

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

МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ
MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Науковий журнал
Виходить 4 рази на рік
Засновано у липні 2006 року

№ 1(41)
2018

Одеса
ОНУ
2018

Засновник
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво про державну реєстрацію: серія КВ № 19409 від 17.08.2012 р.

ГОЛОВНИЙ РЕДАКТОР
В. О. Іваниця (Одеса, Україна)
ЗАСТУПНИК ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА
Т. О. Філіпова (Одеса, Україна)
ВІДПОВІДАЛЬНИЙ СЕКРЕТАР
Т. В. Бурлака (Одеса, Україна)

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ
А. Анадон (Мадрид, Іспаня), Л. Д. Варбанець (Київ, Україна), А. І. Вінніков (Дніпропетровськ, Україна), Р. А. Волков (Чернівці, Україна), Б. М. Галкін (Одеса, Україна), А. Гаміан (Вроцлав, Польща), П. І. Гвоздяк (Київ, Україна), Т. Ертле (Нант, Франція), Г. О. Іутинська (Київ, Україна), Л. В. Капрельянц (Одеса, Україна), Н. К. Коваленко (Київ, Україна), І. К. Курдиш (Київ, Україна), Б. П. Мацелюх (Київ, Україна), І. П. Метеліцина (Одеса, Україна), Ф. Моцці (Тукуман, Аргентина), В. П. Пагика (Київ, Україна), Петров С. А. (Одеса, Україна), В. С. Підгорський (Київ, Україна), А. А. Сибірний (Львів, Україна), Л. М. Сківка (Київ, Україна), М. Я. Співак (Київ, Україна), І. А. Тихонович (Санкт-Петербург, Росія), Ф. І. Товчач (Київ, Україна), В. О. Федоренко (Київ, Україна), Н. Чанішвілі (Тбілісі, Грузія), С. В. Чеботар (Одеса, Україна)

Науковий редактор випуску В. О. Іваниця

Прийняті до друку статті обов'язково рецензуються
Затверджено до друку Вченою радою
Одеського національного університету імені І.І. Мечникова

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

Реферативна база даних Україніка наукова», Index Copernicus Journals Master list, Наукова періодика України (Національна бібліотека України імені В. І. Вернадського), Ulrich's periodicals, Електронний архів-репозитарій Одеського національного університету імені І. І. Мечникова, Наукова періодика України (journal.uran.ua), Українські наукові журнали (usj.org.ua), Google Академія, Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Index. Reseach Bib, Наукова електронна бібліотека e-LIBRARY, IBI Factor

Завідувач редакцією Н. Г. Юргелайтіс
Редактори: Л. Б. Котлярова, І. В. Райко
Адреса редакції:
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна. Тел.: +38 (048) 723-28-39,
e-mail: journal.mbt@onu.edu.ua
<http://mbt.onu.edu.ua>

© Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова, 2018

Establisher
by Odesa National Mechnykov University.
Registration of state certification: KB № 19409. Date of issue 17.08.2012.

EDITOR-IN-CHIEF

V. O. Ivanytsia (Odesa, Ukraine)

CO-EDITOR-IN-CHIEF

T. O. Filipova (Odesa, Ukraine)

EXECUTIVE SECRETARY

T. V. Burlaka (Odesa, Ukraine)

EDITORIAL BOARD MEMBERS

A. Anadon (Madrid, Espana), N. Chanishvili (Tbilisi, Geordgia), S. V. Chebotar (Odesa, Ukraine),
V. O. Fedorenko (Kyiv, Ukraine), B. M. Galkin (Odesa, Ukraine), A. Gamian (Wroclaw, Poland),
P. I. Gvozdyak (Kyiv, Ukraine), T. Haertle (Nantes, France), G. O. Iutynska (Kyiv, Ukraine),
L. V. Kapreliants (Odesa, Ukraine), N. K. Kovalenko (Kyiv, Ukraine), I. K. Kurdish (Kyiv, Ukraine),
B. P. Matselyukh (Kyiv, Ukraine), I. P. Metelitsyna (Odesa, Ukraine), F. Mozzi (Tucuman, Argentina),
V. P. Patyka (Kyiv, Ukraine), Petrov S. A. (Odesa, Ukraine), V. S. Pidgorskyi (Kyiv, Ukraine),
M. Ya. Spivak (Kyiv, Ukraine), A. A. Sybirny (Lviv, Ukraine), L. M. Skivka (Kyiv, Ukraine),
I. A. Tykhonovych (St.-Peterburg, Russia), F. I. Tovkach (Kyiv, Ukraine), L. D. Varbanets (Kyiv, Ukraine),
A. I. Vinnikov (Dnipropetrovsk, Ukraine), R. A. Volkov (Chemivtsi, Ukraine)

Scientific editor V. O. Ivanytsia

Accepted for publishing articles are reviewed

Approved for publishing by Academic Council
of Odesa National Mechnykov University

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

**Bibliographic Database «Ukrainika scientific», Index Copernicus Journals Master List,
Scientific Periodicals in National Library of Ukraine Vernadsky, Ulrich's periodicals,
Scientific Periodicals of Ukrain (journal.uran.ua), Ukrainian Scientific journals (usj.org.
ua), Institutional Repository at Odesa I. I. Mechnykov National University, Google Scholar,
Base-search, Citefactor, Advanced, Sciences Reseach Bib, e-LIBRARY, IBI Factor**

Publishing editor N. G. Yurgelaitis

Editors: L. B. Kotlyarova, I. V. Raiko

A d d r e s s:

Odesa National Mechnykov University,

Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine Tel.: +38 (048) 723-28-39,

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

<http://mbt.onu.edu.ua>

© Odesa National Mechnykov
University, 2018

ЗМІСТ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ПРАЦІ

Т. О. Філіпова, М. Б. Галкін, М. Я. Головенко ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТИЛОРОНУ – АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ІНГРЕДІЄНТУ АМІКСИНУ, В МІКРОПЛАНШЕТНОМУ ВАРІАНТІ ТЕСТУ ЕЙМСА	6
В. Б. Настенко, Ю. В. Короткий, О. А. Смертенко, Н. О. Осипчук, В. П. Ширококов, А. П. Чоботар ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СОЛЕЙ АЛКІЛ (R-АРИЛ) ОКСИДИАЛКІЛ АМОНІЮ ЩОДО РЕФЕРЕНТНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ	18
Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Л. С. Нещерет, К. І. Семенов, Т. В. Васильєва, І. А. Блайда БАКТЕРІАЛЬНЕ ВИЛУГОВУВАННЯ МЕТАЛІВ З ВІДПРАЦЬОВАНОЇ МАСИ ПАЛИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ	28
Т. Сегін, С. Гнатуш, О. Масловська, О. Василів АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ГЛУТАТИОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ БАКТЕРІЙ <i>CHLOROBIDIUM LIMICOLA</i> ІМВ К-8 ЗА ВПЛИВУ КУПРУМУ (II) СУЛЬФАТУ	39
Н. В. Ліманська, Н. Ю. Адарма ВПЛИВ <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> НА <i>FUSARIUM SP.</i> ЗБУДНИКА ФУЗАРІОЗУ СІЯНЦІВ СОСНИ	47
О. В. Тарабас, С. О. Гнатуш, А. А. Галушка, О. М. Мороз ПІГМЕНТИ <i>RHODOPSEUDOMONAS YAVOROVII</i> ІМВ В-7620	57
Н. І. Теслюк УТВОРЕННЯ МНОЖИННИХ ПАГОНІВ ВИНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i> НА РІЗНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ	66
АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ, ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ «МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ» У 2017 РОЦІ	76
ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ	82

CONTENTS

EXPERIMENTAL WORKS

T. O. Filipova, M. B. Galkin, M. Ya. Golovenko MUTAGENIC ACTIVITY OF TILORONE – ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE OF AMIXIN IN MICROTITER PLATE VARIANT OF AMES TEST	6
V. B. Nastenکو, Yu. V. Korotkiy, O. A. Smertenko, N. O. Osypchuk, V. P. Shyrobokov, A. P. Chobotar STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ALKYL (R-ARYL) OXY DIALKYL AMMONIUM SALTS TOWARDS THE REFERENCE STRAINS OF MICROORGANISMS	18
N. Yu. Vasyleva, L. I. Slusarenko, L. S. Nescheret, K. I. Semenov, T. V. Vasyleva, I. A. Blayda BACTERIAL LEACHING OF THE METALS FROM THE SPENT MASS OF FUEL ELEMENTS	28
T. Segin, S. Hnatush, O. Maslovska, O. Vasylyv ENZYMES ACTIVITY OF GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM OF <i>CHLOROBIVM LIMICOLA</i> IMV K-8 BACTERIA UNDER THE INFLUENCE OF COPPER (II) SULFATE	39
N.V. Limanska, N.Yu. Adarma EFFECT OF <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> ON THE AGENT OF DAMPING-OFF OF PINE SEEDLINGS	47
O.V. Tarabas, S.O. Hnatush, A.A. Halushka, O.M. Moroz PIGMENTS OF <i>RHODOPSEUDOMONAS YAVOROVII</i> IMV B-7620	57
N.I. Teslyuk FORMATION OF THE MULTIPLE GRAPE SHOOTS IN CULTURE <i>IN VITRO</i> ON DIFFERENT NOURISHING MEDIA	66
ALPHABET INDEX OF PAPER PUBLISHED IN JOURNAL “MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY” IN 2017 YEAR	76
INSTRUCTIONS FOR THE AUTHORS	82

УДК 547.6:57.083.138.4:575.162

Т. О. Філіпова¹, М. Б. Галкін¹, М. Я. Головенко²

¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilipova@ukr.net

²Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТИЛОРОНУ – АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧНОГО ІНГРЕДІЄНТУ АМІКСИНУ, В МІКРОПЛАНШЕТНОМУ ВАРІАНТІ ТЕСТУ ЕЙМСА

Мета роботи – виявити можливе індукування генних мутацій за дії тилорону – активного фармацевтичного інгредієнту аміксіну. *Методи.* Здатність тилорону викликати генні мутації оцінювали у тесті Еймса на штамах *Salmonella typhimurium* TA 98 (мутації за типом зсуву рамки зчитування) і TA 100 (точкові мутації типу заміни пар основ). Тилорон використовували у концентраціях 5, 10, 50, 100 та 250 мкг/мл. Як стандартні мутагени застосовували 2-нітрофлуорен для *Salmonella typhimurium* TA 98 і азид натрію для *Salmonella typhimurium* TA 100 у тестах без метаболічної активації. У тестах з метаболічною активацією як мутаген для обох штамів використовували 2-аміноантрацен. Експерименти проводили без та з використанням метаболічної активації. У роботі використовували тест-набір Muta-ChromoPlate kit, виробництва фірми Biototoxicity, Канада. Результати оцінювали за кількістю лунок з мутованими клітинами, що реєстрували за зміною забарвлення середовища з пурпурного на жовтий. Токсичність тилорону відносно досліджуваних штамів сальмонел оцінювали при тих самих концентраціях. *Результати.* Одержані дані показали, що за дії стандартних мутагенів відсоток лунок з мутованими клітинами дорівнював 82–91%, у той час, як у негативному контролі він не перевершував 4,2%. За дії тилорону цей показник знаходився у межах 4–16% і був у 3,3–13,0 рази нижчим за мінімальне значення – 52%, яке за протоколом мікропланшетного тесту є свідченням мутагенної активності. За усіх використаних концентрацій тилорон не впливав на ріст обох досліджуваних штамів *Salmonella typhimurium*. *Висновки.* Тилорон у межах використаних концентрацій не викликав генних мутацій і не чинив токсичної дії на штами *S. typhimurium* TA 98 та TA 100.

Ключові слова: генні мутації, тест Еймса, тилорон, аміксин.



Аміксин (тилорон) – дигідрохлорид 2,7-біс[2-(диетиламіно)етокси]флуоренон-9 є низькомолекулярним синтетичним індуктором синтезу інтерферону, активність якого при пероральному введенні була вперше доведена в 1970 р. G. Mayer, R. Kruger [13].

Протягом багатьох років біологічні й хімічні властивості даної сполуки уважно вивчаються в багатьох лабораторіях світу. Дослідження тилорону за кордоном на певному етапі принесли суперечливі результати й тому викликали деякий скептицизм відносно його перспективності як протипухлинного імуностимулятора [15]. Однак, більш ніж 30-річний досвід клінічного застосування аміксину свідчить про його безпечність та ефективність до широкого кола захворювань інфекційного та неінфекційного генезу [1, 3]. Препарат здійснює пригнічувальний ефект на процеси репродукції вірусу, блокуючи адсорбцію вірусів; синтез вірус-специфічних білків і складання зрілих вірусних частинок, розпізнаючи і дискримінуючи вірусні інформаційні РНК від клітинних; пригнічує внутрішньоклітинне розмноження вірусів. Саме тому до дії тилорону чутливі практично всі РНК- та ДНК-віруси.

Аналіз робіт, присвячених з'ясуванню механізму дії тилорону і його аналогів, показав [6, 13] відсутність єдиного погляду на дане питання. Це пояснюється, певне, широким спектром його біологічної активності, множинністю мішеней в організмі, здатністю до взаємодії з різними ферментами, мембранами клітин тощо. Біологічні ефекти тилорону *in vitro* спочатку пов'язувалися з його здатністю індукувати інтерферон, проте пізніше було показано відсутність кореляції між рівнем індукованого інтерферону і ступенем противірусного захисту [8].

Було встановлено [19], що однією з ключових стадій біологічної дії тилорону є його взаємодія з нуклеїновими кислотами та олігонуклеотидами. В розчинах тилорон утворює стабільні нековалентні комплекси з ДНК, які виникають завдяки проникненню молекул сполуки між парами основ ДНК (комплекси інтеркалярного типу). Існує припущення, що механізм індукції синтезу інтерферону за допомогою тилорону зумовлено модифікацією інертних гомологічних нуклеїнових кислот в активні стимулятори інтерфероногенезу [12].

Збільшення відстані між парами азотистих основ у місці інтеркаляції ліганду супроводжується зміною кута між цими парами основ, що призводить до локального розкручування подвійної спіралі [10]. Методом мікрокалориметричного титрування було встановлено, що зв'язування з ДНК тилорону є екзотермічним процесом [16]. Основний сприятливий внесок у взаємодію має гідрофобна складова вільної енергії. Стабілізація інтеркаляційного комплексу відбувається в основному за рахунок Ван-дер-ваальсових взаємодій. Такий тип інтеркаляції викликає зміни в топології ДНК (розкручування), що веде до мутацій і впливає на функції ДНК, тому препарати, що вміщують субстанцію тилорону, безумовно, заслуговують на пильну увагу генетиків.

У літературі є суперечливі відомості щодо мутагенності тилорону: від визнання його мутагеном до опису антимутагенних властивостей. Згадки про його мутагенну дію відносяться до 70-х років минулого століття [5]. Автори на підставі експериментів з тест-штамом *S. typhimurium* TA 1537, чутливим



до речовин, що викликають мутацію типу заміни пар нуклеотидів зазначали, що тилорон у високих концентраціях є дуже слабким мутагеном, але не має канцерогенних властивостей. Крім того, автори припустили, що зазначена активність може бути пов'язана з присутністю домішок у препараті.

З появою в арсеналі дослідників нового, більш чутливого та специфічного методу (SOS-хромотест), заснованого на сучасних уявленнях про механізм мутаційного процесу, як наслідку функціонування SOS-репарації показало [18] відсутність мутагенної дії у тилорону. В іншій роботі [2] було вивчено вплив аміксину на спонтанний та індукований мутагенез у *S. typhimurium*. Отримані авторами результати свідчать про відсутність токсичності випробуваної концентрації (50 мкг/мл) розчину аміксину для тест-культури *S. typhimurium* TA 98. Показано, що випробуваний розчин не впливає на частоту спонтанних і індукованих біхроматом калію мутацій в культурі *S. typhimurium* TA 98, яка характеризується підвищеною частотою мутацій і високою чутливістю до мутагенів [14].

У зв'язку з гармонізацією українського і європейського законодавства в галузі регулювання обігу лікарських засобів в Україні зросли вимоги до якості доказової бази з безпеки і, зокрема, генотоксичності лікарських засобів, що відображено в Наказі МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. "Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів". Керівний документ Європейського Медичного Агентства [9] рекомендує набір методів, що дозволяють реєструвати всі типи генетичних змін. Особлива увага при цьому приділяється методам тестування речовин з використанням мікроорганізмів, як тест-об'єктів. Вони набули досить широкого застосування, так як мікроорганізми розмножуються швидко, утримувати їх досить просто і порівняно дешево. Одним з експрес-методів для виявлення мутагенної активності є тест Еймса, що базується на використанні штамів *Salmonella typhimurium* ауксотрофних за гістидином та здатних під дією мутагенів ревертувати до прототрофності. Ці тест-штами було сконструйовано Еймсом і співавт. [4] спеціально для скринінгових програм досліджень потенційної мутагенної активності чинників навколишнього середовища. Методами генно-інженерних маніпуляцій в геном бактеріальної клітини були введені спеціальні мутації, що забезпечують, з одного боку, максимальну чутливість тест-організмів до дії мутагенних агентів, молекули яких мають різноманітну величину і форму, з іншого – виявлення мутагенних агентів з різними механізмами дії. Так як малігнізація часто пов'язана з пошкодженням ДНК, цей тест також використовується як експресний метод оцінки канцерогенного потенціалу різних хімічних сполук і може бути доповненням стандартного тесту на гризунах.

Мета даних досліджень – виявити можливе індукування генних мутацій за дії тилорону – активного фармацевтичного інгредієнту аміксину.

Матеріали та методи

В дослідках було використано тилорон тверду порошкоподібну речовину, із високим рівнем розчинення у воді виробництва ТДВ «ІНТЕРХІМ». Сполуку досліджували у концентраціях 5, 10, 50, 100 та 250 мкг/мл. У контроль-



ному фоновому варіанті у лунку вносили відповідний об'єм стерильної води.

Визначення наявності мутагенних властивостей у тилорону проводили у мікропланшетному варіанті тесту Еймса з використанням тест-наборів (Muta-ChromoPlate kit, Biototoxicity, Канада). До їх ключових переваг слід віднести: наявність якісних та сертифікованих штамів *S. typhimurium* TA 98 (мутації за типом зсуву рамки зчитування) і TA 100 (мутації типу заміни пар основ); витрата невеликої кількості досліджуваної хімічної речовини, а також можливість автоматизації низки стадій при проведенні великих скрінінгових програм. Зручності надає і те, що цей набір містить стандартизовану постмітохондріальну фракцію (S9) печінки щурів, індукованих Aroclor 1254, та НАДФ-Н генеруючу систему, що дає можливість оцінити активність речовини без та з метаболічною активацією (+S9).

У дослідженні використано флукуаційний варіант тесту Еймса, який базується на визначенні ревертованих бактерій за їх метаболічною активністю [9]. Негативним контролем є кількість спонтанних ревертантних лунок з проб, що не містили досліджуваної сполуки. Позитивний контроль базується на використанні стандартних мутагенів: 2-нітрофлуорену для *Salmonella typhimurium* TA 98 і азиду натрію для *Salmonella typhimurium* TA 100 у тестах без метаболічної активації. У тестах з метаболічною активацією як мутаген для обох штамів використовували 2-аміноантрацен.

Усі дослідження здійснювали у трьох повторах. Результати враховували при наявності мутагенних ефектів у всіх варіантах позитивного контролю і при нормальному фоновому рівні. Досліди проводили у відповідності до інструкції фірми виробника тест-набору.

Інкубацію тест-штамів *S. typhimurium* з досліджуваними сполуками проводили у 24-лункових планшетах впродовж 100 хв у середовищі з гістидином. У кожному планшеті одну лунку відводили на контроль стерильності, дві лунки на позитивний контроль та по три лунки – на негативний контроль і кожну з концентрацій досліджуваних речовин. По закінченню інкубації матеріал з кожного варіанту досліду вносили у 48 лунок 96-лункових мікропланшетів. Культивування проводили впродовж 72 годин у середовищі з індикатором рН (бромкрезоловий пурпурний), яке не містило гістидину, що забезпечувало ріст тільки ревертованих клітин *S. typhimurium*. Оцінка отриманих даних базувалася на підрахунку кількості лунок, в яких спостерігається зміна кольору середовища з пурпурного на жовтий. Негативним результатом (відсутність мутагенної активності) вважається наявність менш ніж 15 ревертантних лунок серед 48 лунок, позитивним (наявність мутагенної активності) – 25 і більше ревертантних лунок серед 48 лунок і пряма залежність ефекту від концентрації досліджуваної сполуки.

Ріст тест-штамів у присутності різних концентрацій тилорону оцінювали спектрофотометричним методом [17]. Культивування здійснювали у 96-лункових планшетах впродовж доби у середовищі з гістидином, яке забезпечує ріст штамів сальмонел, ауксотрофних за цією амінокислотою. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі μ Quant, (Bio-Tek, США) за довжини хвилі 540 нм.

Для опрацювання вихідних даних розраховували стандартне відхилен-



ня показника числа позитивних лунок на концентрацію. Воно є стандартним відхиленням середнього значення числа позитивних лунок на тестовану концентрацію, і кратність перевищення щодо нульової лінії, яке визначалося як відношення середнього значення числа позитивних лунок на тестовану концентрацію до нульової лінії негативного контролю (розчинник). При цьому нульова лінія обчислювалася складанням середнього числа позитивних лунок для негативного контролю і значення стандартного відхилення.

Результати та їх обговорення

Використана у роботі експериментальна токсикологічна модель відповідала загальним цілям програми досліджень безпеки лікарських засобів і вміщувала визначення дії прямих мутагенів (варіант без метаболічної активації сполук) та промутагенів (ефект, яких пов'язаний з утворенням мутагенних метаболітів), а також аналогічну процедуру для контрольного варіанту, тобто розчинника.

Експерименти проводили в двох паралельних варіантах – без метаболічної активації та з активацією мікросомною сумішшю (S9 mix). У варіантах без метаболічної активації реєстрували дію прямих мутагенів – сполук, які індукують мутації за рахунок активності первинної структури досліджуваної речовини. Дію ж промутагенів – речовин, ефект яких зумовлений утворенням мутагенних метаболітів – реєстрували у варіантах експерименту з метаболічною активацією.

Одержані дані показали, що за дії стандартних мутагенів відсоток лунок з мутованими клітинами дорівнював 82–91%, у той час, як у негативному контролі він не перевершував 4,2%. Типовий вигляд планшету з негативним і позитивними контролями наведений на рисунку.

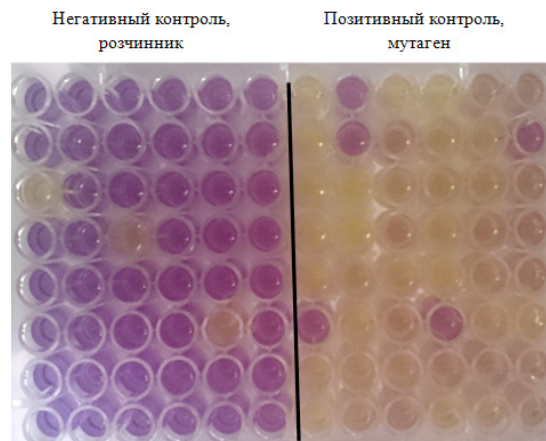


Рис. Фото планшету з негативним і позитивним контролями
Примітка: жовте забарвлення – лунки що містять ревертанні клітини,
пурпурне забарвлення – лунки що не містять ревертанних клітин

Fig. Photo of plate with negative and positive control
Note: yellow – wells with revertant cells,
purple – wells without revertant cells

Контрольні дані, одержані з використанням штамів *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100 наведені у табл. 1. Стандартними мутагенами для штамів було використано 2-нітрофлуорен та азид натрію, відповідно.

Таблиця 1

**Контрольні показники для штамів *Salmonella typhimurium*
(кількість лунок з ревертантами серед 48, $M \pm m$, $n = 3$)**

Table 1

**Control parameters for *Salmonella typhimurium* strains
(number of wells with revertant from 48, $M \pm m$, $n = 3$)**

Варіант	Контроль стерильності	Негативний контроль (розчинник)	Позитивний контроль (мутаген)
ТА 98 без активації	0	1,0 ± 0	39,5 ± 3,0*
ТА 98 з активацією	0	1,7 ± 0,3	43,3 ± 3,7*
ТА 100 без активації	0	2,0 ± 0,4	43,5 ± 2,0*
ТА 100 з активацією	0	1,3 ± 0,2	41,0 ± 3,7*

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з негативним контролем
Note: * – the differences were significant in comparison with negative control

Як показують результати експериментів, у контрольному (негативному) варіанті частота спонтанних мутацій не перевищувала стандартного рівня, відповідного до генетичних особливостей кожного з референтних штамів [14]. Для обох штамів нами отримано (табл. 1) близькі за значенням дані щодо контролю стерильності, негативного контролю (розчинник) та позитивного контролю (відповідні мутагени).

Незважаючи на те, що в обох випадках дані дослідження мутагенної активності зразків тилорону (табл. 2) дещо перевищують аналогічні показники контролю (табл. 1), можна зробити висновок, що в межах чутливості даного методу, сполука не є мутагеном прямої або непрямої дії, яка спроможна індукувати мутації типу зсуву рамки зчитування генетичної інформації або заміни пар основ.

Таблиця 2

**Активність тилорону у тесті Muta-ChromoPlate kit з *S. typhimurium*
(кількість лунок з ревертантами серед 48, $M \pm m$, $n = 3$)**

Table 2

**Activity of tilorone in the test Muta-ChromoPlate kit with *S. typhimurium*
(number of wells with revertant from 48, $M \pm m$, $n = 3$)**

Варіант	Концентрація тилорону, мкг/мл				
	5	10	50	100	250
ТА 98 без активації	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,5	4,3 ± 0,4	5,7 ± 1,3	4,7 ± 0,6
ТА 98 з активацією	3,3 ± 0,6	4,3 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,7 ± 1,1	2,3 ± 0,3
ТА100 без активації	5,7 ± 0,3	6,0 ± 0,7	7,0 ± 1,0	6,7 ± 0,5	7,7 ± 0,7
ТА 100 з активацією	2,0 ± 0,0	6,0 ± 0,5	3,3 ± 0,4	4,0 ± 0,3	2,0 ± 0,3



Негативний результат у тесті з активацією свідчить про відсутність мутагенної активності також у метаболітів досліджуваної сполуки. Цей факт не є незвичайним так як відомо, що тилорон піддається незначному окисному метаболізму (N-деалкілюванню) в організмах експериментальних тварин та людини і не утворює реакційноздатних метаболітів [11].

З метою встановлення можливого токсичного впливу аміксину на досліджувані штами, що є необхідним для валідації тест-методу, визначали ріст *S. typhimurium* TA 98 і TA 100 у присутності вивчених у тестах на мутагенність концентрацій сполуки. Культивування здійснювали впродовж 24 годин у рідкому живильному середовищі. Ріст штамів *S. typhimurium* оцінювали спектрофотометрично. Результати цього дослідження наведені у табл. 3.

Таблиця 3

Вплив тилорону на ріст тест-штамів *Salmonella typhimurium*
(OD_{540} , $M \pm m$, $n=3$)

Table 3

Influence of tilorone on the growth of *Salmonella typhimurium* strains
(OD_{540} , $M \pm m$, $n=3$)

Штам	Контроль	Концентрація, мкг/мл				
		5	10	50	100	250
TA 98	0,64±0,07	0,64±0,06	0,62±0,07	0,63±0,06	0,63±0,05	0,65±0,05
TA 100	0,38 ± 0,05	0,39±0,03	0,38±0,04	0,38±0,02	0,37±0,04	0,37±0,03

Отримані результати показали, що тилорон за усіх використаних концентрацій не впливає на ріст обох досліджуваних штамів *Salmonella typhimurium*. Тобто, аміксин не є токсичним для тест-штамів у діапазоні концентрацій 5–250 мкг/мл.

Аналіз отриманих результатів показав, що досліджувана речовина не виявила здатності індукувати генні мутації у використаних нами тест-організмів. Система метаболічної активації також не була ефективною, тобто, тилорон не є ні «прямим», ні «непрямим» мутагеном для штамів *S. typhimurium*. Незначне перевищення середнього числа ревертантів у дослідах щодо контролю (табл. 1–3) статистично є недостовірним. Чутливість обох тест-штамів щодо досліджуваних речовин виявилася приблизно однаковою, тобто перевищення контрольних значень в обох варіантах дослідів практично не мінялося, що свідчить про однозначність дії цих сполук. Загальним для всього експерименту також є відсутність перевищення числа ревертантів в дослідних варіантах на максимальних дозах. Додаткове тестування цих сполук у різних концентраціях на ріст штамів *Salmonella typhimurium* показало відсутність такої дії.

Таким чином, дані, отримані в ході проведення мікропланшетного варіанту тесту Еймса (Muta-ChromoPlate kit) на штамів *Salmonella typhimurium* TA 98 і TA 100 свідчать про відсутність мутагенної активності тилорону у вивчених концентраціях, що підтверджує дані отримані іншими авторами [2, 18], з використанням інших методичних прийомів. У зв'язку з цим, наявність у препарату канцерогенних властивостей, пов'язаних з генотоксичністю, є також малоімовірною.



Т. О. Филиппова¹, Н. Б. Галкин¹, Н. Я. Головенко²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilipova@ukr.net

²Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ ТИЛОРОНА – АКТИВНОГО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИНГРЕДИЕНТА АМИКСИНА, В МИКРОПЛАШЕТНОМ ВАРИАНТЕ ТЕСТА ЭЙМСА

Реферат

Цель работы – выявить возможность индукции генных мутаций при действии тилорона – активного фармацевтического ингредиента амиксина.

Методы. Способность тилорона вызывать генные мутации оценивали в тесте Эймса на штаммах *Salmonella typhimurium* TA 98 (мутации типа сдвига рамки считывания) и TA 100 (точечные мутации типа замены пар оснований). Тилорон исследовали в концентрациях 5, 10, 50, 100 та 250 мкг/мл. В качестве стандартных мутагенов использовали 2-нитрофлуорен для *Salmonella typhimurium* TA 98 и азид натрия для *Salmonella typhimurium* TA 100 в тестах без метаболической активации. В тестах с метаболической активацией мутагеном для обоих штаммов служил 2-аминоантрацен. Эксперименты проводили без и с использованием метаболической активации. В работе использовали тест-набор Muta-ChromoPlate kit, производства фирмы Biotocicity, Канада. Токсичность тилорона в отношении использованных штаммов сальмонелл оценивали при тех же концентрациях. **Результаты.** Полученные данные показали, что при действии стандартных мутагенов процент лунок с мутировавшими клетками достигал 82–91%, в то время как в отрицательном контроле он не превышал 4,2%. При действии тилорона этот показатель находился в границах 4–16% и был в 3,3–13,0 раз ниже минимального значения – 52%, которое по протоколу микроплашетного теста является свидетельством мутагенной активности. При всех использованных концентрациях тилорон не влиял на рост обоих штаммов *Salmonella typhimurium*. **Выводы.** Тилорон в интервале использованных концентраций не вызывал генных мутаций и не оказывал токсического действия на штаммы *S. typhimurium* TA 98 и TA 100.

Ключевые слова: генные мутации, тест Эймса, тилорон, амиксин.



T. O. Filipova¹, M. B. Galkin¹, M. Ya. Golovenko²

¹Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str, Odesa, 65082, Ukraine, phone: +38 (0482) 63 57 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

²A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of NASU
86, Lustdorfska doroga, Odessa, 65080, Ukraine

MUTAGENIC ACTIVITY OF TILORONE – ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCE OF AMIXIN IN MICROTITER PLATE VARIANT OF AMES TEST

Summary

Aim – to discover potential mutagenic activity of tilorone – active pharmaceutical substance of amixin. **Methods.** Mutagenic activity of tilorone was studied in the Ames test on *Salmonella typhimurium* TA 98 (frame-shift mutations) and TA 100 (Dot mutations – base pars change). Tilorone was examined in concentrations 5, 10, 50, 100 and 250 µg/ml. As standard mutagens, 2-nitrofluorene was used for *Salmonella typhimurium* TA 98 and sodium azide for *Salmonella typhimurium* TA 100 in tests without metabolic activation. In tests with metabolic activation, mutagen for both strains served as 2-aminoanthracene. The experiment was carried out with and without metabolic activation. In this work Muta-ChromoPlate kit (Biototoxicity, Canada) was used. Tilorone toxicity against salmonella strains was calculated at the same concentrations. **Results.** The obtained data show that in presence of standard mutagenic compounds amount of wells with mutated cells were 82–91%. At the same time in negative control this amount was not higher than 4.2%. In presence of tilorone amount of wells where mutated cells were detected, it was 4–16% – 3.3–13.0 times lower then the minimum value – 52%, which, according to protocol of micro titer plate test, is the evidence of mutagenic activity. In presence of all tilorone concentrations there is not any inhibition of bath growth of used *Salmonella typhimurium* strains. **Conclusions.** Tilorone in the range of used concentration did not posses any mutagenic activity or toxicity on *S. typhimurium* TA 98 ma TA 100.

Key world: genetic mutation, Ames test, tilorone, amixin.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабаченко И. В., Левина А. С., Ушакова Г. М., Копылова А. В. Опыт применения Амиксина® в комплексной терапии хронических герпесвирусных инфекций у часто болеющих детей // Детские инфекции. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 34–37.
2. Буценко Л. Н., Жолобак Н. М. Влияние амиксина, лорамиксина и их композитов с дрожжевой РНК на спонтанный и индуцированный мутагенез у *Salmonella typhimurium* // Мікробіол. журн. – 2010. – Т. 72, № 4. – С. 44–49.
3. Жолобак Н. М. Состояние и перспективы современной противовирусной терапии // Научный медицинский вестник. – 2016. – № 1(3). – С. 89–105.
4. Ames B. N., McCann J., Yamasaki E. Method for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test // Mutat. Res. – 1975. – V. 161. – P. 347–364.



5. *Benedict W. F., Baker M. S., Haroun L., Choi E., Ames B. N.* Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella-microsome test // *Cancer Res.* – 1977. – V. 37. – P. 2209–2213.

6. *Chandra P., Woltersdorf M., Wright G. J.* Tilorone hydrochloride. Ed.: F.E. Hahn, In: *Antibiotics V/2, Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Agents.* Ed.: F.E. Hahn, Springer, Berlin. 1979, P. 385–413.

7. *Curieux F., Marzin D., Erb F.* Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test // *Mutat. Res.* – 1994. – V. 341. – P. 1–15.

8. *Giron D. J., Schmidt J. H., Pindak F. F.* Tilorone hydrochloride: Lack of correlation between interferone induction and viral protection // *Antimicrob. Agents and Chemoterapy.* – 1972. – V. 1, № 1. – P. 78–79.

9. *Guidance for Industry. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.* June 2012. ICH. 31 p.

10. *Hendry L. B., Mahesh V. B., Bransome E. D. Jr., Ewing D. E.* Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals // *Mutat. Res.* – 2007. – V. 623. – P. 53–71.

11. *Hoening V., Préteux F.* Hepatic disposition of tilorone hydrochloride in the rat // *Xenobiotica.* – 1977. – V. 7(6). – P. 339–344.

12. *Johnston M., Stollar B., Torrence P., Witkop B.* Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. (antibody to double-stranded RNA/recognition of nucleic acids) // *PNAS.* – 1975. – V. 72, No. 11. – P. 4564–4568.

13. *Mayer G., Kruger R.* Tilorone hydrochloride: mode de action // *Science.* – 1970. – V. 169. – P. 1214–1215.

14. *McCann J., Spingarn N. E., Kobori J., Ames B. N.* Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids // *PNAS.* – 1975. – 72, № 3. – P. 979–983.

15. *Munson A. E., Munson J. A., Regelson W., Wampler, G. L.* Effect of Tilorone Hydrochloride and Congeners on Reticuloendothelial System, Tumors, and the Immune Response // *Cancer Res.* – 1972. – V. 32, № 7. – P. 1397–1403.

16. *Nishimura T., Okobira T., Kelly A. M. et al.* DNA binding of tilorone: 1H NMR and calorimetric studies of the intercalation // *Biochemistry.* – 2007. – V. 46, № 27. – P. 8156–8163.

17. *Physical Methods for Microorganisms Detection / Ed.: Wilfred H. Nelson.* CRC Press Inc. 1991, 155 p.

18. *Rempola B., Demkowicz-Dobrzafiski K., Fikus M.* Genotoxicity assessment of low-molecular weight interferon inducers by the SOS Chromotest // *Mutat. Res.* – 1986. – V. 172. – P. 47–50.

19. *Sturm J., Srieber L., Daune M.* Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotide // *Biopolymers.* – 1981. – V. 20. – P. 765–782.



Referens

1. Babachenko I. V., Levina A. S., Ushakova G. M., Kopylova A. V. The experience of Amixin® in the treatment of chronic herpes virus infections in sickly children. *Childrens Infections*. 2012;11(2):34–37. (In Russian)
2. Butsenko LN, Zholobak NM. Effect of Amyxine, Loramyxine and Their Composites with Yeast RNA on Spontaneous and Induced Mutagenesis in *Salmonella typhymurium*. *Microbiol. Zhurn.* 2010;72(4):44–49. (In Russian)
3. Zholobak N. M. The state and prospects of the modern-day antiviral therapy. *Scientific Medical Bulletin*. 2016;1(3):89–105. (In Russian)
4. Ames BN., McCann J, Yamasaki E. Method for Detecting Carcinogens and Mutagens with the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1975;161:347–364.
5. Benedict WF, Baker MS, Haroun L, Choi E, Ames BN. Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella*-microsome test. *Cancer Res.* 1977;37: 2209–2213.
6. Chandra P, Woltersdorf M, Wright GJ. Tilorone hydrochloride. Ed.: F.E. Hahn, In: *Antibiotics V/2, Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Agents*. Ed.: F.E. Hahn, Springer, Berlin, 1979:385–413.
7. Curieux F, Marzin D, Erb F. Study of the genotoxic activity of five chlorinated propanones using the SOS chromotest, the Ames-fluctuation test and the newt micronucleus test. *Mutat. Res.* 1994;341:1–15.
8. Giron DJ, Schmidt JH, Pindak FF. Tilorone hydrochloride: Lack of correlation between interferone induction and viral protection *Antimicrob. Agents and Chemoterapy*. 1972;1(1):78–79.
9. Guidance for Industry. S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. June 2012. ICH. 31 p.
10. Hendry LB, Mahesh VB, Bransome EDJr, Ewing DE. Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutat. Res.* 2007;623:53–71.
11. Hoenig V, Préteux F. Hepatic disposition of tilorone hydrochloride in the rat. *Xenobiotica*. 1977;7(6):339–344.
12. Johnston M, Stollar B, Torrence P, Witkop B. Structural features of double-stranded polyribonucleotides required for immunological specificity and interferon induction. (antibody to double-stranded RNA/recognition of nucleic acids) *PNAS*. 1975;72(11):4564–4568.
13. Mayer G, Kruger R. Tilorone hydrochloride: mode de action. *Science*. 1970;169:1214–1215.
14. McCann J, Spingarn NE, Kobori J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *PNAS*. 1975;72(3): 979–983.
15. Munson AE, Munson JA, Regelson W, Wampler, GL. Effect of Tilorone Hydrochloride and Congeners on Reticuloendothelial System, Tumors, and the Immune Response. *Cancer Res.* 1972;32(7):1397–1403.
16. Nishimura T, Okobira T, Kelly AM. et al. DNA binding of tilorone: 1H NMR and calorimetric studies of the intercalation. *Biochemistry*. 2007;46(27):8156–8163.



17. Physical Methods for Microorganisms Detection / Ed.: Wilfred H. Nelson. CRC Press Inc., 1991:155 p.

18. Rempola B, Demkowicz-Dobrzafiski K, Fikus M. Genotoxicity assessment of low-molecular weight interferon inducers by the SOS Chromotest. Mutat. Res. 1986;172:P. 47–50.

19. Sturm J, Srieber L Daune M. Binding of ligands to a one-dimensional heterogeneous lattice II. Intercalation of tilorone with DNA and polynucleotide. Biopolymers. 1981;20:765–782.

Стаття надійшла до редакції 14.02.2018 р.



УДК 579:57.044

**В. Б. Настенко¹, Ю. В. Короткий², О. А. Смертенко²,
Н. О. Осипчук¹, В. П. Ширококов¹, А. П. Чоботар¹**

¹Національний медичний університет імені О.О.Богомольця,
бульвар Т. Шевченка, 13, 01004, Київ, Україна;

²Інститут органічної хімії НАН України, вул. Мурманська, 5, 02660, Київ, Україна,
e-mail: encelad1991@gmail.com

ВИВЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ СОЛЕЙ АЛКІЛ (R-АРИЛ) ОКСИДИАЛКІЛ АМОНІЮ ЩОДО РЕФЕРЕНТНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мета роботи: визначення антимікробних властивостей солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. **Методи.** Об'єктом дослідження були 52 сполуки похідних алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію, які були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України. Як тест-мікроорганізми використовували *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231. Визначення протимікробної дії даних сполук проводилось у 2 етапи: 1-ший – скринінг методом дифузії в живильне середовище; 2-й – визначення мінімальної інгібувальної та бактеріцидної концентрації (МІК та МБК) мікрометодом серійних розведень. **Результати.** В результаті проведеного скринінгу було встановлено, що антифунгальний та антистафілококовий ефект наявний у 45-ти препаратів з 52-х, з них 10 сполук спричинили появу зон затримки росту діаметром 15–19 мм. Усі досліджувані речовини виявилися неієвими щодо грамнегативних бактерій. Посилаючись на результати скринінгу, визначено показники МІК та МБК. Антимікотичну дію флуконазолу, що слугував препаратом порівняння, перевершило 26 досліджуваних солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію. Також сполуки проявили виражену антибактеріальну дію щодо референтного штаму *S. aureus*. Найефективнішими щодо цих мікроорганізмів були сполуки Кс22, Кс1 та Кс3, їхні антимікробні властивості були вищими чи відповідали показникам ампіциліну (МІК – 1,62±0,33 мкг/мл, а МБК – 2,60±0,65 мкг/мл). З усіх активних 45 сполук 25 проявили протимікробний ефект на рівні антибіотиків порівняння, тобто їхня МІК не перевищувала значення 7,81 мкг/мл. **Висновки.** На основі отриманих результатів відібрано по 10 найбільш ефективних сполук для подальшого дослідження антимікробних властивостей солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію на клінічних ізолятах в умовах *in vitro*.

Ключові слова: антимікробні препарати, арил ациклічні аміноспирти, метод дифузії в живильне середовище, метод серійних розведень, мінімальна інгібувальна концентрація.



У 1945 році, в інтерв'ю для видання *The New York Times*, англійський бактеріолог Александр Флемінг спрогнозував, що надмірне використання пеніциліну може призвести до появи резистентних штамів бактерій. Справдження цього прогнозу спостерігалось наступні 10 років після введення препарату [14].

Мікробна резистентність до антибіотиків стала серйозною проблемою в боротьбі зі збудниками різних інфекційних захворювань [11]. Останнім часом все частіше виділяють мультирезистентні штами *Pseudomonas aeruginosa*, що є збудником гнійно-запальних, внутрішньолікарняних та постопераційних інфекцій. *Escherichia coli*, що відноситься до збудників опортуністичних та внутрішньолікарняних захворювань, почала проявляти стійкість до цефалоспоринів та фторхінолонів III-го покоління – основних антибіотиків широкого спектру дії [2]. Відсоткове представлення метицилін-резистентних штамів стафілококів (MRSA) уже давно переважає кількість штамів, що чутливі до пеніцилінів та інших бета-лактамних антибіотиків, хоча саме проти цих збудників пеніцилін вважався «панасеєю» у період відкриття [6]. Ймовірність летальності від MRSA на 64% вища, ніж від звичайного *Staphylococcus aureus*. На засіданні ВООЗ в 2015 році було озвучено сумне передбачення, що за умов сучасного розвитку резистентності мікроорганізмів до відомих антимікробних засобів, світу загрожує постантибіотична ера [2].

Одним із можливих варіантів боротьби з розвитком резистентності у бактерій є пошук та введення нових класів речовин з вираженою протимікробною дією [2]. Прикладом таких сполук можуть слугувати аміноспирти, похідні яких проявляють виражену протимікробну та антифунгальну активність [4, 9, 10]. Опираючись на літературні дані, доведено, що речовини даної групи порушують синтез та цілісність клітинної стінки, як у грибів, так і у бактерій [4, 12]. Метою нашої роботи було визначення антимікробних властивостей солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 52 сполуки похідних алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію, які були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України.

У роботі використовували референтні штами різних груп мікроорганізмів, а саме: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (грампозитивні бактерії), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (грамнегативні бактерії) та *Candida albicans* ATCC 10231 (дріжджоподібні гриби).

Визначення протимікробної дії даних сполук проводилося у 2 етапи: на першому проводився скринінг методом дифузії в агар, а саме методом «колодязів» [13]; на другому визначалися мінімальна інгібувальна та мінімальна бактерицидна концентрації (МІК та МБК) мікрометодом серійних розведень у рідкому живильному середовищі [6, 7].

Для проведення скринінгу використовувалося середовище Мюллера-Хінтона (для бактерій) та середовище Сабуро (для кандид) [5, 7]. Інокулят бактерій вміщував $1,5 \times 10^8$ КУО/мл, а кандид – $1,5 \times 10^6$ КУО/мл. Препарати вносили у лунки діаметром 6 мм, у кількості 20 мкл в лунку, інкубували 24 год



за температури 37 °С (бактерії) та 48 год при 27 °С (дріжджоподібні гриби) [1, 7]. Оцінку антибактеріальної активності сполук визначали за розміром зони затримки росту (у мм) [3].

Другий етап полягав у дослідженні МІК та МБК і вважався основною частиною дослідження. Вибірка препаратів ґрунтувалася на результатах скринінгу методом дифузії в агар. Препаратами порівняння були відомі антимікробні засоби: дослідження протибактеріальної дії – тетрациклін, ампіцилін та цефазолін; визначення протигрибової дії – флуконазол.

Мікрометод серійних розведень полягає в тому, що титрування сполук проводиться у стерильних полістиролових планшетах за менших об'ємів препаратів та живильного середовища, що використовуються у дослідженні (для прокаріотів використовували бульйон Мюллера-Хінтона [6], а для грибів – бульйон Сабуро [5]). У кожен лунку планшета (96 лунок), крім контролю середовища, в об'ємі 150 мкл вносилися суспензії клітин мікроорганізмів у рідкому живильному середовищі у кількості 1×10^6 КУО/мл (для бактерій) [6, 7] та 1×10^3 КУО/мл (для кандид) [5]. Препарати вводили у тій же кількості у першу лунку, з подальшим титруванням. Далі планшети інкубувалися за тих же температурних умов, що і в попередній методиці. Через добу визначалися показники МІК та МБК. Контроль МБК проводився прямим висівом 10 мкл вмісту лунки на чашку з МПА (для бактерій) [6] та Сабуро (для мікроскопічних грибів). Усі досліди проводилися у 3-х кратному повторі.

Результати та їх обговорення

В результаті проведеного скринінгу було встановлено, що антифунгальний ефект наявний у 45 препаратів з 52, з них 10 сполук (Кс19, Кс18, Кс21, Кс17, Кс15, Кр13, Кр4, Кс12, Кс14) спричинили появу зон затримки росту діаметром 15–19 мм. Дріжджоподібні гриби роду *Candida* проявили високу чутливість до 4-х досліджуваних сполук – діаметр зони затримки росту за дії Кс20 становив $21,67 \pm 1,86$ мм, Кс6 – $20,33 \pm 0,67$ мм, Кс5 – $20,33 \pm 1,20$ мм, Кс7 – $20,00 \pm 1,15$ мм.

Серед представників бактерій лише золотистий стафілокок виявився чутливим до сполук, що вивчалися. Антистафілокову дію виявили, як і у дослідженні з грибами 45 сполук, з яких 12 спричинили появу зон діаметром 15 і більше мм. Найефективнішими серед усіх виявилися речовини Кр12 ($18,33 \pm 0,33$ мм), Кр13 ($18,00 \pm 0,58$ мм), Кс20 ($17,33 \pm 0,88$ мм), Кс29 ($17,00 \pm 1,00$ мм), Кс6 ($16,67 \pm 0,88$ мм).

Препарати Кс24, Кс25, Кс26, Кс30, Кс31, Кр6 та Кр14 не виявили жодного пригнічувального ефекту на *S. albicans* та *S. aureus* (рис. 1). Такий же результат виявили на етапі проведення скринінгу: усі досліджувані солі алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію виявилися неідеальними щодо референтних штамів грамнегативних бактерій.

Результати другої частини дослідження дозволили визначити показники МІК та МБК. МІК за дії флуконазолу становила $10,42 \pm 2,61$ мкг/мл, а МБК – $20,96 \pm 5,51$ мкг/мл. Порівняно з даним препаратом, МІК 26-ти досліджуваних солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію дорівнювала або була нижчою від пригнічувальної концентрації флуконазолу.



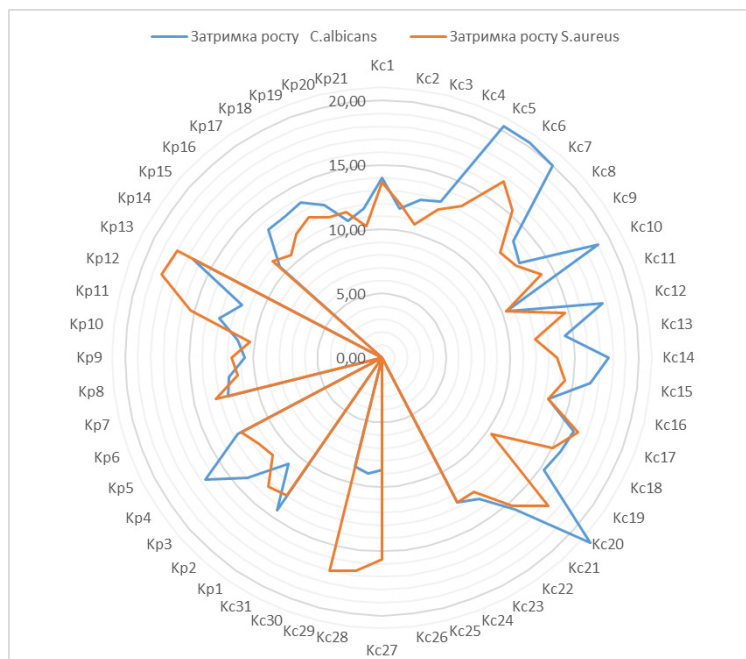


Рис. 1. Антимікробна дія солей алкіл (R-арил) оксидалкіл амонію щодо референтних штамів у твердому живильному середовищі (метод «колодязів»)

Fig. 1. Antimicrobial action of alkyl (R-aryl) oxy alkyl ammonium salts relative to reference strains in a solid nourishing medium («wells» method)

Найбільш дієвими серед досліджуваних речовин були Кс15 (МІК – $1,30 \pm 0,33$, а МБК – $2,60 \pm 0,65$ мкг/мл) та Кс2 (МІК – $1,62 \pm 0,33$ мкг/мл, МБК – $2,60 \pm 0,65$). Загалом 15 сполук мали МІК, яка не перевищила значення 5 мкг/мл, ще 11 у діапазоні 5–10 мкг/мл (табл. 1). В результаті перелік 10-ти найбільш ефективних протикандидозних речовин представлено списком: Кс2, Кс3, Кс14, Кс15, Кс16, Кс22, Кр4, Кр8, Кр18, Кр19 (табл. 2).

Ампіцилін, серед усіх препаратів порівняння, виявив найвищу антистафілокову активність (МІК – $1,62 \pm 0,33$ мкг/мл, а МБК – $2,60 \pm 0,65$ мкг/мл). МІК та МБК тетрацикліну знаходилися в діапазоні $3,25 \pm 0,65$ мкг/мл, що, приблизно, в два рази краще, ніж у цефазоліну – $6,51 \pm 1,30$ мкг/мл. Арил ациклічні аміноспирти виявили виражену антибактеріальну дію щодо референтного штаму *S. aureus*. Найефективнішими щодо цих мікроорганізмів були сполуки Кс22 (МІК – $1,30 \pm 0,33$ мкг/мл, МБК – $2,27 \pm 0,86$), Кс1 (МІК – $1,62 \pm 0,33$ мкг/мл, МБК – $2,60 \pm 0,65$) та Кс3 (МІК – $1,62 \pm 0,33$ мкг/мл, МБК – $3,90 \pm 0,00$), що означає, що їхні антимікробні властивості були вищими чи відповідали показникам ампіциліну. З усіх досліджуваних 45 сполук 25 виявили протимікробний ефект на рівні антибіотиків порівняння, тобто МІК не перевищувала значення 7,81 мкг/мл (табл. 1). На основі цієї частини дослідження відібрано 10 речовин, що показали найвищий пригнічувальний ефект на золотистий стафілокок, а саме: Кс1, Кс2, Кс3, Кс4, Кс15, Кс22, Кр10, Кр16, Кр18, Кр19 (табл. 2).

Таблиця 1

Розподіл солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію за значеннями МІК та МБК щодо референтних штамів

Table 1

Division of alkyl (R-aryl) oxy dialkyl ammonium salts towards the reference strains

Мікроорганізми		Концентрація (мкг/мл)								
		0,97	1,95	3,9	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250
<i>S.aureus</i>	МІК	2	5	6	12	14	4	2	-	-
	МБК	1	2	7	11	12	7	3	2	-
<i>C.albicans</i>	МІК	1	2	12	11	9	6	3	-	1
	МБК	1	1	7	8	7	11	7	1	1

Для подальшого дослідження антимікотичного ефекту відібрано Кс2, Кс3, Кс14, Кс15, Кс16, Кс22, Кр4, Кр8, Кр18, Кр19. Для вивчення антибактеріальних властивостей – Кс1, Кс2, Кс3, Кс4, Кс15, Кс22, Кр10, Кр16, Кр18, Кр19. Варто зазначити, що сполуки Кс2, Кс3, Кс15, Кс22, Кр18, Кр19 були високоефективними щодо обох груп мікроорганізмів.

Таблиця 2

Значення МІК та МБК найбільш ефективних солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію та препаратів порівняння щодо референтних штамів (мкг/мл)

Table 2

MICs and MBCs of the most effective compounds among the alkyl (R-aryl) oxy dialkyl ammonium salts and comparator products for the reference strains (µg/ml)

<i>S.aureus</i>			<i>C.albicans</i>		
Сполука	МІК	МБК	Сполука	МІК	МБК
Кс2	2,27±0,86	3,90±0,00	Кс2	1,62±0,33	2,60±0,65
Кс3	1,62±0,33	3,90±0,00	Кс3	3,25±0,65	3,90±0,00
Кс22	1,30±0,33	2,27±0,86	Кс22	2,27±0,86	3,25±0,65
Кр18	2,60±0,65	3,25±0,65	Кр18	2,92±0,98	3,25±0,65
Кр19	3,25±0,65	3,90±0,00	Кр19	3,25±0,65	3,25±0,65
Кс15	2,60±0,65	2,60±0,65	Кс15	1,30±0,33	1,95±0,98
Кс1	1,62±0,33	2,60±0,65	Кс14	2,92±0,98	4,55±1,72
Кс4	3,25±0,65	3,90±0,00	Кр4	2,60±0,65	3,90±0,00
Кр10	3,90±0,00	5,20±1,30	Кр8	2,92±0,98	3,25±0,65
Кр16	3,25±0,65	3,25±0,65	Кр20	2,27±0,86	2,60±0,65
Тетрациклін	3,25±0,65	3,25±0,65	Флуконазол	10,42±2,61	20,96±5,51
Ампіцилін	1,62±0,33	2,60±0,65			
Цефазолін	6,51±1,30	6,51±1,30			



Отже, в результаті проведеного скринінгу антимікробних властивостей солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію, методом дифузії в агар, встановлено, що 45 досліджуваних сполук проявляють антимікробний ефект щодо референтних штамів *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Candida albicans* ATCC 10231. Дослідження МІК та МБК даних речовин відносно тест мікроорганізмів, доводять, що арил ациклічні аміноспирти мають високу пригнічувальну дію. Антистафілококовий ефект більшості сполук визначався на рівні антибіотиків порівняння, тобто МІК не перевищувала значення 7,81 мкг/мл. Пригнічувальна концентрація Кс22 була вищою, ніж в усіх використаних антимікробних препаратів, і становила $1,30 \pm 0,33$ мкг/мл. Антифунгальний ефект флуконазолу, який було використано для порівняння протигрибкової дії, солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію, становив $10,42 \pm 2,61$ мкг/мл. З 45 сполук, які обрані в результаті скринінгу, 26 речовин виявили подібний або кращий пригнічувальний ефект відносно дріжджеподібних грибів. На основі отриманих результатів відібрано по 10 найбільш ефективних сполук, що діяли на певну групу тест-мікроорганізмів для подальшого дослідження антимікробних властивостей солей алкіл (R-арил) оксидиалкіл амонію на клінічних ізолятах в умовах *in vitro*.

**В. Б. Настенко¹, Ю. В. Короткий², Е. А. Смертенко²,
Н. А. Осипчук¹, В. П. Широбоков¹, А. П. Чоботар¹**

¹Национальний медичинський університет імені А.А. Богомольця,
бульвар Т. Шевченка, 13, 01004, Київ, Україна;

²Інститут органічної хімії НАН України, ул. Мурманская 5, 02660, Київ,
Україна, e-mail: encelad1991@gmail.com

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ СОЛЕЙ АЛКИЛ (R-АРИЛ) ОКСИДИАЛКИЛ АММОНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНО РЕФЕРЕНТНЫХ ШТАМОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Реферат

Цель работы: определение антимикробных свойств солей алкил (R-арил) оксидиалкил аммония относительно референтных штаммов микроорганизмов. **Методы.** Объектом исследования были 52 производных алкил (R-арил) оксидиалкил аммония, которые были синтезированы в Институте органической химии НАН Украины. В качестве тест-микроорганизмов использовали *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231. Определение противомикробного действия данных соединений проводилось в 2 этапа: 1-ый – скрининг методом диффузии в питательную среду; 2-й – определение минимальной ингибирующей и бактерицидной концентрации (МИК и МБК) микрометодом серийных разведений. **Результаты.** В результате проведенного скрининга было установлено, что антифунгальный и антистафилококковый эффект присутствует у 45 препаратов из 52, из них в присутствии 10 соединений образовывались зоны задержки роста диаметром 15–19 мм. Все исследуемые вещества оказались неэффективны в отношении грамотрицательных бактерий. На основании результатов скри-



нинга определялись показатели МИК и МБК. Противогрибковое действие флуконазола, который служил препаратом сравнения, превзошло 26 исследуемых солей алкил (R-арил) оксидиалкил аммония. Также соединения проявили выраженное антибактериальное действие в отношении референтного штамма *S. aureus*. Наиболее эффективными в отношении этих микроорганизмов были соединения Кс22, Кс1 и Кс3, их антимикробные свойства были выше или соответствовали показателям ампициллина (МИК – $1,62 \pm 0,33$ мкг/мл, а МБК – $2,60 \pm 0,65$ мкг/мл). Из всех активных 45 соединений 25 проявили противомикробный эффект на уровне антибиотиков сравнения, то есть их МИК не превышала значение 7,81 мкг/мл. **Выводы.** На основе полученных результатов отобрано по 10 наиболее эффективных соединений для дальнейшего исследования антимикробных свойств солей алкил (R-арил) оксидиалкил аммония на клинических изолятах в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: антимикробные препараты, арил ациклические аминокислоты, метод диффузии в питательную среду, метод серийных разведений, минимальная ингибирующая концентрация.

V. B. Nastenکو¹, Yu. V. Korotkiy², O. A. Smertenko²,
N. O. Osypchuk¹, V. P. Shyrobokov¹, A. P. Chobotar¹

¹Bogomolets National Medical University,
13, Shevchenko boulevard, Kyiv, Ukraine, 01004,

²Institute of Organic Chemistry NAS of Ukraine, 12, Murmanska str., Kyiv, Ukraine,
02660, e-mail: encelad1991@gmail.com

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ALKYL (R-ARYL) OXY DIALKYL AMMONIUM SALTS TOWARDS THE REFERENCE STRAINS OF MICROORGANISMS

Summary

Aim: evaluation of the antimicrobial properties of alkyl (R-aryl) oxy dialkyl ammonium salts towards the reference strains of microorganisms. **Methods.** The objects of the study were 52 derivatives of alkyl (R-aryl) oxy dialkyl ammonium, synthesized at the Institute of Organic Chemistry of NAS of Ukraine. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 were used as the test microorganisms. The determination of the antimicrobial activity of these compounds was conducted in 2 stages: the 1-st – screening by diffusion method in the nutrient medium; the 2nd – determination of the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and MBC) by the micro-method of serial dilutions. **Results.** As a result of the screening, it has been detected that antifungal and antistaphylococcal effect has been present in 45 among 52 studied, 10 compounds caused the appearance of growth inhibition zones with the diameter of 15–19 mm. All studied substances were not effective towards gram-negative bacteria. The MIC and MBC values were determined referring to the results of the screening. 26 investigated alkyl salts (R-aryl) oxy dialkyl ammonium surpassed antimycotic effect of fluconazole, serving as a reference preparation. Also, the compounds showed a pronounced antibacterial effect on the *S. aureus* reference strain. Kc22, Kc1



and Kc3 compounds were the most effective against these microorganisms, their antimicrobial properties were higher or consistent with ampicillin (MIC – $1.62 \pm 0.33 \mu\text{g/ml}$, and MBC – $2.60 \pm 0.65 \mu\text{g/ml}$). 25 compounds of all 45 studied showed antimicrobial effect at the level of reference product, that is, their MIC didn't exceed $7.81 \mu\text{g/ml}$. **Conclusions.** 10 most effective compounds selected on the basis of obtained results for further investigation of the antimicrobial properties of alkyl (R-aryl) oxy dialkyl ammonium salts on clinical isolates in vitro.

Key words: antimicrobial drugs, aryl acyclic aminoalcohols, diffusion method in the nutrient medium, serial dilutions method, minimum inhibitory concentration.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волянський Ю. Л., Гриценко І. С., Широбоков В. П., Смірнов В. В., Бірюкова С. В., Дяченко В. Ф., Кучма І. Ю., Марюшенко А. М., Ліпатникова К.І. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. Методичні рекомендації – Київ, 2004. – 38 с.
2. Устойчивость к антибиотикам: Информационный бюллетень // Всемирная организация здоровья. Центр СМИ. – Женева. 2016 г.
3. Гоцуля Т. С., Панасенко О. І., Книш Є. Г., Ачкасова О. М. Дослідження антимікробної та протигрибкової активності серед галогенідів 1-алкіл-4-(5-нітрофуран-2-іл)-метиленаміно-4н-1,2,4-тріазолу та їх диметильних аналогів // Запорозький медичинський журнал. – 2011. – № 5. – С. 140–142.
4. Дронова М. Л., Войчук С. І., Вринчану Н. О. Антибактеріальна активність 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси]- 3-(п-бензил-4-метилпіперидиній)- 2-пропанолу хлориду // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 6 (41). – С. 92–97.
5. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
6. Настенко В. Б., Короткий Ю. В., Смертенко О. А. Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо метицилін-резистентних стафілококів // XV з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Одеса, вересень, 2017 р.): тез. доп. – О., 2017. – 214 с.
7. Семіна Н. А. и др. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2004. – Том 6. – № 4. – С. 306–359.
8. Торопин В. Н., Бурмистров К. С., Сурмашева Е. В., Романенко Л.И. Изучение антимикробных свойств иммобилизованных волокнистых п,п-дихлорсульфонамидов // ScienceRise: Pharmaceutical Science. – 2016. – № 4(4). – С. 48–52.
9. Angelina M. de Almeida, Thiago Nascimento, Bianca S. Ferreira, Pedro P. de Castro, Vânia L. Silva, Cláudio G. Diniz, Mireille Le Hyaric. Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2013. – № 23. – P. 2883–2887.
10. Fernandes F. de Souza, L. S. da Silveira, Caneschi W., Lourenço M. C., Diniz C. G., de Oliveira P. F., Martins S. P., Pereira D. E., Tavares D. C., Le Hyaric M., de Almeida M. V., Couri M. R. Synthesis and evaluation of antibacterial and antitumor activities of new galactopyranosylated amino alcohols // European



Journal of Medicinal Chemistry. – 2015. – № 108. – P. 203–210.

11. *Gerald Dziekan, Itziar Larizgoitia Jauregui, Elizabeth Mathai*. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. – WHO, 2013. – P. 119.

12. *Kondoh, Inagaki Y., Fukuda H*. Piperazine propanol derivative as a novel antifungal targeting 1,3-beta-D-glucan synthase // *Biol. Pharm. Bull.* – 2005. – Vol. 28, N 11. – P. 2138–2141

13. *Nastenko V. B., Voloshchuk O. M., Korotkij Yu.V.* Peculiarities of antimicrobial action of synthetic aromatic alcohols. // *Actual problems of microbiology and biotechnology: 2015, June 1-4.* – Odesa. 2015. – P. 44.

14. *Noah Rosenblatt-Farrell*. The Landscape of Antibiotic Resistance // *Environmental Health Perspectives.* – 2009. – V. 117, № 6. – P. 245–250.

References

1. Volianskyi YuL, Hrytsenko IS, Shyrobokov VP, Smirnov VV, Biriukova SV, Diachenko VF, Kuchma IYu, Mariushenko AM, Lipatnykova KI. Vyvchennia spetsyfichnoi aktyvnosti protymikrobykh likarskykh zasobiv. *Metodychni rekomendatsii*, Kyiv, 2004:38.

2. Ustoichyvost k antibiotikam: Informatsyonyy buleten. Vsemirnaia orhanyzatsiia zdorovia. Tsentr SMY. Zheneva, 2016.

3. Hotsulia TS, Panasenko OI, Knysh YeH, Achkasova OM. Doslidzhennia antymikrobnoi ta protyhrybkovoi aktyvnosti sered halohenidiv 1-alkil-4-(5-nitrofurano-2-il)-metylenamino-4n-1,2,4-triazolu ta yikh dymetylnykh analogiv. *Zaporozhskiy medytsynskiy zhurnal*. 2011;(5):140-142.

4. Dronova ML, Voichuk SI, Vrynchanu NO. Antybakterialna aktyvnist 1-[4-(1,1,3,3-tetrametylbutyl) fenoksy]- 3-(n-benzyl-4-metylpiperydyinii)-2-propanolu khlorydu. *Ukrainskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal*. 2015;(6):92-97.

5. Myronov AN. *Rukovodstvo po provedeniyu doklynnycheskykh issledovanyi lekarstvennykh sredstv*. Chast pervaia. M.: Hryf i K, 2012. 944.

6. Nastenko VB, Korotkyi YuV, Smertenko OA. Antymikrobnii vlastyivosty pokhidnykh aryl atsyklichnykh aminospyrtiv shchodo metytsylin-rezystentnykh stafilokokiv. In: *Proceedings of XV zizd Tovarystva mikrobiolohiv Ukrainy im. S.M. Vynohradskoho*, Odesa. 2017: 214.

7. Semina NA i dr. *Opredelenie chuvstvitelnosti mikroorhanizmov k antimikrobnym preparatam*. *Klin. mikrobiol. antimikrob. khimioter.* 2004;(6(4)):306-359.

8. Toropin VN, Burmistrov KS, Surmasheva EV, Romanenko LY. *Izuchenie antimikrobykh svoistv immobilizovanykh voloknistykh n,n-dikhlorosulfonamidov*. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2016; (4(4)):48-52.

9. De Almeida AM, Nascimento T, Ferreira BS, de Castro PP, Silva VL, Diniz CG, Le Hyaric M. *Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013;(23):2883–2887.

10. Fernandes F de S, Fernandes TS, da Silveira LS, Caneschi W, Lourenço MC, Diniz CG, de Oliveira PF, Martins SP, Pereira DE, Tavares DC, Le Hyaric M, de Almeida MV, Couri MR. *Synthesis and evaluation of antibacterial and antitumor activities of new galactopyranosylated amino alcohols*. *European Journal*



of Medicinal Chemistry. 2015;(108):203-210.

11. Kondoh O, Inagaki Y, Fukuda H. Piperazine propanol derivative as a novel antifungal targeting 1,3-beta-D-glucan synthase. *Biol. Pharm. Bull.* 2005;(28(11)):2138–2141.

12. Dziekan G, Jauregui IL, Mathai E. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. WHO. 2013. 119.

13. Nastenکو VB, Voloshchuk OM, Korotkij YuV. Peculiarities of antimicrobial action of synthetic aromatic alcohols. In: Proceedings of the conference «Actual problems of microbiology and biotechnology», Odessa. 2015:44.

14. Noah Rosenblatt-Farrell. The Landscape of Antibiotic Resistance. *Environmental Health Perspectives.* 2009;(117(6)):245-250.

Стаття надійшла до редакції 12.12.2017 р.



**Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Л. С. Нещерет,
К. І. Семенов, Т. В. Васильєва, І. А. Блайда**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 746 51 02,
e-mail: iblayda@ukr.inet

БАКТЕРІАЛЬНЕ ВИЛУГОВУВАННЯ МЕТАЛІВ З ВІДПРАЦЬОВАНОЇ МАСИ ПАЛИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Мета. Встановити можливість бактеріального вилуговування цинку і марганцю з електродної маси відпрацьованих батарейок. **Методи.** Для визначення росту ацидофільних хемолітотрофних бактерій (АХБ) використовували середовища різного компонентного і концентраційного складу, як джерела енергії – двовалентне залізо і тіосульфат. Концентрацію клітин визначали шляхом висіву на агаризовані середовища після десятикратних послідовних розведень. Вміст металів у розчинах визначали методом спектроскопії атомної абсорбції на спектрофотометрах ААС-1, С-115ПК Selmi. Результати рентгеноструктурного аналізу електродної маси батарейок записували на дифрактометрі УРС-501М. **Результати.** Встановлена можливість використання АХБ для вилуговування марганцю і цинку з електродної маси відпрацьованих батарейок. Найкращі показники вилучення металів протягом 7 діб реєстрували на середовищах 9К1 з двовалентним залізом у концентрації 44,5 г/дм³. При продовженні терміну вилуговування до 14 діб підвищення ступеню вилучення металів реєстрували тільки на живильному середовищі 15 з тіосульфатом. Додавання суспензії *Acidithiobacillus ferrooxidans* МФ Lv 7 до живильних середовищ значно підвищувало ступінь вилучення металів: марганцю до 30,0% і цинку до 99,8%. Рентгеноструктурний аналіз показав відсутність сполук ZnO і MnO у структурі електродної маси після бактеріального вилуговування, а також зменшення кількості MnO₂, збільшення Mn₂O₃ і появу Mn₃O₄. **Висновки.** Встановлена можливість використання АХБ для вилучення металів з електродної маси відпрацьованих батарейок, що сприяє додатковому отриманню цинку і марганцю і попереджає забрудненню довкілля екологічно небезпечними сполуками.

Ключові слова: бактеріальне вилуговування, ацидофільні хемолітотрофні бактерії, цинк, марганець, електродна маса батарейок.

Проблема утилізації та переробки електродної маси відпрацьованих джерел живлення набуває глобального характеру і стає все більш актуальною, бо вони містять токсичні метали та їх сполуки у великій концентрації. В розвинених країнах ця проблема вирішується шляхом збору та вторинної переробки відпрацьованих елементів живлення. В Європі є три заводи, які мають потужності для переробки батарейок. Один з них працює в Україні – це Львівське державне підприємство «Аргентум». На цих підприємствах

© Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Л. С. Нещерет, К. І. Семенов, Т. В. Васильєва, І. А. Блайда, 2018



переробку електродних відходів здійснюють звичайними піро- та гідрометалургійними методами, недоліком яких є необхідність використання кислот, високого тиску і температур [7, 6, 14].

У теперішній час перевагою користуються біотехнологічні методи знешкодження таких відходів. В оглядовій статті [13] автори використовували для вилучення металів з різних електронних відходів (електронний лом, відпрацьовані батарейки тощо) ацидофільні хемолітотрофні бактерії (АХБ) і гриби. Встановлено, що *Thiobacillus thiooxidans* DSM 622, *T. ferrooxidans* DSM 2392, *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum* сприяли вилученню міді на рівні 90,0–95,0 % [10]. Є дані про вилучення металів з електродного лому не тільки чистими мезофільними бактеріями, але й помірно термофільною аборигенною асоціацією, яку отримали з відпрацьованих електродних субстратів. Такий консорціум здатний вилучати з відпрацьованих електродних відходів більш 81,0% Ni, 89,0% Cu, 79,0% Al і 83,0% Zn [12]. Наявні результати поодинокі, носять розрізнений, іноді суперечливий характер. Крім того, треба відзначити відсутність вітчизняних досліджень в цьому напрямку.

Мета роботи – встановити можливість бактеріального вилуговування цинку і марганцю з електродної маси відпрацьованих батарейок.

Матеріали та методи

Проведення досліджень щодо вилучення цинку і марганцю з електродної маси відпрацьованих батарейок ґрунтується на використанні розробленого авторами даної статті біотехнологічного методу вилуговування металів із породних відвалів центральної збагачувальної фабрики «Червоноградська», золи-виносу Ладижинської і золи-шлаку Добротвірської теплоелектростанцій [1, 2, 9].

Об'єктом досліджень була електродна маса відпрацьованих батарейок з застосуванням диоксиду марганцю як окиснювача, порошкоподібного цинку високого ступеню очищення як відновника, яка також містить згущувач, розчин електроліту, пригнічувач корозії та ацетиленову сажу як наповнювач. Основними цінними компонентами електродної маси є марганець і цинк.

Біотехнологічний процес вилуговування металів з електродної маси відпрацьованих батарейок проводили в лабораторних установках об'ємом 0,5 дм³, куди вносили 0,1 дм³ живильного середовища і 10,0 г електродної маси, що відповідало співвідношенню твердої фази (електродна маса) до рідкої (живильне середовище) 1:10. Вилуговування металів проводили за температури 32,0±0,5 °С і 45,0±0,5 °С протягом 7 і 14 діб. Значення рН до ≤ 2,0 доводили 0,1 N H₂SO₄ [2, 9].

Дослідження проводили з використанням АХБ, тому що вони відіграють важливу роль у процесах вилуговування металів з природних і техногенних субстратів [1, 4]. Для розвитку клітин і прояви окиснювальної дії АХБ використовували стандартне середовище Сільвермана-Лундгрема 9К з двовалентним залізом як джерело енергії [11] і живильне середовище 15 з тіосульфатом. Склад живильних середовищ наведено у табл. 1. Додатково до живильних середовищ додавали суспензію штаму *Acidithiobacillus ferrooxidans* МФ Lv 7 у кількості 2,0 об. %, що відповідало концентрації клітин у живильних



середовищах на рівні 10^2 КУО/мл. Штам *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 був отриманий з аборигенної асоціації породних відвалів вуглезабагачення Львівсько-Волинського вугільного басейну і використовувався для вилучення германію з відходів паливно-енергетичного комплексу України [3]. Контрольним дослідом слугувала обробка стерилізованої у автоклаві при 121 атм протягом 20 хв електродної маси дистильованою водою.

Таблиця 1

Склад живильних середовищ (г/дм³), що використовувалися як вилуговуючі розчини

Table 1

Composition of nourishing media (g/dm³) used as leaching solutions

Компоненти середовищ	Середовище 15	Середовище 9К1	Середовище 9К2
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,5	0,5	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,02	3,0	3,0
MgCl ₂ × 6H ₂ O	-	-	-
NH ₄ Cl	0,9	-	-
KCl	1,0	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1,0	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	-	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	0,01	0,01
Na ₂ S ₂ O ₃	5,0	-	-
FeSO ₄ × 7H ₂ O	-	44,5	4,0

Забарвлений мікроскопічний препарат вивчали за допомогою світлової мікроскопії. Концентрацію клітин визначали шляхом висіву на агаризовані середовища після десятикратних послідовних розведень.

Вміст металів, що перейшли з твердої фази до розчину, визначали методом спектроскопії атомної абсорбції на спектрофотометрах ААС-1, С-115ПК Selmi [8]. Рентгенограми субстратів записували на дифрактометрі УРС-50ІМ за умов: Cu/Kα-випромінювання, 35 kV, 8 mA, швидкість обертання зразка 1 град/хв.

Результати та їх обговорення

Результати спектроскопії атомної абсорбції вихідної електродної маси відпрацьованих батарейок свідчать про високу концентрацію марганцю (226,9 г/кг) і у 2,6 разів менший вміст цинку (87,4 г/кг). Згідно з результатами рентгеноструктурного аналізу в досліджуваній електродній масі, виявлені сполуки марганцю – MnO, MnO₂, Mn₂O₃ і цинку – ZnO; а також графіт, що відіграє роль наповнювача (табл. 2).



Таблиця 2

Вміст (%) сполук досліджуваних металів в електродній масі батарейок

Table 2

Content (%) of investigated metals compounds in electrode mass of spent batteries

Електродна маса	Сполуки, %					
	С (графіт)	MnO ₂	Mn ₂ O ₃	Mn ₃ O ₄	MnO	ZnO
До обробки	30,3	17,6	14,5	-	16,3	21,3
Контроль	30,4	17,2	14,5	-	16,1	21,4
Після обробки із середовищем 9K1	<15,0	<4,0	47,0	22,0	-	-
Після обробки із середовищем 9K1 та суспензією <i>A. ferrooxidans</i> МФ Lv 7	<17,0	<6,0	51,0	26,0	-	-

На отриманих рентгенограмах вихідного зразка електродної маси (рис. 1) чітко видно піки сполук MnO (з основними віддзеркаленнями від площини, параметри решітки яких складають 4,1837; 3,3327; 3,2297 Å), ZnO (3,0669; 2,8176; 2,6008; 2,4766 Å), а також Mn₂O₃ (4,2245; 3,8454; 2,7227; 2,5163; 2,3557 Å) і MnO₂ (4,0455; 3,2297; 3,5642; 2,5531; 2,4162 Å).

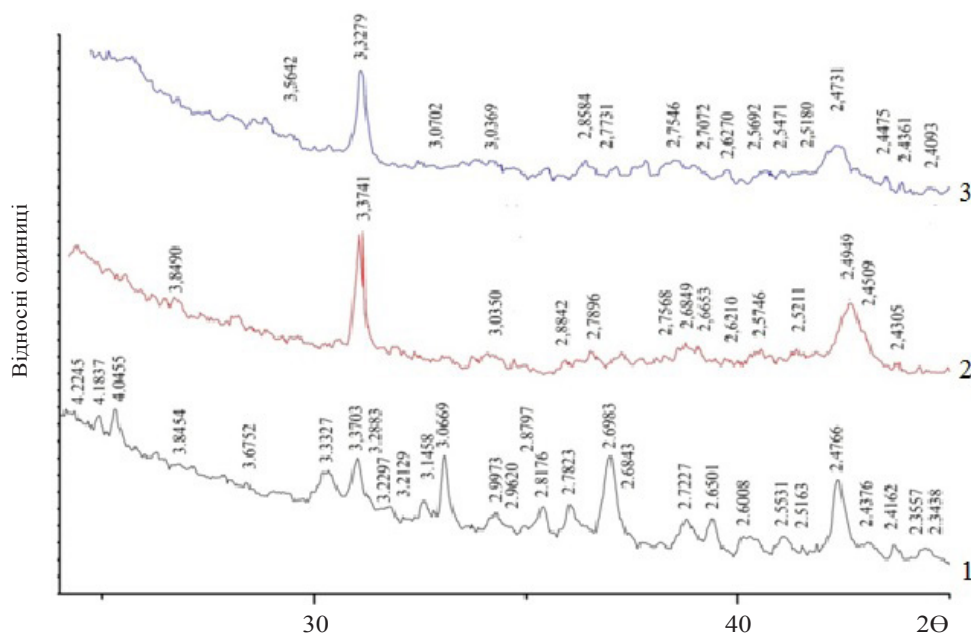


Рис. 1. Рентгенограми електродної маси батарейок:

1 – до обробки; 2 – після обробки з використанням середовища 9K1 і суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 3 – після обробки з використанням середовища 9K1.

Fig. 1. X-ray structural analysis of electrode mass of spent batteries:

1 – before treatment; 2 – after treatment with using 9K1 medium and suspension of *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 3 – after treatment with using 9K1 medium.



Результати спектроскопії атомної абсорбції та рентгеноструктурного аналізу відповідають характеристики наповнювачів батарейок [5].

Протягом усього терміну експерименту на усіх живильних середовищах – 9К1, 9К2 і 15 – як з додаванням суспензії штаму *A. ferrooxidans* МФ Lv 7, так і без неї, спостерігали ріст клітин АХБ, однак з різною швидкістю. Через 7 діб на середовищах 9К1 і 15 без суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 концентрація клітин досягала 10^2 КУО/мл; на середовищі 9К2 ріст клітин був більш активний і досягав концентрації 10^4 КУО/мл. Через 14 діб кількість клітин на середовищах 9К1 і 9К2 зростала до 10^6 КУО/мл; на середовищі 15 – до 10^4 КУО/мл. Цей ріст відбувався за рахунок розвитку представників АХБ аборигенної асоціації електродної маси батарейок на сприятливих живильних середовищах з використанням джерел енергії. У досліді з додаванням бактеріальної суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 накопичення біомаси АХБ відбувалося значно активніше: через 7 діб на середовищах 9К1 і 15 цей показник був на рівні 10^5 КУО/мл, на середовищі 9К2 досягав 10^6 КУО/мл. Протягом 14 діб спостерігали зростання кількості бактерій до 10^8 , 10^9 і 10^7 КУО/мл на середовищах 9К1, 9К2 і 15 відповідно.

Накопичення бактеріальних клітин супроводжувалося вилученням цинку і марганцю з електродної маси відпрацьованих батарейок, але ефективність вилуговування була різною (рис. 2, 3).

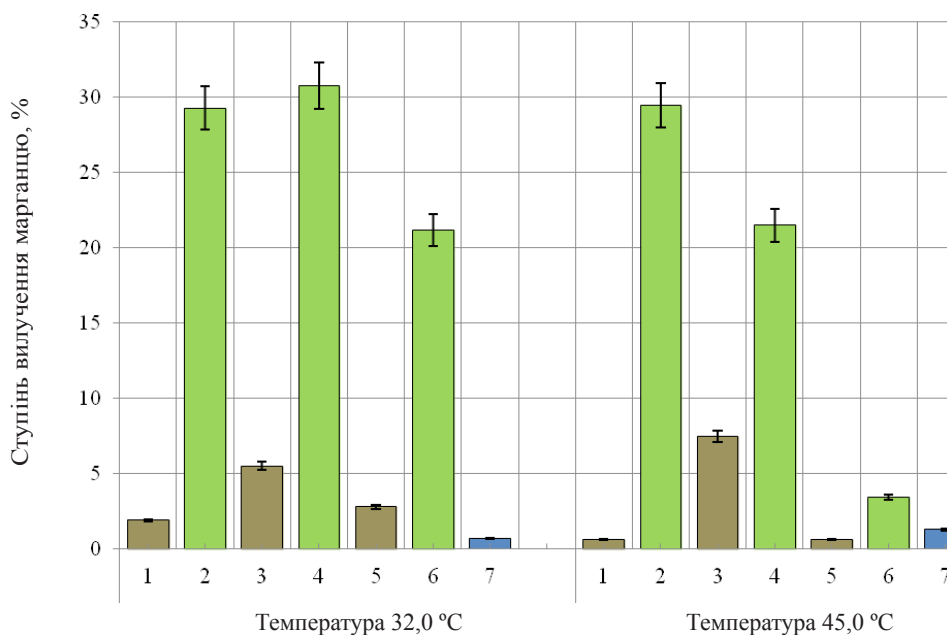


Рис. 2. Вилучення марганцю з електродної маси на середовищах:
 1 – 15; 2 – 15 і суспензія *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 3 – 9К1; 4 – 9К1 і суспензія *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 5 – 9К2; 6 – 9К2 і суспензія *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 7 – контрольний дослід. Термін – 7 діб.

Fig. 2. Removal of manganese from electrode mass on nutrient media:
 1 – 15; 2 – 15 with suspension *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 3 – 9K1; 4 – 9K1 15 with suspension *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 5 – 9K2; 6 – 9K2 15 with suspension *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 7 – control experience. Period – 7 days.



Вилучення марганцю було незначним і досягало 5,0 та 7,5% відповідно при температурі $32,0 \pm 0,5$ та $45,0 \pm 0,5$ °C через 7 днів вилуговування лише на середовищі 9K1 з концентрацією $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, яка є оптимальною для вилуговування металів [4, 9]. Додавання суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 до живильних середовищ сприяло значному підвищенню ефективності вилучення марганцю: до 31,5% при температурі $32,0 \pm 0,5$ °C і до 29,5% при $45,0 \pm 0,5$ °C протягом 7 днів (рис. 2).

Ефективність бактеріального вилуговування цинку була значно вищою, ніж марганцю. Найбільший ступінь вилуговування цинку у мезофільних і помірно термофільних умовах, як і при вилученні марганцю, реєстрували на середовищі 9K1 з оптимальною для вилуговування металів концентрацією двовалентного заліза, однак вона не перевершувала 20,0 % на середовищі 9K1 без додавання суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 (рис. 3). Додавання суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 сприяло значному підвищенню ефективності вилуговування цинку: до 73,7, 76,3 і 99,8 % відповідно на середовищах 15, 9K2 і 9K1 у мезофільних умовах; у помірно термофільних умовах з використанням середовищ 15 і 9K1 цинк повністю переходив з твердої фази до розчину.

При продовженні терміну експерименту до 14 днів значне зростання вилучення марганцю і цинку реєстрували тільки на середовищі 15 з тіосульфатом. У цьому випадку вилуговування у мезофільних і помірно термофільних

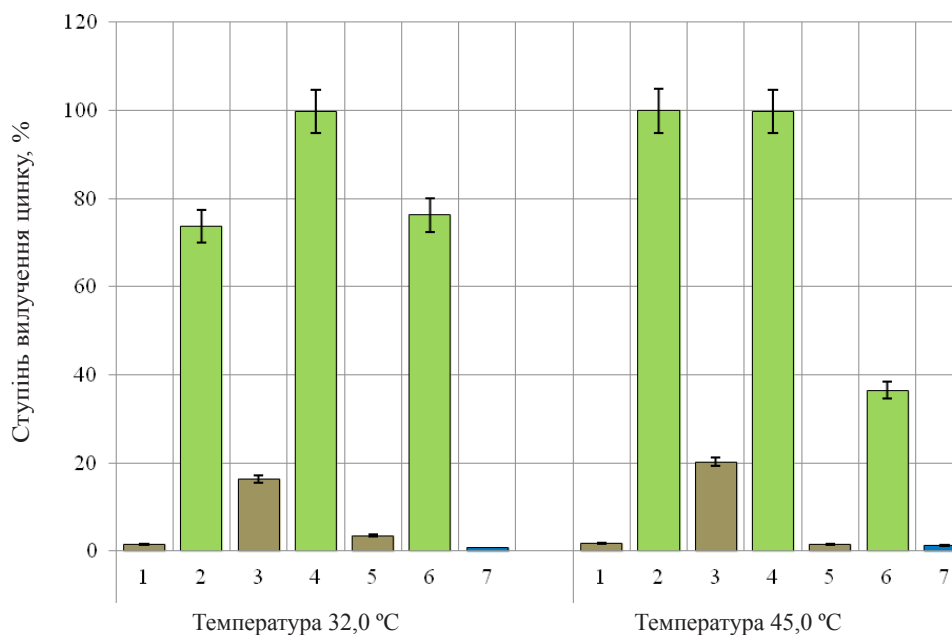


Рис. 3. Вилучення цинку з електродної маси на середовищах:

1 – 15; 2 – 15 і суспензія *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 3 – 9K1; 4 – 9K1 і суспензія *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 5 – 9K2; 6 – 9K2 і суспензія *A. ferrooxidans* МФ Lv 7; 7 – контрольний дослід. Термін – 7 днів.

Fig. 3. Removal of zinc from electrode mass on nutrient media:

1 – 15; 2 – 15 with suspension *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 3 – 9K1; 4 – 9K1 15 with suspension *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 5 – 9K2; 6 – 9K2 15 with suspension *A. ferrooxidans* MF Lv 7; 7 – control experience. Period – 7 days.



умовах зростало у 4 та 17 разів для марганцю і у 25 і 13 разів для цинку.

Отримані результати свідчать, що максимальне вилуговування марганцю і цинку з електродної маси батарейок впродовж 7 діб відбувалося при високих концентраціях двовалентного заліза як джерела енергії. При проведенні процесу вилуговування до 14 діб найбільш ефективний перехід марганцю і цинку до розчину відбувався у присутності тіосульфату як джерела енергії. Ці результати відповідають наявним літературним даним і пояснюються таким чином: при використанні Fe^{2+} як джерела енергії під впливом представників АХБ відбувається окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} , який у свою чергу є сильним окиснювачем і сприяє активному вилученню металів, зокрема, марганцю і цинку. Тіосульфатне вилуговування відбувається більш повільно із створенням проміжних продуктів – політіонатів, тетратіонатів тощо, що супроводжується підвищенням активності ацидофільних хемолітотрофних бактерій і, відповідно, вилученням металів в розчин [4].

Результати рентгеноструктурного аналізу свідчать, що структура і склад електродної маси батарейок до і після вилуговування відрізняються, і ці зміни є більш вираженими при додаванні до живильного середовища суспензії *A. ferrooxidans* МФ Lv 7 (рис. 1, криві 2 і 3). Так, в електродній масі після вилуговування практично відсутні ZnO та MnO; кількість MnO_2 зменшується у 3–4 рази, але збільшується кількість Mn_2O_3 (3,8490; 2,6849 і 2,2155 Å), з'являється нова сполука Mn_3O_4 (3,3741; 3,0702; 3,0350; 2,8584; 2,7546; 2,6653; 2,5211; 2,4949; 2,4731; 2,4509; 2,4475 Å). У контрольному досліді ніяких змін у структурі і складі електродної маси не відбувається. На підставі отриманих результатів і базуючись на знаннях з хімії цинку і марганцю, можна припустити, що у кислому середовищі під впливом бактерій йде вилучення оксидів металів у розчин, в даному випадку в основному у вигляді сульфатів, за реакцією:



де Me – Zn або Mn.

Частина присутніх у вихідній електродній масі полівалентних оксидів марганцю під впливом асоціації АХБ і компонентів живильного середовища здатна утворювати нові фази – Mn_2O_3 і Mn_3O_4 , що можна представити рівняннями:



Тому кількість Mn_2O_3 у електродній масі після обробки зростає майже у 4 рази, а також з'являється сполука Mn_3O_4 , яка відсутня у вихідній електродній масі (табл. 2).

Дослідженнями встановлена можливість вилучення марганцю і цинку з електродної маси відпрацьованих батарейок з використанням ацидофільних хемолітотрофних бактерій. Бактеріальне вилуговування відбувалося як



у мезофільних, так і помірно термофільних умовах, але з різною ефективністю. Показано, що при проведенні досліджень протягом 7 діб оптимальним є середовище 9К1 з додаванням двовалентного заліза як джерела енергії з концентрацією 44,5 г/дм³, а при продовженні процесу вилуговування до 14 діб – середовище 15 з додаванням тиосульфату як джерела енергії. Додавання суспензії штаму *Acidithiobacillus ferrooxidans* sp. МФ Lv 7 до живильних середовищ супроводжувалося значним зростанням кількості бактеріальних клітин і сприяло підвищенню ефективності вилучення марганцю у процесі вилуговування в розчин з 5,0 (без суспензії) до 30,0%, а цинку – з 20,0 (без суспензії) до 99,8%, в основному, у вигляді розчинних сульфатів.

Підхід, який пропонується для утилізації електродної маси відпрацьованих батарейок, є екологічно безпечним, ресурсозберезливим, буде сприяти додатковому отриманню цінних металів, що мають народногосподарське значення, і попереджати забруднення довкілля екологічно небезпечними іонами важких металів.

**Н. Ю. Васильєва, Л. И. Слюсаренко, Л. С. Нещерет,
К. И. Семенов, Т. В. Васильєва, И. А. Блайда**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38(048) 746 51 02,
e-mail: iblayda@ukr.net

БАКТЕРИАЛЬНОЕ ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ МЕТАЛЛОВ ИЗ ОТРАБОТАННОЙ МАССЫ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Реферат

Цель. Установить возможность бактериального выщелачивания цинка и марганца из электродной массы отработанных батареек. **Методы.** Для определения роста ацидофильных хемолитотрофных бактерий (АХБ) использовали среды различного компонентного и концентрационного состава, в качестве источников энергии – двухвалентное железо и тиосульфат. Концентрацию клеток определяли путем высевов на агаризованные среды после десятикратных последовательных разведений. Содержание металлов в растворе определяли методом спектроскопии атомной абсорбции на спектрофотометрах ААС-1, С-115ПК Selmi. Результаты рентгеноструктурного анализа электродной массы батареек записывали на дифрактометре УРС-50ИМ. **Результаты.** Установлена возможность использования АХБ для выщелачивания марганца и цинка из электродной массы отработанных батареек. Наилучшие показатели извлечения металлов в течение 7 суток регистрировали на средах 9К1 с двухвалентным железом в концентрации 44,5 г/дм³. При продлении срока выщелачивания до 14 суток повышение степени извлечения металлов регистрировали только на питательной среде 15 с тиосульфатом. Добавление суспензии *Acidithiobacillus ferrooxidans* МФ Lv 7 к питательным средам значительно повышало степень извлечения металлов: марганца до 30,0% и цинка до 99,8%. Рентгеноструктурный анализ показал отсутствие в структуре электродной массы батареек после бактериального выщелачивания соединений ZnO и MnO, а также уменьшение



количества MnO_2 , увеличение Mn_2O_3 и появление Mn_3O_4 . **Выводы.** Показана возможность использования АХБ для извлечения металлов из электродной массы отработанных батареек, что способствует дополнительному получению цинка и марганца и предупреждает загрязнение окружающей среды экологически опасными соединениями.

Ключевые слова: бактериальное выщелачивание, ацидофильные хемолитотрофные бактерии, цинк, марганец, электродная масса батареек.

**N. Yu. Vasyleva, L. I. Slusarenko, L. S. Nescheret,
K. I. Semenov, T. V. Vasyleva, I. A. Blayda**

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

tel.: +38 (048) 746 51 02, e-mail: iblayda@ukr.net

BACTERIAL LEACHING OF THE METALS FROM THE SPENT MASS OF FUEL ELEMENTS

Summary

Aim. To establish the possibility of bacterial leaching of zinc and manganese from the electrode mass of spent batteries. **Methods.** To determine the growth of acidophilic chemolithotrophic bacteria of acidophilic chemolithotrophic bacteria (ACB) there were used the media of different component and concentration composition. Ferrous iron and thiosulfate were used as energy sources. The amount of cells was determined by seeding on solid medium after tenfold serial dilutions. Stained microscopic preparation was examined by light microscopy. The method of atomic absorption spectroscopy with using AAS-1, S-115PK Selmi instruments was used to determine the content of metals in solutions. The results of determining the structural analysis of the electrode mass of spent batteries were recorded on a URS-50IM diffractometer. **Results.** The possibility of using AHB for leaching manganese and zinc from the electrode mass of spent batteries was established. The maximum metal leaching within a week was recorded when there were used the media 9K1 with ferrous iron at concentration of 44.5 g/dm³. When extending the term of leaching to a fortnight there were registered high intensity of biological leaching of the metals from electrode mass of spent batteries only in case of using the nutrient medium No. 15. It was shown that the using of the suspension *Acidithiobacillus ferrooxidans* MF Lv 7 increases the degree of manganese extraction to 30.0%, and zinc to 99.8%. The differences in the structure of the electrode mass of spent batteries before and after bacterial leaching, namely the absence of ZnO and MnO, decrease in the amount of MnO₂, increase in Mn₂O₃, and appearance of Mn₃O₄ has been shown with help of X-ray diffraction analysis. **Conclusions.** The possibility of using ACV for bacterial leaching of metals from the electrode mass of spent batteries was shown. The obtained results make it possible to additionally getting zinc and manganese and preventing environmental pollution by environmentally hazardous compounds.

Key words: bacterial leaching, acidophilic chemolithotrophs bacteria, zinc, manganese, electrode weight of spent batteries.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Блайда И. А.* Извлечение ценных металлов при переработке промышленных отходов биотехнологическими методами (Обзор) // Энерготехнологии и ресурсосбережение. – 2010. – № 6. – С. 39–45.
2. *Блайда И. А., Слюсаренко Л. И., Васильева Т. В., Васильева Н. Ю., Джамбек О. И., Джамбек А. А., Иваница В. А.* Возможности извлечения германия из промышленных отходов с применением гидрометаллургических и микробиологических методов // Энерготехнологии и ресурсосбережение. – 2008. – № 5. – С. 50–54.
3. *Блайда И. А., Васильева Т. В., Баранов В. И., Семенов К. И., Слюсаренко Л. И., Барба И. Н.* Свойства новых штаммов хемолитотрофных бактерий, выделенных из техногенных субстратов / Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates // Biotechnologia Acta. – 2015. – Vol. 8 (6). – P. 56–62. doi: 10.15407/biotech8.06.056.
4. *Каравайко Г. И., Дубинина Г. А., Кондратьева Т. Ф.* Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 593–629.
5. *Ковалев В. З.* Химические источники энергии. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2005. – 66 с.
6. *Ларин В. И., Хоботова Э. Б., Даценко А. А.* Утилизация активной никелевой массы из отработанных железо-никелевых аккумуляторов // XIII (ежегодная) международная научно-техническая конференция "Экология и здоровье человека, охрана водного и воздушного бассейнов, утилизация отходов" (13-17 июня 2005 г., г. Алушта). – Сборник научных трудов. – Харьков-Алушта, 2005. – С. 813–818.
7. *Марьев В. А., Комиссаров В. А.* Об организации переработки батарей // Экологический Вестник России – 2012. – Т. 12. – С. 21–23.
8. *Хавезов И., Цалев Д.* Атомно-абсорбционный анализ. - Л.: Химия, 1983. – 144 с.
9. *Blayda I. A.* Composition and activity of bacterial community of coal tailing // Biotechnologia Acta. – 2014. – Vol. 7, № 5. – P. 94–100.
10. *Brandl H., Bosshard R., Wegmann M.* Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi // Hydrometallurgy 59. – 2001. – P. 319–326.
11. *DSMZ: List of Recommended Media for Microorganisms.* Режим доступа: <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology/list-of-https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms.html>
12. *Ilyas Sadia, Anwar Munir A., Niazi Shahida B., Ghauri M. Afzal.* Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria // Hydrometallurgy. – 2007. – Vol. 88. – P. 180–188.
13. *Willner Joanna, Fornalczyk Agnieszka.* Extraction of metals from electronic waste by bacterial leaching // Environment Protection Engineering. – 2013. – Vol. 39, N 1. – P. 197–208.
14. *Willner J., Kadukova J., Fornalczyk A., Saternus M.* Biohydrometallurgical methods for metals recovery from waste materials // Metalurgija. – 2015. – Vol. 54, N 1. – P. 255–258.



References

1. *Blayda IA*. Extraction of valuable metals during processing of industrial wastes by biotechnological methods (Review). *Energotehnologii i resursoberezhnie*. 2010;(6):39 – 45 (In Ukrainian).
2. *Blayda IA, Vasylieva TV, Sliusarenko LI, Khitrich VF, Ivanytsia VO*. Retrieval of rare and non-ferrous metals by a community of microorganisms from ash after burning of Pavlograd coal. *Microbiology and Biotechnology*. 2012;(3):91 – 101 (In Ukrainian).
3. *Blayda IA, Vasylieva TV, Baranov VY, Semenov KY, Sliusarenko LI, Barba YN*. Properties of chemolithotrophic bacteria new strains isolated from industrial substrates. *Biotechnologia Acta*. 2015;(8)6: 56 – 62. doi: 10.15407/biotech8.06.056.
4. *Karavaiko HY, Dubynyna HA, Kondrateva TF*. Lithotrophic microorganisms of oxidation cycles of sulfur and iron. *Mykrobiolohiya*. 2006;(75)5: 593 – 629.
5. *Kovalev VZ*. Chemical sources of energy: Lecture notes / V. Z. Kovalev, E. M. Zavialov. – Omsk: Izd-vo OmGTU, 2005. – 66 p.
6. *Larin VI, Khobotova EB, Datsenko AA*. Utilization of active mass of nickel from spent iron-nickel batteries. In: XIII (ezhegodnaya) mezhdunarodnaya nauchno-tehnicheskaya konferentsiya "Ekologiya i zdorove cheloveka, ohrana vodnogo i vozdušnogo basseynov, utilizatsiya othodov", Harkov-Alushta, Ukrain. 2005: 813 – 818.
7. *Marev VA, Komissarov VA*. About organization of battery processing. *Ekologicheskiy Vestnik Rossii*. 2012;(12):21 – 23.
8. *Khavezov I, Tsalev D*. Atomic absorption analysis. – L.: Khimiia, 1983. – 144 p.
9. *Blayda IA*. Composition and activity of bacterial community of coal tailing. *Biotechnologia Acta*. 2014;(7)5:94 – 100.
10. *Brandl H, Bosshard R, Wegmann M*. Computer-munching microbes: metal leaching from electronic scrap by bacteria and fungi. *Hydrometallurgy*. 2001;(59):319 – 326.
11. DSMZ: List of Recommended Media for Microorganisms – elektronnyi resurs, <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms/culture-technology/list-of-media-for-microorganisms.html>
12. *Ilyas Sadia, Anwar Munir A, Niazi Shahida B, Ghauri MAfzal*. Bioleaching of metals from electronic scrap by moderately thermophilic acidophilic bacteria. *Hydrometallurgy*. 2007;(88):180 – 188.
13. *Willner J, Fornalczyk A*. Extraction of metals from electronic waste by bacterial leaching. *Environment Protection Engineering*. 2013;39(1):197 – 208.
14. *Willner J, Kadukova J, Fornalczyk A, Saternus M*. Biohydrometallurgical methods for metals recovery from waste materials. *Metallurgija*. 2015; (54)1: 255 – 258.

Стаття надійшла до редакції 11.10.2017 р.



Т. Сегін, С. Гнатуш, О. Масловська, О. Василів

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна,
тел.: +38 (067) 732 51 33, e-mail: segint@ukr.net

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ ГЛУТАТІОНОВОЇ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ БАКТЕРІЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ІМВ К-8 ЗА ВПЛИВУ КУПРУМ (II) СУЛЬФАТУ

Мета. Дослідити зміни активностей ензимів глутатіонової антиоксидантної системи бактерій *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату. **Методи.** У роботі використовували бактерії *C. limicola* ІМВ К-8, які вироцивали у середовищі *Green sulfur bacteria*. Глутатіонпероксидазну активність визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до і після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою. Глутатіон-S-трансферазну активність визначали за швидкістю утворення кон'югату відновленого глутатіону в реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом. **Результати.** Досліджено глутатіон-S-трансферазну, глутатіонпероксидазну та глутатіонредуктазну активності безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату у концентраціях, які спричиняли зниження накопичення біомаси на 10–70%. Показано, що за впливу всіх досліджуваних концентрацій купрум (II) сульфату зростали глутатіон-S-трансферазна та глутатіонпероксидазна активності, порівняно з контролем. Активність цих ензимів змінювалася залежно від концентрації купрум (II) сульфату в середовищі інкубації та тривалості культивування бактерій. Також встановлено, що у досліджуваних бактерій відсутня глутатіонредуктазна активність. **Висновок.** Зростання глутатіонпероксидазної активності у 2–12 разів та глутатіон-S-трансферазної активності у 1,5–2 рази, порівняно з контролем, у безклітинних екстрактах *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату свідчить про накопичення у клітинах гідрофобних і гідрофільних органічних пероксидів, а також про те що, ймовірно, ця система є одним із важливих способів захисту клітин зелених фотосинтезуювальних бактерій, зокрема *C. limicola*, від активних метаболітів кисню.

Ключові слова: зелені бактерії, *Chlorobium limicola*, глутатіон-S-трансфераза, глутатіонпероксидаза, глутатіонредуктаза, купрум (II) сульфат.

Мікроорганізми у навколишньому середовищі, особливо у техногенно трансформованих біотопах, зазнають впливу стресових чинників. Важливим забруднювачем кар'єрних водойм у місцях промислового видобування сірки, є гідроген сульфід, який утворюється у значних кількостях і згубно впливає на функціонування організмів [8, 10]. Виділені нами зелені фотосинтезуюваль-



ні бактерії *Chlorobium limicola* ІМВ К-8 з води озера Яворівське (Україна, Львівська обл.) використовують водень сульфід як донор електронів, внаслідок чого водойма очищується від нього [1]. Такі властивості *C. limicola* ІМВ К-8 можуть бути використані для створення біотехнологій для очищення вод, забруднених воднем сульфідом. Відомо, що забруднювачами навколишнього середовища, у тому числі і техногенних водойм, є сполуки важких металів [10]. Йони металів із змінною валентністю спричиняють утворення активних метаболітів кисню (АМК) [2, 4, 6]. Щоб протидіяти шкідливому впливу АМК багато анаеробних мікроорганізмів виробили систему захисту, важливою ланкою якої є глутатіонзалежна антиоксидантна система [8, 11]. Її функціонування у клітинах прокариот досліджено не достатньо. Відомо, що глутатіонова антиоксидантна система є видоспецифічною, а інколи і штамоспецифічною [11]. Гени, які кодуєть глутатіонпероксидазу чи глутатіон-S-трансферазу у бактерій *C. limicola* у базі даних GenBank не виявлено. Однак, ідентифіковано амінокислотні та нуклеотидні послідовності ензимів глутатіонної системи у близькоспоріднених родів і задепоновано послідовність ензиму штаму *Chlorobium tepidum* TLS (NP_661153.1) довжиною 164 амінокислоти, який характеризується глутатіон-S-трансферазною активністю. Також задепоновано дві амінокислотні послідовності ензимів штаму *Chlorobium* sp. GBChlB довжиною 163 (GI:662569203) та 157 амінокислот (GI:662568093), для яких характерна глутатіонпероксидазна активність [9]. Глутатіонова система забезпечує відновлення H_2O_2 і різних органічних гідропероксидів та знешкодження токсичних альдегідів, внаслідок кон'югації з відновленим глутатіоном [2, 4, 11]. У літературі немає даних щодо функціонування такої системи у зелених сіркобактерій.

Метою роботи було дослідити зміни активностей ензимів глутатіонної антиоксидантної системи бактерій *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату.

Матеріали і методи

У роботі використовували бактерії *Chlorobium limicola* ІМВ К-8, які вирощували у середовищі Green sulfur bacteria (GSB) [1] як описано в роботі [6]. Суспензію клітин бактерій з експоненціальної фази росту обробляли упродовж однієї години трис-НСІ буфером (50 мМ, рН 7,0), який містив купрум (II) сульфат у концентраціях від 0,05 до 0,5 мМ як описано у нашій попередній роботі [6]. У зразки, що слугували за контроль, купрум (II) сульфат не вносили. Обрані концентрації купрум (II) сульфату зумовлювали зниження нагромадження біомаси від 10% до 70%, що дозволяє оцінити зміни показників антиоксидантної системи за зростання пригнічувального впливу [6]. Безклітинні екстракти одержували руйнуванням клітин на ультразвуковому гомогенізаторі УЗДН-2Т (22 кГц, 5 хв, 0 °С) [6]. Концентрацію білків у безклітинних екстрактах визначали за методом Лоурі [7]. Глутатіонпероксидазну активність визначали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону до та після інкубації з гідропероксидом третинного бутилу за допомогою кольорової реакції з 5,5-дитіобіс-2-нітробензойною кислотою [2]. Глутатіон-S-трансферазну активність визначали за швидкістю утворення кон'югату відновлено-



го глутатіону в реакції з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який характеризується максимумом поглинання за довжини хвилі 340 нм [3]. Глутатіонредуктазну активність визначали за зниженням вмісту НАДФН упродовж 1 хв, вимірюючи оптичну густину за довжини хвилі 340 нм [2]. Вираховували основні статистичні показники за отриманими даними (середнє арифметичне – М; стандартну похибку середнього арифметичного – m). Для оцінки достовірності різниці між статистичними характеристиками трьох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стюдента. Критичний рівень значимості «р» був прийнятий рівним 0,05 [5]. Для обробки даних використовували пакети програм MS Excel 2003 та Origin 8.

Результати досліджень та їх обговорення

Внесення купрум (II) сульфату, як стресового чинника, до середовища інкубації *C. limicola* ІМВ К-8 в концентраціях 0,05–0,5 мМ спричиняє вільно-радикальне окиснення ліпідів, що призводить до активації системи антиоксидантного захисту [6].

Глутатіон-S-трансферазна активність *C. limicola* ІМВ К-8 у контролі була найвищою на сьому добу культивування ($41 \pm 2,7$ од. акт./мг білка) (рис. 1).

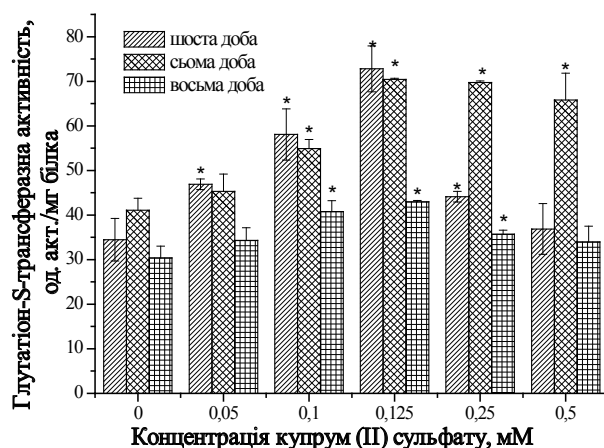


Рис. 1. Глутатіон-S-трансферазна активність безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату (* – $p = 0,05$, $n = 3$ – вірогідні зміни, порівняно з контролем)

Fig. 1. Glutathione-S-transferase activity of cell-free extracts *C. limicola* of IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate (* – $p = 0.05$, $n = 3$ – probable changes compared with control)

Внесення купрум (II) сульфату в інкубаційне середовище зумовлювало зростання глутатіон-S-трансферазної активності у безклітинних екстрактах *C. limicola* ІМВ К-8, порівняно з контролем. За внесення купрум (II) сульфату в інкубаційне середовище у концентраціях 0,05–0,125 мМ глутатіон-S-транс-

феразна активність була найвищою на шосту добу вирощування і зі збільшенням тривалості вирощування до восьми діб знижувалася. Ензиматична активність безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8, інкубованих у середовищі із 0,25 та 0,5 мМ купрум (II) сульфату, була найвищою на сьому добу культивування (відповідно $70 \pm 0,34$ та $66 \pm 6,02$ од. акт./мг білка). Упродовж шостої та восьмої діб глутатіон-S-трансферазна активність не змінювалася, порівняно з контролем. За впливу цих концентрацій купрум (II) сульфату біомаса *C. limicola* ІМВ К-8 знижувалася у 2,7 та 3,2 рази, порівняно з контролем.

Припускаємо, що за цих умов у клітинах *C. limicola* ІМВ К-8 пошкоджується поліпептидний ланцюг глутатіон-S-трансфери внаслідок впливу АМК, оскільки відомо, що токсичні продукти перекисного окиснення ліпідів, зокрема малоновий диальдегід та 4-гідроксिनоненаль, здатні взаємодіяти з амінокислотами і, таким чином, знижувати або унеможливити ензиматичну активність [4]. Також, причиною зниження активності глутатіон-S-трансфери може бути пошкодження генів, які кодують цей ензим або забезпечують його синтез, внаслідок взаємодії АМК з ДНК. Тому клітини *C. limicola* ІМВ К-8, інкубовані у буфері із купрум (II) сульфатом у концентраціях 0,25–0,5 мМ, внаслідок пошкодження структури ензиму або зниження його синтезу не здатні відновлювати гідропероксильні групи окиснених фосfolіпідів, що, ймовірно, негативно впливає на функціональний стан мембрани і відображається у значному зниженні накопичення біомаси за впливу цих концентрацій купрум (II) сульфату.

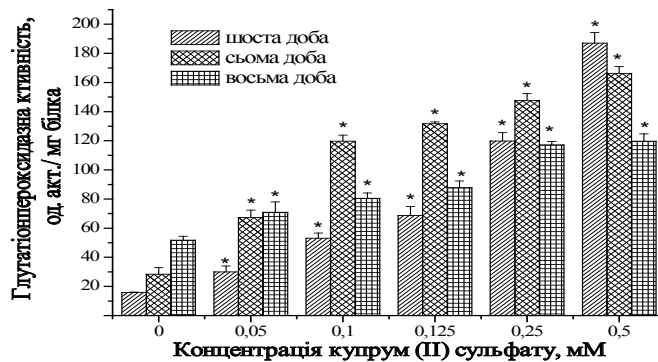


Рис. 2. Глутатіонпероксидазна активність безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату

(* – $p = 0,05$, $n=3$ – вірогідні зміни, порівняно з контролем)

Fig. 2. Glutathione peroxidase activity of cell-free extracts of *C. limicola* of IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate

(* – $p = 0.05$, $n = 3$ – probable changes compared with control)

Під час дослідження глутатіонпероксидазної активності безклітинних екстрактів *C. limicola* ІМВ К-8, інкубованих без внесення купрум (II) сульфату, виявлено зростання активності ензиму зі збільшенням тривалості куль-



тивування (рис. 2). За внесення усіх досліджуваних концентрацій купрум (II) сульфату в середовище інкубації спостерігали зростання глутатіонпероксидазної активності. За впливу купрум (II) сульфату у концентраціях 0,05; 0,1 та 0,125 мМ на сьому добу культивування бактерій активність ензиму зростала відповідно у 2,4; 4,2 та 4,7 рази, порівняно з контролем. За впливу купрум (II) сульфату найвищу активність ензиму (187 ± 7 од. акт./мг білка) спостерігали на шосту добу вирощування за впливу 0,5 мМ купрум (II) сульфату, що в 12 разів вище за контрольний показник. Глутатіонпероксидазна активність безклітинних екстрактів *C. limicola* IMB K-8, інкубованих у буфері, який містив купрум (II) сульфат у концентраціях 0,1–0,25 мМ, була найвищою на сьому добу вирощування, а за впливу 0,5 мМ купрум (II) сульфату була найвищою на шосту добу вирощування. За подальшого збільшення тривалості культивування глутатіонпероксидазна активність за впливу 0,5 мМ купрум (II) сульфату знижувалася, що може бути зумовлено зниженням вмісту відновленого глутатіону.

Біорегенерація окисненого глутатіону, який утворюється в глутатіонпероксидазній реакції, здійснюється з участю глутатіонредуктази [2], активності якої ми не виявили у *C. limicola* IMB K-8. У базі даних GenBank не виявлено гени, які кодують цей ензим у *C. limicola*, однак є задепонована послідовність гіпотетичного ензиму, який характеризується глутатіонредуктазною активністю у бактерій *Chlorobium ferrooxidans* DSM 13031 (EAT59077.1) [9]. У *E. coli* для оновлення вмісту відновленого глутатіону більш важливими процесами є синтез глутатіону *de novo*, ніж його відновлення глутатіонредуктазою [11]. Ймовірно, бактерії *C. limicola* IMB K-8 також синтезують відновлений глутатіон *de novo*, а не відновлюють окиснену форму у глутатіонредуктазній реакції. Однак, це буде предметом наших наступних досліджень.

Отже, зростання глутатіонпероксидазної активності у 2–12 разів та глутатіон-S-трансферазної активності у 1,5–2 рази, порівняно з контролем, у безклітинних екстрактах *C. limicola* IMB K-8 за впливу купрум (II) сульфату свідчить про накопичення у клітинах гідрофобних і гідрофільних органічних пероксидів, а також про те що, ймовірно, ця система є одним із важливих способів захисту клітин зелених фотосинтезуювальних бактерій, зокрема *C. limicola*, від активних метаболітів кисню.

T. Segin, S. Hnatush, O. Maslovska, O. Vasylyv

Department of Microbiology, Biological Faculty of Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevsky Str., Lviv, 79005, Ukraine,
tel.: +38 (067) 732 51 33, e-mail: segint@ukr.net

ENZYMES ACTIVITY OF GLUTATHIONE ANTIOXIDANT SYSTEM OF *CHLOROBIVM LIMICOLA* IMV K-8 BACTERIA UNDER THE INFLUENCE OF COPPER (II) SULFATE

Summary

Aim. Investigation of changes of glutathione antioxidant system enzymes activity of *Chlorobium limicola* IMV K-8 bacteria under the influence of copper (II) sulfate.



Methods. In this investigation there were used *C. limicola* IMV K-8 bacteria which were cultivated in Green sulfur bacteria medium. Glutathione peroxidase activity was determined by the rate of oxidation of reduced glutathione before and after incubation with tert-butyl hydroperoxide by color reaction with 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid. Glutathione S-transferase activity was determined by the rate of formation of conjugate of reduced glutathione with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene.

Results. Glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity of cell free extracts of *C. limicola* IMV K-8 were investigated under the influence of copper (II) sulfate in concentrations that caused decrease of biomass accumulation from 10 to 70%. It was shown that under the influence of all investigated copper (II) sulfate concentrations glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activity increased in comparison with control. Activity of these enzymes changed in dependence on copper (II) sulfate concentration in incubation medium and duration of cultivation. Also it was determined that glutathione reductase activity is absent in investigated bacteria. **Conclusion.** The increase of activity of glutathione peroxidase by 2–12 times and glutathione-S-transferase by 1.5–2 times, in comparison with control, in cell free extracts of *C. limicola* IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate indicates on accumulation of hydrophobic and hydrophilic organic peroxides inside the cells. It also shows that, possibly, this system is one of the important ways of cell defense of green photosynthetic bacteria, in particular *C. limicola*, against reactive oxygen species.

Key words: green bacteria, *Chlorobium limicola*, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, copper (II) sulfate.

Т. Сегін, С. Гнатуш, О. Масловская, О. Васи́лів

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,

ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина,

тел.: +38 (067) 732 51 33, e-mail: segint@ukr.net

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ГЛУТАТИОНОВОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ *CHLOROBIVM LIMICOLA* ИМВ К-8 ПРИ ВЛИЯНИИ КУПРУМ (II) СУЛЬФАТА

Реферат

Цель. Исследовать изменения активностей ферментов глутатионовой антиоксидантной системы бактерий *Chlorobium limicola* ИМВ К-8 под влиянием купрум (II) сульфата. **Методы.** В работе использовали бактерии *C. limicola* ИМВ К-8, которые выращивали в среде *Green sulfur bacteria*. Глутатионпероксидазную активность определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона до и после инкубации с гидропероксидом третичного бутила с помощью цветной реакции с 5,5-дитиобис-2-нитробензойной кислотой. Глутатион-S-трансферазную активность определяли по скорости образования конъюгата восстановленного глутатиона в реакции с 1-хлор-2,4-динитробензолом. **Результаты.** Исследовали глутатион-S-трансферазную, глутатионредуктазную и глутатионпероксидазную активности бесклеточных экстрактов *C. limicola* ИМВ К-8 под влиянием купрум (II) сульфа-



та при концентрациях, которые повлекли снижение накопления биомассы на 10–70%. Под воздействием купрум (II) сульфата при всех исследуемых концентрациях увеличивались глутатион-S-трансферазная и глутатионпероксидазная активности по сравнению с контролем. Активность этих ферментов изменялась в зависимости от концентрации купрум (II) сульфата в инкубационной среде и продолжительности культивирования бактерий. Также установлено, что в исследуемых бактериях отсутствует глутатионредуктазная активность. **Вывод.** Увеличение глутатионпероксидазной активности в 2–12 раз и глутатион-S-трансферазной активности в 1,5–2 раза, по сравнению с контролем, в бесклеточных экстрактах *C. limicola* ИМВ К-8 под влиянием купрум (II) сульфата свидетельствует о накоплении в клетках гидрофобных и гидрофильных органических пероксидов, а также о том, что, вероятно, эта система является одним из важных способов защиты клеток зелёных фотосинтезирующих бактерий, в частности *C. limicola*, от активных метаболитов кислорода.

Ключевые слова: зелёные бактерии, *Chlorobium limicola*, глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, купрум (II) сульфат.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гнатуш С., Горишний М., Сегин Т. Фотосинтезирующие зелёные серобактерии, выделенные из озера Яворовское (Украина, Львовская область) // Интер-медикал. – 2014. – № 3. – С. 63–68.
2. Головчак Н. П., Тарновська А. В., Коцюмбас Г. І., Санагурський Д. І. Процеси перекисного окиснення ліпідів у живих організмах. – Львів: ЛНУ ім. Івана Франка, 2012. – 250 с.
3. Мартинчик А., Бондарев И. Активность глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы в печени крыс в зависимости от содержания восстановленного глутатиона // Вопр. мед. химии. – 1986. – 32, № 2. – С. 39–43.
4. Меньшикова Е., Ланкин З., Зенков Н., Боднарь И., Кругловых Н., Труфакин В. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. – Москва: Слово, 2006. – 553 с.
5. Лакин Г. Биометрия. – Москва: Высшая школа, 1990. – 352 с.
6. Сегин Т., Гнатуш С., Горишний М. Процеси ліпопероксидації у клітинах *Chlorobium limicola* ИМВ К-8 за впливу купрум (II) сульфату // Вісн. Дніпропетр. ун-ту. Сер. Біол. Екол. – 2016. – 24, № 1. – С. 72–77.
7. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement, with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 265–275.
8. Fareleira P., Santos B. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas* // Microbiology. – 2003. – 149. – P. 1513–1522.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B., Beeregowda K. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals // Interdiscip. Toxicol. – 2014. – 7, № 2. – P. 60–72.
11. Rui-Yan F., Jian C., Yin L. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells // Chinese J. Biotechnol. – 2007. – 23, № 5. – P. 770–775.



References

1. Hnatush S, Goryshnyi M, Segin T. Photosynthetic green sulfur bacteria, isolated from Yavoriv lake (Lviv region, Ukraine). *Inter-medykal. J.* 2014; 3:63-68 (in Russian).
2. Holovchak N., Tarnovs'ka A., Kotsyumbas H., Sanahurs'kyi D. Processes of lipid peroxidation in living organisms. Lviv: LNU im. Ivana Franka. 2012. 250 p. (in Ukrainian).
3. Martinchik A, Bondarev G. The activity of glutathione reductase and glutathione-S-transferase in rat liver in dependence of content of reduced glutathione. *Vopr. med. himii.* 1986; 32(2):39-43 (in Russian).
4. Menshikova E., Lankin V., Zenkov N., Bodnar I., Kruglovyih N., Trufakin V. Oxidative stress. Prooxidants and antioxidants. Moskva: Slovo. 2006. 553 p. (in Russian).
5. Lakin G. Biometrics. Moskva: Vyssh. Shkola. 1990. 352 p. (in Russian).
6. Segin T, Hnatush S, Gorishnyi M. The processes of lipid peroxidation in the cells of *Chlorobium limicola* IMV K-8 under the influence of copper (II) sulfate. *Visn. Dnipropetr. Univ. Ser. Biol. Ekol.* 2016; 24(1):72-77 (in Ukrainian).
7. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement, with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275.
8. Fareleira P, Santos B. Response of a strict anaerobe to oxygen: survival strategies in *Desulfovibrio gigas*. *Microbiology.* 2003; 149:1513-1522.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
10. Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew B, Beeregowda K. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 2014; 7(2):60-72.
11. Rui-Yan F, Jian C, Yin L. The function of the glutathione/glutathione peroxidase system in the oxidative stress resistance systems of microbial cells. *Chinese J. Biotechnol.* 2007; 23(5):770-775.

Стаття надійшла до редакції 04.12.2017 р.



Н. В. Ліманська, Н. Ю. Адарма

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: limanska@gmail.com

ВПЛИВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА *FUSARIUM SP.* ЗБУДНИКА ФУЗАРІОЗУ СІЯНЦІВ СОСНИ

Мета. Вивчити вплив *L. plantarum* на мікроміцети *Fusarium sp.*, виділений з уражених полягань сіянцив сосни звичайної. **Методи.** Антагоністичний вплив лактобацил виявляли лунковим методом дифузії в агар. Вплив *L. plantarum* на проростання інфікованого насіння вивчали шляхом внесення добової культури лактобацил і відмитих клітин лактобацил у ґрунт перед посівом насіння. Добовою культурою також обробляли сіянци сосни. **Результати.** Дослідження впливу культур лактобацил на ріст *Fusarium sp.* 17, виділеного з ураженого сіянца сосни, показало, що добові культури *L. plantarum* ОНУ 12, ОНУ 311, ОНУ 355 та їх консорціуми спричиняли зони затримки росту міцелію гриба. Обробка ґрунту перед посівом добовою культурою штаму *L. plantarum* ОНУ 311 збільшувала схожість насіння сосни на 17,3%, виживання рослин на 7%, і середню висоту сіянцив на 8%. Внесення у ґрунт суспензії відмитих клітин і обробка ними сіянцив були неефективними. **Висновок.** Бактерії виду *L. plantarum* можуть бути розглянуті як перспективні мікроорганізми для покращення схожості насіння сосни звичайної і захисту сіянцив за дотримання певних умов обробки ґрунту.

Ключові слова: *Fusarium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pinus sylvestris L.*, полягання, антагонізм.

Полягання сіянцив сосни призводить до загибелі 33,0–40,0% молодих рослин у розсадниках лісових культур України та інших країн світу [2, 3]. Це небезпечне захворювання спричиняють мікроміцети родів *Alternaria*, *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, але найчастіше – представники роду *Fusarium* [2, 4, 9]. Різні автори вказують на можливість спричинення полягання такими видами, як *Fusarium oxysporum* [13], *F. acuminatum*, *F. equiseti* [11,14], *F. commune*, *F. redolens*, *F. chlamydosporum* [10], *F. moniliforme* [8].

Біологічний захист рослин за допомогою штамів мікроорганізмів є перспективною альтернативою застосування хімічних препаратів з антифунгальною дією. За вираженістю дії біологічні препарати поступаються хімічним, але вони відрізняються більш вузьким спектром дії і не порушують рівновагу у біоценозі, що стає перевагою за перевантаження навколишнього середовища шкідливими речовинами [12]. Бактерії роду *Lactobacillus* характеризуються високою антагоністичною активністю, в тому числі – проти збудників фу-



заріозів рослин [6]. Лактобацили відносяться до мікроорганізмів зі статусом GRAS ("Generally Recognized as Safe"), тобто вони є абсолютно безпечними для здоров'я людини і тварин, що є додатковою перевагою їх застосування. Дотепер не було відомостей щодо впливу лактобацил на збудників полягання сіянців сосни.

У зв'язку з цим метою дослідження було вивчити вплив *L. plantarum* на мікроміцети штаму *Fusarium sp.*, виділеного з уражених поляганням сіянців сосни звичайної.

Матеріал і методи дослідження

Мікроміцети виділяли методом відбитків з уражених поляганням одномісячних сіянців сосни звичайної *Pinus sylvestris* L. [5, 14]. Для виділення та очищення ізольованої культури мікроміцета використовували середовище Сабуро, температура культивування 25 °С. Для ідентифікації вивчали морфолого-культуральні властивості мікроміцета. Конідії досліджували під світловим мікроскопом (збільшення 400х).

Для посівів культуру мікроміцета вирощували на агарі Сабуро впродовж двох тижнів, а потім відбирали фрагмент середовища з міцелієм, поміщали у колбу зі стерильною дистильованою водою і струшували для отримання суспензії, в якій надалі підраховували кількість конідій під світловим мікроскопом (збільшення 400х). Для посівів використовували суспензію з концентрацією 10^5 конідій в мл.

Лактобацили штамів *L. plantarum* ОНУ 12, ОНУ 311, ОНУ 355 та їх консорціями *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 та *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 355 вирощували у середовищі MRS ("de Man, Rogosa and Sharpe agar"), за температури 37 °С впродовж трьох діб. Молочнокислі бактерії відділяли від культуральної рідини центрифугуванням при 10000 g впродовж 20 хв. Вплив продуктів метаболізму рідкої культури на ріст мікроміцета досліджували лунковим методом дифузії на агаризованому середовищі Сабуро. Результати враховували на 7–10-й день культивування мікроміцетів.

Для вивчення впливу лактобацил на проростання насіння сосни і виживання сіянців у ґрунт «Поліський універсальний» вносили добову культуру *L. plantarum* ОНУ 311 з концентрацією клітин 10^8 кл/мл шляхом поливу. В іншому варіанті у ґрунт вносили лактобацили добової культури, відмиті від культуральної рідини стерильною дистильованою водою методом трьохразового центрифугування при 10 000 g впродовж 10 хв, і доведені до первинної концентрації 10^8 КУО/мл.

Відразу після внесення лактобацил у ґрунт здійснювали посів насіння сосни звичайної *Pinus sylvestris* L. комерційного постачальника, яке за попереднього тестування виявилось зараженим збудником полягання. Контролем слугувало насіння з цієї ж партії, засіяне у ґрунт без внесення лактобактерій. Крім того, один з варіантів досліду полягав у тому, що добову культуру лактобацил, розведену до концентрації 10^7 кл/мл, вносили у ґрунт під двотижневими сіянцями сосни та обприскували суспензією проростки. Дослідження проводили у двох незалежних експериментах, у кожному варіанті засівали по 75 насінин. Сіянці вирощували за умов, що сприяють розвитку грибкових



інфекцій [4]. Статистичну достовірність відмінностей визначали за критерієм Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Результати дослідження та їх обговорення

У результаті висіву методом відбитків мікробіоти сіянців сосни (рис. 1) на середовище Сабуро було виділено культуру мікроскопічних грибів.

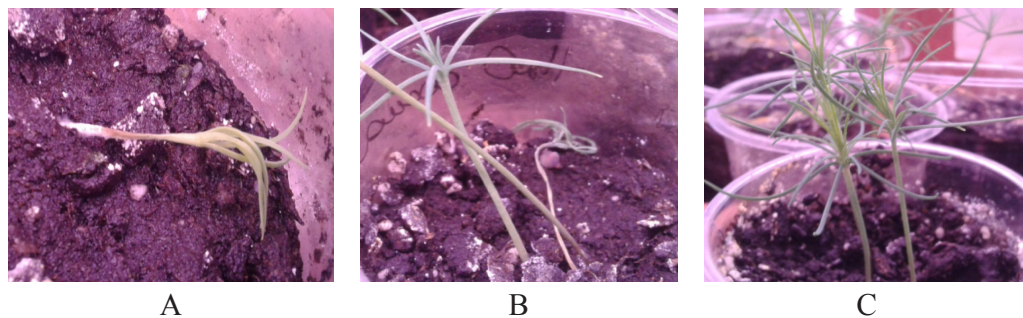


Рис. 1. Вигляд сіянців сосни звичайної, уражених поляганням (А, В – рослина справа) і здорових сіянців (С).

Fig. 1. Seedlings of Scots pine infected with damping-off (A, B – plant on the right) and healthy seedlings (C).

За морфологічними особливостями (рис. 2) міцелію (рожево-білий, добре розвинутий, на деяких ділянках – занурений у середовище, субстрат забарвлений у винно-червоний колір) та конідій (мікроконідії еліпсоподібні, макроконідії – веретеноподібні, зі слабо вираженою ніжкою) ізольовані мікроміцети було ідентифіковано за Визначником [1] як такі, що належать до роду *Fusarium*. У роботі надалі використовували штам *Fusarium sp.* 17.

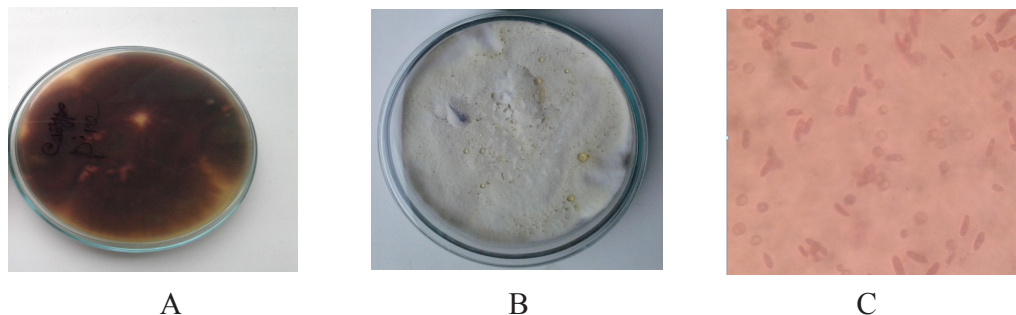


Рис. 2. Морфолого-культуральні властивості мікроміцета *Fusarium sp.* 17: А – культура гриба на середовищі Сабуро, реверзум колонії; В – міцелій гриба; С – мікроконідії та макроконідії гриба (збільшення 400х).

Fig. 2. Morphological and cultural properties of micromycete *Fusarium sp.* 17 from damping-off pine seedlings: А – fungal culture on Saburo medium; В – fungal mycelium; С – microconidia and macroconidia of a fungus, 400x.

Дослідження впливу культур лактобацил на ріст *Fusarium sp.* 17 показало, що добові культури *L. plantarum* ОНУ 12, ОНУ 311, ОНУ 355 та їх консорціуми спричиняли зони затримки росту міцелію гриба (2–6 мм) (рис. 3, а). Трьохдобові культури були менш ефективними (3, б).

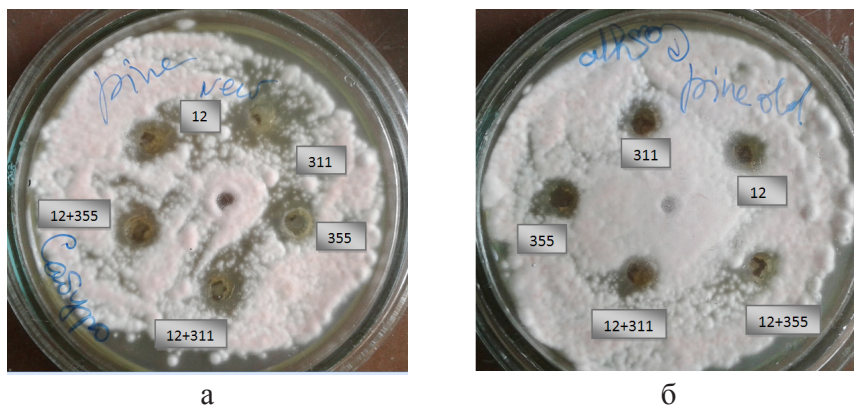


Рис. 3. Зони затримки росту *Fusarium sp.* 17 на середовищі Сабуро під впливом культур *Lactobacillus plantarum* (центральна лунка – негативний контроль без внесення культур).

Fig. 3. Zones of inhibition of *Fusarium sp.* 17 growth on Saburo medium caused by *Lactobacillus plantarum* cultures (central well – negative control without addition of cultures).

Культуральна рідина лактобацил без клітин характеризувалася меншим пригнічувальним впливом і невеликими зонами затримки росту (до 2 мм).

У дослідженнях з впливу лактобацил на схожість насіння сосни звичайної і захист сіяньців від збудника полягання сіяньців сосни використовували штам *L. plantarum* ОНУ 311, оскільки бактерії цього штаму найбільше пригнічували ріст збудника фузаріозу на живильному середовищі у попередніх дослідженнях. Насіння сосни звичайної висівали у ґрунт, в який було внесено бактерії штаму *L. plantarum* ОНУ 311. Ґрунт обробляли у двох варіантах: суспензією відмитих клітин лактобацил і добовою культурою штаму *L. plantarum* ОНУ 311. Третій варіант включав обробку добовою культурою лактобацил вже після появи сходів (полив ґрунту і обприскування основ сіяньців). Контролем слугувало насіння, висіяне у ґрунт, в який не вносили лактобацили.

Облік результатів схожості насіння показав, що позитивний вплив внесення рідкої культури лактобацил у ґрунт спостерігався вже на 15-й день від посіву: обробка ґрунту життєздатними бактеріями разом з їх метаболітами прискорювала схожість насіння сосни на 17,3% (табл. 1).

Напроти, внесення у ґрунт відмитих лактобацил зменшувало схожість, що свідчить про непридатність такого варіанту обробки для насіння сосни. Отже, саме продукти метаболізму культуральної рідини з життєздатними лактобацилами мали стимулювальний вплив. Ймовірно, культуральна рідина, внесена разом з лактобацилами, створює сприятливі умови для первинного виживання молочнокислих бактерій і поступового їх включення у мікроценоз ґрунту.

Таблиця 1

Вплив *L. plantarum* ОНУ 311 на схожість насіння сосни звичайної

Table 1

Effect of *L. plantarum* ONU 311 on germination of Scots pine seeds

Варіант	15 днів	30 днів	45 днів
Необроблений ґрунт (контроль)	16,0 ± 0,7 %	33,3 ± 1,2 %	37,3 ± 2,7 %
Клітини <i>L. plantarum</i> ОНУ 311	8,0 ± 0,4 %	18,6 ± 1,7 %	29,3 ± 2,2 %
Культура <i>L. plantarum</i> ОНУ 311	33,3 ± 2,7 %*	41,3 ± 3,8 %*	50,7 ± 1,9 %*

Примітка: *значення достовірно перевищують такі у контролі ($p \leq 0,05$).Note: * values are significantly higher than those in the control ($p \leq 0,05$).

Така ж тенденція спостерігалася й за впливу молочнокислих бактерій на виживання сіянців сосни (рис. 4).

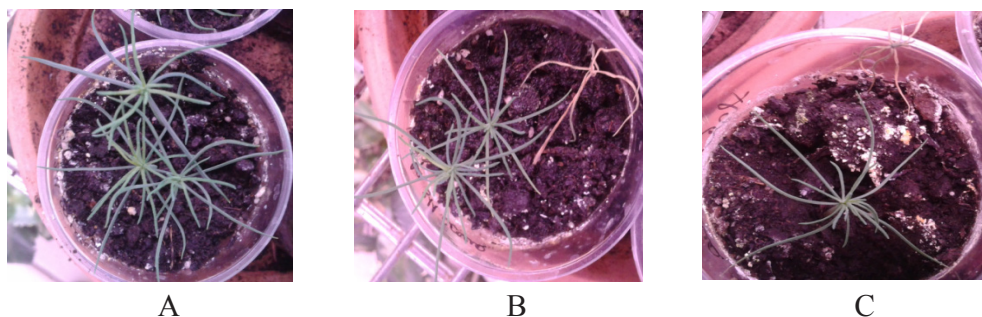


Рис. 4. Виживання сіянців сосни на 75-й день експерименту:

А, В – за внесення рідкої культури лактобацил у ґрунт;

С – за внесення відмитих клітин лактобацил.

Fig. 4. Surviving of pine seedlings on the 75th day of the experiment:

A, B – if soil was treated with non-washed lactobacilli;

C – if soil was treated with washed cells of lactobacilli.

Внесення у ґрунт відмитих клітин негативно відобразилося на виживанні рослин, а натомість, обробка ґрунту внесенням рідкої культури лактобацил підвищила виживання рослин на 7% (табл. 2).

Сіянці сосни, які вирости у різних варіантах, відрізнялися також за розмірами. Показано, що одноразове передпосівне внесення добової культури *L. plantarum* ОНУ 311 у ґрунт сприяло й кращому росту рослин (табл. 3). Середня висота сіянців у даному варіанті обробки на 8% перевищувала таку у контролі.

Отже, бактерії виду *L. plantarum* можуть бути розглянуті як перспективні мікроорганізми для покращення схожості насіння сосни звичайної і захисту сіянців від фітопатогенних грибів роду *Fusarium*.



Таблиця 2
Вплив *L. plantarum* ОНУ 311 на виживання засіяного насіння сосни звичайної (%)
Table 2
Percentage of survived seedlings from general amount of Scots pine seeds (%)

Варіант	30 днів	45 днів	75 днів
Необроблений ґрунт (контроль)	30,6 ± 1,3 %	24,0 ± 2,8 %	22,6 ± 1,5 %
Внесення відмитих клітин ОНУ 311 у ґрунт	14,6 ± 2,1 %	17,3 ± 1,3 %	17,3 ± 1,3 %
Внесення добової культури ОНУ 311 у ґрунт	36,0 ± 1,1 %*	37,3 ± 2,3 %*	29,3 ± 1,5 %*
Обробка сіяньців добовою культурою ОНУ 311	28,0 ± 2,4 %	17,1 ± 1,6 %	18,6 ± 2,3 %

Примітка: * різниця достовірна з контролем ($p \leq 0,05$).
Note: * values are significantly higher than those in the control ($p \leq 0,05$).

Таблиця 3
Середня висота сіяньців сосни після обробок лактобацилами
Table 3
Mean height of pine seedlings after the treatment with lactobacilli

Варіант	Висота, см
Необроблений ґрунт (контроль)	3,70 ± 0,12
Внесення клітин ОНУ 311 у ґрунт	3,4 ± 0,26
Внесення добової культури ОНУ 311 у ґрунт	4,02 ± 0,15*
Обробка сіяньців добовою культурою ОНУ 311	3,52 ± 0,16

Примітка: *значення достовірно перевищують такі у контролі ($p \leq 0,05$).
Note: * values are significantly higher than those in the control ($p \leq 0,05$).

Дані у літературі щодо використання бактерій у біологічному контролі полягання сіяньців сосни обмежуються роботою Hwang et al. (1995), в якій було досліджено вплив *Bacillus subtilis* на *F. moniliforme*, виділеного з ураженої сосни. Антагонізм *L. plantarum* до *Fusarium sp.* – збудника фузаріозу сіяньців сосни, було показано нами уперше.

Внесення у ґрунт добової культури *L. plantarum* ОНУ 311 збільшувало схожість насіння сосни звичайної, інфікованого *Fusarium sp.* 17, на 17,3%, виживання сіяньців сосни – на 7%, середню висоту сіяньців сосни – на 8%.

Необхідними є подальші дослідження, направлені на пошук речовини з антифунгальною дією, яка синтезується бактеріями штаму *L. plantarum* ОНУ 311 і пригнічує ріст збудника фузаріозу *Fusarium sp.*



Н. В. Лиманская, Н. Ю. Адарма

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: limanska@gmail.com

ВЛИЯНИЕ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА ВОЗБУДИТЕЛЯ ФУЗАРИОЗА СЕЯНЦЕВ СОСНЫ

Реферат

Цель. Изучить влияние *L. plantarum* на микромицеты штамма *Fusarium sp.*, выделенного из сеянцев сосны обыкновенной, пораженных полеганием. **Методы.** Антагонистическое влияние лактобацилл выявляли луночным методом диффузии в агар. Влияние *L. plantarum* на прорастание инфицированных семян изучали путем внесения суточной культуры лактобацилл и отмытых клеток лактобацилл в почву перед посевом семян. Суточной культурой также обрабатывали сеянцы сосны. **Результаты.** Изучение влияния культур лактобацилл на рост *Fusarium sp.* 17, выделенного из пораженного сеянца, показало, что суточные культуры *L. plantarum* ОНУ 12, ОНУ 311, ОНУ 355 и их консорциумы вызывали зоны задержки роста мицелия гриба. Обработка почвы перед посевом суточной культурой штамма *L. plantarum* ОНУ 311 увеличивала всхожесть семян сосны на 17,3%, выживание растений на 7%, и среднюю высоту сеянцев на 8%. Внесение в почву суспензии отмытых клеток и обработка сеянцев были неэффективными. **Вывод.** Бактерии вида *L. plantarum* могут быть рассмотрены как перспективные микроорганизмы для улучшения всхожести семян сосны обыкновенной и защиты сеянцев при соблюдении определенных условий обработки почвы.

Ключові слова: *Fusarium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pinus sylvestris L.*, полегание, антагонизм.

N. V. Limanska, N. Yu. Adarma

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limanska@gmail.com

EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ON THE AGENT OF DAMPING-OFF OF PINE SEEDLINGS

Summary

Aim. To study the effect of *L. plantarum* on micromycetes of *Fusarium sp.* strain isolated from Scots pine seedlings infected with damping-off disease. **Methods.** The antagonistic effect of lactobacilli was tested by well agar diffusion method. Effect of *L. plantarum* on germination of infected seeds was studied by pre-sowing treatment of soil with overnight culture of lactobacilli and washed cells of lactobacilli. Overnight culture was also used for treatment of pine seedlings. **Results.** Overnight cultures of *L. plantarum* ONU 12, ONU 311, ONU 355 and their consortia caused the inhibition zones on a lawn of *Fusarium sp.* 17 isolated from damping-off seedling. Pre-sowing treatment of soil with overnight *L. plantarum* ONU 311 culture increased germination of seeds in 17,3%, surviving of plants – in 7% and mean height of seedlings – in 8%. Inoculation of soil with washed



cells and treatment of seedlings were non-effective. **Conclusion.** Bacteria of *L. plantarum* species could be studied as perspective microorganisms for improving germination of Scots pine seeds and protection of seedlings under the certain condition of soil treatment.

Key words: *Fusarium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pinus sylvestris* L., damping-off, antagonism.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білай В. І. Фузарии. – Киев: Наукова думка, 1977. – 442 с.
2. Максимчук Н. В. Інфекційні цикли розвитку збудників дитячої хвороби сіянців сосни звичайної та заходи захисту від них у тимчасових розсадниках Київського Полісся // Лісознавство, лісівництво, лісова наука і освіта. – 2004. – № 14. – С. 67–71.
3. Черкус Т. М. Результаты изучения эффективности некоторых протравителей для защиты сеянцев сосны от поражения возбудителями фузариоза // Научные ведомости БелГУ. Серия Естественные науки. – 2015. – № 15(32). – С. 53–60.
4. Юсипович Ю. М., Ковальова В. А., Гут Р. Т. Діагностика грибів роду *Fusarium* у сіянцях сосни звичайної методом полімеразної ланцюгової реакції // Наукові праці Лісівничої академії наук України. – 2015. – № 13. – С. 55–58.
5. Ahangar M. A., Dar G. H., Bhat Z. A., Sofi N. R. Fungi associated with root rot of *Pinus wallichiana* seedlings in Kashmir // Plant Pathology Journal. – 2011. – V. 10 (1). – P. 42–45.
6. Gordon T. R., Swett C. L., Wingfield M. J. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers // Crop protection. – 2015. – Vol. 73. – P. 28–39.
7. Hoda A. H., Yomna A. M., Shadia M. A.-A. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant // Life Science J. – 2011. – Vol. 8. – P. 462–468.
8. Hwang S. F., Chakravarty P., Chang K.-F. The effect of two ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Suillus tomentosus*, and of *Bacillus subtilis* on *Fusarium* damping-off in jack pine seedlings // Phytoprotection. – 1995. – Vol. 76, № 2. – P. 57–66.
9. James R. L., Gilligan C. J. Studies of *Fusarium* associated with containerized conifer seedling diseases: pathogenecity tests of isolates from Alpine nursery, Kalispell, Montana // Forest Pest Management. – 1984. – № 144. – P. 14–84.
10. Lazreg F., Belabid L., Sanchez J., Gallego E., Garrido-Cardenas J.A., Elhaitoum A. First report of *Fusarium redolens* as a causal agent of Aleppo pine damping-off in Algeria // Plant Disease. – 2013. – Vol. 97 (7). – P. 997.
11. Lori G. A., Salerno M. I. *Fusarium* species on seeds of *Pinus taeda* L. and *Pinus elliottii* Eugelm. in Argentine // Journal of Plant Diseases and Protection. – 2003. – Vol. 110 (5). – P. 437–443.
12. Okorski A., Oszako T., Nowakowska J. A., Pszolkowska A. The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of *Oomycetes* and *Fusarium* fungi // Forest Research Papers. – 2014. – Vol. 75 (3). – P. 301–321.



13. Omokhua G. E., Godwin-Egein M. I., Okereke V. C. Damping-off disease of two pulp and paper forest species (*Pinus caribae* Morelet and *Pinus oocarpa* Schiede) in the nursery // African Research Review. – 2009. – Vol. 3 (4). – P. 275–282.

14. Salerno M.I., Lori G., Morelli P. Effect of seedborn *Fusarium* on nursery diseases of *Pinus panderosa* Dougl. ex Laws in Argentina // XII World Forestry Congress (Quebec, Canada, 2003): Proc. <http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/WFC/XII/0588-B3.HTM>

References

1. Bilai VI. Fusarii. K.: Naukova dumka, 1977. 442 p. (in Russian).
2. Maksymchuk NV. Infekziini tsykly rozvitku zbudnykiv dytiachoi khvoroby siaintsiv sosny zvychainoi ta zahody zahystu vid hih u tymchasovykh rozsadnikah Kyivs'kogo Polissia. Lisoznavstvo, lisivnytstvo, lisova nauka i osvita. 2004. 14:67-71 (in Ukrainian).
3. Cherkis TM. Rezultaty izucheniia effektivnosti nekotorykh protravitelei dlia zaschity seianzev sosny ot porazheniia vzbuditeliami fusariosa. Nauchnie vedomosti BelGu. Serii Estestvennie nauki. 2015. 15(32):53-60 (in Russian).
4. Yusipovych YuM, Kovaliova VA, Gut RT. Diagnostyka grybiv rodu *Fusarium* u siaintsiah sosny zvychainoi metodom polimeraznoi lanzuigovoi reakzii. Naukovi pratsi Lisivnichoi akademii nauk Ukrainy. 2015. 13:55 - 58 (in Ukraine).
5. Ahangar MA, Dar GH, Bhat ZA, Sofi NR. Fungi associated with root rot of *Pinus wallichiana* seedlings in Kashmir. Plant Pathology Journal. 2011. 10: 42 - 45.
6. Gordon TR, Swett CL, Wingfield MJ. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. Crop protection. 2015. 73:28 - 39.
7. Hoda AH., Yomna AM., Shadia MA-A. In vivo efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. Life Science J. 2011. 8:462–468.
8. Hwang SF, Chakravarty P, Chang K-F. The effect of two ectomycorrhizal fungi, *Paxillus involutus* and *Suillus tomentosus*, and of *Bacillus subtilis* on *Fusarium* damping-off in jack pine seedlings. Phytoprotection. 1995. 76: 57 - 66.
9. James RL, Gilligan CJ. Studies of *Fusarium* associated with containerized conifer seedling diseases: pathogenecity tests of isolates from Alpine nursery, Kalispell, Montana. Forest Pest Management. 1984.144: 14 - 84.
10. Lazreg F, Belabid L, Sanchez J, Gallego E, Garrido-Cardenas JA, Elhaitoum A. First report of *Fusarium redolens* as a causal agent of Aleppo pine damping-off in Algeria. Plant Disease. 2013. 97 (7):997.
11. Lori GA, Salerno MI. *Fusarium* species on seeds of *Pinus taeda* L. and *Pinus elliottii* Eugelm. in Argentina. Journal of Plant Diseases and Protection. 2003. 110: 437 - 443.
12. Okorski A, Oszako T, Nowakowska JA, Pszolkowska A. The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of *Oomycetes* and *Fusarium* fungi. Forest Research Papers. 2014. 75: 301 - 321.
13. Omokhua GE, Godwin-Egein MI, Okereke VC. Damping-off disease of two pulp and paper forest species (*Pinus caribae* Morelet and *Pinus oocarpa*



Schiede) in the nursery. African Research Review. 2009. 3:275 - 282.

14. Salerno MI, Lori G, Morelli P. Effect of seedborn *Fusarium* on nursery diseases of *Pinus panderosa* Dougl. ex Laws in Argentina. XII World Forestry Congress (Quebec, Canada, 2003): Proc. <http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/WFC/XII/0588-B3.HTM>

Стаття надійшла до редакції 30.01.2018 р.



УДК 579.695+537.31+[547-386+546.72]

О. В. Тарабас, С. О. Гнатюш, А. А. Галушка, О. М. Мороз

Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Університетська 1, Львів, 79000, Україна, тел.: +38(032) 239 40 53,
e-mail: otarabas@gmail.com

ПІГМЕНТИ *RHODOPSEUDOMONAS YAVOROVII* IMB B-7620

Мета. Визначення спектрів пігментів фотосинтезу пурпурових несіркових бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620. **Методи.** Бактерії вирощували у рідкому модифікованому середовищі ATCC № 1449 і на триптонсоевому агарі за анаеробних чи аеробних умов. Розділення пігментів здійснювали з допомогою системи вискоефективної рідинної хроматографії. **Результати.** Фотосинтезувальні пурпурові несіркові бактерії *R. yavorovii* IMB B-7620 можуть рости як за анаеробних, так і за аеробних умов культивування. В екстрактах пігментів бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 з використанням вискоефективної рідинної хроматографії визначено три гомологічні форми бактеріохлорофілу *a*, які мали спектри поглинання за λ_{max} = 361, 605, 770 нм. У процесі розділення каротиноїдів ідентифікували лікопін (за λ_{max} = 446, 473, 504 нм) та ангідрородовібрин (за λ_{max} = 459, 485, 519 нм). **Висновки.** У процесі одностадійного розділення пігментних сумішей з використанням вискоефективної рідинної хроматографії показано, що клітини пурпурових несіркових бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 за анаеробних умов культивування містять бактеріохлорофіл *a*, лікопін та ангідрородовібрин.

Ключові слова: пурпурові несіркові бактерії, каротиноїди, бактеріохлорофіли.

Життя сьогодні існує завдяки процесу фотосинтезу. Перетворення енергії світла в енергію хімічних зв'язків здійснюють рослини та фотосинтезувальні прокариоти [10]. На відміну від рослин, деякі фотосинтезувальні бактерії не використовують воду як донор електронів у процесі фотосинтезу і не виділяють кисень. Аноксигенними фотосинтетиками є пурпурові несіркові бактерії (ПНСБ), пурпурові сіркові бактерії (ПСБ), зелені сіркові та несіркові бактерії. ПНСБ є метаболічно, таксономічно та морфологічно універсальною групою мікроорганізмів. Основними пігментами фотосинтезу цих бактерій є бактеріохлорофіл *a* або *b* і каротиноїди [1].

Штами ПНСБ були використані для очищення стічних вод, акваріумних вод, сільськогосподарських стоків. Також вони можуть продукувати водень, індол-3-оцтову кислоту і 5-амінолевулінову кислоту [14].

ПНСБ можуть використовувати у процесі життєдіяльності різні органічні речовини, що забезпечує їм відносно високу швидкість росту. ПНСБ очищують водойми від сірководню і, будучи компонентами трофічних ланцю-



гів екосистем, беруть участь у процесах колообігу сполук сульфуру [1].

Rhodopseudomonas yavorovii ІМВ В-7620, виділені нами з води озера Яворівське (Львівська область, Україна) [3], здатні використовувати сульфід- та тіосульфат-йони як донори електронів у процесі аноксигенного фотосинтезу [2]. Вода озера містить підвищені концентрації сполук сульфуру, у т. ч. і сірководню. Життєдіяльність фотосинтезувальних бактерій значною мірою визначає вміст цих сполук і забезпечує умови існування для інших організмів. Синтез різних пігментів фотосинтезу дозволяє їм заселяти відповідні екологічні ніші та існувати за впливу різних чинників [1].

Метою роботи було визначення спектрів пігментів фотосинтезу пурпурових несіркових бактерій *R. yavorovii* ІМВ В-7620.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували фототрофні пурпурові несіркові бактерії *Rhodopseudomonas yavorovii* ІМВ В-7620. Бактерії вирощували в рідкому модифікованому середовищі АТСС № 1449 у скляних ємностях об'ємом 250 мл за анаеробних умов. Як єдине джерело органічного карбону додавали 12 мМ CH_3COONa , а 1,4 мМ $\text{Na}_2\text{S}\times 9\text{H}_2\text{O}$ як донор електронів аноксигенного фотосинтезу [2]. Культивували 7 діб за температури $+27\text{--}30\text{ }^\circ\text{C}$ та умов постійного освітлення (200 лк). Як джерела освітлення використовували лампи розжарювання різної потужності. Інтенсивність освітлення вимірювали люксометром Ю116. Бактерії культивували на триптонсоєвому агарі (TSA) за аеробних умов.

Для отримання зразків пігментів клітини бактерій відокремлювали від культуральної рідини центрифугуванням (2600 г, центрифуга МОО11551) протягом 20 хв. Супернатант зливали, клітини ресуспендували в ацетоні та руйнували за $0\text{ }^\circ\text{C}$ на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН-2Т при 22 к Гц впродовж 5 хв. Отриману суспензію переносили в мікропробірки типу Епендорф об'ємом 2 мл та витримували її протягом 24 год за температури $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Після цього екстракти клітин центрифугували впродовж 10 хв при 1800 г. Екстракти пігментів отримали після фільтрування відомих об'ємів супернатанту крізь мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм. Усі маніпуляції виконували за кімнатної температури та без потрапляння прямого сонячного світла, щоб уникнути фотоокиснення пігментів.

Хроматографічне розділення пігментів здійснювали з допомогою системи вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що складалася з двох pomp VarianProStar 210 (Agilent Technologies, Сінгапур), хроматографічної колонки Pursuits 5 С18 (Agilent Technologies, Нідерланди), $250\times 4,6$ мм у модулі колонок Varian ProStar 500 (Agilent Technologies, Австралія), спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею VarianProStar 335 (Agilent Technologies, Австралія). Як рухоми фазу використовували два розчинники: розчинник А – суміш метанолу (Sigma-Aldrich, Франція) з 1 М розчином амоній ацетату (Fluka, Нідерланди) у воді, отриманій з допомогою системи очистки води Adrona Crystal E Bio з ультрафільтром Milipore (Adrona, Латвія), 70:30; розчинник Б – суміш метанолу з етилацетатом (Альфарус, Україна) та ацетонітрилом (Lab-Scan, Польща), 50:30:20. Хроматографічне розділення по-



чинали з 50% розчинника Б. Розділення продовжували в лінійному градієнті від 50 до 100% розчинника Б впродовж 40 хв, після чого витримували за 100% розчинника Б упродовж наступних 18 хв. Час зрівноваження становив 5 хв. Перед наступним введенням зразка систему витримували з 50% розчинника Б 10 хв. Потік розчинника був 0,5 мл/хв [5]. Зразок вводили в кількості 100 мкл. Хроматограми записували за довжин хвиль 474 нм (для каротиноїдів) та 770 нм (для бактеріохлорофілів). Температура колонки становила 35 °С. Визначення пігментів здійснювали за їхніми спектрами поглинання, записаними за допомогою спектрофотометричного детектора з фотодіодною матрицею згідно даних літератури [5, 1, 13, 9].

Результати та їх обговорення

Види роду *Rhodopseudomonas* – фотосинтезувальні пурпурові несіркові бактерії, широко розповсюджені у різноманітних природних середовищах, зокрема, у ґрунті й стічних водах [4]. Багато представників пурпурових несіркових бактерій росте у темряві за мікроаерофільних та аеробних умов, отримуючи енергію внаслідок аеробного дихання [10]. Дослідження здатності бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 рости аеробно за освітлення показали різницю у синтезі пігментів. На відміну від анаеробних умов росту, коли колонії мали рожево-червоне забарвлення, клітини бактерій були жовтуваті або безбарвні за аеробних умов. Припускаємо, що в досліджених бактерій кисень пригнічує синтез пігментів фотосинтезу [10].

Клітини, які виростили аеробно, знову висівали у модифіковане середовище АТСС № 1449 та вирощували за анаеробних умов та освітлення. Спостерігали появу рожево-червоного забарвлення на 7 добу культивування. Культура бактерій, вирощена за цих умов, мала рожево-червоне забарвлення. Утворення внутрішньоцитоплазматичних мембран, у яких локалізований фотосинтетичний апарат, відбувається за анаеробних умов та освітлення [10].

Багато видів ПНСБ, зокрема, *Rhodopseudomonas parapalustris*, *Rhodopseudomonas harwoodiae*, *Rhodopseudomonas pseudopalustris* і *Rhodopseudomonas palustris* [15] утворюють бактеріохлорофіл *a*. Окрім *R. yavorovii* IMB B-7620, бактеріохлорофіл *a* синтезують пурпурові сіркові бактерії *Thiocapsa litoralis*, *Thiocapsa roseopersicina*, *Thiocapsa pendens*, *Thiocapsa rosea*, *Thiocapsa marina* [7].

У зелених сіркових бактерій *Chlorobium limicola* [5] та *Chlorobium phaeobacteroides* [11] ідентифіковані по три гомологічні форми: Бхл *c1*, Бхл *c2*, Бхл *c3* та Бхл *e1*, Бхл *e2*, Бхл *e3*, відповідно. У зелених сіркових бактерій *Chlorobium thiosulfatophilum* ідентифіковані лише Бхл *d1* та Бхл *d2* (за λ_{\max} = 658, 427 нм) [11]. Спектральні властивості пігментів у клітині визначаються взаємодією молекул між собою, а також з ліпідами і білками фотосинтезувальних мембран [1]. Деякі ПНСБ *Thioflavococcus mobilis*, *Thiococcus pfennigii*, *Thioalkalicoccus limnaeus* синтезують бактеріохлорофіл *b*, що характеризується максимумом поглинання у суспензіях клітин *in vivo* за довжини хвилі 1025 нм [12]. Тому пурпурові бактерії можуть рости не тільки у видимій ділянці спектру, але й у ближній інфрачервоній. Цією властивістю користуються для отримання нагромаджувальних культур мікроорганізмів, особливо



тих, які синтезують бактеріохлорофіл *b* [1].

Екстракти пігментів бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 розділяли з використанням ВЕРХ. Було визначено три гомологічні форми бактеріохлорофілу *a* (Бхл *a1*, Бхл *a2*, Бхл *a3*) (рис. 1). Гомологи мали спектри поглинання за λ_{\max} = 361, 605, 770 нм. Кількість гомологів бактеріохлорофілу може бути різною і залежить від виду бактеріохлорофілу, а також таксономічної групи бактерій [5].

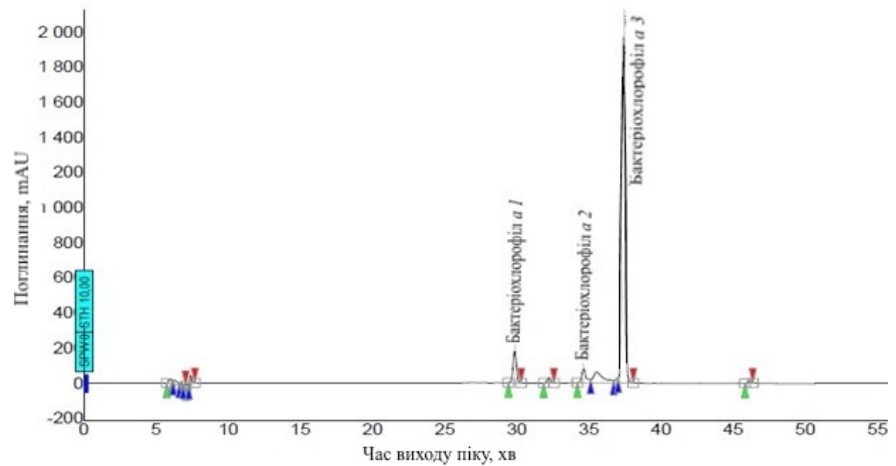


Рис. 1. Гомологічні форми бактеріохлорофілу *a* *R. yavorovii* IMB B-7620, виявлені з використанням ВЕРХ ($\lambda=770$ нм)

Fig. 1. Homologous forms of bacteriochlorophyll *a* of *R. yavorovii* IMB B-7620, determined with using of HPLC ($\lambda=770$ nm)

До складу фотосинтетичних одиниць фототрофних мікроорганізмів входять також каротиноїди. Вони не лише поглинають енергію світла та передають її через бактеріохлорофіли до реакційних центрів і систем транспортування електронів, але й виконують фотопротекторну функцію [10]. Вони є поліізопреноїдними сполуками. Їх поділяють на дві основні групи: каротини або вуглеводневі каротиноїди, які складаються з атомів карбону та водню; ксантофіли, які є окисгенованими вуглеводневими похідними, що містять принаймі одну окисгеновмісну функціональну групу, таку як гідроксил, кето-, епокси-, метокси-групи [6].

Максимуми поглинання каротиноїдів знаходяться у межах довжин хвиль 450–600 нм. Саме в цій ділянці спектру було зафіксовано відмінності у спектральних властивостях екстрактів пігментів бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620. Використовуючи ВЕРХ при розділенні каротиноїдів, вдалося ідентифікувати лікопін (за λ_{\max} = 446, 473, 504 нм) та ангідрородовібрин (за λ_{\max} = 459, 485, 519 нм) (рис. 2, 3). Спектральні властивості цих пігментів були близькими до описаних максимумів поглинання, але не ідентичними, ймовірно, через використання різних розчинників для екстракції. Численні інші неідентифіковані піки речовин, які ймовірно були пігментами, не вдалося ідентифікувати у досліджуваних зразках (рис. 2).



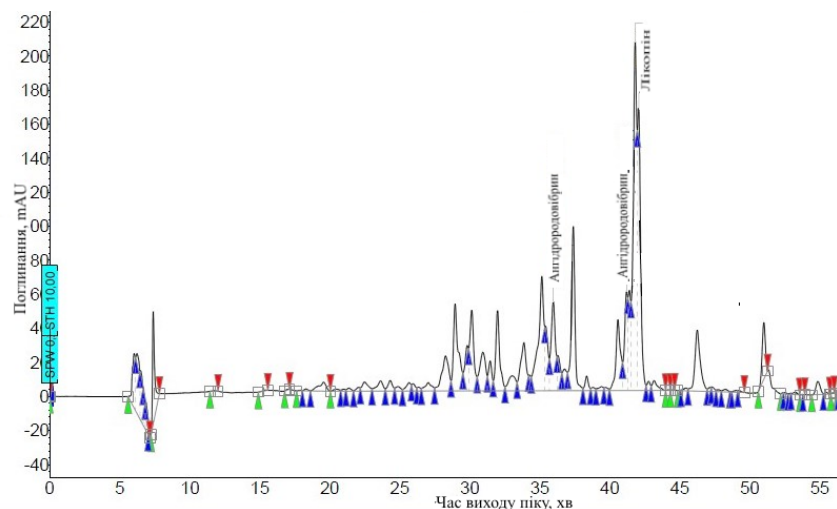


Рис. 2. Каротиноїди *R. yavorovii* IMB B-7620, визначені з використанням ВЕРХ ($\lambda=474$ нм)

Fig. 2. Carotenoids of *R. yavorovii* IMV B-7620, determined with using of HPLC ($\lambda=474$ nm)

Лікопін та ангідрородовібрин належать до каротиноїдів спірилоксантинового ряду. У пурпурових несіркових бактерій *Rhodospirillum rubrum* описано шлях біосинтезу лікопіну як проміжного каротиноїду та кінцевого спірилоксантину [8].

Можна припустити, що лікопін, синтезований клітинами бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620, є проміжним продуктом, оскільки пігменти були визначені у клітинах, які перебували у середині експоненційної фази росту.



Рис. 3. Спектри поглинання лікопіну та ангідрородовібрину пурпурових несіркових бактерій *R. yavorovii* IMB B-7620 в органічних розчинниках

Fig. 3. Absorption spectra of lycopene and anhydrorhodovibrin of purple non-sulfur bacteria *R. yavorovii* IMV B-7620 in organic solvents

Наявність ангідрородовідрину у клітинах бактерій також свідчить про те, що кінцевим синтезованим каротиноїдом може бути спірілоксантин. Завдяки лікопіну клітини *R. yavorovii* IMB B-7620 мають червоне забарвлення.

Отже, за спектрами поглинання пігментів та з використанням даних літератури встановили, що клітини *R. yavorovii* IMB B-7620 за анаеробних умов містять бактеріохлорофіл *a*, лікопін та ангідрородовібрин.

O. V. Tarabas, S. O. Hnatush, A. A. Halushka, O. M. Moroz

Ivan Franko National University of Lviv,
1, Universytetska Str., Lviv, 79000, Ukraine; tel.: (032) 239 40 53,
e-mail: otarabas@gmail.com

PIGMENTS OF *RHODOPSEUDOMONAS YAVOROVII* IMV B-7620

Summary

Aim. Determination of spectra of photosynthetic pigments of the purple non-sulfur bacteria *R. yavorovii* IMV B-7620. **Methods.** Bacteria were grown in liquid modified medium of ATCC No. 1449 and tryptic soy agar under anaerobic or aerobic conditions, respectively. Separation of pigments was conducted by using the system of high-performance liquid chromatography. **Results.** The photosynthetic purple non-sulfur bacteria *R. yavorovii* IMV B-7620 can grow both under anaerobic and aerobic conditions of cultivation. In extracts of bacteria *R. yavorovii* IMV B-7620 pigments with the use of high-performance liquid chromatography three homologous forms of bacteriochlorophyll *a* were determined which had absorption spectra at λ_{max} = 361, 605, 770 nm. In the process of separating carotenoids, lycopene (at λ_{max} = 446, 473, 504 nm) and anhydrorhodovibrin (at λ_{max} = 459, 485, 519 nm) were identified. **Conclusions.** In the process of one-step separation of pigment mixtures with the use of high-performance liquid chromatography, it has been shown that cells of purple non-sulfur bacteria *R. yavorovii* IMV B-7620 under anaerobic conditions of cultivation contain bacteriochlorophyll *a*, lycopene and anhydrorhodovibrin.

Key words: purple non-sulfur bacteria, carotenoids, bacteriochlorophylls.

O. В. Тарабас, С. А. Гнатуш, А. А. Галушка, О. М. Мороз

Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Университетская, 1, Львов, 79000, Украина; тел.: (032) 239 40 53,
e-mail: otarabas@gmail.com

ПИГМЕНТЫ *RHODOPSEUDOMONAS YAVOROVII* ИМВ В-7620

Реферат

Цель. Определение спектров пигментов фотосинтеза пурпурных несерных бактерий *R. yavorovii* ИМВ В-7620. **Методы.** Бактерии выращивали в жидкой модифицированной среде АТСС № 1449 и на триптонсоевом агаре



в анаэробных или аэробных условиях. Разделение пигментов осуществляли с помощью системы высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. Фотосинтезирующие пурпурные несерные бактерии *R. yavorovii* IMB B-7620 могут расти как в анаэробных, так и в аэробных условиях культивирования. В экстрактах пигментов бактерий *R. yavorovii* IMB B-7620 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии определены три гомологические формы бактериохлорофилла *a*, которые имели спектры поглощения при λ_{max} = 361, 605, 770 нм. В процессе разделения каротиноидов идентифицировали ликопин (при λ_{max} = 446, 473, 504 нм) и ангидрородовибрин (при λ_{max} = 459, 485, 519 нм). **Выводы.** В процессе одностадийного разделения пигментных смесей с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии показано, что клетки пурпурных несерных бактерий *R. yavorovii* IMB B-7620 в анаэробных условиях культивирования содержат бактериохлорофилл *a*, ликопин и ангидрородовибрин.

Ключевые слова: пурпурные несерные бактерии, каротиноиды, бактериохлорофиллы.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кондратьева Е. Н., Максимова И. В., Самуилов В. Д. Фототрофные микроорганизмы. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1989. – 374 с.
2. Тарабас О. В., Гнатуш С. О., Мороз О. М., Василечко В. О., Гришук Г. В., Звір Г. І., Комплікевич С. Я. Використання сульфід- та тіосульфат-йонів пурпуровими несірковими бактеріями *Rhodopseudomonas yavorovii* // Biosystems Diversity. – 2017. – 25, № 3 – С. 181–185.
3. Тарабас О., Гнатуш С., Остап Б., Мутенко Г., Кошля О. Ідентифікація пурпурових несіркових бактерій *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016 // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2017. – 75. – С. 140–145.
4. Bent S. J., Gucker C. L., Oda Y., Forney L. J. Spatial distribution of *Rhodopseudomonas palustris* ecotypes on a local scale // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – 69. – P. 7–5192.
5. Borrego C. M., Garcia-Gil L. J. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLS // Photosynth. Research. – 1994. – 41. – P. 157–163.
6. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function // The FASEB Journ. – 1995. – 9, № 15. – P. 1551–1558.
7. Caumette P., Guyoneaud R., Imhoff J. F., Suling J., Gorlenko V. *Thiocapsa marina* sp. nov., a novel, okenone-containing purple sulfur bacterium isolated from brackish coastal and marine environments // Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol. – 2004. – 54. – P. 1031–1036.
8. Davies B.H. A novel sequence for phytoene dehydrogenation in *Rhodospirillum rubrum* // Biochem. J. – 1970. – 116. – P. 93–99.
9. Frigaard N.-U., Larsen K.L., Cox R.P. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs // FEMS Microbiol. Ecol. – 1996. – 20. – P. 69–77.
10. Hu X., Ritz T., Damjanovic A., Autenrieth F., Schulten K. Photosynthetic apparatus of purple bacteria // Quarterly Rev. Biophys. – 2002. – 35, № 1. – P. 1–62.



11. Hurley J. P., Watras C.J. Identification of bacteriochlorophylls in lakes via reverse-phase HPLC // *Limnol. Oceanogr.* –1991. – 36, № 2. – P. 307–315.
12. Imhoff J. F., Pfennig N. *Thioflavicoccus mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll *b* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – 51. – P. 105–110.
13. Nelis H. J., De-Leenheer A.P. Profiling and quantitation of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – 55, № 12. – P. 3065–3071.
14. Rajani B., Sunil Kumar R., Uma Devi M., Nayak J.B. Role of purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* RSOU000 and *Rhodopseudomonas thermotolerance* RSOU555 in waste water treatment // *World J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sci.* – 2016. – 5, № 8. – P. 1379–1387.
15. Ramana V. V., Chakravarthy S. K., Raj P. S., Kumar B. V., Shobha E., Ramaprasad E.V.V., Sasikala Ch., Ramana Ch.V. Descriptions of *Rhodopseudomonas parapalustris* sp. nov., *Rhodopseudomonas harwoodiae* sp. nov. and *Rhodopseudomonas pseudopalustris* sp. nov., and emended description of *Rhodopseudomonas palustris* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2012. – 62. – P. 1790–1798.

References

1. Kondratieva EN, Maksimova IV, Samuilov VD. Phototrophic microorganisms. Moscow: Moscow University Publishing House, 1989. 374 p (in Russian).
2. Tarabas OV, Hnatush SO, Moroz OM, Vasylechko VO, Gryshchouk GV, Zvir GI, Komplikevych SYa. The usage of sulfide and thiosulfate ions by purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas yavorovii*. *Biosystems Diversity.* 2017; 25(3):181–185 (in Ukrainian).
3. Tarabas O, Hnatush S, Ostash B, Mutenko G, Koshla O. Identification of purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas* sp. Ya-2016. *Visnyk Lviv. Univ. Ser. Biol.* 2017; (75):140–145 (in Ukrainian).
4. Bent SJ, Gucker CL, Oda Y, Forney LJ. Spatial distribution of *Rhodopseudomonas palustris* ecotypes on a local scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; (69):7–5192.
5. Borrego CM, Garcia-Gil LJ. Separation of bacteriochlorophyll homologues from green photosynthetic sulfur bacteria by reversed-phase HPLS. *Photosynthesis Research.* 1994; (41):157–163.
6. Caumette P, Guyoneaud R, Imhoff JF, Suling J, Gorlenko V. *Thiocapsa marina* sp. nov., a novel, okenone-containing purple sulfur bacterium isolated from brackish coastal and marine environments. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 2004; (54):1031–1036.
7. Davies BH. A novel sequence for phytoene dehydrogenation in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* 1970; (116):93–99.
8. Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journ.* 1995; 9(15):1551–1558.
9. Frigaard NU, Larsen KL, Cox RP. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs. *FEMS Microbiol.*



Ecol. 1996; (20):69–77.

10. Hu X, Ritz T, Damjanovic A, Autenrieth F, Schulten K. Photosynthetic apparatus of purple bacteria. Quarterly Rev. Biophys. 2002; 35(1):1–62.

11. Hurley JP, Watras CJ. Identification of bacteriochlorophylls in lakes via reverse-phase HPLC. Limnol. Oceanogr. 1991; 36(2):307–315.

12. Imhoff JF, Pfennig N. *Thioflavococcus mobilis* gen. nov., sp. nov., a novel purple sulfur bacterium with bacteriochlorophyll *b*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001; (51):105–110.

13. Nelis HJ, De-Leenheer AP. Profiling and quantitation of bacterial carotenoids by liquid chromatography and photodiode array detection. Appl. Environ. Microbiol. 1989; 55(12):3065–3071.

14. Rajani B, Sunil Kumar R, Uma Devi M, Nayak JB. Role of purple non-sulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* RSOU000 and *Rhodopseudomonas thermotolerance* RSOU555 in waste water treatment. World J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sci. 2016; 5(8):1379–1387.

15. Ramana VV, Chakravarthy SK, Raj PS, Kumar BV, Shobha E, Ramaprasad EVV, Sasikala Ch, Ramana ChV. Descriptions of *Rhodopseudomonas parapalustris* sp. nov., *Rhodopseudomonas harwoodiae* sp. nov. and *Rhodopseudomonas pseudopalustris* sp. nov., and emended description of *Rhodopseudomonas palustris*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2012; (62):1790–1798.

Стаття надійшла до редакції 23.01.2018 р.



УДК 60:- 634.8: -579.64

Н. І. Теслюк

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, тел.:+38(0482) 68 79 64, e-mail: natalana@onu.edu.ua

УТВОРЕННЯ МНОЖИННИХ ПАГОНІВ ВІНОГРАДУ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* НА РІЗНИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Зазвичай розвиток множинних пагонів винограду *in vitro* індукують тільки на твердих або рідких живильних середовищах. **Мета.** Дослідити вплив концентрації агару в різних живильних середовищах, їх консистенції на показники приживлюваності, росту та розвитку ініціальних експлантів, індукцію множинних пагонів винограду. **Методи.** Використовували методи введення ініціальних експлантів в культуру *in vitro* і культивування мікроклонів, а також метод регенерації рослин із меристемних тканин. Дослідні живильні середовища готували рідкими (без вмісту агару), напіврідкими (4 г/л агару) та твердими (8 г/л агару) і додавали до усіх експериментальних середовищ один мг/л 6-БАП. В ході досліджень проводили облік приживлюваності експлантів, початку проліферації бруньок та кількості утворених пагонів. **Результати.** Виявлена перевага використання напіврідких середовищ порівняно із твердими та рідкими живильними середовищами. Успішно проведено пошук оптимального живильного середовища для індукції множинних пагонів винограду в культурі *in vitro*. Встановлено, що напіврідке модифіковане середовище МС сприяє кращій приживлюваності, диференціації та регенерації меристем винограду. В середньому по сортах на ньому утворювалося 9,59 пагонів від одного експланту, що в подальшому підвищувало коефіцієнт розмноження винограду в культурі *in vitro* до 1:9. **Висновки.** Застосування удосконаленого методу індукції множинних пагонів сприяло кращій приживлюваності ініціальних експлантів технічних сортів винограду в культурі *in vitro*, прискорювало процеси проліферації пазушних мікро-бруньок, та процеси утворення більшої кількості пагонів, що були придатними для подальшого клонального мікророзмноження.

Ключові слова: культура винограду *in vitro*, ініціальні експланти, множинні пагони, мікроклони, живильні середовища.

З метою збільшення коефіцієнту розмноження, а, отже, і підвищення ефективності клонального мікророзмноження, доцільно використовувати метод індукції множинних пагонів винограду на штучних живильних середовищах. Незважаючи на результативність методу, робіт з індукції множинних пагонів винограду відомо мало.

На розвиток множинних пагонів впливає склад живильного середовища та вибір і концентрації фітогормонів. З аналізу літератури, а також наших попередніх досліджень [3] було зроблено висновок про те, що для успішної

© Н. І. Теслюк, 2018



індукції множинних пагонів більшості сортів винограду достатньо 1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП).

Індукуючи множинні пагони, дослідники використовують як тверді, так і рідкі середовища. Так, Дорошенко Н. П. [1] етап введення в культуру *in vitro* розподіляє на два підетапи: культивування виділених меристем здійснювали спочатку на твердих середовищах, а потім – на рідких. Рідкі середовища в своїй роботі використовували багато авторів [2, 5, 8]. За їхніми спостереженнями, рідкі середовища мають певні переваги перед агаризованими, оскільки в них забезпечується велика рухливість поживних речовин [2, 5]. Нye-Jeong Park із співавторами [6] індукували утворення множинних пагонів на твердих середовищах МС та Ніча і Ніч із цитокінінами, а Nadra Khan із співавторами [7] використовували як рідкі так і напіврідкі середовища для клонального мікророзмноження винограду (*Vitis vinifera* L.) cv. Кінгс Рубін.

Отже, немає єдиної думки щодо оптимальної консистенції живильних середовищ для індукції множинних пагонів при клональному мікророзмноженні винограду *in vitro*. Пошук та вирішення проблеми оптимальної консистенції середовища залишається актуальним. В цьому напрямку нами запропоновано використовувати напіврідкі живильні середовища для розмноження винограду *in vitro* методом індукції множинних пагонів [3, 4].

Сорти винограду по-різному проявляють себе в культурі *in vitro* і тому для успішної реалізації технологічних процесів прискореного розмноження винограду різних сортів важливо підбирати склад живильного середовища з урахуванням сортової специфіки винограду, використовувати універсальні живильні середовища та методичні прийоми культивування.

Метою нашої роботи був вибір оптимального живильного середовища на первинних етапах індукції множинних пагонів технічних сортів винограду *in vitro*.

Матеріали та методи

Вихідний матеріал відбирали з кущів - донорів, які ростуть на клоно-дослідній та селекційній ділянках ННЦ "Інститут Виноградарства і Виноробства імені В.Є. Таїрова", а також в теплицях Центру клонової та фітосанітарної селекції і які були тестовані на відсутність вірусної та бактеріальної інфекції. Дослідження проводили спільно з співробітниками групи культури тканин відділу розсадництва та розмноження винограду ННЦ "ІВіВ імені В.Є. Таїрова" на дослідних сортах Каберне Совіньйон, Марсельський чорний ранній, Шардоне, Трамінер рожевий.

В своїй роботі використовували меристемні верхівки з листовими зародками розміром 1,5–2,5 мм, що в подальшому дало добре збільшення експланту та розвиток множинних пагонів. Меристемні верхівки виділяли під бінокулярною лупою в ламінарному боксі в стерильних умовах. В даній роботі до усіх експериментальних середовищ додавали один мг/л 6-БАП.

З метою оптимізації складу живильного середовища для утворення множинних пагонів досліджували різні варіанти середовищ:

- Мурасіге та Скуга (МС);
- МС модифікований нами щодо кількісного і якісного складу вітамінів,



сахарози та фітогормонів [3,4];

– Ніча і Ніч; та Гамборга.

Перелічені середовища готували рідкими (без вмісту агару), напіврідкими (4г/л агару) та твердими (8г/л агару). За контроль слугували тверді живильні середовища. Ініціальні експланти висаджували в окремі культуральні стакани з експериментальними варіантами середовища. Стакани з рідкими середовищами закріплювали на струшувальному апараті. Напіврідке середовище є напівпрозорим та киселеподібним. Експлант знаходився в ньому в напівзануреному плавальному положенні. На твердому живильному середовищі експлант знаходився на поверхні середовища. Культивування на твердих та напіврідких середовищах проводили без струшування. Культивування експлантів проводили в культуральному боксі при $t = 23-26\text{ }^{\circ}\text{C}$, перший тиждень при освітленні 80–1000 люкс., а потім при 2000–3000 люкс., при 16-годинному фотоперіоді.

Під час культивування проводили спостереження за станом ініціальних експлантів, проводячи облік приживлюваності, проліферації та кількості утворених пагонів. Далі утворені агрегати пагонів розділяли на окремі пагони, і ці пагони пересаджували на середовище для укорінення з метою подальшого розмноження. Для цього використовували середовище $\frac{1}{2}\text{MS}$ з додаванням 0,1–0,3 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК), 8 г/л агару та рН 5,2. Розраховували коефіцієнт розмноження, враховуючи кількість утворених пагонів від одного ініціального експланту за однаковий проміжок часу [4]. Результати обробляли методом дисперсійного аналізу із використанням комп'ютерних статистичних програм *Excel*. Дисперсійний аналіз проводили окремо за кожним досліджуваним показником.

Результати досліджень та їх обговорення

Приживлюваність ініціальних експлантів винограду. В результаті досліджень встановлено, що на показники приживлюваності меристемних верхівок при введенні в культуру *in vitro* впливає тип, склад живильного середовища, а також його консистенція. При розгляді впливу складу живильного середовища встановлено, що всі типи живильного середовища Гамборга є малопридатними для введення апікальних меристем винограду. На них було відмічено низький відсоток приживлюваності експлантів в межах 15,0–36,7%.

На середовищах Ніча і Ніч приживлюваність ініціальних експлантів була вищою порівняно із середовищами Гамборга, хоча і не перевищувала 60% в кращому варіанті (сорт Каберне Совіньйон 441, середовище Ніча і Ніч напіврідке). Досить часто ініціальні експланти набували коричневого кольору, середовища темніли. Приживлюваність коливалася в межах 28,3–60,0%, що співпадає із нашими попередніми дослідженнями [3, 4] та думкою Hye-Jeong Park із співавторами [6].

Хороші результати були отримані на усіх типах середовищ MS. При порівнянні стандартного середовища MS та MS модифікованого, кращим по приживлюваності ініціальних експлантів виявилось модифіковане середовище MS. Показники приживлюваності експлантів на всіх типах модифіковано-



го середовища МС були значно вищими, ніж на стандартному середовищі МС.

Надалі вивчали вплив консистенції живильних середовищ на приживлюваність меристемних верхівок в культурі винограду *in vitro*. Виявлено залежність приживлюваності експлантів від консистенції живильного середовища. Встановлено, що на всіх типах твердих живильних середовищ приживлюваність експлантів була низькою, значно меншою ніж на рідких та напіврідких середовищах. Досить високий відсоток приживлюваності ініціальних експлантів було відмічено на всіх типах рідких середовищ.

Найкращі результати були отримані на всіх типах напіврідких середовищ. Особливо виділялося культивування на напіврідких середовищах МС і МС модифікованому. Але найкраща приживлюваність експлантів була на напіврідкому модифікованому середовищі МС. Так, середнє значення показника приживлюваності всіх дослідних сортів складало на модифікованому середовищі МС рідкому – $75,4 \pm 2,5\%$, напіврідкому – $87,1 \pm 3,9\%$, а на стандартному середовищі МС рідкому – $62,5 \pm 4,2\%$, напіврідкому – $73,3 \pm 3,4\%$.

Залежність приживлюваності ініціальних експлантів від консистенції середовища спостерігалася у всіх дослідних сортів. Наприклад, у сорту Трамінер рожевий на твердому модифікованому середовищі МС приживлюваність складала $51,7 \pm 9,5\%$, на рідкому – $73,3 \pm 3,6\%$, а на напіврідкому – $81,7 \pm 3,6\%$; у сорту Каберне Совіньйон відповідно на твердому – $56,7 \pm 18,9\%$, рідкому – $76,7 \pm 6,1\%$, напіврідкому – $95,0 \pm 12,4\%$.

Проліферація. В результаті досліджень вперше виявлено позитивний вплив напіврідких живильних середовищ на процеси проліферації винограду при індукції множинних пагонів в культурі *in vitro*. Як показали дослідження, проліферація бруньок, утворення пагонів у всіх дослідних технічних сортів винограду на твердих середовищах починалися на 8–10 день, на рідких – 6–7 день, а на напіврідких – 6 день. Така тенденція зберігалася у всіх варіантах досліду. В середньому за всіма показниками застосування напіврідких середовищ сприяло прискоренню процесів проліферації порівняно з рідкими середовищами на один день, а порівняно з твердими живильними середовищами – на два дні.

Для представлених технічних сортів винограду кращим живильним середовищем було напіврідке середовище МС модифіковане. При цьому слід враховувати вплив генотипу сорту – сортову специфічність в культурі *in vitro*. Найбільш активно проліферація ініціальних експлантів відбувалася у клонів сортів винограду Каберне Совіньйон 441 та Шардоне 4876.

Утворення множинних пагонів. Через 30–40 днів культивування від кожного ініціального експланту утворювалися пагони. Виявлено, що кількість утворених пагонів, які були придатними до подальшого клонального мікропомноження, залежала від типу живильного середовища. На різних живильних середовищах було одержано від 1 до 10 та більше пагонів від введеного в культуру *in vitro* ініціального експланту (Табл.).

На всіх типах середовища Гамборга утворення пагонів було мінімальним. У сортів Марсельський чорний ранній 1294, Трамінер рожевий 832, Шардоне 4876 на твердому середовищі Гамборга пагони взагалі не утворювалися.



Таблиця
Кількість пагонів, що утворилися на різних живильних середовищах (шт)
Table
Amount of the formed shoots on different nourishing media (number)

Тип живильного середовища	Марсельський чорний ранній 1294	Трамінер рожевий 832	Каберне Совіньйон 441	Шардоне 4876	Середнє по сортах
МС тв.	1,00±0,00	1,00±0,00	1,20±0,43	1,00±0,00	1,05±0,98
МС р.	6,50±3,72	4,73±1,03	5,90±1,63	3,90±1,14	5,26±4,42
МС н/р.	7,83±4,27	6,60±0,74	7,33±3,53	5,63±0,80	6,85±6,01
МС мод. тв.	1,27±1,15	1,00±0,00	1,43±0,57	1,00±0,00	1,18±0,99
МС мод. р.	8,73±2,88	7,10±1,61	7,50±3,28	6,03±1,12	7,34±6,46
МС мод. н/р.	10,60±3,02	9,20±1,31	11,00±2,48	8,17±1,12	9,74±8,83
Ніча і Ніч тв.	1,00±0,00	1,00±0,72	0,94±0,24	0,87±0,29	0,94±0,66
Ніча і Ніч р.	4,83±0,52	3,77±1,49	4,30±2,80	2,97±0,14	3,97±3,33
Ніча і Ніч н/р.	5,37±1,00	4,33±1,29	6,30±2,69	3,43±1,00	4,86±4,02
Гамборга тв.	0	0	0,85±0,33	0	0,85±0,52
Гамборга р.	2,55±1,93	2,10±1,31	2,50±1,24	1,27±1,15	2,06±1,44
Гамборга н/р.	2,93±2,31	2,65±0,51	3,87±1,00	1,83±1,83	2,82±2,22

На рідкому та напіврідкому середовищі цього типу кількість пагонів, що утворилися, була мінімальною – в середньому по сортах 2,06±1,44 пагонів і 2,82±2,22 пагонів, відповідно. Таким чином було зроблено висновок про нецільність використання середовища Гамборга для індукування множинних пагонів винограду.

На живильних середовищах Ніча і Ніч ріст експлантів та утворення пагонів були повільними. На твердому агаровому середовищі утворювалися поодинокі пагони і в середньому по сортах було одержано 0,94±0,66 пагонів із одного експланту. У варіантах із рідким та напіврідким живильним середовищем кількість пагонів, що утворилися, збільшувалася і коливалася в межах 2,97–6,30 пагонів. В середньому по сортах на рідкому середовищі отримували 3,97±3,33 пагонів, а на напіврідкому – 4,86±4,02 пагонів. У варіантах із рідким та напіврідким середовищами досить часто зустрічалося надмірне потовщення пагону та збільшені крихкі листочки.

Хороші результати були отримані на усіх типах середовища МС стандартного та модифікованого. На середовищах МС стандартному іноді спостерігали прояви вітрифікації, а також утворення калюса біля основи агрегатів множинних пагонів. Таке утворення калюса, як правило, гальмувало процеси утворення множинних пагонів. Найкращим для індукції множинних пагонів всіх сортів винограду, що вивчалися, виявилось модифіковане середовище МС.

Найбільш високі показники індукції множинних пагонів були відмічені на напіврідкому середовищі МС модифікованому і складала 8–11 пагонів із одного експланту за 30–40 днів культивування (Рис.). Можливо, зниження кон-



центрації сахарози до 15 г/л в модифікованому середовищі МС зменшувало ймовірність утворення калюса, збалансований вітамінний склад та напіврідка консистенція середовища дозволили досягти кращої приживлюваності та утворення множинних пагонів.



Рис. Утворення множинних пагонів винограду сорту Шардоне 4876 на напіврідкому середовищі МС модифікованому

Fig. Formation of the multiple grape shoots of Shardone 4876 cultivar on semi-liquid modified medium MC

Зменшення концентрації агару в середовищі було сприятливим для збільшення кількості пагонів. Рідка консистенція середовища позитивно впливала на аерацію експлантів та засвоєння ними живильних речовин.

В результаті досліджень було виявлено, що на твердих агарових середовищах із одного експланту, як правило, утворювався один пагін. Наприклад, у сорту Марсельський чорний ранній 1294 на твердому модифікованому середовищі МС середня кількість пагонів складала – $1,33 \pm 0,21$ пагонів, на рідкому – $8,73 \pm 0,88$, а на напіврідкому – $10,66 \pm 0,92$ пагонів ($P < 95\%$).

При використанні рідких середовищ (без вмісту агару) експлант занурювався на дно культуральної склянки, і у процесі культивування було необхідним безперервне струшування на качалці. При культивуванні ініціалі на напіврідких живильних середовищах (4 г/л агару) апікальні верхівки занурювалися у середовище не повністю, зависаючи у ньому. Це забезпечувало хороший контакт експланта із середовищем, запобігало його закисанню, що дозволяло проводити культивування без застосування струшування. На твердих середовищах (8г/л агару) ініціальні експланти малого розміру (1,5–2,5 мм) розміщувалися на поверхні живильного середовища і через відсутність повного контакту із середовищем частина меристемних верхівок на 2–3 день від введення у культуру *in vitro* темніла та всихала.

Найбільш інтенсивне утворення множинних пагонів відбувалося на напіврідких живильних середовищах (Рис.). Встановлено, що для максимального збільшення кількості множинних пагонів дослідних технічних сортів

та клонів винограду найкращим було напіврідке живильне середовище МС модифіковане. В середньому по сортах на ньому утворювалося 9,59 пагонів, що в подальшому збільшувало коефіцієнт розмноження цих сортів майже у 2 рази.

На напіврідкому середовищі МС модифікованому, на відміну від інших середовищ, утворювалися великі агрегати множинних пагонів кулеподібної форми. Активно відбувалася проліферація із багаточисельних пазушних мікро-бруньок. Як правило, через 40–60 днів експланти являли собою агрегати бруньок та пагонів в середньому площею 6 см².

У подальшому агрегати множинних пагонів, що утворилися, розділяли на окремі пагони. Пагони довжиною 7 мм і більше висаджували для подальшого культивування на тверде агарове середовище ½МС із 0,2–0,3 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК) та рН 5,7. Довгі пагони розділяли на одновічкові вузли. Базальну частину агрегату бруньок та пагонів, які залишалися після розділення, культивували на свіжих живильних середовищах такого ж складу, що і попередній для додаткового утворення пагонів. Таким чином, на першому етапі клонального мікророзмноження можливо збільшити кількість мікроклонів, одержаних від однієї висадженої апікальної верхівки в 7–8 разів.

Застосування розробленого методу індукції множинних пагонів сприяє підвищенню коефіцієнту розмноження винограду в культурі *in vitro* [6]. При клональному мікророзмноженні *in vitro* одновічковими мікрочубуками на твердому агаровому середовищі коефіцієнт розмноження в середньому становив 1:5 через місяць культивування, а при використанні методу індукції множинних пагонів на напіврідкому живильному середовищі МС модифікованому цей показник в середньому становив 1:9 для технічних сортів винограду.

У результаті досліджень виявлена перевага використання напіврідких середовищ порівняно із твердими та рідкими живильними середовищами. Встановлено оптимальне живильне середовище – напіврідке модифіковане середовище МС, яке сприяло кращій приживлюваності, диференціації та регенерації меристем. На цьому середовищі утворювалася більша кількість пагонів, що були придатними для подальшого клонального мікророзмноження.

Розроблене середовище було випробувано та впроваджено в Центрі клонової селекції, відділі розмноження та розсадництва ННЦ “ІВіВ імені В.С. Таїрова”. Впровадження удосконаленого методу індукції множинних пагонів сприяло підвищенню коефіцієнту розмноження винограду в культурі *in vitro* до 1:9, що в подальшому зменшувало собівартість мікроклону винограду на первинних етапах клонального мікророзмноження.



Н. И. Теслюк

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

ОБРАЗОВАНИЕ МНОЖЕСТВЕННЫХ ПОБЕГОВ ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Реферат

Для индукции множественных побегов винограда *in vitro* использовались полужидкие питательные среды. **Цель.** Изучить влияние концентрации агара в различных питательных средах, их консистенции на показатели приживаемости, роста и развития инициальных эксплантов, индукцию множественных побегов винограда. **Методы.** Использовали методы введения инициальных эксплантов в культуру *in vitro* и культивирования микроклонов, а также метод регенерации растений из меристемных тканей. Питательные среды готовили жидкими (без содержания агара), полужидкими (4 г/л агара) и твердыми (8 г/л агара) с добавлением ко всем экспериментальным средам 1 мг/л 6-БАП. Проводили учет приживаемости эксплантов, начала пролиферации пазушных почек и количества полученных побегов. **Результаты.** Использовали полужидкие питательные среды (4 г/л агара). Установили преимущество использования полужидких сред в сравнении с твердыми и жидкими питательными средами. Успешно проведен поиск оптимальной питательной среды для индукции множественных побегов винограда в культуре *in vitro*. Выявлена оптимальная питательная среда – МС модифицированная полужидкая. Ее использование способствовало лучшей приживаемости, дифференциации и регенерации меристем винограда. В среднем по сортам на ней образовывалось 9,59 шт., побегов от одного экспланта, что в дальнейшем повышало коэффициент размножения винограда в культуре *in vitro* до 1:9. **Выводы.** Использование усовершенствованного метода индукции множественных побегов способствовало лучшей приживаемости инициальных эксплантов технических сортов винограда в культуре *in vitro*, ускоряло процессы пролиферации пазушных микро-почек, и процессы образования большего количества побегов, которые пригодны для дальнейшего клонального микроразмножения.

Ключевые слова: культура *in vitro*, инициальные экспланты, множественные побеги, микроклоны, питательные среды.



N. I. Teslyuk

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38(0482) 68 79 64, e-mail: natalana@onu.edu.ua

FORMATION OF THE MULTIPLE GRAPE SHOOTS IN CULTURE *IN VITRO* ON DIFFERENT NOURISHING MEDIA

Summary

Semi-liquid nutrient media were used for the multiple grape shoots induction. Aim of the research was to study the agar concentration effect in different nutrient media and define influence of the media consistency on the survivability parameters, growth and development of initial explants, and the multiple grape shoots induction. Methods. Initiation of culture *in vitro* formation from explants, microclones cultivation, and the method of the meristematic plant regeneration were used. Nutrient media were liquid (without agar as a component), semi-liquid (with agar content of 4 g/l), and solid (with agar content of 8 g/l), including an addition of 1 mg/l 6-BAP to all experimental media. The registration of the explants' survivability, time of the beginning of axillary buds proliferation, and amount of obtained shoots was conducted. **Results.** Semi-liquid nutrient media were used. The advantage of using semi-liquid media in comparison with solid and liquid nutrient media is revealed. The search of the optimal nutrient medium for multiple grape shoots induction *in vitro* was successfully done. Modified semi-liquid MS was determined as the optimal nutrient media. Its application contributed to better survivability, differentiation, and regeneration of grape meristems. On average in sortes, it formed 9.59 pcs., shoots, which further increases the coefficient of grape multiplication in culture *in vitro* to 1: 9. **Conclusions.** The application of the improved method of induction of multiple shoots contributed to a better survivability of the initial explants of grapes of technical varieties in culture *in vitro*, accelerates the processes of proliferation of the axillary microbuds, and the processes of generating more shoots suitable for subsequent clonal micropropagation.

Key words: culture *in vitro*, initial explants, clonal micropropagation, microclones, nourishing medium.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дорошенко Н. П. Результаты исследований по биотехнологии винограда // Юбилейна научна сесия «100 години институту по лозарство и винарство». (Плевен, 2002). – С. 88–95.
2. Зленко В. А., Трошин Л. П., Котиков И. В. Размножение винограда методами *in vitro*. Часть 1. Культивирование верхушек побегов и пролиферация аксиллярных почек винограда *in vitro*. – Виноград и вино России. – 1998. – № 2. – С. 22–25.
3. Стущько С. А., Глотова Л. В., Теслюк Н. І. Індукція множинних пагонів при розмноженні винограду *in vitro* // Вісник аграрної науки. – 2004. – № 4. – С. 25–27.



4. Теслюк Н. І., Кічмаренко О. Д. Оптимізація процесу індукції множинних пагонів винограду в культурі *in vitro* // Виноградарство і виноробство. - 2006. – Вип. 43. – С. 158–167.

5. Harris R. E., Stevenson I. H. *In vitro* propagation of Vitis // Vitis. – 1982. – Vol. 21. – P. 22–32.

6. Hye-Jeong Park, Ho-Rim Lee, Jaeho Pyee, and Hyeon-Cheol Cha. Regeneration of Grape (*Vitis labruscana* cv. Kyoho) by Shoot-Tip culture. // Journal of Plant Biology, - December, 2001. – 44(4) p. 185–192 .

7. Nadra Khan, Maqsood Ahmed, Ishfaq Hafiz, Nadeem Abbasi, Shaghef Ejaz and Muhammad Anjum. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. // Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France) J. Int. Sci. Vigne Vin, – 2015, – 49, – p. 37–45.

8. Monette P. L. Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium // Plant Cell Tissue Org. Cult. – 1983. – Vol. 2. – P. 327–332.

Reference

1. Doroshenko NP. Results of study of grape biotechnology. In: Proceedings of the jubileina nauchna sesia «100 hodyny instytu po lozarstvo i vynarstvo», Pleven. 2002: 88 – 95 (In Russian).

2. Zlenko VA, Troshyn LP, Kotikov IV. Multiplication of grape by the methods *in vitro*. Part 1. Cultivation of shoot apexes and proliferation of axillary grape buds *in vitro*. Vinograd i vino Rossii. 1998. (2):22–25 (In Russian).

3. Stytsko SA, Hlotova LV, Tesliuk NI. Induction of multiple shoots when grape cultivating *in vitro*. Visnyk ahrarnoi nauky. 2004; (4):25–27 (In Ukrainian).

4. Tesliuk NI, Kichmarenko OD. Optimization of induction process of multiple grape shoots in culture *in vitro*. Vynogradarstvo i vynorobstvo. 2006. (43):158–167 (In Ukrainian).

5. Harris RE, Stevenson IH. *In vitro* propagation of Vitis. Vitis. 1982. (21):22 – 32.

6. Hye-Jeong Park, Ho-Rim Lee, Jaeho Pyee, and Hyeon-Cheol Cha. Regeneration of Grape (*Vitis labruscana* cv. Kyoho) by Shoot-Tip culture. Journal of Plant Biology, December 2001, 44(4) : 185–192.

7. Nadra Khan, Maqsood Ahmed, Ishfaq Hafiz, Nadeem Abbasi, Shaghef Ejaz and Muhammad Anjum. Optimizing the concentrations of plant growth regulators for *in vitro* shoot cultures, callus induction and shoot regeneration from calluses of grapes. Vigne et Vin Publications Internationales (Bordeaux, France) J. Int. Sci. Vigne Vin, 2015, 49, 37–45.

8. Monette PL. Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. Plant Cell Tissue Org. Cult. 1983. (2):327–332.

Стаття надійшла до редакції 04.12.2017 р.



**АЛФАВІТНИЙ ПОКАЖЧИК СТАТЕЙ,
ОПУБЛІКОВАНИХ У ЖУРНАЛІ
«МІКРОБІОЛОГІЯ І БІОТЕХНОЛГІЯ»
У 2017 РОЦІ**

Автори	№ вип.	№ стор.
<i>Авдєєва Л.В. див. Балко О.І.</i>	2	51
<i>Андронов Є.Є. див. Іутинська Г.О.</i>	1	23
<i>Бабенко Д.О. див. Мерліч А.Г.</i>	1	36
<i>Балко О.Б. див. Балко О.І.</i>	2	51
<i>Балко О.Б. див. Максименко Л.О.</i>	3	75
<i>Балко О.І. див. Максименко Л.О.</i>	3	75
<i>Балко О.І., Ярошенко Л.В., Балко О.Б., Пасічник Л.А., Авдєєва Л.В.</i> Активність бактеріоцинів <i>Pseudomonas aeruginosa</i> щодо фітопатогенних штамів <i>Pseudomonas syringae</i>	2	51
<i>Баранова Г.В. див. Науменко К.С.</i>	4	21
<i>Басюл О.В. див. Крилова К.Д.</i>	1	85
<i>Баті В.В., Бойко Н.В.</i> Мікробіологічний аналіз квашеної капусти при ферментації за традиційною та модернізованою технологіями	2	94
<i>Беляєва Т.О. див. Горшкова О.Г.</i>	2	61
<i>Беляєва Т.О. див. Горшкова О.Г.</i>	3	66
<i>Блайда І.А., Васильєва Т.В.</i> Бактеріальна десульфуризація вугілля	3	6
<i>Блайда І.А., Васильєва Т.В., Семенов К.І.</i> Вплив ультразвуку на процеси біовилуговування металів і десульфуризації вугілля	4	6
<i>Бойко А.А., Жумінська Г.І., Кушкіна А.І., Іваниця В.О., Товкач Ф.І.</i> Характеристичні особливості КЕУ-подібних бактеріофагів <i>Erwinia amylovora</i>	4	85
<i>Бойко М.В., Патица М.В., Патица Т.І.</i> Оцінка продуктивності <i>Bacillus thuringiensis</i> на різних поживних середовищах	1	16
<i>Бойко Н.В. див. Баті В.В.</i>	2	94
<i>Васильєва Т.В. див. Блайда І.А.</i>	3	6
<i>Васильєва Т.В. див. Блайда І.А.</i>	4	6
<i>Василюк О.М. див. Гармашева І.Л.</i>	4	76
<i>Вінніков А.І. див. Дрегваль О.А.</i>	1	73
<i>Вознюк С.В. див. Іутинська Г.О.</i>	1	23



Волощук О.М., Короткий Ю.В., Смертенко О.А., Рибалко С.Л., Порва Ю.І., Широбоков В.П. Антивірусна дія похідних амінопропанолу-2 на експериментальні моделі вірусу гепатиту С	3	55
Волювач О.В. див. Горшкова О.Г.	2	61
Волювач О.В. див. Горшкова О.Г.	3	66
Волювач О.В. див. Конуп І.П.	3	84
Галкін Б.М. див. Галкін М.Б.	2	40
Галкін Б.М. див. Семенець А.С.	3	33
Галкін М.Б. див. Семенець А.С.	3	33
Галкін М.Б., Семенець А.С., Фіногенова М.О., Галкін Б.М., Філіпова Т.О. Утворення біоплівки та рухливість бактерій <i>Pseudomonas aeruginosa</i> з різними рівнями вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату	2	40
Гармашева І.Л., Коваленко Н.К., Василюк О.М., Олещенко Л.Т. Продукція ескополісахаридів штамами молочнокислих бактерій, ізольованих з ферментованих продуктів	4	76
Гвоздяк П.І., Сапура О.В. Денітрифікація питної води з використанням пробіотичних бактерій	2	81
Гладка Г.В. див. Зелена П.П.	1	94
Головань А.В. див. Науменко К.С.	4	21
Горшкова О.Г. Антагоністична і деструктивна активність морських бактерій	4	65
Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Конуп І.П. Окиснення вуглеводнів нафти і продукція БІО-ПАР ґрунтовими штамами <i>P. fluorescens</i> ONU541 і <i>V. megaterium</i> ONU542	2	61
Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Конуп І.П. Вилучення Cu (II) з водних розчинів іммобілізованими клітинами бактерій роду <i>Pseudomonas</i>	3	66
Григорюк І.П. див. Коломісць Ю.В.	3	24
Гудзенко Т.В. див. Горшкова О.Г.	2	61
Гудзенко Т.В. див. Горшкова О.Г.	3	66
Гудзенко Т.В. див. Конуп І.П.	3	84
Данкевич Л.А. див. Круть В.В.	1	48

<i>Дрегваль О.А., Єременко А.О., Черевач Н.В., Вінніков А.І.</i> Антагоністична активність ґрунтових стрептоміцетів по відношенню до фітопатогенних бактерій та грибів	1	73
<i>Єременко А.О.</i> див. <i>Дрегваль О.А.</i>	1	73
<i>Жумінська Г.І.</i> див. <i>Бойко А.А.</i>	4	85
<i>Жуцько І.Д.</i> див. <i>Мерліч А.Г.</i>	1	36
<i>Жуцько І.Д.</i> див. <i>Мерліч А.Г.</i>	3	45
<i>Загородня С.Д.</i> див. <i>Науменко К.С.</i>	4	21
<i>Зелена П.П., Гладка Г.В., Шепелевич В.В., Юмина Ю.М., Сенчило Н.В., Сківка Л.М.</i> Чутливість до ультрафіолетового випромінювання грам-негативних епіфітних бактерій з зони відчуження ЧАЕС	1	94
<i>Златогурська М.А., Товкач Ф.І.</i> Структура віріонних ДНК помірних ервініофагів 49 і 59	4	56
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Бойко А.А.</i>	4	85
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Мерліч А.Г.</i>	3	45
<i>Іваниця В.О.</i> див. <i>Штеніков М.В.</i>	2	6
<i>Іваниця В.О., Штеніков М.Д., Остапчук А.М.</i> Факультативно-анаеробні спороутворювальні бактерії глибоководних відкладень Чорного моря	4	94
<i>Іутинська Г.О., Титова Л.В., Пінаєв О.Г., Андронов Є.Є., Вознюк С.В.</i> Біорізноманітність мікробіому ризосфери сої за застосування фунгіцидів та інокуляції мікробним препаратом Ековітал	1	23
<i>Капрельянц Л.В., Круницька Л.О.</i> Пробіотичні властивості та біотехнологічний потенціал пропіоновокислих бактерій	1	6
<i>Кирик Д.Л., Філоненко Г.В., Коваленко Н.О., Талалаєв О.С., Скороход І.М.</i> Антибіотикорезистентність та біоплівкоутворювальні властивості штамів <i>Klebsiella pneumoniae</i> , що виділені у дітей з вродженими вадами серця	4	45
<i>Коваленко Н.К.</i> див. <i>Гармашева І.Л.</i>	4	76
<i>Коваленко Н.О.</i> див. <i>Кирик Д.Л.</i>	4	45
<i>Коломієць Ю.В., Ліханов А.Ф., Григорюк І.П.</i> Просторова гетерогенність і специфічність індукованих бактеріозів у калюсних тканинах <i>Lycopersicon esculentum mill. in vitro</i>	3	24
<i>Конуп І.П.</i> див. <i>Горшкова О.Г.</i>	2	61
<i>Конуп І.П.</i> див. <i>Горшкова О.Г.</i>	3	66



Конуп І.П., Гудзенко Т.В., Конуп Л.А., Волювач О.В. Детектування біосурфактантів на поверхні нанопористого кремнію	3	84
Конуп Л.А. див. Конуп І.П.	3	84
Корня Т.М. див. Сардарян К.Б.	2	72
Короткий Ю.В. див. Волощук О.М.	3	55
Кравченко Н.О. див. Похилько Ю.М.	2	104
Крилова К.Д., Сергеева Ж.Ю., Басюл О.В. Антимікробна активність до збудника м'якої гнилі комплексу молочнокислих бактерій і каротоворицинів за зберігання	1	85
Круницька Л.О. див. Капрельяну Л.В.	1	6
Крутило Д.В. RFLP-аналіз бульбочкових бактерій виду <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , поширених в агроценозах України	4	32
Круть В.В., Данкевич Л.А. Жирнокислотний склад ліпідів ентомопатогенних штамів бактерій роду <i>Bacillus</i>	1	48
Кушкіна А.І. див. Бойко А.А.	4	85
Ліманська Н.В. див. Мерліч А.Г.	1	36
Ліманська Н.В. див. Мерліч А.Г.	3	45
Ліханов А.Ф. див. Коломісць Ю.В.	3	24
Максименко Л.О., Балко О.І., Балко О.Б. Низькомолекулярні каротоворицини <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	3	75
Мерліч А.Г., Жунько І.Д., Ліманська Н.В., Іваниця В.О. Антагоністична активність продуктів метаболізму бактерій <i>Lactobacillus plantarum</i> та <i>Enterococcus italicus</i> за сумісної дії проти фітопатогенних бактерій	3	45
Мерліч А.Г., Ліманська Н.В., Жунько І.Д., Бабенко Д.О. Вплив <i>Lactobacillus plantarum</i> та <i>Bacillus atrophaeus</i> на проростання насіння та ріст проростків пшениці	1	36
Науменко К.С., Головань А.В., Баранова Г.В., Шермолочевич Ю.Г., Пікун Н.В., Загородня С.Д. Аналіз нових поліфторгїоацильованих похідних амінокислот методами <i>in silico</i> та <i>in vitro</i>	4	21
Олещенко Л.Т. див. Гармашева І.Л.	4	76
Остапчук А.М. див. Іваниця В.О.	4	94
Остапчук А.М. див. Ямборко Г.В.	1	56
Пасічник Л.А. див. Балко О.І.	2	51

<i>Пастиря А.С., Собко І.О., Шайхет Є.О., Поліщук В.П.</i> Серологічний моніторинг поширення вірусу інфекційної бурсальної хвороби в господарствах України в період з 2014 по 2016 роки	2	33
<i>Патика М.В. див. Бойко М.В.</i>	1	16
<i>Патика Т.І. див. Бойко М.В.</i>	1	16
<i>Пилипенко Л.М. див. Ямборко Г.В.</i>	1	56
<i>Пилипенко І.В. див. Ямборко Г.В.</i>	1	56
<i>Пікун Н.В. див. Науменко К.С.</i>	4	21
<i>Пінаєв О.Г. див. Іутинська Г.О.</i>	1	23
<i>Поліщук В.П. див. Пастиря А.С.</i>	2	33
<i>Порва Ю.І. див. Волощук О.М.</i>	3	55
<i>Похилько Ю.М., Кравченко Н.О.</i> Стійкість бактерій роду <i>Lactobacillus</i> до метаболітів травної системи	2	104
<i>Рибалко С.Л. див. Волощук О.М.</i>	3	55
<i>Сапура О.В. див. Гвоздяк П.І.</i>	2	81
<i>Сардарян К.Б., Корня Т.М.</i> Ефективність використання екстрактів водоростей в мікроклональному розмноженні деяких видів рослин	2	72
<i>Семенець А.С. див. Галкін М.Б.</i>	2	40
<i>Семенець А.С., Галкін М.Б., Галкін Б.М., Філіпова Т.О.</i> Вплив антибіотиків на біоплівки штамів <i>Pseudomonas aeruginosa</i> з різним рівнем вмісту циклічного дигуанозинмонофосфату	3	33
<i>Семенов К.І. див. Блайда І.А.</i>	4	6
<i>Сенчило Н.В. див. Зелена П.П.</i>	1	94
<i>Сергєєва Ж.Ю. див. Крилова К.Д.</i>	1	85
<i>Сергєєва Ж.Ю. див. Ямборко Г.В.</i>	1	56
<i>Сківка Л.М. див. Зелена П.П.</i>	1	94
<i>Скороход І.М. див. Кирик Д.Л.</i>	4	45
<i>Смертенко О.А. див. Волощук О.М.</i>	3	55
<i>Собко І.О. див. Пастиря А.С.</i>	2	33
<i>Талалаєв О.С. див. Кирик Д.Л.</i>	4	45
<i>Титова Л.В. див. Іутинська Г.О.</i>	1	23
<i>Товкач Ф.І. див. Бойко А.А.</i>	4	85
<i>Товкач Ф.І. див. Златогурська М.А.</i>	4	56
<i>Філіпова Т.О. див. Галкін М.Б.</i>	2	40
<i>Філіпова Т.О. див. Семенець А.С.</i>	3	33



<i>Філоненко Г.В.</i> див. <i>Кирик Д.Л.</i>	4	45
<i>Фіногенова М.О.</i> див. <i>Галкін М.Б.</i>	2	40
<i>Черевач Н.В.</i> див. <i>Дрегваль О.А.</i>	1	73
<i>Шайхет Є.О.</i> див. <i>Пастиря А.С.</i>	2	33
<i>Шепелевич В.В.</i> див. <i>Зелена П.П.</i>	1	94
<i>Шермолович Ю.Г.</i> див. <i>Науменко К.С.</i>	4	21
<i>Широбоков В.П.</i> див. <i>Волощук О.М.</i>	3	55
<i>Штеніков М.В., Іваниця В.О.</i> Бактеріоцини факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій	2	6
<i>Штеніков М.Д.</i> див. <i>Іваниця В.О.</i>	4	94
<i>Юмина Ю.М.</i> див. <i>Зелена П.П.</i>	1	94
<i>Ямборко Г.В., Остапчук А.М., Сергєєва Ж.Ю., Пилипенко Л.М., Пилипенко І.В.</i> Хемотаксономічні особливості та плазмідні профілі аеробних та факультативно-анаеробних спороутворювальних бактерій з овочевої продукції	1	56
<i>Ярошенко Л.В.</i> див. <i>Балко О.І.</i>	2	51

ІНФОРМАЦІЙНЕ ПОВІДОМЛЕННЯ ДЛЯ АВТОРІВ

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

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

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

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

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

До статті додається рекомендація установ, організацій, у яких виконувалася робота, за підписом керівника та письмова згода керівників установ, організацій, де працюють автори.

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. №7-5/1, 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 мети 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 рукописи (2 примірники) обсягом до 18 сторінок (з урахуванням рисунків, таблиць і підписів до них, анотації, реферату, списку літератури), огляди – до 30 стор., рецензії – до 3 стор., короткі повідомлення – до 2 стор. Відхилені рукописи не повертаються.

До рукопису додається електронний варіант рукопису 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;
- Реферат мовою оригіналу статті:
 - назва статті великими літерами;
 - прізвища та ініціали автора (авторів);



- 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);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти).

- Реферат англійською мовою:

- назва статті великими літерами;
- прізвища та ініціали автора (авторів), транслітерація;
- 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);
- реферат із зазначенням новизни дослідження (200–250 слів);
- ключові слова (не більше п'яти);

- Повний текст статті мовою оригіналу.

Текст статті має включати такі складові:

вступ; матеріали і методи; результати та їх обговорення; висновки; список використаної літератури мовою оригіналу цитованої статті, список використаної літератури (Referens) англійською мовою (за вимоги міжнародних наукометричних баз).

До кожного примірника статті додається реферат мовою оригіналу статті (українською/російською) та англійською мовою.

Враховуючи, що реферат відображає основний зміст статті і використовується в інформаційних, в тому числі автоматизованих системах для пошуку документів та інформації, необхідно дотримуватися певних вимог при його написанні:

- реферат має бути інформативним (не містити зайвих слів);
- структурованим, тобто містити розділи: мета; методи, що використані в роботі та/або методологія проведення досліджень; результати та сфера їх застосування; висновки;
- англійська версія реферату має бути написана якісною англійською мовою (за потреби доцільно користуватися послугами кваліфікованих спеціалістів-лінгвістів з подальшим науковим редагуванням тексту автором), з використанням термінології, яка використовується в англійськомовних медикобіологічних журналах, уникати використання термінів, які є прямою українською/російською калькою;
- компактним (200–250 слів);
- ключові слова (не більше 5-ти) розміщуються з абзацу після реферату.

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 з фаховими термінологічними словниками).

Латинські біологічні назви видів, родів подаються курсивом латиницею.

Якщо часто повторювані у тексті словосполучення автор вважає за потрібне скоротити, то абревіатури 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.

Розділ “Матеріали і методи”:

- Методи дослідження та схеми експерименту мають бути представлені так, щоб їх можна було відтворити.
- Для використаних реактивів та матеріалів вказати назву компанії та країни-виробника.
- Одиниці вимірювання вказати в системі СІ.
- Концентрацію розчинів представляти в М, мМ, мкМ (молярна концентрація).
- Молекулярку масу (Мм) - Да (дальтони) або кДа.
- При використанні ферментів навести їх номенклатурну систематичну назву та шифр.
- Активність ферментів виражають в мкмолях використаного субстрату або утвореного продукту за 1 хв на 1 мг протеїну або використати стандартну одиницю активності U (IU) і катал (скорочено кат), питома активність ензиму виражається в ммоль/хв на 1 мг протеїну або в од.акт/мг, кат/кг.
- Вказати умови проведення ферментативної реакції (температура, рН, концентрація субстрату).
- Вказати використані методи статистичного аналізу, програму статистики.

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 Word, TIF, JPG). Осі координат на графіках мають бути позначені. Рисунки розміщуються у тексті статті.

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

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



Список використаної літератури

1. Список використаної літератури в оригіналі цитованої статті складається за алфавітно-хронологічним порядком (спочатку кирилиця, потім латиниця). 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.

2. Список використаної літератури англійською мовою (Referens), за вимогами міжнародних наукометричних баз.

Стиль шрифту – NLM (National Library of Medicine).

Прізвища, імена та по-батькові авторів, назву цитованого видання (журнал, монографія, збірник тощо) наводять послуговуючись безкоштовними сайтами (<http://www.easybib.com/>, <http://www.bibme.org/>, <http://www.sourceaid.com/>, <https://www.citethisforme.com/>), що дозволяють здійснити переклад з використанням однієї з міжнародних систем транслітерації.

Назви статей наводять англійською мовою.

Порядок подання посилань Referens (список 2) має повністю співпадати зі списком використаної літератури (список 1).

Зразки посилання літератури

Вимоги до оформлення бібліографічних посилань мовою оригіналу (в тому числі цитовані англомовні джерела)

На книги

Векірчик К. М. Мікробіологія з основами вірусології. – К.: Либідь, 2001. – 312 с.

Патика В.П., Тихонович І.А. Мікроорганізми і альтернативне землеробство. – К.: Урожай, 1993. – 176 с.

Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

Методы общей бактериологии: В 3 т. / Под ред. Ф. Герхардта. – М.: Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.; Т. 2. – 470 с.; – Т. 3. – 263 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 566 с.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – 9th ed. – Baltimore; London, 1986. – Vol. 2. – 1599 p.

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

На журнальні статті

Подгорский В.С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // *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., Подорван Н.І. Біотехнологія очищення забрудненої природної води // Вісник ОНУ. – 2001. – т. 6, в. 4. – С. 65 – 67.

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

На тези доповідей

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

На депоновані наукові роботи

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

На стандарти

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

На автореферати дисертацій

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

Зразки посилань літератури в романській абетці

References

Стиль шрифту для англomовного варіанту списку джерел – NLM (National Library of Medicine), зразок:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53.

Статті в журналах:

DeLong EF, Karl DM. Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 2015;(437):336–342.

Klochkov VK, Kavok NS, Malyukin YuV. The effect of specific interaction of nanocrystals GdYVO₄:Eu³⁺ with cell nuclei. Dop Nats Akad Nauk Ukr. 2010;(10):81–86.

Книги:

Best RJ. Tomato spotted wilt virus. In: Advances Virus Res Eds Smith KM, Lauffer MA. Academic Press, New York, 1968:65–146.

Speissel B, Beahrs OH, Hermanek P, Hutter RVP, Scheibe O. TNM atlas: illustrated guide to the TNM. pTNM classification of malignant tumours. Berlin New York: Springer-Verlag. 1989. 12.

Sastry SK. Seed-borne plant virus diseases. India: Springer, 2013. 327 p.

Матеріали з'їздів, конференцій:

Dikova B, Djourmanski A, Lambev H. Establishment of economically important viruses on *Echinacea purpurea* and their influence on the yield. In: Proceedings of the conference «Innovative aspects to coneflower study». Ed. Pospelov S. Poltava: Dyvosvit, 2013:36–45.



Yin R, Francis F, Bragard C, Liu Y, Chen J. Study on transmission efficiency of CMV transmitted by Myzus persicae from different places. In: Proceedings of 9th International Symposium on Aphids, Beijing, China. 2013:49–50.

Диссертационные работы:

Koreneva AA. Biological properties of medicinal plants viruses. PhD thesis, Taras Shevchenko National University of Kyiv, 2009: 22.

Сборники:

Dunich A, Mishchenko L. Heavy metals content in virus infected purple coneflower plants. Bull T Shevchenko Nat Univ Kyiv Ser Biol. 2013; 65(3):22–26.

Rose PI. Gelatin. In: Encyclopedia of polymer science and engineering Eds: Mark HF, Bikales NM, Overberger CG, Menges G, Kroschwitz JI New York: Wiley; 1987;7, 2nd ed. 488–513.

Shrago MI, Guchok MM, Kalugin YuV. Some principles of direct synthesis of cryoprotectants. In: Current Problems of Cryobiology. Eds. Pushkar NS and Belous AM. Kiev: Naukova Dumka, 1981:157–201.

Патенти, заявки:

A.s. 4411066/14 SSSR, MBI G 01 N 33/50. A method of determining bile acids in biological fluids. Veselskiy SP, Lyashchenko PS, Лукьяненко IA. (SSSR). – N 1624322; zayavl. 25.01.1988; opubl. 30.01.1991, Byul. N 4.

Статті з електронних журналів:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53, available at: www.ascusc.org/jcmc/vol5/issue2/

За наявності в статті DOI (Digital Object Identifier), яка є міжнародним ISO стандартом (<http://www.doi.org/>), в списку літератури бажано вказати її ідентифікатор, наприклад:

Author AA, Author BB, Author CC. Title of article. Title of Journal. 2005; 10 (2):49-53. Cited 2 times. doi: 10.1134/S1023193508080077

Датою надходження статті вважають день, коли до редколегії надійшов перший варіант тексту статті.

Після одержання коректури статті автор повинен виправити лише помилки і терміново відіслати статтю на адресу редколегії або повідомити про свої правки по телефону чи електронною поштою.

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

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



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

Верстка С. О. Остапенко
Підписано до друку 22.03.2018 р. Формат 70x100/16.
Ум.-друк. арк. 7,07. Тираж 100 пр.
Зам. № 1727

Видавець та виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011.
65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: +38 (048) 723 28 39