у кількості 15 мл, що забезпечує активність стандартних кислотостабільних амілаз, яка дорівнює 145,2 і 143,6 од/мл, відповідно.

К л ю ч о в і с л о в а: біосинтез амілаз, *Aspergillus niger*, глибинне культивування, амілолітичні ферменти.



M.V. Stratan, A.A. Desyatnic

Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM
Akademycheskaya str., 1, MD-2028, Chisinau, Moldova, tel: (373 22) 739824,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

**INOCULUM INFLUENCE ON AMYLOLYTIC ACTIVITY OF THE STRAIN
ASPERGILLUS NIGER 33-19 CNMN FD-02**

Summary

Inoculum influence of the type, age and quantity on the producing of amylases of *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A strain was studied. It was noticed that enzymatic activity of ordinary as well as of acid stable amylases is higher at using of inoculum 10 ml (into 200ml growing medium) spores suspension (1×10^6 spores/ml) of the 12 — 14 days age culture, cultivated on the splay wort-agar medium, at t 28 — 30 °C. Maximum of the amylolytic enzymes accumulation in the culture filtrate was established at the sixth day of cultivation, being 172.2 u/ml for ordinary amylases (pH 4.7) and 274.0 u/ml for acid stable (pH 2.5).

Using vegetative inoculum as inoculation material, the optimal effect was obtained. That is a 24-hours age culture in quantity of 15 ml, ensured the activity for ordinary as well as acid stable amylases equal to 145.2 u/ml and 143.6 u/ml, respectively.

Key words: biosynthesis of amilazes, *Aspergillus niger*, deep cultivation, amylolytic enzymes



Е.П. Копылов

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН,
ул. Шевченко, 97, Чернигов, Украина, 14027

СЕЛЕКЦИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ ШТАММОВ ДИАЗОТРОФОВ ДЛЯ ИНОКУЛЯЦИИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ

*Методами аналитической селекции получен эффективный штамм бактерий рода *Azospirillum*, который способен приживаться и активизировать процесс ассоциативной азотфиксации в корневой зоне яровой пшеницы, положительно влиять на фотосинтетический аппарат растений. При этом улучшается рост и развитие растений, повышается их стойкость к возбудителям корневых гнилей, увеличивается урожайность яровой пшеницы.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Azospirillum*, яровая пшеница, селекция, ассоциативная азотфиксация, корневые гнили, хлорофиллы *a* и *b*.

Для ризосферы и ризопланы сельскохозяйственных культур характерно большое разнообразие diaзотрофов, которые участвуют в образовании микробно-растительных ассоциаций. Функции ассоциативных азотфиксирующих бактерий при их взаимодействии с растениями разнообразны, это фиксация атмосферного азота, синтез биологически активных соединений, которые стимулируют рост и развитие растений, повышение устойчивости растений к действию фитопатогенных организмов.

Из литературы известно, что в мире методами аналитической селекции получено большое количество diaзотрофов, штаммы которых более чем в 50 раз отличаются между собой по эффективности и активности азотфиксации [1]. Это свидетельствует о перспективности поиска природных азотфиксирующих бактерий, которые можно использовать для повышения урожайности сельскохозяйственных культур, улучшения качества получаемой продукции, при сохранении окружающей среды от загрязнения химическими соединениями.

Целью данной работы было получить с помощью методов аналитической селекции эффективные штаммы diaзотрофов, которые бы характеризовались высокой активностью фиксации азота в чистой культуре, приживались и активизировали процесс ассоциативной азотфиксации в корневой зоне яровой пшеницы, продуцировали биологически активные вещества, повышали устойчивость растений к возбудителям болезней и способствовали увеличению урожайности яровой пшеницы.

Материалы и методы

Учет численности diaзотрофов осуществляли методом предельных разведений с использованием ацетиленового теста в ризосферной почве, на



отмытых корнях яровой пшеницы и в корнях после их стерилизации. Выделение активных diaзотрофов осуществляли из накопительных культур после определения их нитрогеназной активности [2]. С этой целью использовали слабоагаризованные среды Доберейнер, Эшби, Федорова-Калининской, полужидкая консистенция которых дает возможность микроорганизмам развиваться в оптимальном для них режиме парциального давления кислорода. Аэробы при этом образуют пленку на поверхности среды, микроаэрофилы — погруженную в среду пленку, анаэробы могут развиваться на дне. Накопительные культуры рассеивали на твердые питательные среды: картофельный агар с сахарозой, среду Кассероса, агаризованную среду с глицерином.

Эффективным оказалось использование пластин с SiO_2 , пропитанных средой Виноградского без глюкозы [3]. На пластины с SiO_2 раскладывали корни растений или ризосферную почву. Использование в этом случае безазотной среды Виноградского обеспечивает условия для развития группы бактерий, которые способны покрывать свои потребности в азоте за счет фиксации атмосферного азота. В дальнейшем проводили выделение микроорганизмов из колоний, которые образовались на корнях или комочках почвы.

Азотфиксирующую активность микроорганизмов в чистой культуре и в ассоциации с растениями определяли ацетилен-этиленовым методом на газовом хроматографе «Chrom-4» с пламенноионизационным детектором. Колонка длиной 370 см была заполнена хромосорбом з в-в'-оксидипропионитрилом. Температура термостата 50 °С, газ-носитель — азот, расход газов (в мл/мин): водорода — 30, азота — 100, воздуха — 500.

Приживаемость азоспирилл в корневой зоне растений яровой пшеницы изучали в условиях вегетационного опыта резистентным методом с использованием мутантов, устойчивых к высоким дозам стрептомицина (1000 мкг/мл) [4].

Эффективность полученных штаммов diaзотрофов проверялась в полевых опытах с яровой пшеницей сорта Ранняя 93 в течение 2002 - 2004 гг. на черноземе выщелоченном легкосуглинистом, который характеризовался следующими агрохимическими показателями: содержание гумуса в пахотном горизонте — 3,6 %, подвижных форм фосфора (по Кирсанову) — 210 - 240 мг P_2O_5 , обменного калия (по Кирсанову) — 160 - 170 мг K_2O на 1 кг почвы, рН 6,5. Площадь учетной делянки — 10 м², повторность опытов — 4-х кратная. Норма высева семян составляла 5 млн. зерен на 1 га. Схема опытов: 1 — без инокуляции (контроль), 2 — инокуляция семян *Agrobacterium radiobacter* 204 (положительный контроль), 3 — инокуляция семян испытуемым штаммом. Яровую пшеницу выращивали без внесения удобрений.

Содержание хлорофиллов в листьях растений определяли спектрофотометрическим методом [5].

Распространение и развитие корневых гнилей яровой пшеницы определяли, используя балловую оценку по шкале и соответствующую формулу [6,7]. Количество пораженных растений, выраженное в процентах, характеризовало распространение болезни, а интенсивность поражения — её развитие.

Результаты и их обсуждение

Всего из корневой зоны яровой пшеницы было выделено 288 чистых культур diaзотрофов, из них 60 культур (20,8 %) обладали активностью азотфиксации, которая превышала 0,3 мкг азота на 1 мл питательной сре-



ды. Выделенные активные культуры diaзотрофов относились к родам *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* и представляли интерес как потенциальные инокулянты яровой пшеницы. Наиболее высокой способностью фиксировать атмосферный азот характеризовались бактерии рода *Azospirillum*. Их нитрогеназная активность составляла от 3,5 до 12,6 мкг азота на 1 мл питательной среды. Все выделенные штаммы азоспирилл проверялись в серии вегетационных опытов с яровой пшеницей, где изучалась их приживаемость и способность вступать в ассоциации с растениями, повышая активность процесса фиксации атмосферного азота в корневой зоне. В результате проведенной работы был отобран наиболее эффективный штамм *Azospirillum sp.*

Для изучения способности отобранного штамма приживаться в ризосферной почве, ризоплане и гистосфере яровой пшеницы был получен стрептомицинустойчивый мутант, который не отличался от исходного штамма по культурально-морфологическим и физиологическим признакам. Не изменилась также нитрогеназная активность мутанта и способность положительно влиять на рост и развитие растений.

Динамику численности мутанта, интродуцированного в корневую зону яровой пшеницы, изучали в ризосферной почве, на отмытых корнях и в гистосфере растений в условиях вегетационного опыта (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что интродуцированные азоспириллы способны приживаться не только в ризосферной почве и на корнях, а и проникают во внутренние ткани растений яровой пшеницы. В ризосферной почве наблюдалось незначительное снижение и дальнейшая стабилизация численности внесенного мутанта. Более активно азоспириллы приживались на корнях яровой пшеницы. Численность мутанта во внутренних тканях корней культуры была значительно меньше, и составляла 10^2 бактериальных клеток в 1 г корней. Тем не менее такая локализация азоспирилл дает им определенные преимущества по сравнению с ризосферными микроорганизмами в плане доступа к питательным веществам и отсутствия конкуренции с аборигенной микрофлорой. Кроме того, локализация азоспирилл внутри растительных тканей позволяет им сохраняться и постоянно пополнять ризосферную популяцию.

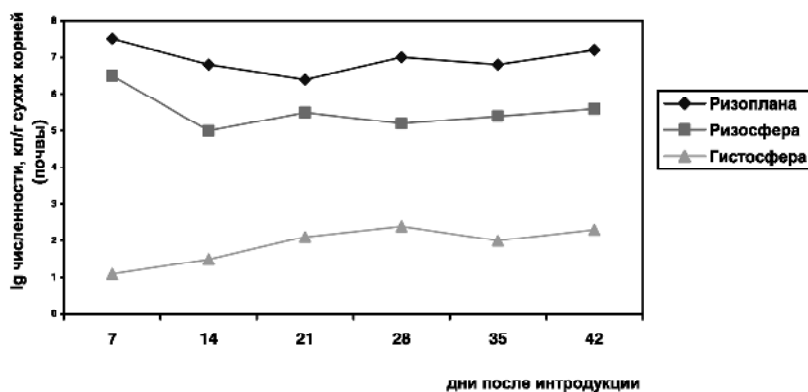


Рис. 1. Колонизация корневой сферы яровой пшеницы *Azospirillum sp.*^{str}

Аналогичные результаты были получены и в полевом опыте. Количество бактериальных клеток стрептомицинустойчивого мутанта в ризоплане яровой пшеницы в фазу цветения на порядок превосходило аналогич-

ный показатель в ризосфере и составляло 36×10^6 . В гистосфере насчитывалось 10^2 клеток азоспирилл в 1 г корней (табл. 1).

Таблица 1

Колонизация различных корневых сфер яровой пшеницы штаммом *Azospirillum sp.*^{str} (полевой опыт, фаза развития растений - цветение)

| Варианты опыта | Количество бактериальных клеток, тыс/г сухих корней (почвы) |
|-------------------|---|
| Ризосферная почва | $3,4 \times 10^3 \pm 0,37 \times 10^3$ |
| Отмытые корни | $36,0 \times 10^3 \pm 3,4 \times 10^3$ |
| Гистосфера | $0,12 \pm 0,011$ |

Характер действия отобранного штамма на растения яровой пшеницы сорта Ранняя 93 проверялся в условиях полевого опыта на черноземе выщелоченном. В качестве позитивного контроля использовали *Agrobacterium radiobacter* 204 — биоагент препарата диазофита, рекомендованного для инокуляции яровой и озимой пшеницы, который был получен нами из коллекции полезных почвенных микроорганизмов Института сельскохозяйственной микробиологии. Результаты проведенных исследований показали, что инокуляция семян яровой пшеницы азоспириллами способствует активизации процесса азотфиксации в корневой зоне культуры и увеличению содержания хлорофиллов *a* и *b* в листьях растений. Известно, что между интенсивностью процесса фотосинтеза и активностью азотфиксации в корневой зоне растений имеют место корреляционные связи [8]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что интродукция азоспирилл в корневую зону яровой пшеницы обеспечила увеличение концентрации хлорофиллов *a* и *b* в листках на 86,5 %, нитрогеназная активность в корневой зоне растений увеличилась в 2,2 раза по сравнению с вариантом без инокуляции. Сравнивая варианты с использованием азоспирилл и агробактерий приходим к выводу, что изменения в концентрации хлорофиллов были несущественными, в то время как нитрогеназная активность в корневой зоне растений при интродукции азоспирилл значительно превышала аналогичный показатель в варианте с агробактериями (табл. 2).

Таблица 2

Влияние инокуляции активными штаммами diaзотрофов на содержание хлорофиллов *a* и *b* в листках растений яровой пшеницы сорта Ранняя 93 и активность азотфиксации в корневой зоне культуры

| Вариант опыта | Концентрация хлорофиллов, мг/100 г листов | | | Нитрогеназная активность, нмоль этилена/растение за час |
|---|---|----------|--------------|---|
| | <i>a</i> | <i>b</i> | <i>a + b</i> | |
| Без инокуляции (контроль) | 82,4 | 49,6 | 132,0 | 112,8 |
| Инокуляция семян <i>Agrobacterium radiobacter</i> 204 | 140,2 | 98,2 | 238,4 | 186,5 |
| Инокуляция семян <i>Azospirillum sp.</i> | 143,8 | 102,4 | 246,2 | 248,4 |
| НСР ₀₅ | 4,96 | 8,86 | | 43,2 |



Следующим показателем, который мы определяли в вариантах опыта была поражаемость растений яровой пшеницы по фазам развития корневыми гнилями. Результаты изучения видового состава микромицетов, выделенных из пораженных корневыми гнилями растений яровой пшеницы, свидетельствуют о том, что доминирующими в патогенном комплексе были представители рода *Fusarium*, а именно: *Fusarium culmorum* (Sm.) Sacc., *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. oxysporum* Schlecht. Snyd et Hans, *F. oxysporum* var. *orthoceras* (App. et Wr.) Bilai, *F. solani* (Mart.) App. et Wr., *F. heterosporum* Nees, *F. sambucinum* var. *minus* Wr. Встречались также *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. (Syn. *Drechslera sorokiniana* Subram., *Helminthosporium sativum* P.K. et B.), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron.) Deighton.

Из данных, приведенных на рис. 2, 3, 4 видно, что при использовании азоспирилл повысилась устойчивость растений яровой пшеницы к корневым гнилям. Так, распространение болезни снизилось в 1,7 - 1,8 раза, развитие болезни — в 2,3 - 3,7 по сравнению с вариантом без инокуляции. В данном случае использование азоспирилл было значительно эффективнее, чем агробактерий.

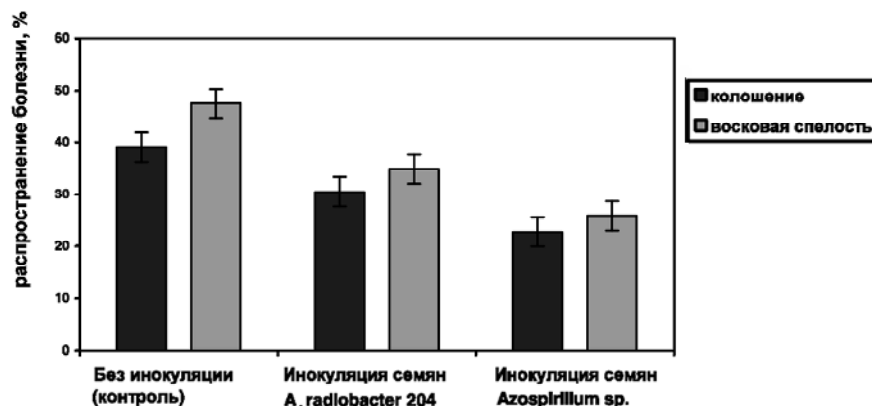


Рис. 2. Поражаемость растений яровой пшеницы корневыми гнилями при использовании активных штаммов diazotrophs (распространение болезни)

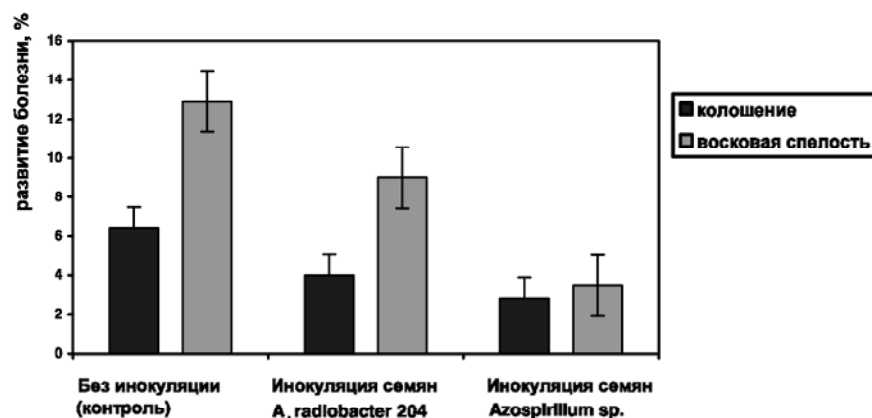


Рис. 3. Поражаемость растений яровой пшеницы корневыми гнилями при использовании активных штаммов diazotrophs (развитие болезни)

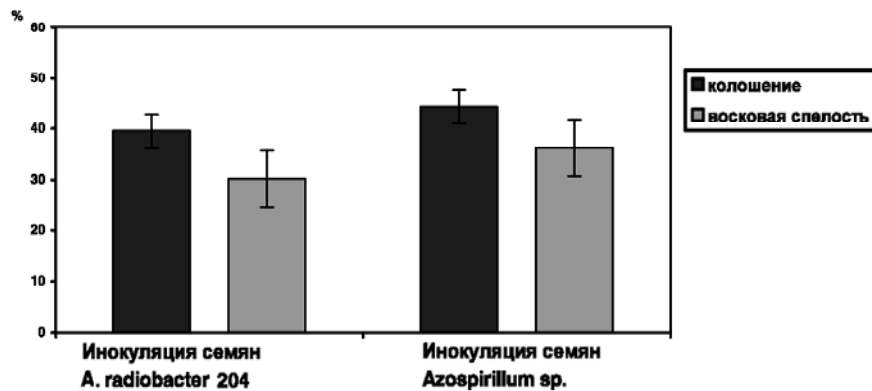


Рис. 4. Биологическая эффективность при использовании активных штаммов diazotрофов

Эффект защиты яровой пшеницы от возбудителей корневых гнилей под влиянием diazотрофов можно объяснить как тем, что азотфиксирующие бактерии способны проявлять антагонистическую активность по отношению к фитопатогенным грибам - возбудителям корневых гнилей, так и тем, что под влиянием diazотрофов повышается неспецифическая устойчивость растений к фитопатогенам.

Исследования показали, что интродукция diazотрофов в корневую зону растений яровой пшеницы не ограничивала развитие аборигенной микрофлоры почвы (табл.3).

Таблица 3

Численность микромицетов в ризосфере яровой пшеницы (полевой опыт, фаза развития растений- цветение)

| Варианты опыта | Кол-во КОЕ грибов тыс. / г почвы | <i>Acetomonium</i> | <i>Bipolaris</i> | Семейство Dematiaceae | <i>Glodiadium</i> | <i>Mucor</i> | <i>Mortierella</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Rhizopus</i> | <i>Trichoderma</i> | Другие грибы |
|--|---|--------------------|------------------|-----------------------|-------------------|--------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------|
| Без инокуляции (контроль) | 366,0 ± 42,2 | 22,4 ± 4,0 | 16,8 ± 2,4 | 28,0 ± 5,6 | 25,2 ± 2,7 | 14,0 ± 1,5 | 11,2 ± 1,4 | 39,2 ± 6,9 | 109,2 ± 21,8 | 42,0 ± 5,3 | 14,0 ± 1,8 | 44,8 ± 5,8 |
| | Инокуляция семян <i>Agrobacterium radiobacter</i> 204 | 329,0 ± 21,13 | 22,4 ± 3,86 | 14,0 ± 1,8 | 25,2 ± 3,4 | 19,6 ± 2,0 | 19,6 ± 2,9 | 12,6 ± 2,0 | 32,2 ± 6,4 | 67,2 ± 7,0 | 42,0 ± 6,1 | 12,6 ± 2,1 |
| Инокуляция семян <i>Azospirillum</i> sp. | 358,4 ± 24,1 | 19,6 ± 3,1 | 19,6 ± 2,8 | 33,6 ± 5,8 | 25,2 ± 3,0 | 19,6 ± 4,0 | 14,0 ± 2,8 | 33,6 ± 5,9 | 81,2 ± 8,3 | 44,8 ± 6,8 | 14,0 ± 2,4 | 53,2 ± 8,4 |

Таким образом, использованные штаммы азоспирилл и агробактерий не выявляли антагонистического действия в отношении фитопатогенных грибов — возбудителей корневых гнилей. Поэтому снижение пораженности яровой пшеницы корневыми гнилями при использовании изучаемых diazотрофов можно объяснить повышением устойчивости растений к фитопатогенам. Важную роль в этом процессе, на наш взгляд, играет способность азоспирилл к эндодитии. Как известно, бактерии-эндодиты стиму-



лируют рост растений и их устойчивость к фитопатогенам. Это может быть обусловлено как метаболической деятельностью эндوفита, так и возможностью занимать экологическую нишу, временно недоступную патогенам.

Значительное уменьшение пораженности растений яровой пшеницы корневыми гнилями, улучшение азотного питания растений, активизация процесса фотосинтеза, наблюдаемое при интродукции diazotрофов, привело к увеличению урожайности культуры (табл.4).

Таблица 4

Влияние активных штаммов diazотрофов на урожай зерна яровой пшеницы и его структуру (среднее за 2002-2004 гг.)

| Вариант опыта | Длина колоса, см | Количество зерен в колосе, шт | Масса зерна в 1 колосе, г | Урожай, ц/га |
|---|------------------|-------------------------------|---------------------------|--------------|
| Без инокуляции (контроль) | 7,4 ± 0,55 | 26,2 ± 2,13 | 0,936 ± 0,10 | 21,6 |
| Инокуляция семян <i>Agrobacterium radiobacter</i> 204 | 7,9 ± 0,68 | 24,7 ± 2,22 | 1,08 ± 0,10 | 26,1 |
| Инокуляция семян <i>Azospirillum sp.</i> | 8,0 ± 0,74 | 29,2 ± 1,71 | 1,11 ± 0,09 | 27,3 |
| НСР ₀₅ | | | | 2,07 |

Таким образом, с использованием методов аналитической селекции были получены новые штаммы азоспирилл, которые характеризовались высокой нитрогеназной активностью в чистой культуре: от 3,5 до 12,6 мкг азота на 1 мл питательной среды. Проведение серии вегетационных опытов дало возможность отобрать наиболее эффективный штамм, который способен не только приживаться в ризосферной почве, но и проникать во внутренние ткани растений яровой пшеницы. Использование отобранного штамма азоспирилл для инокуляции яровой пшеницы способствует активизации процесса ассоциативной азотфиксации в корневой зоне культуры, положительно влияет на фотосинтетический аппарат, улучшает рост и развитие растений, повышает их стойкость к возбудителям корневых гнилей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Okon Y. Recent progress in research on biological nitrogen fixation with nonleguminous crops //Phosphorus in Agricult. - 1982. - V.82. - P.3-10.
2. Калининская Т.А., Редькина Т.В., Белов Ю.М. Применение ацетиленового метода для количественного учёта разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений //Микробиология. - 1981. - Т.50, №5. - С. 924-927.
3. Берестецкий О.А., Шерстобоев Н.К., Шерстобоева Е.В., Патыка В.Ф. Модифицированный метод накопительных культур для выделения симбиотрофных азотфиксирующих микроорганизмов //Микробиологический журнал. - 1986. - Т.48, №2. - С. 85-89.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. проф. Д.Г. Звягинцева. Изд-во Московского ун-та. - 1980. - 224 с.
5. Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. Краткий справочник по физио-



логии растений. - Киев: Наук. думка, 1973. - 567 с.

6. Коршунова А.Ф., Чумаков А.С., Щекочихина Р.И. Защита пшеницы от корневых гнилей. - Л.: Колос, 1976. - 184 с.

7. Методи випробовування і застосування пестицидів / За ред. С.О. Трибеля. - К.: Світ, 2001. - 448 с.

8. Емцев В.Т., Нице Л.К., Ахмедов Ф.Т. Фиксация азота атмосферы в корневой зоне у различных зерновых культур //Изв. ТСХА. - 1989. - №1. - С.89-99.

Є.П. Копилов

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, вул. Шевченка, 97, Чернігів, Україна, 14027

СЕЛЕКЦІЯ ЕФЕКТИВНИХ ШТАМІВ ДІАЗОТРОФІВ ДЛЯ ІНОКУЛЯЦІЇ ЯРОЇ ПШЕНИЦІ

Реферат

Методами аналітичної селекції одержано ефективні штами бактерій роду *Azospirillum*, які здатні приживатися і активізувати процес асоціативної азотфіксації в кореневій зоні ярої пшениці, позитивно впливати на фотосинтетичний апарат рослин. При цьому поліпшується ріст і розвиток рослин, підвищується їх стійкість до збудників корневих гнилей, збільшується урожай ярої пшениці.

К л ю ч о в і с л о в а: *Azospirillum*, яра пшениця, селекція, асоціативна азотфіксація, кореневі гнилі, хлорофіли *a* і *b*.

Е.Р. Копылов

Institute of agricultural microbiology, Shevchenko str., 97, Chernigiv, Ukraine, 14027

SELECTION OF EFFECTIVE STRAINS OF NITROGEN-FIXING BACTERIA FOR INOCULATION OF SPRING WHEAT

Summary

The effective bacteria strains of *Azospirillum* genus which are able to settle down and activate the process of associative nitrogen fixation in root zone of spring wheat and have positive influence on photosynthetic system of plants have been obtained with help of analytical selection. For all this it is going to improve the growth and development of plants, advances their resistance to agents of root rots, extends the harvest of the spring wheat.

Key words: *Azospirillum*, spring wheat, selection, associative nitrogen fixation, root rots, chlorophylls *a* and *b*.



УДК 579.26:631.461

В.В. Чайковська, Я.В. Чабанюк, О.В. Шерстобоева

Інститут агроєкології Української академії аграрних наук, вул. Метрологічна, 12, м. Київ, 03143, Україна.

ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИЙ МІКРОБНИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ІНТЕГРОВАНИХ СИСТЕМ ЗЕМЛЕРОБСТВА

Підібрано склад поліфункціонального комплексу мікроорганізмів, що підвищує біологічну активність ґрунту ризосфери озимої пшениці, зокрема інтенсивність респірації, активність деструкції целюлози, антифунгальну активність, знижує фітотоксичність ґрунту, що виникає при розкладанні соломи.

К л ю ч о в і с л о в а: *поліфункціональний мікробний комплекс, біологічна активність ґрунту.*

Головним завданням сільськогосподарського виробництва сьогодні є необхідність подвоєння валового виробництва зерна згідно з прогнозами демографів, але при зниженні хімічного навантаження на екосферу [1]. Відомо, що проблеми економіки невідривно пов'язані з проблемами екології, і економічні вигоди від застосування певних агрозаходів не завжди узгоджуються з екологічними наслідками, бо приріст врожаю може супроводжуватись погіршенням якості продукції та стресовими навантаженнями на довкілля [2].

Інформативними показниками екологічного стану агроєкосистеми є рівень фітопатогенезу і біологічна активність ґрунту. Тому ретельне і планомірне вивчення процесів, які відбуваються у ґрунті кореневої зони сільськогосподарських рослин, може дозволити цілеспрямовано впливати на них з метою регулювання рослинно-мікробних взаємодій, зокрема за допомогою інтродукції штамів мікроорганізмів з більшою за їх місцеві популяції функціональною активністю агрономічно цінних властивостей, таких як азотфіксація, фосфатмобілізація, рістрегуляція, антагонізм щодо фітопатогенів тощо [3].

У зв'язку з цим метою роботи було вивчення впливу інокуляції насіння озимої пшениці поліфункціональним комплексом мікроорганізмів на біологічну активність ґрунту і ураженість рослин кореневими гнилями за умов вирощування їх із застосуванням органічних і мінеральних добрив.

Матеріали і методи

Досліджували зразки ґрунту кореневої зони пшениці озимої в польовому досліді Миронівського інституту пшениць імені В.М. Ремесла УААН (МІП УААН), де впродовж 2002 - 2006 років вивчається вплив застосування біо-



органо-мінеральної системи удобрення та захисту рослин від хвороб на продуктивність злакових рослин.

Ґрунт дослідних ділянок – чорнозем типовий, гумусовий шар 38 - 42 см, карбонати знаходяться на глибині 45 - 65 см. Вміст у орному шарі гумусу 3,6 - 4,1 %, рухомого фосфору (за Труогом) 12,8 - 18,9 мг, а обмінного калію (за Масловою) 9,5 - 12,7 мг/100 г ґрунту. Гідролітична кислотність у межах 1,7 - 2,2 мг -екв./100 г ґрунту; рН_{сол.} 6,0. Площа дослідних ділянок 25 м². Повторення дослідів триразове.

Насіння до посіву обробляли поліфункціональним комплексом мікроорганізмів (ПКМ), який складався із виробничих штамів мікроорганізмів: *Agrobacterium radiobacter* 204 (азотфіксація), *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 (фосфатмобілізація і рістстимуляція), *Chaetomium cochliodes* 3250 (деструкція целюлози і антагонізм щодо фітопатогенних мікроміцетів). Інокуляційне навантаження становило 10⁴ - 10⁵ клітин на одну насінину.

У ґрунт вносили добрива в дозах: N₄₀P₄₀K₄₀, 3 т/га соломи (різка), 30 т/га гною, сидерату (горох) 3 т/га, преміксу 0,01 г/л. Насіння обробляли фізіологічно активною речовиною ендофіту-Л-1 (ФАР) з розрахунку 5 мл/т насіння.

Схема польового дослідів: 1. контроль без добрив і інокуляції; 2. NPK; 3. NPK + ПКМ; 4. NPK + ПКМ + ФАР; 5. солома; 6. солома + NPK; 7. солома + NPK + ПКМ; 8. солома + NPK + ПКМ + ФАР; 9. гній; 10. гній + NPK; 11. гній + NPK + ПКМ; 12. гній + NPK + ПКМ + ФАР; 13. сидерат; 14. сидерат + NPK; 15. сидерат + NPK + ПКМ; 16. сидерат + NPK + ПКМ + ФАР.

Мікробіологічні аналізи здійснювали традиційними методами, наведеними у посібнику Д.Г. Звягінцева [4]. Целюлозолітичну активність ґрунту визначали лабораторним методом Крістенсена [5]. Антифунгальну активність ґрунту визначали, розкладаючи наважки ґрунту 0,5 г на вологі диски фільтрувального паперу діаметром 2 см, які клали у центр чашки Петрі на посів газonom суспензії ґрунту контрольного варіанту на середовищі Чапека. Вимірювали прозорі зони відсутності росту грибів навколо паперу через 5 діб. Токсичність ґрунту визначали за зниженням проростання насіння на пластинках ґрунту [6], інтенсивність респірації – методом Штатнова [7].

Математичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою стандартної комп'ютерної програми "Статистика".

Результати та їх обговорення

Результати багаторічних польових дослідів МІП УААН показали, що інокуляція насіння озимої пшениці біопрепаратами, біоагентами яких є мікроорганізми азотфіксатори, фосфатмобілізатори, продуценти речовин фітогормональної і антибіотичної дії підвищують продуктивність рослин і якість одержаного зерна [8]. Так, внесення мінеральних добрив активізує респірацію в ризосферному ґрунті озимої пшениці в середньому на 17 %, гною – на 75 %, соломи – на 88 %, сидератів – на 108 % (табл. 1). Застосування комплексу мікроорганізмів та помірної дози мінеральних добрив як окремо, так і у сполученні, має тенденцію до активізації процесу ще на 9, 4, 6, і 13 %, відповідно.

На целюлозолітичну активність ґрунту значний вплив має склад органічної речовини, а саме співвідношення вмісту С:N у ній. Тому в соломі, яка має високий вміст вуглецю і низький – азоту, деструкція клітковини проходила повільно, і целюлозолітична активність у даному варіанті становила 12 %. Більш



збалансованими стосовно вуглецю й азоту є сидерати бобових культур, деструкція їх маси протікає швидше за деструкцію соломи, і целюлозоруйнівна активність у 2,3 рази була вищою (рис. 1). Застосування комплексу мікроорганізмів достовірно збільшувало целюлозоруйнівну активність ґрунту, адже він

Таблиця 1

Вплив комплексної інокуляції насіння пшениці озимої сорту Миронівська 61 на інтенсивність респірації ґрунту

| №№ варіантів | Варіант дослідю | Інтенсивність респірації, мг CO ₂ /кг ґрунту |
|--------------|----------------------|---|
| 1 | Контроль | 28,8 ± 0,5 |
| 2 | НРК | 33,9 ± 0,5 |
| 3 | НРК+ПКМ | 35,8 ± 2,3 |
| 4 | НРК+ПКМ+ФАР | 37,1 ± 0,5 |
| 5 | Солома | 54,1 ± 0,5 |
| 6 | Солома+ПКМ | 56,1 ± 0,5 |
| 7 | Солома+НРК+ПКМ | 54,9 ± 0,4 |
| 8 | Солома+НРК+ПКМ+ФАР | 56,0 ± 0,1 |
| 9 | Гній | 50,3 ± 0,5 |
| 10 | Гній+ПКМ | 51,6 ± 0,8 |
| 11 | Гній+НРК+ПКМ | 50,7 ± 0,9 |
| 12 | Гній+НРК+ПКМ+ФАР | 53,3 ± 0,5 |
| 13 | Сидерати | 60,0 ± 0,8 |
| 14 | Сидерати+ПКМ | 63,2 ± 0,5 |
| 15 | Сидерати+НРК+ПКМ | 62,6 ± 0,9 |
| 16 | Сидерати+НРК+ПКМ+ФАР | 68,1 ± 0,5 |

містить, крім високоактивних целюлозоруйнівних, ще й азотофіксувальні й фосфатмобілізівні, мікроорганізми, які забезпечують доступними формами азоту і фосфору целюлозоруйнівну мікробіоту. Майже у 4 рази активізувався процес

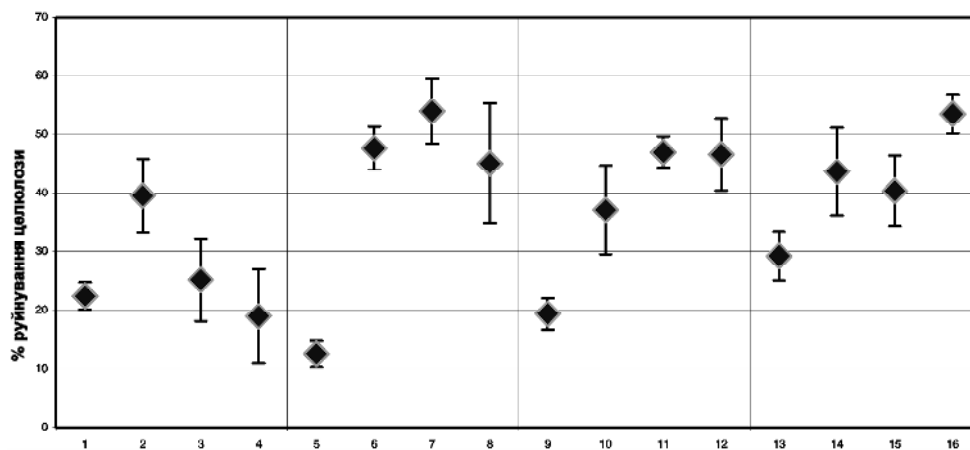


Рис. 1. Целюлозоруйнівна активність ризосфери пшениці озимої сорту Миронівська 61 за варіантами дослідю



розкладу целюлози у ризосфері інокульованої озимої пшениці при її вирощуванні з внесенням у ґрунт соломи. Подібному збільшенню целюлозоруйнівної активності сприяло й внесення мінеральних добрив, які можливо замінити біологічними.

Мікробіоті належить також важлива функція формування фунгістатичного статусу ґрунту, який має велике значення для проявів фітопатогенезу, адже підвищена загальна чисельність мікроскопічних грибів у ризосферному ґрунті є потенційною загрозою розвитку хвороб рослин [9]. У наших дослідках при використанні біоагенту препарату хетомік мікроміцета *C. cochlíodes* 3250, як антифунгального компонента мікробного комплексу, чисельність мікроскопічних грибів у ризосфері інокульованих рослин зростала (рис. 2).

Вивчення таксономічної різноманітності мікроміцетів у ризосфері рослин показало, що мікотрофність прикореневої зони формується за допомогою розвитку конкурентоспроможного інтродуцента *C. cochlíodes*, адже у 2,5-3,0 рази знижується різноманітність інших мікроміцетів (рис. 3).

Органічні добрива впливали на антифунгальну активність ґрунту в на-

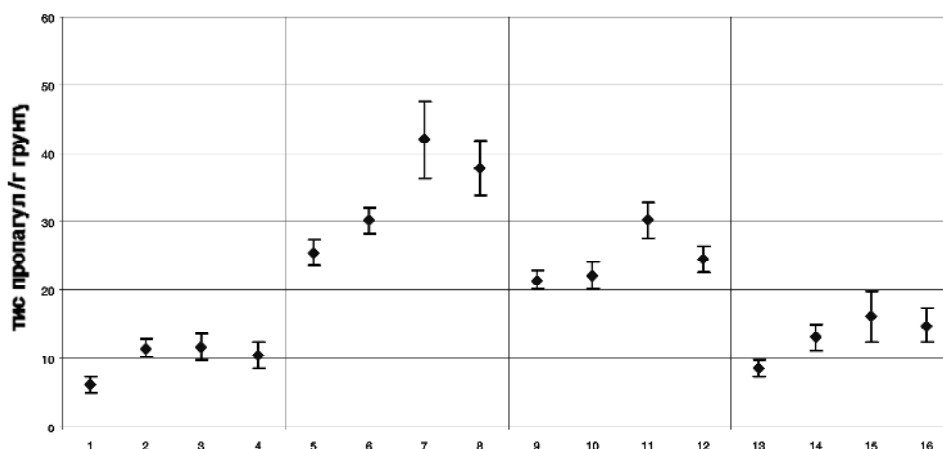


Рис. 2. Чисельність мікроміцетів у ризосфері озимої пшениці сорту Миронівська 61 за варіантами дослідження

шому досліді, але достовірне її збільшення забезпечувало тільки внесення у ґрунт гною, що можна пояснити високим вмістом у гної різних видів конкурентоспроможних мікроорганізмів з агрономічно цінними властивостями, зокрема антагоністів фітопатогенних мікроорганізмів. Проте, штучна

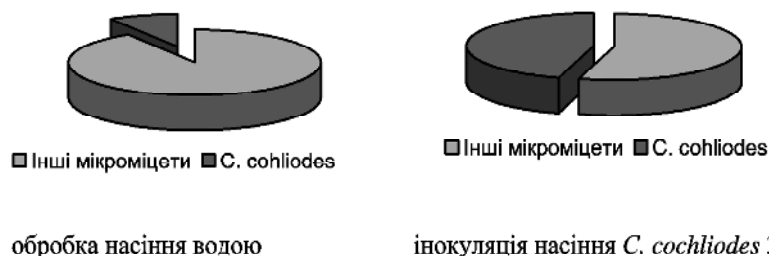


Рис. 3. Зростання частки мікроміцетів роду *Chaetomium* у ризосфері озимої пшениці сорту Миронівська 61, інокульованої поліфункціональним комплексом мікроорганізмів



інокуляція насіння комплексом мікроорганізмів, який складається з високо конкурентоспроможних мікроорганізмів – антагоністів фітопатогенних грибів, і подальше вирощування рослин на фоні органо-мінеральних добрив у всіх варіантах позитивно впливали на антифунгальну активність ґрунту (рис. 4).

Підвищення антифунгального статусу ґрунту кореневої зони озимої пшениці застосуванням біоорганомінерального комплексу агрозаходів спричинило зниження ураженості посівів корневими гнилями. Обробка насіння до посіву комплексом мікроорганізмів покращила санітарний стан

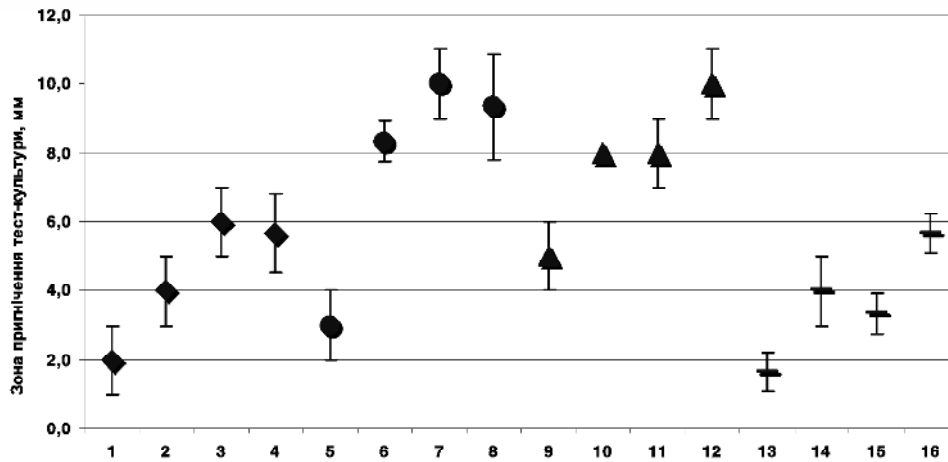


Рис. 4. Антифунгальна активність ризосфери озимої пшениці сорту Миронівська 61 за варіантами дослідів

посівів за розвитком корневих гнилей на 14,5 %, та за поширенням хвороб – на 33,9 % (табл.2). Вирощування інокульованих рослин на ділянках, удобрених мінеральними або органічними добривами ще на 10 – 24 % знижує ураженість рослин. Додаткове припинення поширення корневих гнилей у посіві на 27,9 % та 20,5 % спостерігали лише при вирощуванні рослин на ділянках удобрених, відповідно, гноєм або соломною.

Таблиця 2

Вплив поліфункціонального комплексу мікроорганізмів (ПКМ) на ураження посівів озимої пшениці сорту Миронівська 61 корневими гнилями

| Варіант | Поширення хвороб, % | Зниження, % | Розвиток хвороб, % | Зниження, % |
|---------------|---------------------|-------------|--------------------|-------------|
| Контроль | 68 ± 4,5 | - | 34,6 ± 2,4 | - |
| ПКМ | 45 ± 4,5 | 33,9 | 29,6 ± 1,4 | 14,5 |
| НРК + ПКМ | 45 ± 3,8 | 33,9 | 21,3 ± 1,7 | 38,4 |
| Солома + ПКМ | 31 ± 1,8 | 54,4 | 24,4 ± 0,9 | 29,5 |
| Гній + ПКМ | 26 ± 2,0 | 61,8 | 22,6 ± 0,9 | 34,7 |
| Сидерат + ПКМ | 44 ± 3,1 | 35,3 | 26,1 ± 2,3 | 24,6 |



Рівень фітотоксичності ґрунту дослідного поля під озимою пшеницею був невисоким, але він ще знижувався у варіантах, де вносили органічні добрива (окрім соломи). Наші дослідження підтверджують відомий факт зростання токсичності ґрунту під впливом продуктів розкладання соломи, тобто заорювання солом'яної різки достовірно підвищує цей показник до 39,3 % проти 21,2 % у контрольному варіанті (рис. 5). Але те, що інтродукція в ризосферу рослин комплексу досліджених мікроорганізмів нівелювала дію цього негативного фактору і в 4 рази знижувала фітотоксичність ґрунту, є важливим позитивним наслідком для агроєкосистеми. Ґрунт кореневої зони рослин, які вирощуються на ділянках, удобрених гноєм, характери-

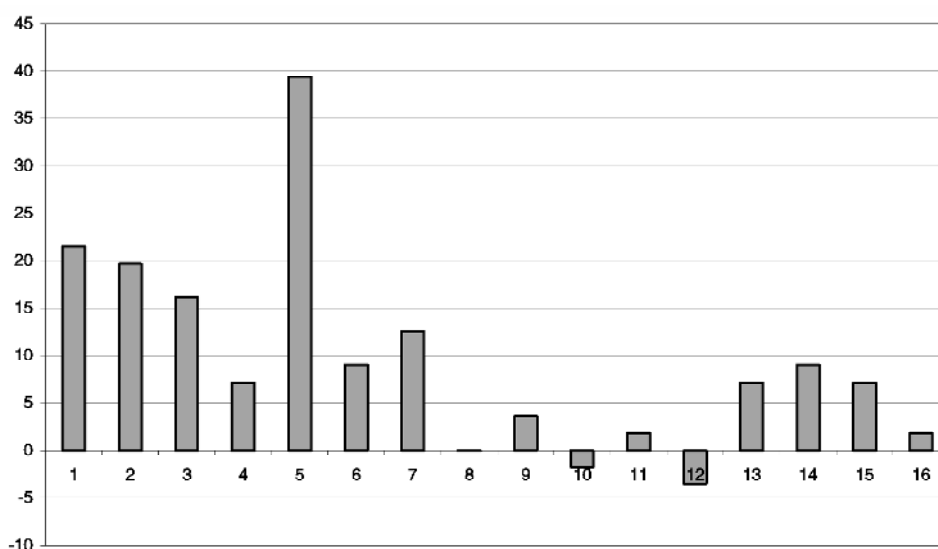


Рис. 5. Фітотоксичність ґрунту ризосфери озимої пшениці сорту Миронівська 61 за варіантами дослідження

зується відсутністю токсичності й, навіть, набуває стимулювальних властивостей, особливо при поєднанні з фізіологічно активною речовиною ендофіт-Л-1.

Таким чином, обробка насіння поліфункціональним комплексом мікроорганізмів при вирощуванні пшениці озимої сорту Миронівська 61 з удобренням ґрунту соломою, гноєм або сидератами позитивно впливає на показники біологічної активності ґрунту ризосфери. Підвищується інтенсивність респірації, целюлозоруйнівна та антифунгальна активність, знижується фітотоксичність ґрунту і ураженість рослин кореневими гнилями.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Tilman D., Cassman K.G., Matson P.A., Naylor R., Polaskyt S.* Agricultural sustainability and intensive production practices // *Nature*. – 2002. – 418(6898). – Р. 671-677.
2. *Кисіль В.І.* Агрохімічні аспекти екологізації землеробства. – Х.: 13 типографія, 2005. – 167 с.
3. *Біологічний азот* / Під ред. В.П. Патики. – К.: Логос, 2003. – 424 с.
4. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М., 1991.



5. *Некоторые новые* методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств: Метод. рек. – Ленинград, 1982. – С. 23-25.

6. А.с. 628143 СССР, М. Кл³ G 01 N 33/24 / Способ определения фитотоксичности почвы. Ю.М. Мочалов, Н.К. Шерстобоев. СССР; Оpubл. 23.01.82; Бюл. № 3.

7. *Штатнов В.И.* К методике определения биологической активности почвы // Докл. ВАСХНИЛ. – 1952. – Вып. 6. – С. 27-33.

8. *О.В. Шерстобоева, А.І. Шевченко, А.І. Твердохліб, Г.І. Кузьменко.* Ефективність застосування мікробіологічних препаратів для підвищення продуктивності ярої та озимої пшениці // Агроєколог. журн. – 2003. - № 1. – С. 47-50.

9. *Л.М. Полянская, С.М. Озерская, Г.А. Кочкина и др.* Численность и структура микробных комплексов корневых систем тепличных роз // Микробиология. – 2003. – Т. 72, № 4. – С. 554-562.

В.В. Чайковская, Я.В. Чабанюк, Е.В. Шерстобоева

Институт агроэкологии Украинской академии аграрных наук,
ул. Метрологическая, 12, г. Киев, 03143, Украина.

ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНИЙ МИКРОБНИЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ИНТЕГРИРОВАННЫХ СИСТЕМ ЗЕМЛЕДЕЛИЯ

Реферат

Подобран состав полифункционального комплекса микроорганизмов, который повышает биологическую активность почвы ризосферы озимой пшеницы, в частности интенсивность респирации, активность деструкции целлюлозы, антифунгальную активность, снижает фитотоксичность почвы, возникающую при разложении соломы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: полифункциональный комплекс микроорганизмов, биологическая активность почвы.

V.V. Chaykovska, J.V. Chabaniuk, O.V. Sherstoboeva

Institute of agroecology of Ukrainian Academy of Agrarian Sciences,
Metrologichna str.12. Kyiv, Ukraine

MULTIFUNCTIONAL MICROBIAL COMPLEX FOR THE AGRICULTURAL INTEGRAL SYSTEMS

Summary

It has been established the positive effect of introduction of the multifunctional complex of microorganisms of rhizosphere winter wheat. High activity of different strains can increase general biological activity, activate destruction of cellulose the amounts in the soils, establishing antifungal capacity of the soil.

K e y w o r d s: multifunctional complex of microorganisms, biological activity of soil.

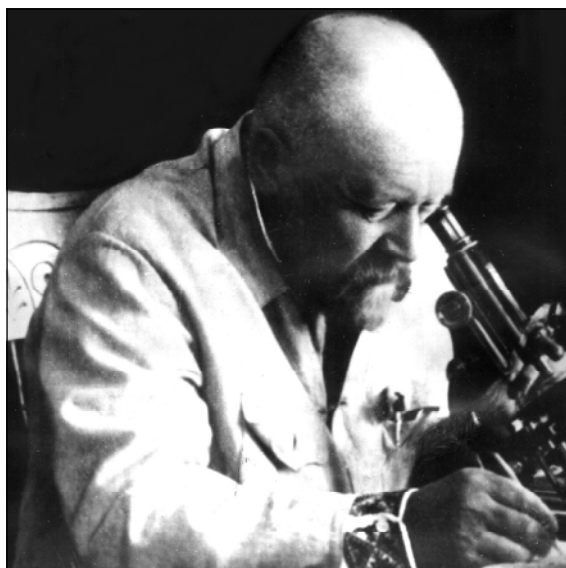


УДК: 579:923 Заболотний (477.74)

В.О. Кузнєцов, Н.В. Кузнєцова

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, cuznetsov@meta.ua

**ЖИТТЯ ТА НАУКОВО-ПЕДАГОГІЧНА
ДІЯЛЬНІСТЬ АКАДЕМІКА
Д.К. ЗАБОЛОТНОГО В ОДЕСІ
(28.12.1866 – 15.12.1929)**



На підставі вивчення архівних матеріалів Інституту архівознавства НБУ імені В.І. Вернадського АН України, Державного архіву Одеської області, особистих архівів викладачів Одеського університету та літературних джерел розглянуто основні події науково-педагогічної діяльності Д.К. Заболотного, що пов'язані з його перебуванням у м. Одесі у різні роки.

К л ю ч о в і с л о в а: історія, мікробіологія, Д.К. Заболотний, Одеський університет.

Данило Кирилович Заболотний — український мікробіолог і епідеміолог, академік АН СРСР (з 1929), академік АН УРСР (з 1922), її президент у 1928-1929 рр., випускник Новоросійського університету (1891), нині Одеський національний університет імені І.І. Мечникова [1, 7].

© В.О. Кузнєцов, Н.В. Кузнєцова



Все життя Д. К. Заболітного тісно пов'язане з Одесою. Перший одеський період у житті Д.К. Заболітного налічує 11 років: з 1880 року, коли він вступив до п'ятого класу Рішельєвської класичної гімназії, і до закінчення навчання в Імператорському Новоросійському університеті. До університету Д.К. Заболітного зараховано у серпні 1885 р. У списках студентів і сторонніх слухачів Імператорського Новоросійського університету в першому півріччі 1885-1886 навчального року на Природничому відділенні фізико-математичного факультету серед інших студентів під № 9 знаходимо – «Заболітний Данило». В аналогічних списках за 1886 - 1887 н.р. інформація більш повна: «№8 - Заболітний Данило Кирилович, селянин, православний, дата народження – 2 січня 1867 р., місце народження – Подільська губернія» [32, с. 28; 33, с. 40]. Як видно з цього документа (рис. 1), дата народження, що наведена у ньому, не узгоджується з іншими джерелами, очевидно у Списках допущена помилка.

На той час на Природничому відділенні Фізико-математичного факультету читали лекції такі видатні вчені як П.М. Бучинський, О.А. Веріго, В.В. Заєнський, Ф.М. Каменський, О.О. Ковалевський, П.А. Спіро, М.О. Умов та ін. Деякі дослідники, невірно трактуючи вислів Д.К. Заболітного в «Життєписі» [12], доходять висновку, що він слухав лекції І.І. Мечникова і Л.С. Ценковського. На превеликий жаль, у період його навчання вони вже не працювали в університеті.

| ІУ СЕМЕСТРЪ. | | | | | | | |
|--------------|--------------------------------|-------------|----------------|-----------------|------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | Балаганецъ Самуилъ Агъевичъ | Мѣщанинъ | Ариано-григор. | 29 янв. 1865 г. | Тюльинской губ. | Москов. унив. | Авг. 1886 г. |
| 2 | Балашовъ Николай Васильевичъ | Мѣщанинъ | Православнаго | 16 апр. 1858 г. | Петерб. губ. | Быв. студ. Нов. университета | Авг. 1886 г. |
| 3 | Вонадоронъ Василій Николаевичъ | Мѣщанинъ | Православнаго | 2 авг. 1866 г. | Херсонской губ. | Вѣжли. институт. | Авг. 1885 г. |
| 4 | Бѣчкихинъ Аванасій Алексѣевичъ | Мѣщанинъ | Православнаго | 5 юля 1865 г. | Таврической губ. | Бердян. гимн. | Авг. 1885 г. |
| 5 | Вольсензонъ Давидъ Самуиловичъ | Мѣщанинъ | Еврейскаго | 21 юля 1864 г. | Подольской губ. | Быв. студ. Нов. университета | Авг. 1885 г. |
| 6 | Гальперинъ Михаилъ Абрамовичъ | Сынъ купца | Еврейскаго | 15 окт. 1866 г. | Херсонской губ. | Одесской 3 гим. | Авг. 1885 г. |
| 7 | Густяковъ Петръ Михайловичъ | Мѣщанинъ | Православнаго | 6 окт. 1862 г. | Саратовск. губ. | Казаиск. унив. | Авг. 1886 г. |
| 8 | Заболотный Даниилъ Кириловичъ | Крестьянинъ | Православнаго | 2 янв. 1867 г. | Подольской губ. | Ришельев. гимн. | Авг. 1885 г. |

Рис. 1. «Список студентов и посторонних слушателей Императорского Новороссийского университета во втором полугодии 1886 - 1887 учебного года» (фрагмент сторінки)

Л.С. Ценковський залишив Одесу ще у 1871 р., а що до І.І. Мечникова, Д.К. Заболітний пригадував: «Коли я був учнем гімназії, то пам'ятаю, як учитель природознавства реального училища (де природознавство викладалося краще) говорив, що в університеті нам буде викладати І.І. Мечников (...). На жаль, І.І. Мечникова в Університеті я вже не застав, — він був зайнятий на Бактеріологічній Станції» [16, с. 20]. До речі, їх перше особисте знайомство відбулося тільки у 1898 році, коли Д.К. Заболітного, вже відомого вченого, запросили до Пастерівського інституту в лабораторію

І.І. Мечникова. У лабораторіях Пастерівського інституту він проводив експерименти з чуми і прослухав курс лекцій з мікробіологічної техніки [3].

Д.К. Заболотний починає навчання в університеті у дуже складні часи. Він пригадує: «Починаючи з 1885 року, в університетах було введено новий статут 1883 року, і скасована їх автономія. Молодь хвилювалася, збиралися на сходки, переривалася звичайна робота» [13, с. 6]. Д.К. Заболотний не залишався осторонь цих подій. Його молодий допитливий розум шукав інтелектуального розвитку і студент приділяв науковій роботі багато часу. На формування особистості Д.К. Заболотного як дослідника найбільший вплив справили три наукові школи, які на той час активно розвивалися в Новоросійському університеті: І.І. Мечникова, через його учня і послідовника Я.Ю. Бардаха; О.О. Ковалевського і О.А. Веріго.

Данило Заболотний багато часу приділяє позааудиторним заняттям у лабораторіях О.О. Ковалевського та О.А. Веріго. Вірогідно, що саме ці дві особистості найбільше вплинули на молодого Д.К. Заболотного і залучили його до наукової роботи, якій він залишився відданим до останнього подиху.

Д.К. Заболотний пригадував, що «...ніде не почувався так добре, як в аудиторії О.О. Ковалевського» [11, с. 22]. Він захопився дослідженнями над філоксерою, яким присвячував навіть свої канікули [31]. Спогади Д.К. Заболотного надають можливості відчутти творчу атмосферу, яку створював О.О. Ковалевський навколо себе: «Для своїх наукових досліджень О.О. щоденно приходив до своєї університетської лабораторії (...)». Тут під його керівництвом працювали [П.М.] Бучинський, [Я.М.] Лебединський, [М.М.] Шульгін, [І.М.] Відгальм, [С.М.] Морін і відомий у подальшому бактеріолог [В.А.] Хавкін, який вивчав у ті часи механізм руху у інфузорій.

З тими, хто працював у лабораторії, О.О. Ковалевський щоденно обговорював удачі та невдачі, планував подальший хід роботи і часто цитував на лекціях результати їх досліджень.

Особливо цікаво було з ним на екскурсіях. Такі екскурсії бували як в околицях міста, на лимани, так і у більш віддалені місцевості, до Криму для ознайомлення з фауною Севастопольської бухти» [11, с. 22].

Багато уваги приділяв роботі зі студентами талановитий учень професора О.О. Ковалевського — доцент кафедри зоології В.М. Реп'яхов. Годинами просиджував він з ними над мікроскопами, вивчаючи загадковий світ Найпростіших. Василь Михайлович щиро зустрічав студентів, створював всі умови для їх роботи і знайомив з дивовижним світом мікроскопічних тварин. З цього юнацького захоплення і виросла у подальшому перша наукова робота Д.К. Заболотного «О свечении живых организмов» [30].

Проблему світіння води моря і лиманів не обходив увагою жоден з великих одеських зоологів. Перші дослідження цього яскравого явища провів професор Рішельєвського ліцею О.Д. Нордман [26]. З'ясуванням причин світіння води у Чорному морі займався також професор Л.С. Ценковський, який описав новий вид — *Noctiluca meleagris* Сепс. Завершальну крапку у розв'язанні цього питання поставив Д.К. Заболотний, який узагальнив дані попередників і довів, що причини світіння лиманів і моря мають різне походження. Про це Д.К. Заболотний зробив наукову доповідь «О светящихся организмах» на засіданні Новоросійського товариства природознавців [29, с. 5].

Після від'їзду з Одеси Л.С. Ценковського духовним лідером та науковим еталоном для студентів-природничників Новоросійського університету став А.О. Веріго, який приділяв велику увагу дослідженням прикладного



характеру. Він був одним з найактивніших членів Одеського бальнеологічного товариства. Досліджуючи процес грязеутворення в лиманах з точки зору фізичної хімії, він робить висновок про неможливість його протікання без участі мікроорганізмів [6]. Для перевірки цього припущення він вперше в Новоросійському університеті проводить мікробіологічні експерименти, до яких залучає усіх бажаючих студентів [25]. Саме з його лабораторії почався науковий шлях таких видатних учених-мікробіологів як Я.Ю. Бардах, О.М. Безредка, М. Вейнберг, М.Ф. Гамалея, В.А. Хавкін.

Є.М. Брусиловський пригадував: "Спостереження його [О.А. Веріго] було настільки запевняючим, що услід за повідомленням у засіданні Одеського Бальнеологічного Товариства 18 жовтня 1885 року одночасно декілька осіб, у тому числі і автор цього повідомлення, розпочали відшукувати у грязі ймовірних бактерій..." [4, с. 37]. За безпосередньою участю О.А. Веріго, його учнями М.Д. Зелінським і Є. М. Брусиловським були також проведені дослідження, які довели бактеріологічне походження сірководню у глибинах Чорного моря [19].

Проте плідна навчальна і наукова робота Д.К. Заболотного була перервана арештом і відрахуванням його з університету 21 листопада 1889 р. як «призвідника безладів». За участь у зборах студентів і роботі в гуртках робітників порту і залізниці студента четвертого курсу Д.К. Заболотного було ув'язнено. Майже три місяці просидів він у камері-одиначці № 35 Одеської в'язниці. Йому загрожувало заслання, і тільки виявлений в нього гострий поліартрит врятував його від Сибіру [9].

У своїй автобіографії Д.К. Заболотний пише: «В університетському житті не все йшло гладко. Після однієї зі студентських сходок, що виражала протест проти масового звільнення найбільш активних студентів, довелося і мені порвати з університетом. Втративши можливість наукової роботи, я знайшов притулок у заснованій невдовзі перед цим І.І. Мечниковим Бактеріологічній станції. Тут розпочалась моя наукова робота у галузі вивчення мікроорганізмів снігу, лиманної води (описано новий вид інфузорій, які світяться), у подальшому холери» [13, с. 6].

На станції панувала творча наукова атмосфера. Маленький колектив працював в усіх галузях мікробіологічної науки, яка тільки народжувалася. «Перший персонал тодішньої станції складався з І.І. Мечникова, його помічників М.Ф. Гамалії і Я.Ю. Бардаха, фельдшерів Рябова та Турчановської при 4 санітарах» [34, с. 7]. Станція знаходилася у спеціально найнятому приміщенні по вул. Гульовій, 4 (нині вул. Льва Толстого, 4). Разом з Пастерівськими щепленнями тут досліджувались чума і сибірка рогатої худоби. Проводились дослідження з дифтерії, тифу, холери, сухоти, малярії, вивчалися причини епізоотій серед птахів. У цей час І.І. Мечников розпочав дослідження з імунології і біологічних методів боротьби з ховраками за допомогою бактерій курячої холери [10]. Станція вела велику просвітницьку діяльність, влаштувала курси лекцій для земських лікарів і вперше у Росії організувала практичні заняття з бактеріології, які проводив Я.Ю. Бардах.

Знайомство з родиною Бардахів розпочалося у Д.К. Заболотного ще з дитинства і тривало все життя. Н.Є. Піцик [31] пише, що ще учнем гімназії Д.К. Заболотний отримував від учителя Ю. Бардаха природничу літературу. Саме за допомогою його сина — лікаря Я.Ю. Бардаха, студенту Заболотному пощастило уникнути заслання до Сибіру і знайти собі притулок на Бактеріологічній станції, де він отримав теоретичні знання і практичні уміння та навички з бактеріології, виконав свої перші наукові дослідження і написав магістерську роботу "О микробах снега" [8]. Протягом всього життя він



завжди знаходив собі притулок у домі Я.Ю. Бардаха.

Не переривались зв'язки Д.К. Заболотного і з університетським професором О.А. Веріго. Бактеріологічна станція сумісно з його лабораторією проводила дослідження з проблем мікробіології Чорного моря і лиманів. Ці питання розглядалися на засіданнях Бальнеологічного товариства. На одному з них зробив доповідь Д.К. Заболотний.

"125 засідання (23 березня 1891 р.)

(...). Все засідання після того було присвячено доповіді г. Заболотного "О фосфорисценции соляных лиманов" (Повідомлення не надано до друку)" [30]. Ця робота була надрукована пізніше на сторінках "Южнорусской медицинской газеты" [14].

Співробітники лабораторії О.А. Веріго і Бактеріологічної станції досліджували причини виникнення і накопичення сірководню у морській воді на значних глибинах. На засіданні Російського фізико-хімічного товариства М.Д. Зелінський відзначає: «Зразки морського ґрунту були узяті мною на канонірському човні "Запорожець" у п'яти різних пунктах. (...). Зібраний мною у серпні 1891 р. матеріал був привезений до Одеси, і тут на бактеріологічній станції і у хімічній лабораторії університету, разом з доктором [С.М.] Брусиловським ми почали дослідження» [18, с. 238]. В історії університету це були перші досліди у галузі морської мікробіології, які у подальшому були продовжені і розвинуті багатьма поколіннями одеських мікробіологів. Д.К. Заболотний також підключився до вивчення цієї проблеми, узагальнив весь фактичний матеріал щодо сірководневих і сірчаних бактерій і визначив їхню роль у кругообігу сірки в природі [15].

З великою повагою і вдячністю він завжди пригадував роки, які провів на станції: «Станція була тоді єдиним живим центром, де бився пульс істинної дослідницької наукової думки, і серед нас, студентської молоді, було дуже багато бажаючих туди поїти працювати. (...) Станція приваблювала увагу студентства, і нам було приємно там бувати» [16, с. 20].

Він випробував свої сили у різних галузях наукових досліджень, але зупинив свою увагу на медичній мікробіології, тому перед ним постала необхідність набуття медичної освіти. У Новоросійському університеті за тих часів медичного факультету ще не було. Після багатьох поневірянь та прохань у 1891 р. Д.К. Заболотний отримав дозвіл скласти екстерном державні іспити за університетський курс. Він одержує диплом I ступеню і вирушає до Києва для продовження освіти, де вступає на третій курс медичного факультету.

До речі, нами виявлена неузгодженість фактів щодо дати закінчення університету Д.К. Заболотним. У праці О.І. Маркевича «Двадцятипятилетие Императорского Новороссийского Университета», у розділі «Список лиц, окончивших курс в Императорском Новороссийском Университете за первое 25-летие существования университета (1865-1890 гг.)», прізвище Д.К. Заболотного знаходиться серед випускників 1889 р. за № 1671 [23]. Це був рік випуску курсу з природничого відділення, на якому він навчався. (Мабуть, тому і виникла ця помилка).

З від'їздом до Києва завершився перший період перебування Д.К. Заболотного в Одесі.

На деякий час Д.К. Заболотний приїздив до Одеси під час боротьби з епідемією бубонної чуми у 1910 р., коли завдяки його активній та цілеспрямованій організаційній діяльності вдалося уникнути серйозних наслідків у житті великого портового міста.

Другий недовготривалий період, коли Д.К. Заболотний жив і працював



у м. Одесі, нараховує три роки — 1920 -1923.

У 20-х роках Одеса була охоплена висипнотифозною епідемією. З жовтня 1919 по липень 1920 року було зареєстровано 22810 захворювань. У зв'язку з цим влада утворила надзвичайну комісію - «Чрезсыптіф», перед якою було поставлено невідкладне завдання: ліквідувати захворювання. Одеський лікар Г.С. Матульський писав, що в першу чергу «Чрезсыптіф» «...вимушений був створити спеціальний транспортний апарат з вивозу трупів, і за короткий час він вилучив із закладів і деяких медичних установ понад 1500 трупів» [24, с. 5]. Щоб опанувати ситуацією було вирішено запросити на допомогу місцевим лікарям Д.К. Заболотного. І хворий Данило Кирилович терміново вирушив до Одеси, куди прибув 15 лютого 1920 р. Зупинився він, як завжди, у Я.Ю. Бардаха, син якого О.Я. Бардах писав: «У двадцяті роки у нас декілька років жив Д.К. Заболотний. Квартира перетворилася на центр боротьби з епідемією. Тут часто бували [В. К.] Стефанський, [Л.В.] Громашевський та ін.

У ті роки життя в місті завмирало рано. Вечори батько і Д.К. Заболотний проводили в сумісних співбесідах. Вони обговорювали питання боротьби з епідемією, наукові проблеми, наукові новини, які уривками доходили до міста. Пригадували давнину» [2, с. 11] (рис. 2).

Лікар Л.О. Севаст'янов згадував: «Данило Кирилович запам'ятався мені у зимовій Одесі 1920 р. серед снігових заметів. Худий, зі впалими щокми, блискучими очима, Данило Кирилович був у довгій старій шинелі з витертим коміром и тримав туго набитий чимось портфель» [31, с. 198].

У найскладніших умовах, разом з постійною діагностичною роботою, Д.К. Заболотний продовжує наукову роботу з вивчення носіїв інфекції. Разом з колегами вони шукають збудника, вивчають етіологію й імунологію висипного тифу. Професор С.М. Щасний писав: «Важкі роки голоду, розрухи, народного мору, коли поряд з хімікалями, ватою, склом і фуражем

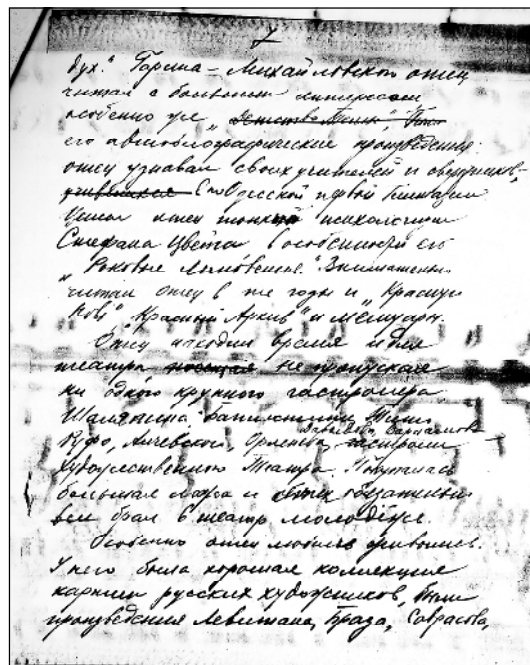


Рис. 2. Сторінка з рукопису О.Я. Бардаха «Воспоминания». Оригінал. (Друкується вперше)

для коней, кроликів і свинок треба було вишукувати, у буквальному розумінні слова, хліб для співробітників, проте ні на один день не зупинили ні в одному з відділень роботу Станції» [34, с. 13].

За цих неймовірно важких обставин Д.К. Заболотний за допомогою Я.Ю. Бардаха і В.В. Вороніна починають видавати «Праці наукової комісії з висипного тифу», і в 1920 - 1921 рр. виходить два випуски «Одесского сборника по сыпному тифу».

Усвідомлюючи роль санітарної освіти у боротьбі з інфекційними хворобами, Д.К. Заболотний завжди приділяв цій справі багато уваги. Виконуючи вкрай складну роботу з ліквідації епідемії, він працює і над створенням в Одесі першого в країні Будинку санітарної просвіти, який було відкрито у 1921 році. Пізніше Данило Кирилович пригадував: «Напівголодний художник намалював портрет Пастера, стіни ми розписали плакатами, лозунгами, прикрасили розмашисто виготовленими таблицями...» [17, с. 4].

У квітні 1920 року Одеський народний університет (таку назву мав університет з 1919 р.) було розформовано. Медичний факультет об'єднується з Вищими жіночими медичними курсами, і засновується Медичний інститут Вищої школи Одеси. У січні 1921 р. йому надано назву Медичної академії, а у листопаді того самого року перейменовано в Одеський медичний інститут [28]. 18 лютого 1921 р. наказом № 5 по Відділу реформ вищої школи Одеського губпрофобра професор Д.К. Заболотний призначається ректором цього навчального закладу [9]. Він одразу ж звернувся до Наркомпросу України з пропозицією заснувати при інституті самостійну кафедру епідеміології. Восени того самого року вона була відкрита. У складі новоутвореної кафедри перебувало лише три штатні одиниці – завідувач професор Д.К. Заболотний та двоє старших асистентів, Л.В. Громашевський і М.М. Соловійов. Для розміщення кафедри епідеміології було надано приміщення колишніх Вищих жіночих медичних курсів. Д.К. Заболотний склав для кафедри навчальний план і програми з нових курсів, написав перший вітчизняний посібник з епідеміології, який не втратив свого значення і містить цінний, просто і ясно викладений матеріал. [5].

За період роботи в Одеському медичному інституті Д.К. Заболотний створив наукову епідеміологічну школу, представники якої (Л.В. Громашевський, М.М. Соловійов та ін.) сформулювали основні принципові положення, що стали теоретичним підґрунтям епідеміології [27].

До останніх днів життя Д.К. Заболотний підтримував зв'язок з Одеським університетом і вболівав за стан розвитку тут загальної мікробіології і продовження славетних традицій своїх учителів І.І. Мечникова та Я.Ю. Бардаха. В архіві Інституту архівознавства АН України нами знайдено лист Д.К. Заболотного до ректора Одеського інституту народної освіти Т.М. Внукова, який датовано 24 червня 1929 р. (рис. 3).

«Дорогий Т. М. [Внуков]!

Розвиток секції і катедри мікробіології, зв'язаний з пам'яттю І.І. Мечникова і Я.Ю. Бардаха, основоположників цієї доктрини в Союзі, – найкраще можна забезпечити, призначивши керівником одного з найвидатніших молодих співробітників катедри тов. [Л.Й.] Рубенчика, наукові праці якого дають йому право проводити і виконувати з успіхом сучасні завдання» [21].

Цей лист не залишився поза увагою тодішніх керівників освіти. Л.Й. Рубенчика було призначено завідувачем мікробіологічного сектору Одеського науково-дослідного зоолого-біологічного інституту і професором кафедри технології в Одеському інституті зерна і борошна. Після відновлен-



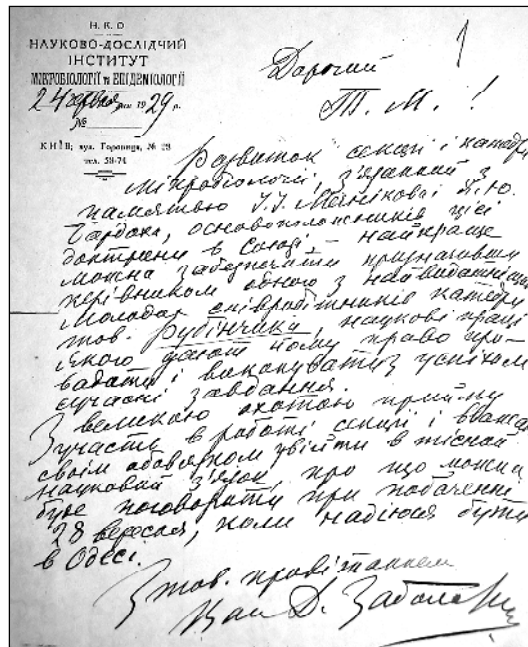


Рис. 3. Лист Д.К. Заболотного до ректора Одеського ІНО Т.М. Внукова. Оригінал (друкується вперше)

ня у 1933 році Одеського державного університету Л.Й. Рубенчик очолив кафедру мікробіології, якою керував до 19 липня 1941 р. [22].

Значну допомогу, як видатний організатор науки та талановитий педагог, академік Д.К. Заболотний надавав керівництву губернського відділу народної освіти Одеського губвиконкому. Данило Кирилович наполегливо працював у другому комітеті Губнаробразу, який охоплював діяльність вищих навчальних закладів та наукових установ. Академік Д.К. Заболотний приділяв максимум уваги переоснащенню та переобладнанню їхньої професійної діяльності на сучасному рівні [20].

У травні 1923 р. Д.К. Заболотний виїжджає до Страсбургу та Парижу на святкування сторіччя з дня народження Л. Пастера. Після повернення до Одеси у перших числах вересня розпочинає читати лекції, але вже 15 вересня передає кафедру епідеміології — асистенту Л.В. Громашевському. Кафедрою бактеріології він продовжує керувати до повідомлення, що йому доручено заснування ще однієї — третьої в його педагогічній практиці — кафедри мікробіології, епідеміології та вчення про дезінфекцію у Військово-медичній академії в Петрограді, яку він очолив 12 травня 1924 р.

Таким чином, майже 20 років життя та науково-педагогічної діяльності Д.К. Заболотного тісно пов'язані з м. Одесою. Великий вплив на формування науково-мікробіологічних поглядів Д.К. Заболотного справили видатні вчені Одеського (Новоросійського) університету О.А. Веріго, О.О. Ковалевський, І.І. Мечников, Я.Ю. Бардах.

Д.К. Заболотний до кінця свого життя не поривав зв'язків з Alma Mater і піклувався про продовження славетних мікробіологічних традицій в Одеському університеті, які започаткували його видатні вчителі.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бабий Т.П., Коханова Л.Л., Костюк Г.Г.* и др. Биологи: Биограф. Справ. — К.: Наук. думка, 1984.
2. *Бардах А.Я.* Воспоминания. б.д. Рукопись. Оригинал // Архив семьи Я.Ю. Бардаха.
3. *Билай В.И.* Даниил Кирилович Заболотный. — К.: Наук. думка, 1987. — 83 с.
4. *Брусиловский Е.М.* К вопросу о роли микроорганизмов в образовании лиманной грязи // Отчеты о деятельности Одесского бальнеологического общества. Вып. IV. С октября 1887 г. по январь 1891 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — О.: Пусск. Типогр. Исаковича, 1892. — 167 с.
5. *Васильев К.Г., Чуев П.Н., Васильев К.К.* Очерки истории высшей медицинской школы в Одессе. — О., 1999. — 240 с.
6. *Вериго А.А.* О влиянии микроорганизмов на образование лиманной грязи. — Одесса: Тип. «Одес. листка», 1887. — 107 с.
7. *Випускники Одеського (Новоросійського) університету:* Енциклопедичний словник. Вип. 1. / Відпов. ред. В.А. Сминтина — Одеса: Астропринт, 2005. — 264 с.
8. ДАОО. Ф. 45. Оп. 4. Од. зб. — 299.
9. ДАОО. Ф. 1395. Оп. 1. Од. зб. — 11.
10. *Диатропов П.Н.* Одесская бактериологическая станция (1892 - 1907) // Отчет Одесского государственного санитарно-бактериологического института им. И.И. Мечникова за 1925 - 1926 гг. — Одесса, 1927. — С. 21 - 30.
11. *Заболотный Д.К.* Академик А.О. Ковалевский (к 25-летию со дня его кончины) // Природа. — 1926. — №7/8. — С. 20 - 26.
12. *Заболотный Д.К.* Життєпис // Вибрані праці. — К.: Наук. Думка, 1969. — С. 3 - 5.
13. *Заболотный Д.К.* Автобиография // Билай В.И. Даниил Кирилович Заболотный. — К.: Наук. думка, 1987. — С. 2 - 4.
14. *Заболотный Д.К.* О фосфорисценции одесских лиманов // Южно-рус. мед. газ. — 1892. — №7. — С. 78 - 80.
15. *Заболотный Д.К.* Сероводородные и серные бактерии и их роль в природе // Д.К. Заболотный: Избр. тр. — К.: Изд-во АН УССР, 1956. — Т.1. — С. 258 - 265.
16. *Заболотный Д.К.* Основоположники Одесской бактериологической станции: Речь в торжественном заседании Научной конференции Института 12.09.1926 г. // Отчет Одесск. гос. санитарно-бактериолог. ин-та имени И.И. Мечникова за 1925 - 1926 гг. — О., 1927. — С. 19 - 21.
17. *Заболотный Д.К.* На саносвітній ниві // Шлях до здоров'я. — 1921. — №2. — С. 4 - 5.
18. *Зелинский Н.Д.* О сероводородном брожении в Черном море и одесских лиманах // Журнал Русского физико-химического общества. — Т. XXV, отд. 1, 1893. — С. 238 - 303.
19. *Зелинский Н.Д., Вериго А.А.* (Некролог) // Русские ведомости. — 1905. — № 78.
20. *Історія Одеси /* Кол. авт.; гол. ред. В.Н. Станко. — О.: Друк, 2002. — 558 с.
21. *Лист Президента ВУАН Д.К. Заболотного до ректора Одеського ІНО Т.М. Внукова.* Автограф // Інститут архівознавства АН України. — Ф. 156. — Оп. — 1. — Спр. 49. — Л. 1а.



22. *Личный листок* по учету кадров Рубенчика Льва Иосифовича / Институт архивоведения НБУ імені В.І. Вернадського. Ф. — №156, Оп. — 1, Спр. — 33, Л.л. — 1 - 2.

23. *Маркевич А.И.* Двадцатипятилетие императорского Новороссийского университета: Ист. зап. и акад. списки. — О.: Экон. тип., 1890. — 734 с.

24. *Матульский Г.С.* Некоторые данные из эпидемиологии сыпного тифа в г. Одессе за 1918 - 1920 гг. // Одесск. сб. по сыпному тифу / Под. ред. Д.К. Заболотного, В.В. Воронина, Я.Ю. Бардаха. — О.: Всеукр. гос. изд-во, 1921. — Вып.2. — С. 1-7.

25. *Меликов П.* Александр Андреевич Вериге // Журн. рус. физико-хим. общества. — 1905. — Т. 37. — Вып. 5. — С. 469 - 475.

26. *Нордман А.Д.* О городе Одессе в естественноиспытательном отношении, 1847, б/м.

27. *Одеський* медуніверситет. 1900 - 2000 / І.Л. Бабій, Ю.І. Бажора, В.М. Запорожан та ін.; За ред. В.М. Запорожана. — О.: Изд-во Одеськ. мед. ун-та, 2000. — 324 с.

28. *Одесский* университет за 75 лет (1865 - 1940) / Отв. ред. К.П. Добролюбский. — О., 1940. — 195 с.

29. *Отчет* о деятельности Новороссийского Общества Естествоиспытателей за 1890 г.

30. *Отчеты* о деятельности Одесского бальнеологического общества. Вып. IV. С октября 1887 г. по январь 1891 г. / Под ред. д-ра М. Погребинского. — О.: Русск. типогр. Исаковича, 1892.

31. *Пицък Н.Е.* Даниил Кириллович Заболотный: 1866-1929. — М.: Наука, 1988. — 303 с.

32. *Список* студентов и посторонних слушателей ИНУ в первом полугодии 1885 - 1886 учебного года. — О.: Типогр. «Одесского вестника», 1885.

33. *Список* студентов и посторонних слушателей ИНУ во втором полугодии 1886-1887 учебного года. — О.: Типогр. «Одесского вестника», 1887.

34. *Щастный С.М.* Одесский бактериологический институт за 40 лет // Отчет Одесск. гос. санитарно-бактериолог. ин-та имени И.И. Мечникова за 1925 - 1926 гг. — О., 1927. — С. 5-16.

В. А. Кузнецов, Н.В. Кузнецова

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, cuznetsov@meta.ua

ЖИЗНЬ И НАУЧНО-ПЕДАГОГИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ

АКАДЕМИКА Д.К. ЗАБОЛОТНОГО В ОДЕССЕ (28.12.1866 – 15.12.1929)

Реферат

На основе изучения архивных материалов Института архивоведения НБУ имени В.И. Вернадского АН Украины, Государственного архива Одесской области, личных архивов преподавателей Одесского университета и литературных источников, рассмотрены основные события в научно-педагогической деятельности Д.К. Заболотного, кото-



рые связаны с его пребыванием в г. Одессе в разные годы.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *история, микробиология, Заболотный, Одесский университет.*

V.O. Kuznetsov, N.V. Kuznetsova

¹Odesa National Mechnyckov University
Dvoryanska Str., Odesa, 65082, Ukraine, cuznetsov@meta.ua

**LIFE, SCIENTIFIC AND PEDAGOGICAL ACTIVITY OF ACADEMICIAN
D.K. ZABOLOTNY IN ODESA (28.12.1866—15.12.1929)**

Summary

On the basis of studying the archives materials of Institute of Archivestudying NLU named after V.I. Vernadskiy AN Ukraine, National Archive Odesa region, private archives of Odessa University teachers and literature sources the main events of the scientific and pedagogical (activity) of D.K. Zabolotny, connected with the years, spent in Odesa in different time have been investigated.

K e y w o r d s: history, Microbiology, Zabolotny, Odesa University.



**II ЛІТНЯ ШКОЛА "МОЛЕКУЛЯРНА
МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ",
ОДЕСА, 14-26 ТРАВНЯ, 2007р.**

**II SUMMER SCHOOL "MOLECULAR MICROBIOLOGY
AND BIOTECHNOLOGY",
ODESA, MAY 14-26, 2007**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова МОН України, Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, Товариство мікробіологів України імені С.М. Виноградського з 14 по 26 травня 2007 року організували та провели II Літню школу з молекулярної мікробіології і біотехнології. Перша Літня школа проходила з 15 по 31 травня 2006 року.

На базі кафедри мікробіології і вірусології ОНУ проходили I і II Літні школи з молекулярної мікробіології і біотехнології. Матеріально-технічне забезпечення та витрати на проведення занять у школи взяв на себе Одеський національний університет імені І.І. Мечникова. Заняття проводили співробітники Інституту мікробіології і вірусології НАН України на чолі з завідувачем відділу молекулярної вірусології д.б.н. Ф.І.Товкачем та кафедри мікробіології і вірусології ОНУ. Навчання в II Літній школі пройшли 24 молоді викладачі, наукові співробітники, аспіранти, студенти Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, Львівського національного університету імені Івана Франка, Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Програма теоретичного курсу «Автономні генетичні елементи бактерій: бактеріофаги, плазміди і транспозони», обсягом 20 годин, прочитаного Ф.І.Товкачем, включала такі питання:

Молекулярна генетика і молекулярна мікробіологія. Сучасні наукові концепції в молекулярній мікробіології. Біологічний метроном. Теорія нейтральної еволюції. Адаптивні мутації. Прокаріотно-еукаріотна дихотомія. Сучасні схеми класифікації прокаріотних і еукаріотних мікроорганізмів та вірусів. Домени життя.

Первинна послідовність геномів. Методи встановлення первинної послідовності — сіквенс. Бактеріальна геноміка. Топологія цілісних бактеріальних геномів. Ортологи і паралоги. Кластери ортологічних генів (COG). Концепція «найменшого» геному.

Автономні генетичні елементи бактерій. Інсерційні послідовності, транспозони, системи рестрикції-модифікації, плазміди, бактеріофаги, острівки і острови патогенності. Ієрархія і мобільність автономних генетичних елементів. Автономні генетичні елементи і виникнення нових патогенних бактерій.

Бактеріальні віруси. Сучасна класифікація бактеріофагів. Фаги з хвостовими відростками — порядок *Caudovirales*. Помірні і вірулентні бактеріофаги. Стратегія розвитку каудовірусів. Віруси еубактерій і архебактерій.



Фаги ентеробактерій і молочнокислих бактерій. Фаготерапія.

Геноміка профагів і островів патогенності. Фагова лізогенна конверсія. Фагові токсини. Концепція «моронів». Острови патогенності і система секреції III типу.

Дефектні бактеріофаги і бактеріоцини. Роль в міжбактеріальному антагонізмі. Перспективи використання бактеріоцинів – типування бактерій, біоконтроль бактеріальних популяцій і терапія раку.

Геноміка плазмід. Плазмідні детермінанти патогенності. Вектори на основі плазмід. Молекулярна генетика плазмиди pTi – C58 *Agrobacterium tumefaciens*. Трансгенні рослини.

Бактеріальні транспозони, IS-елементи, інтегрони і генні касети. Формування множинної антибіотикостійкості у бактерій. Концепція внутрішньогеномних перебудов – геномний інженеринг.

Екологія бактеріальних вірусів. Поширення і роль в глобальних обмінах речовини. Нові методи в екології бактеріофагів. Світовий океан і віропланктон.

Учасники II Літньої школи пройшли практичний курс навчання обсягом 60 годин, який включав 5 лабораторних занять.

Лабораторне заняття 1. Фаги порядку *Caudovirales*. Бактеріофаги *Escherichia coli*: T7 (родина *Podoviridae*), лямбда (*Syphoviridae*), P1 і T4 (*Myoviridae*). Класифікація. Морфотипи, організація віріонів. Віріонна ДНК.

Титрування фагів. Фагові бляшки (плаки), їх зв'язок з морфотипом, розміром віріонів та природою вірусів.

Препаративне одержання фагових часток. Метод злитного лізису чутливої культури. Концентрування фагових часток методом ПЕГ-преципітації (процедура Ямамото).

Виділення віріонної ДНК. Правила роботи з ДНК.

Рестрикційний аналіз. Ідентифікація бактеріальних вірусів за рестрикційними патернами їх геномів.

Лабораторне заняття 2. Молекулярна генетика помірною коліфага P1. Загальна і спеціалізована P1-трансдукція генетичних маркерів. Плазмідний профаг. Фагова система рестрикції-модифікації EcoP.

Температурна індукція лізогена *E. coli* C600 [P1::Tn9 (Cm^rcts 100)].

Одержання та тестування P1-лізогенів.

Плазмідні профілі лізогенів.

Обмеження продуктивного розвитку бактеріофага лямбда в клітинах *E. coli* (P1) за рахунок R/M системи EcoP1.

Лізогенізація фагом P1::Tn 9 клітин *Erwinia carotovora*.

Інкорпорація транспозона Tn9 в криптичну плазмиду pCA25 *E. carotovora*.

Лабораторне заняття 3. Плазмідні профілі бактерій. Форма і розмір позакромосомних кільцевих ДНК.

Особливості виділення плазмід у грамнегативних бактерій із природних екологічних ніш. Лужний метод Kado і Liu.

Ізоляція плазмідного профага P1 та плазмід ентеробактерій F, RP4, pCA25, pCA25::Tn9. Електрофоретичне розділення плазмідної ДНК. Залежність електрофоретичної рухливості ДНК від її розміру.

Лабораторне заняття 4. Транскон'югація і трансформація. Створення умов для горизонтального перенесення плазмід в бактеріальні клітини. Мобільність плазмід. Плазмідні вектори.

Транскон'югативні плазмиди. Перенесення плазмиди R68.45 із *E. coli* в *E. carotovora*. Селекція реципієнта і контрелекція донора. Частота транскон'югації.



Одержання кальцій-компетентних клітин та плазмідної ДНК.

Трансформація *E. coli* DH і JM109 голубими плазмідами pUC 18 і pBluescript. Частота трансформації. Плазмідні профілі транскон'югантів та трансформантів.

Лабораторне заняття 5. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) – синтез певного фрагменту ДНК *in vitro*. Різновиди ПЛР. ПЛР-діагностика бактеріального раку винограду: виявлення послідовностей Ті-плазміди патогенних штамів *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium vitis*. Метод "біо-ПЛР" у діагностиці хвороб рослин. Правила роботи у ПЛР-лабораторії.

Виділення плазмідної ДНК методом теплового лізису бактеріальних клітин. Реакційні суміші для проведення ПЛР.

Ампліфікація послідовностей Ті-плазміди штамів *Agrobacterium tumefaciens* і *Agrobacterium vitis*. Електрофорез продуктів ПЛР.

По завершенні учасники отримали посвідчення про те, що вони пройшли курс навчання в II Літній школі з молекулярної мікробіології і біотехнології.

В.О. Іваниця



СЛОВНИК ЯК НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК GLOSSARY AS TRAINING MANUAL

Автори словника: В.О. Іваниця, В.С. Підгорський, Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Бурлака, Б.П. Мацелюх, І.Г. Скрипаль — вчені-мікробіологи, які представляють Одеський національний університет імені І.І. Мечникова та Інститут мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного Національної академії наук України.

Автори присвятили свою працю пам'яті заслуженого діяча науки України, двічі лауреата Державної премії України в галузі науки і техніки, лауреата премій імені Д.К. Заболотного та О.В. Паладіна, академіка Валерія Веніаміновича Смірнова.

У словнику подано близько 3000 термінів та словосполучень. Мікробіологія, як і усі сучасні науки, розвивається у тісному контакті з суміжними дисциплінами, тому словник обіймає, крім термінів мікробіології та вірусології, терміни з імунології, біохімії, генетики, біотехнології, які також є широко вживаними у сучасній навчальній та науковій загальнобіологічній термінології. Словник укладено на відповідному науковому рівні.

Життя словників довге. Цьому чимало прикладів має наука. До словників, зазвичай, звертається не одне покоління користувачів. Однак навіть фахові словники, які відображують термінологію однієї науки або спільної з нею галузі, повинні збагачуватися новими поняттями та термінами, завдяки новим науковим відкриттям та технологіям. Саме до таких наук, які сьогодні розвиваються швидкими темпами і спираються на класичну науку, належить мікробіологія.

Бажано відзначити два моменти: простоту системи позначок у словнику, що робить його зручним при використанні, та поєднання перекладного і етимологічного принципів. Так, у словнику наводиться походження термінів, зокрема, з латинської та грецької мов, які свого часу широко використовувалися наукою та згодом стали основою класичної термінології.

Етимологічний принцип, безумовно, поширює загальний фаховий світогляд користувачів, науковців і навіть школярів, та сприяє підвищенню інформаційно-пізнавальної ролі цього видання.

Необхідність появи такого словника викликана нагальною потребою сучасного наукового життя. І базується на поширенні української мови як державної, зокрема у наукових колах, на необхідності донесення мікробіологічної термінології до її потенційних користувачів.

Л.В. Капрельянц



**ВИЙШЛИ В СВІТ
PUBLISHED WORKS**

п і д р у ч н и к и

Вершигора А.Ю., Пастер Є.У, Колибо Д.В., Позур В.К., Віхоть М.Є., Михальський Л.О., Швець Ю.В., Холодна Л.С., Моложава О.С. ІМУНОЛОГІЯ : Підручник для вищих навч. закл. / за заг. ред. Є.У. Пастер. — К. : Вища шк., 2005. — 599 с.

Сергійчук М.Г., Позур В.К., Вінніков А.І., Фурзікова Т.М., Жданова Н.М. МІКРОБІОЛОГІЯ: Підручник для студ. вищих навч. закл. / Київський національний ун-т ім. Тараса Шевченка. — К. : ВПЦ "Київський ун-т", 2005. — 375 с.

Капрельянц Л.В., Пилипенко Л.М., Єгорова А.В., Кананихіна О.М., Кобелєва С.М., Величко Т.О. ТЕХНІЧНА МІКРОБІОЛОГІЯ : підручник для студ. вищих навч. закл. / за заг. ред. Л.В. Капрельянца. — Одеса : Друк, 2006. — 308 с.

Нетрусов А.И. Котова И.Б. МІКРОБІОЛОГІЯ: учебник для студ. вузов. — М. : Академия, 2006. — 352 с.

п о с і б н и к и

Антипчук А.Ф., Кіреєва І.І. ВОДНА МІКРОБІОЛОГІЯ: навч. посіб. для студ. вищ. навч. закл. — К.: Кондор, 2005. — 256 с.

Нетрусов А.И., Єгорова М.А., Захарчук Л.М. Колотилова Н.И., Котова И.Б. ПРАКТИКУМ ПО МІКРОБІОЛОГІИ: Учебное пособие для студ. вузов. обуч., по направлению 510600 "Биология" спец. 012400 "Микробиология" и биол. спец. / А.И. Нетрусов (ред.). — М. : Академия, 2005. — 603 с.

Іваниця В.О., Підгорський В.С., Н.Г. Юргелайтіс, Т.В. Бурлака, Б.П. Мацелюх, І.Г. Скрипаль СЛОВНИК ТЕРМІНІВ У МІКРОБІОЛОГІЇ: навч. посібник для студ. біол. спец. вищ. навч. закл. — К. : Наук. думка, 2006. — 200 с.

м о н о г р а ф і ї

Волкогон В.В., Надкернична О.В., Ковалевська Т.М., Токмакова Л.М., Копилов Є.П., Козар С.Ф., Толкачов М.З., Мельничук Т.М., Чайковська Л.О., Шерстобоев М.К., Москаленко А.М., Халеп Ю.М. МІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ У ЗЕМЛЕРОБСТВІ. Теорія і практика: Монографія / за ред. В.В. Волкогона. — К. : Аграрна наука, 2006. — 312 с.

с л о в н и к и

Фирсов Н.И. МІКРОБІОЛОГІЯ: словарь терминов. — М. : Дрофа, 2005. — 256 с.

Галяс В.Л., Колотницький А.Г. БІОХІМІЧНИЙ І БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ СЛОВНИК. — Оріяна-Нова, 2006. — 486 с.



ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ INFORMATION FOR THE AUTHORS

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

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

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

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

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

До статті додається висновок експертної комісії установи про можливість опублікування 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 8 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди — до 10 стор., рецензії — до 3 стор., короткі повідомлення — до 2 стор.

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



При написанні статті необхідно дотримуватися такого плану:

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

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; література.

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

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

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

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

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то 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; графи, колонки мають бути точно визначеними логічно і графічно. Матеріал таблиць (як і рисунків) має бути зрозумілим і не дублювати текст статті. Цифровий матеріал таблиць слід опрацювати статистично.

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

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

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

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



посилатися на відповідний номер джерела літератури (у квадратних дужках).

У посиланні 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

Погорский В.С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *Мікробіол. журн.* — 1998. — 60, № 5. — С. 27 - 42.

Андреюк Е.И., Козлова И.А., Рожанская А.М. Микробиологическая коррозия строительных материалов // *Биоповреждения в строительстве*. — М.: Стройиздат, 1984. — С. 209 - 221.

Глоба Л.І., Погорван 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 phthalate 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 экспе-



римента / Редкол. "Микробиол. журн." – К., 1991. – 7 с. – Деп. в ВІНИТИ 03.01.92, № 1-В92.

На стандарти

ГОСТ 20264.4-89. Препараты ферментные. Методы определения амила-
литической активности. – М.: Изд-во стандартов, 1989. – 17 с.

На автореферати дисертацій

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

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії на-
дійшов остаточний варіант тексту статті після рецензування.

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



НОВИЙ СЛОВНИК NEW GLOSSARY



**У ВИДАВНИЦТВІ «НАУКОВА
ДУМКА» В СЕРІЇ «СЛОВНИКИ
УКРАЇНИ» ВИЙШОВ ДРУКОМ
УКРАЇНСЬКО-РОСІЙСЬКИЙ ТА
РОСІЙСЬКО-УКРАЇНСЬКИЙ
«СЛОВНИК ТЕРМІНІВ У МІКРО-
БІОЛОГІЇ».**

**З питань придбання словника
звертатися до видавництва «Фенікс»
(Телефон 8 (048) 7777-591, вул. Зоопар-
кова, 25, місто Одеса, 65009.
E-mail: maritimebooks@ yandex.ru).**

Автори словника: В.О. Іва-
ниця, В.С. Підгорський, Н.Г.
Юргелайтіс, Т.В. Бурлака, Б.П.
Мацелюх, І.Г. Скрипаль пред-
ставляють Одеський націо-
нальний університет імені
І.І.Мечникова та Інститут
мікробіології та вірусології
імені Д.К. Заболотного Націо-
нальної академії наук України.

Автори присвятили свою
працю пам'яті заслуженого дія-
ча науки і техніки України,
двічі лауреата Державної
премії України в галузі науки і
техніки, лауреата премій імені
Д.К. Заболотного та О.В. Па-
ладіна, академіка Валерія Вен-
іаміновича Смірнова.

У словнику подано близь-
ко 3000 термінів, понять і сло-
восполучень у мікробіології.

Видання складається з
двох частин: у першій частині
подано терміни українською
мовою та їх переклад російсь-
кою, в другій — російською
мовою та їх переклад українсь-
кою. У словнику поєднано пе-
рекладний та етимологічний
принципи. Словник має акаде-
мічний характер, у ньому дот-
римано правил останньої ре-
дакції чинного "Українського
правопису".

"Словник термінів у мікро-
біології" рекомендований Міні-
стерством освіти і науки Украї-
ни як навчальний посібник для
студентів біологічних спеціаль-
ностей вищих навчальних закладів.

